

잣빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*)의 Procymidone 약제 저항성 요인 구명

조정례 · 이규승

Investigation of resistance mechanism for *Botrytis cinerea* to procymidone

Jeong Rye Cho , Kyu Seung Lee

Abstract

This study was carried out to investigate the resistance mechanism by three different kinds of procymidone-resistant and susceptible isolates of *Botrytis cinerea* which had been collected from green houses.

The average resistance level of the resistant strains was 1,000 times higher than that of susceptible ones. Also, it was revealed that the resistance was not originated from components excreted by *Botrytis cinerea*, based on the result obtained from the treatment with piperonyl butoxide and triphenyl phosphate as an inhibitor of monooxygenase and esterase, respectively.

The total lipod content of resistant strains was 1.3 times higher than that of susceptible ones, among fatty acids, palmitic acid, stearic acid, and linoleic and being 3.0, 2.5, and 2.0 times higher, respectively. Also slight differences in sterol contents and components were observed.

The crude chitin content was slightly higher in susceptible strains but contents of N-acetyl glucosamine, a hydrolysate of chitin, were about 2 times higher in resistant ones.

서 론

농업용 살균제에 대하여 저항성을 지닌 식물병원균이 문제되기 시작한 것은 비교적 최근의 일로서, 1970년대 이후 저독성이며 선택성이 높은 살균제가 실용화 되면서 부터이다¹⁾.

Dicarboximide계에 속하는 procymidone은 1969년에

소개된 침투성 살균제로서 잣빛곰팡이병 방제에 특효가 있는 것으로 알려졌으나²⁾ 1977년 처음으로 저항성균 출현이 보고된³⁾ 이래 많은 저항성균 출현이 보고되고 있으며^{4,5,6,7,8,9,10)} 국내에서도 최근 procymidone약제 저항성 잣빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*)의 출현으로 약효 저하현상이 발생된 사례가 보고된 바 있어¹¹⁾ 병해방제상 커다란 문제점으로 대두되고 있다.

충남대학교 농과대학(College of Agriculture Chungnam National University, Taejon, Republic of Korea)

“본 연구는 한국과학재단의 연구비 지원(KOSEF 931-0600-030-1)에 의하여 수행되었음.”

곰팡이의 살균제에 대한 저항성은 약제의 침투성 감소, 무독화 증가, 독성화합물로의 전환량 감소, 작용부위에서의 친화성 감소, 작용부위 우회 등 기타 여러 가지 다양한 기작에 의하여 발현될 수 있으며, 일반적으로 약제의 작용기작과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다.

Procymidone 약제의 작용기작은 세포막에서의 물질이동¹²⁾, 세포벽의 구성성분이 되는 chitin 생합성 및 triglyceride 생합성 저해¹⁴⁾, 핵의 기능 저해¹⁴⁾, 세포벽 생합성 저해²⁾ 등 여러가지로 보고된 바 있으나, 아직 이의 약제작용기작 및 잣빛곰팡이병균에 대한 저항성 발현기작이 확실히 밝혀져 있지 않은 상태이다. 따라서 일반적인 저항성 발현기작과 procymidone 약제의 작용기작을 근거로 저항성이 발현된 잣빛곰팡이병균 (*Botrytis cinerea*)과 감수성균을 선발하여 저항성 발현 정도와 유래, 그리고 몇가지 세포 구성물질 함량 및 조성을 조사하여 저항성 발현 기작을 구명하고 이의 저감방안을 모색하기 위한 기초자료로 삼고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1-1. 공시균주

전국 시설 원예 주요산지에서 채집하여 단포자 분리한 균주로서 충남대학교 농생물학과에서 보관하고 있는 *Botrytis cinerea* 균주 중 저항성과 감수성 균주 각각 3 균주 씩을 선발하였으며, 이들의 기주식물 및 채집날짜는 Table 1과 같다.

1-2. 공시약제

잣빛곰팡이병 방제 약제로 시판되고 있는 dicarboxy-mide계 살균제인 procymidone (50 WP)을 공시하였다.

1-3. 공시배지

잣빛곰팡이병균의 균사생육 검정은 PDA배지 (감자 200 g, 포도당 20g, 한천 20g, 증류수 1000ml), 균배양은 PDB배지(Difco 배지 24g, 증류수 1000ml) 를 이용하였다.¹¹⁾

1-4. 시약 및 기기

시약으로는 N-acetyl glucosamine(GlcNAc), chitinase, piperonyl butoxide(PBO), triphenyl phosphate (TPP), sodium azide, p-dimethyl aminobenzaldehyde 과 pyrogallol 등은 Sigma 제품을, methanol, ethanol 과 diethyl ether 등은 Burdick & Jackson 제품을, 그리고 hydrochloric acid, acetic acid 등은 G.R.급을 사용하였다.

