

여러 종류의 *in vitro* 생물검정에서 *Botrytis cinerea*에 대한 sulphamide계와 dicarboximide계 살균제의 활성 특성

최경자* · 김흥태 · 김진철 · 조광연

한국화학연구소 스크리닝연구부

요약 : *In vivo*와 *in vitro* 생물검정법에서의 활성관계를 조사하고 또한 보다 효율적인 *in vitro* 검정법을 개발하기 위하여 작용기구가 다른 두 계열 살균제 즉 sulphamide계 (dichlofluanid와 tolylfluanid)와 dicarboximide계 살균제 (iprodone, vinclozolin 및 procymidone)을 시험약제로 하여 본 실험을 수행하였다. Dichlofluanid, tolylfluanid, iprodione, vinclozolin, procymidone의 토마토 유묘에서의 병 방제효과는 유사하였다. 그러나 이들 살균제에 대해 *in vitro* 생물검정법으로 항균활성을 비교한 결과, sulphamide계 살균제는 포자발아 억제실험에서 높은 활성을 나타낸 반면에, dicarboximide계 살균제는 균사생장 억제실험에서 항균활성이 더 우수하였다. 그러므로 *in vivo* 병 방제효과가 유사하더라도 작용기구가 다르면 *in vitro* 생물검정법에서의 항균활성은 다르게 나타남을 알 수 있었다. 또한 포자현탁액을 넣은 96-well microtiter plate에 약제를 처리하고 3시간 배양 후 배양액을 제거하고 다시 새 배지를 넣어 배양한 후 생장억제를 조사한 실험 (microtiter plate method I, MPM I)에서는 살균제들의 포자발아 억제실험과 유사한 경향의 활성을 보였다. 