분석기기는 GC (Model : Varian 3700 equipped with HP 3396A integrator), GC/MS(Model : Trio-1000(Fisons, Manchester, U.K.) 그리고 Uv/vis spectrophotometer (Pye Unicam 社 : PU 8800)를 이용하였다.

2. 방법

2-1. 약제저항성 검정

약제저항성 검정은 균사생육저지법¹¹⁾에 준하여 실시하였다. 즉 PDA 배지를 분주한 직경 9cm의 petri dish 중앙에 공시균주를 이식하고 22℃에서 3일간 배양한 후 균총의 선단부를 내경 5mm의 cork borer로 떼어내어 procymidone이 농도별로 함유된 PDA 배지에 이식하고 22℃에서 5일간 배양한 후 균총의 직경을 측정하였다.

Table 1. Origin of isolates of *Botrytis cinerea* used in this study

Fungal isolates	Host	Location	Date
Resistant			
BT-300	Tomato	Chungnam, Buyeo-Gun	May 12, 1990
FC-122	Cucumber	Kyeongnam, Kimhae-si	May 2, 1990
NS-102	Strawberry	Chungnam, Nonsan-Gun	May 2, 1990
Sensitive			
DS-522	Strawberry	Jeonnam, Damyang-Gun	May 20, 1990
GC-100	Cucumber	Jeonnam, Gure-Gun	May 5, 1990
NS-111	Strawberry	Chungnam, Nonsan-Gun	May 20, 1990

또한 piperonyl butoxide (PBO)와 triphenyl phosphate (TPP)에 대한 균사생육조사도 동일한 방법으로 실시하였다.

2-2. 균배양

PDA배지에 공시균주를 접종하고 22°C에서 3일간 배양한 후 내경 5mm cork borer로 菌叢 5개씩을 떼어내어 PDB배지에 접종하고 22°C 에서 5일간 배양하였다¹¹⁾. 균총을 채취하여 배지성분을 깨끗이 제거한 후 함량이 될 때까지 동결건조하여 밀폐용기에 담아 데시케이터에 보관하면서 균체의 성분분석 시료로 사용하였다.

2-3. 스테롤 함량 및 조성

① 추출방법¹⁵⁾

동결건조한 균체 1g 을 취하여 폴리프로필렌 원심분리관에 넣고 60% EtOH, 20% KOH와 0.1% pyrogallol 혼합액 100ml를 가하고 70°C 로 유지시키면서 하룻밤 동안 검화시킨 후 식히고, 이를 분액여두로 옮겨 1% NaCl 50ml와 diethyl ether 30ml를 가하여 1차 추출한 후 용매층을 분리해 놓고 다시 diethyl ether 20ml 로 추출한 다음 용매층을 합하여 질소가스로서 날려 보낸 후 정용하여 GLC 및 GC/MS 분석시료로 사용하였다.

② 분석조건

Table 2. Optimum condition of gas chromatograph for sterol analysis

Model : Varian 3700 equipped with HP 3396A integrator
 Column : SPB-1 fused silica capillary, 0.25mm(i.d.)×30m(L)
 Temperature : 200°C(3min) $\xrightarrow{4^\circ\text{C}/\text{min}}$ 280°C(5min)
 Carrier gas : N₂, 1.0kg/cm²(split ratio를 30 : 1)
 Detector : F. I. D.

Table 3. Optimum condition of GC/MS for sterol analysis

Model : Trio-1000(Fisons, Manchester, U.K.)
 Column : SPB-5 fused silica capillary, 0.25mm×0.25mm×30m(L)
 Temperature : 150°C(2min) $\xrightarrow{20^\circ\text{C}/\text{min}}$ 300°C(5min)
 Injection temp. : 280°C
 X-line temp. : 280°C
 EI mode(70eV)
 Analyzer : quadrupole

2-4. 지방산 분석

① 추출방법

컷팅밀로 분쇄(40mesh)시킨 분말시료 0.5g을 원통여지(Whatman)에 넣고 diethyl ether 100ml를 가하여 Soxhlet 추출법으로 16시간 연속 추출한 다음 추출물을 감압 농축하여 완전히 건조시킨 후 데시케이터에서 1시간 방치한 후 중량법으로 총지방량을 측정하였다. 총지방성분을 Metcalf 등의 방법¹⁶⁾으로 가수분해시키고 BF₃-methanol을 사용하여 methyl ester화시킨 후 G.L.C. 분석을 실시하였다.

② 분석조건

Table 4. Optimum condition of gas chromatograph for fatty acid analysis

Column : SP-2340 fused silica capillary, 0.5mm(i. d.)×30m(L)
 Temperature : 200°C, isothermal(20 min)
 Carrier gas : N₂, 1.0kg/cm²(split ratio30 : 1)
 Detector : F.I.D.

2-5. 키틴의 조성^{17,18)}

잘게 부순 건조 균체 3g에 1N HCl 100ml를 가하여 완전히 잠기도록 하고, 실온에서 48시간 동안 방치한 후 증류수로 중성이 되도록 여러번 세척하여 여과하였다. 다시 5% NaOH 100ml 를 가하여 6시간 간격으로 용액을 교체하며 36시간 동안 격렬히 진탕하여 끓인 후 증류수로 씻어 여과한 다음 90% EtOH 100ml로 6시간 동안 환류시키고 풍건 후 중량을 조키틴 량으로 하였다.

2-6. 키틴 가수분해산물 측정¹⁸⁾

Eppendorf tube에 1M sodium acetate buffer (pH 4) 와 10mM sodium acetate buffer (pH 5.0)에 chitinase를 현탁시키고 (chitinase 0.5 units) pH 4.4로 맞춘 다음 1ml를 취해, 37°C shaking water bath에 옮기고 조키틴 50mg이 들어 있는 3mM-NaN₃ 용액 1ml를 가하였다. 24시간 진탕 배양 후 원심분리 (1000g, 3 분) 하여 상징액 0.3ml를 취하고 1M phosphate buffer 30l 와 1M borate buffer (pH 8.9) 70μl를 가하고 10분간 방치하였다가 3분간 끓이고 식힌다. 여기에 DMAB 시약

(p-dimethyl aminobenzaldehyde 8g을 acetic acid 70 ml에 용해시킨 저장 용액)을 사용 직전에 acetic acid로 10배 희석시켜 3ml를 가하고 37°C 에서 15분간 반응시킨 후 즉시 Uv/vis spectrophotometer 585nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 생성된 N-acetyl glucosamine (GlcNAc) 의 양은 GlcNAc를 표준물질로 하여 상기의 방법과 동일하게 실시한 후 검량선을 작성하여 정량하였다.

결과 및 고찰

1. 약제저항성 검정

공시균주의 procymidone약제에 대한 균사생육 조사 결과는 Table 5와 같다. 균사생육억제최저농도(MIC)가 저항성균 6,400g/ml 이상, 감수성균은 1.06-6.25g/ml 라고 한 유 등의 결과¹¹⁾와 거의 일치하는 경향으로, 저항성과 감수성 각각 3균주간의 균사생육 특성이 유사하고 저항성 발현정도가 약 1,000배 이상의 큰 차이를 보여 공시균주로서 적합하게 선발된 것으로 판단되었다.

2. PBO와 TPP에 대한 균사생육조사

잿빛곰팡이병균의 procymidone 약제저항성 발현 요인이 균체의 내·외부 중 어디에서 연유되었는지를 알아보고자 monoxygenase 저해제인 PBO와 esterase저해제인 TPP를 PDA 배지에 처리하고 균사생육 반응을 조사한 결과는 Table 6 과 같다. 100ppm 농도에서 PBO 보다는 TPP에서 균사생육이 다소 더 저해되었으나, 전반적으로 저항성과 감수성균주 사이에 차이가 없는 것으로 미루어 볼 때 잿빛곰팡이병균의 procymidone에 대한 저항성 발현은 균의 외부로 효소를 분비하여 약제를 분해시킬 수 있는 능력의 발달에서 기인된 것은 아니라고 판단되었다.

3. Procymidone, PBO 그리고 TPP 혼합 처리 효과

Procymidone 약제저항성 균주에 procymidone 상용 농도인 500µg/ml 그리고 PBO와 TPP는 균사생육에 거의 영향을 주지 않는 농도 10µg/ml를 혼합 처리하고 균사생육을 조사한 결과는 Table 7과 같다. Procymidone 단독 처리구와 비교해 볼 때 혼합 처리구에서 다소의 균사생육 저해효과를 나타내었으나, 뚜렷한 pro-

Table 5. Mycelial growth of resistant and sensitive isolates of *Botrytis cinerea* on PDA media containing procymidone

	Fungal isolates		Mycelial growth(mm) ^{a)}				
			Procymidone(µg/ml)				
			1	4	400	1600	control
Resistant	BT-300	Aver.	88.6	62.3	34.1	32.0	90.0
		Range	(87.3-89.0)	(58.5-65.0)	(32.4-36.5)	(30.3-34.0)	90.0
	FC-122	Aver.	88.4	60.7	40.0	31.5	90.0
		Range	(86.4-88.8)	(58.0-62.0)	(38.9-43.7)	(29.0-33.4)	90.0
	NS-102	Aver.	89.3	65.1	38.3	30.3	89.0
		Range	(88.2-90.0)	(63.3-67.1)	(35.3-41.5)	(26.4-34.2)	90.0
Sensitive	DS-522	Aver.	12.1	10.7	0	0	90.0
		Range	(0.7-14.0)	(0.8-12.0)	0	0	90.0
	GC-100	Aver.	20.3	14.3	0	0	90.0
		Range	(18.4-23.5)	(10.9-17.0)	0	0	90.0
	NS-111	Aver.	18.3	11.1	0	0	90.0
		Range	(15.5-23.1)	(0.8-13.8)	0	0	90.0

a) Diameter of mycelia(4 replicates) after incubation at 22°C for 5 days on PDA media containing procymidone

cymidone 약효 상승 효과는 확인되지 않았다.

4. 스테롤 함량 및 조성

저항성(BT-300, NS-102)과 감수성균주(DS-522, GC-100)의 지방불검화물의 GC/MS분석을 실시한 결과 저항성과 감수성균주는 거의 유사한 chromatogram을 보였고, 스테로이드계 화합물 만이 아니라 고급지방산류도 함유되어 있는 것으로 나타났다. 네균주 모두에서 확인된 스테로이드계 화합물은 RT 10.93의 분자량 428 화합물로서 Fig.1.과 같은 구조가 예상되었다.

Sterol은 특정 곰팡이속을 제외하고 거의 모든 곰팡이에 존재하며 주된 sterol은 ergosterol로서 곰팡이 세포나 균사막의 중요 구성성분 중 하나로 알려져 있다. 한편 ergosterol 생합성 저해 살균제에 대하여 저항성인 *Ustilago maydis*는 sterol C-14 demethylation이 저해되어, ergosterol 함량은 줄어든 반면 C-14 methyl sterol함량이 증가하여 축적되므로써 chitin이 불규칙적으로 축적되고 chitin 생합성 효소활성에도 영향을 미친다고 하였다¹⁹⁾. 아울러 benzimidazole 과 azole 계에 속하는 살균제에서 저항성이 발현된 *Cerecospora beticola* 균은

sterol side chain의 불포화와 같은 sterol조성의 변화로 demethylation inhibitor(DMI)에 대하여 저항성이 유도되는 것으로 보고된 바 있다¹⁵⁾. 그러나 본 실험에서는 저항성과 감수성균주간에 sterol조성의 차이는 거의 없는 것으로 볼 때 잣빛곰팡이병균의 procymidone 약제에 대한 저항성 발현 기작은 DMI제와 같이 sterol 생합성과는 관련되지 않았을 것으로 판단되었다.

5. 총지방 함량

Table 8은 총지방함량을 조사한 것으로 저항성균주가 1.11-1.67%로 감수성의 0.93-1.11%에 비하여 30% 정도 높았다. 특히 저항성균주인 NS-102의 경우 1.67%로 다른 균주에 비하여 현저히 높은 함량을 보였는데, 이 균주는 지방산 함량도 모두 월등히 높았다. 이 실험결과는 잣빛곰팡이병균의 총지방함량에 있어서 *Neurospora crassa* 8.3%, *Ustilago zeae* 7-27.0%, *Sclerotium rolfsii* 2.8% 그리고 *Fusarium solai f. phaseolii* 2.0%로 알려져 있는 결과²⁰⁾와 비교해 볼 때 낮은 편이었다.

Table 6. Effect of PBO and TPP on mycelial growth of procymidone-resistant and sensitive isolates of *Botrytis cinerea* on PDA media

Fungal isolates	Mycelial growth(mm) ^{a)}						
		PBO(ppm)		TPP(ppm)		Contro	
		1	100	1	100		
Resistant	BT-300	Aver.	88.1	34.7	87.7	23.0	90.0
		Range	(86.2-90.0)	(31.5-36.3)	(85.0-89.3)	(20.7-25.1)	90.0
	FC-122	Aver.	86.2	27.9	88.1	20.0	90.0
		Range	(84.0-88.7)	(23.4-29.8)	(84.9-89.8)	(17.3-22.6)	90.0
	NS-102	Aver.	89.7	30.6	89.0	25.0	90.0
		Range	(88.2-90.0)	(28.4-32.5)	(86.4-90.0)	(24.3-30.0)	90.0
Sensitive	DS-522	Aver.	89.3	30.0	84.5	17.5	90.0
		Range	(87.3-90.0)	(25.3-32.1)	(82.0-85.2)	(15.4-19.3)	90.0
	GC-100	Aver.	88.0	29.0	89.0	20.0	90.0
		Range	(86.0-89.4)	(27.4-32.1)	(88.2-90.0)	(16.4-22.4)	90.0
	NS-111	Aver.	86.4	30.5	88.7	20.0	90.0
		Range	(84.4-88.2)	(28.8-31.7)	(86.4-89.0)	(13.7-24.3)	90.0

a) Diameter of mycelia(4 replicates) after incubation at 22°C for 5 days on PDA media containing PBO and TPP

Table 7. Effect of the mixture treatment of procymidone-resistant isolates of *Botrytis cinerea* on PDA media

Fungal isolates		Mycelial growth(mm) ^{a)}		
		P 500 ^{b)}	P500+P010+TPP10 ^{c)}	Control
BT-300	Aver.	30.0	23.0	80.0
	Range	(27.2-32.0)	(18.2-28.0)	(79.0-81.0)
PC-122	Anver.	23.5	22.2	84.0
	Range	(20.0-25.8)	(18.4-26.0)	(83.0-86.0)
NS-102	Aver.	26.2	21.0	80.0
	Range	(24.8-28.0)	(16.0-25.0)	(78.0-82.0)

a) Diameter of mycelia(4 replicates) after incubation at 22°C for 5 days on PDA media

b) Procymidone 500ppm.

c) Procymidone 500ppm+PBO 10ppm+TPP 10ppm.

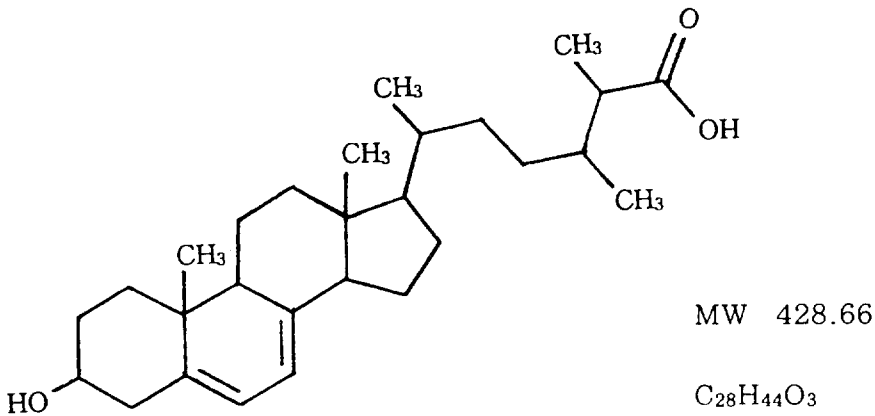


Fig.1. Identified structure of sterol extracted from procymidone-resistant and sensitive isolates of *Botrytis cinerea* by GC/MS.

6. 지방산함량 및 조성

GLC분석하여 얻은 크로마토그램상의 peak 면적을 100으로 나눈 결과(peak area/100 ; units)를 Fig.2에 도시하였다.

Palmitic acid (16 : 0)의 경우 저항성 균주인 NS-102가 32.5 units로 가장 많았고, 저항성 균주 모두 감수성 균주에 비하여 높은 함량을 보였다. 또한 stearic acid (18 : 0)도 저항성 균주인 BT-300이 5.2 units로 감수성 균주인 GC-100의 2 units 보다 약 2.5배 이상 높은 함량을 보였다. Oleic acid (18 : 1)는 저항성 균주인 BT-300이 14.8 units 그리고 NS-102가 12.9 units로, 감수성 균주인 DS-522의 4.5 units 그리고 GC-100이 4.9 units 로 저항성

균주가 약 2.9배 많았다. Linoleic acid(18 : 2)는 지방산 중에서 가장 많은 함량을 보였고, 저항성 균주 모두 감수성 균주 보다 약 2배 많았으며, 특히 저항성 균주인 NS-102는 61.9 Units 로서 월등하게 높았다. 이것은 감수성 균주인 NS-111의 7.7 units 와 비교해 볼 때 약 8배 이상 많은 양이다. 이상의 4가지 밝혀진 지방산 이외에도 저항성 균주 BT-300은 2.63분에서 다른 균주에서 나타나지 않은 peak가 나타났고, NS-102도 4.93 분에서 peak가 나타났다.

일반적으로 곰팡이세포에는 palmitic acid (16 : 0), stearic acid (18 : 0), oleic acid (18 : 1)과 linoleic acid (18 : 2) 등이 주로 존재하는 지방산으로 알려져 있는데

Table 8. Lipid content of procymidone-resistant and sensitive isolates of *Botrytis cinerea*

classification	Fungal isolates		Lipid content(%)
Resistant	BT-300	Aver. ^{a)}	1.24
		Range	(1.03-1.88)
	FC-122	Aver.	1.11
		Range	(0.68-1.72)
	NS-102	Aver.	1.67
		Range	(1.22-2.00)
Sensitive	DS-522	Aver.	1.11
		Range	(0.64-1.30)
	GC-100	Aver.	0.93
		Range	(0.60-1.20)
	NS-111	Aver.	0.98
		Range	(0.66-1.24)

a) : Average of 4 replicates

, 잿빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*)의 경우 일반적으로 알려져 있는 총 지방산 중 각 지방산의 조성비는 palmitic acid가 19.0%, stearic acid가 3.8%, oleic acid가 11.0%, 그리고 linoleic acid가 16.4% 라고 알려져 있다.²¹⁾ 그러나 본 실험 결과는 linoleic acid가 가장 높은 조성비를 보였고, palmitic acid, oleic acid 그리고 stearic acid 순으로 높게 나타나 이전의 결과들과 다른 양상을 보였다.

한편 포화지방산의 함량이 저항성 균주 공히 감수성에 비하여 높은 함량을 나타냈는데, 보고된 바¹⁷⁾에 따르면 포화지방산 함량이 증가되면 균체내로 이행되는 약량의 감소를 초래하여 저항성을 유발시키는 요인이 되고, 지방산 조성의 변화도 약제의 균체내로의 침투이행량에 중요한 인자가 되는 것으로 알려져 있다. 따라서 지방산 함량의 증가 및 조성의 변화가 잿빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*)의 procymidone 약제 저항성 발현 요인이 되었을 것으로 생각되었다.

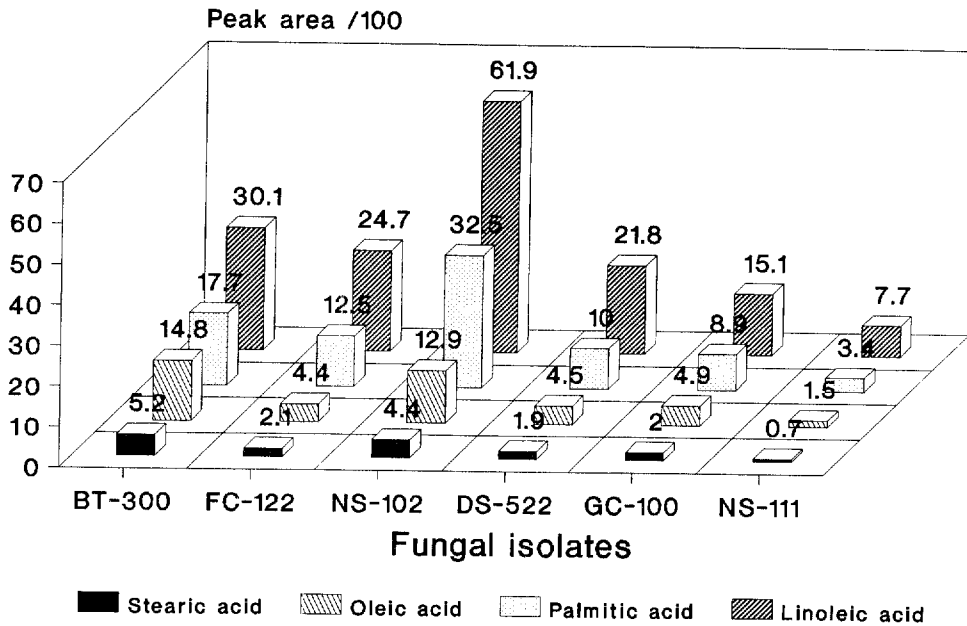


Fig.2. Contents of fatty acids isolated from procymidone-resistant and sensitive isolates of *Botrytis cinerea*.

Table 9. Crude chitin and GlcNAc content of procymidone-resistant and sensitive isolates of *Botrytis cinerea*

	Fungal isolates	Crude chitin ^{a)}	GlcNAc ^{b)}		
			24hrs	48hrs	
Resistant	BT-300	Aver. ^{c)}	87.43	0.31	0.53
		Range	(67.32-98.80)	(0.28-0.40)	(0.42-0.80)
	FC-122	Aver.	97.47	0.17	0.51
		Range	(72.99-110.40)	(0.10-0.28)	(0.34-0.70)
	NS-102	Aver	97.79	0.15	0.39
		Range	(73.54-119.31)	(0.09-0.21)	(0.222-0.50)
Sensitive	DS-522	Aver.	111.97	0.06	0.18
		Range	(88.34-130.02)	(0.04-0.08)	(0.09-0.29)
	GC-100	Aver.	109.60	0.09	0.24
		Range	(84.50-120.87)	(0.04-0.10)	(0.14-0.40)
	NS-111	Aver.	105.83	0.07	0.19
		Range	(73.88-119.00)	(0.04-0.10)	(0.10-0.24)

a) unit is mg/g

b) unit is mg/50mg

c) Average of 4 replicates

7. 조키티 함량 및 이의 가수분해산물(GlcNAc) 함량

조키티 함량과 이의 가수분해산물인 GlcNAc의 생성량은 Table 9 와 같다.

조키티 함량은 저항성 균주가 97.79mg 그리고 감수성이 109.13mg 으로 감수성이 약 1.1배 높게 나타났으나, 이를 24시간 동안 가수분해 시켰을 때 생성된 GlcNAc 함량은 저항성 균주가 0.21mg 그리고 감수성이 0.07 mg으로 저항성이 3배 정도 많았다. 48시간 동안 가수분해 시켰을 때에는 저항성 균주가 약 0.48mg 이었고, 감수성이 약 0.2mg으로 저항성이 2배 이상 많았다. 조키티 mg당 GlcNAc 생성율은 24시간 후에는 저항성 균주가 0.07% 그리고 감수성은 0.03% 였으며, 48시간 후에는 저항성 균주가 0.16% 그리고 감수성이 0.07%로 저항성이 2배 이상 높았다. 특히 저항성 균주중 BT-300은 24시간 후 GlcNAc 생성율이 0.12% 그리고 48시간 후에는 0.2% 로 가장 높았으며, 감수성 균주 중에서는 GC-100이 조키티 함량과 GlcNAc 생성량이 가장 많았는데, 이것은 Table 5의 다른 감수성 균주 보다 저해를

덜 받은 결과와도 무관하지 않은 것으로 볼 수 있다.

키티는 N-acetyl glucosamine의 β -1,4 결합을 하고 있는 다당류의 일종으로서 *Oomycetes* 속 균주를 제외한 거의 모든 곰팡이의 세포벽에 존재하며 세포내·외부의 물리적 작용으로 부터 세포를 보호하고 정상 형태를 유지하는 역할^{21,22)} 외에도 약제의 선택적 흡수·이행과 관련이 있는 것으로 보고된 바 있다.²³⁾ 공시균주의 조키티 함량은 저항성 균주에서 감수성 균주에 비하여 다소 적은 반면, 이의 전구물질인 GlcNAc 함량이 2배 이상 많은 것으로 미루어 저항성 발현 요인은GlcNAc와 관련이 있을 것으로 판단되었다.

이상의 결과들을 종합하여 볼 때 잣빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*)의 procymidone에 대한 약제저항성은 lipid 함량의 증가, fatty acid 함량의 증가 및 조성 변화 그리고 chitin의 전구물질인 GlcNAc 함량과의 복합적인 요인에 의하여 발현되었을 것으로 판단되었다.

적 요

잣빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*)의 procymidone약

제 저항성 발현 요인을 구명하기 위하여 procymidone 약제 저항성과 감수성 균주를 각각 세균주씩 선발하여 약제 저항성 검정과 아울러 세포구성물질의 함량 및 조성을 조사한 결과를 요약하면 아래와 같다.

1. 공시균주의 약제 저항성 검정 결과 저항성이 감수성균주에 비하여 1,000배 이상의 저항성이 발현된 것으로 확인되었다.
2. Monooxygenase 저해제인 piperonyl butoxide와 α -esterase 저해제인 triphenyl phosphate를 PDA 배지에 처리한 후 균사생육을 조사한 결과 저항성과 감수성균주간에 차이가 없어 저항성은 균체의 내재적요인에서 기인된 것으로 판단되었으며, 아울러 procymidone과 혼합 처리시 약효 상승 효과는 확인되지 않았다.
3. 스테롤 조성은 저항성과 감수성 균주 모두 유사하였으며, GC/MS 분석결과 분자량 428의 스테로이드계 화합물이 비슷한 함량으로 존재하였다.
4. 지질함량은 저항성이 감수성균주에 비하여 30% 정도 많았고, 지방산 함량은 저항성균주의 경우 palmitic acid와 stearic acid가 약 2.5배, oleic acid 2.9배, 그리고 linoleic acid가 공시균주의 주된 지방산으로 나타났으며, 2배 정도 많은 함량을 보였다.
5. 조키틴 함량은 감수성균주가 저항성에 비하여 0.11% 많았으나, 이의 가수분해산물인 N-acetyl glucosamine 함량은 저항성균주가 감수성에 비하여 반응 24시간에 3배 그리고 48시간에서 2배 많았다.

따라서 잣빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*)의 procymidone 약제 저항성은 lipid 함량의 증가, fatty acid 함량의 증가 및 조성의 변화 그리고 키틴 전구물질인 GlcNAc 함량과의 복합적인 요인에 의하여 발현되었을 것으로 판단되었다.

참고문헌

1. 上杉康性(1978) 藥劑耐性, 植物病理化學最近の進歩, 植物病理化學最近の進歩刊行會, 名古屋大學, 211-2202.

2. Beever, R. E. and R. J. W., Byrde(1982), Resistant to the dicarboximide fungicide in fungicide resistance in crop protection(eds J. Dekker and S. G., Georgopoulos), Pudoc. Wageningen, 101-117.
3. Leroux, P., R. Fritz et M. Gredt(1977), Etudes en laboratoire de souches de *Botrytis cinerea* Pers., résistantes a la dichlozolin, au dicloran, au quintozone, a la vinclozolin et au 26019 RP(ouglycophene), Pathopath. Z, **89**, 347-358.
4. Beever, R. E.(1983), Osmotic sensitivity of fungal variants resistant to dicarboximide fungicides, Thans. Br. Mycol., Soc., **80**, 327-331.
5. Dennis, C., and R. P. Davis(1979), Tolerance of *Botrytis cinerea* to iprodione and vinclozolin, P1, Path., **28**, 131-133.
6. Fletcher, J. T. and M. J. Griffin(1981), The sensitivity of populations of *Erysiphe graminis* to tridemefon and *Botrytis cinerea* to iprodione, Neth. J., P. Path., **87**, 239.
7. Katan, T.(1980), Resistance to 3,5-dichlorophenyl-N-cyclic imide (dicarboximide) fungicides in the grey mould pathogen *Botrytis cinerea* on protected crops, Pl. Path. 31, 133-141. **8.** Panagiotaku, M. G. and N. E. Malathrakis(1981), Resistance of *Botrytis cinerea* pers. to dicarboximide fungicides. Neth. J. Pl. Path. 87, 242.
9. 村越重雄, 細失俊一郎(1982), トマト圃場におけるイフロシオン耐性灰色カビ病菌の出現, 日植病報, **48**, 547-550.
10. Hisada, Y. H., Takaki, Y. Kawase and T. Ozaki (1979), difference in the potential of *Botrytis cinerea* to develop resistant to procymidone in vitro and in field, Ann., Phytopath., Soc., Japan, **45**, 283, 290.
11. 劉勝憲, 金洪璣, 盧泰弘, 禹仁植, 印茂成(1990) 施設園藝 잣빛곰팡이病 藥劑耐性菌의 發生과 防除에 관한 研究, 農試論文集(農業産學協同篇), **33**, 141-

151

12. Hisada, Y., T. Kato, and Y. Kawase(1978), The mechanisms of antifungal action of procymidone in *Botrytis cinerea*, Ann., Phytopath., Soc., Japan, **44**, 509-518.
13. Pappas, A. C., and D. J., Fisher(1979) A comparison of the modes of action of vinclozolin, procymidone, iprodione and prochloraz against *Botrytis cinerea*, Pestic. Sci., **10**, 239-246.
14. Reilly, D. C., and G. L. Lamoureux(1981) The effect of the fungicide iprodione on the mycelium of *Sclerotinia sclerotiorum*, Phytopath., **71**, 722-727
15. Matthew, J. H. and E. T. Alice(1989), Laboratory-induced Fungicide Resistance to Benzimidazole and Azole Fungicides in *Cercospora beticola*, Pestic. Biochem. and Physiol., **35**, 89-96.
16. Metcalf, L. D., A. A. Schmitz and J. R. Pelka(1966), Rapid preparation of fatty acids ester from lipids for gas chromatographic analysis, Anal. Chem., **38**, 514
17. Kim, Y. S., M. Y. Lee, and Y. M. Park(1992), Purification and Characterization of Chitinase from Green Onion, Korean Biochem. J., **25**, 171-177
18. Shimahara, K.(1988), Preparation of Crustacean chitin, Method in Enzymology, **161**, 417-45919.
- Deniel B. and Kerkenaar A.(1984), Resistance in mutagen-induced mutants of *Ustilago maydis* to fungicides which inhibit ergosterol biosynthesis, J. of Pesticide Science, **15**, 78-84.
20. Fuchs, A. and M. Viets-Verweij(1975), Permanent and transient resistance against triarimol and triforine in some pathogenic fungi, Meded. Fac. Landbouwwet. Rijksuniv. Gent, **40**, 699-70621. Roger, H. J. and H. R. Parkins(1968), Cell wall and membranes, E & F. N. Spon Ltd., London.
22. Hepburn, H. R.(1970), Insect integument, Elsevier, New York.
23. Misato, T., K., Kakik, and M. Hori(1977) Mechanism of polyoxin resistance, Neth., J. Pl., Path., **83**, Suppl., **1**, 253-260.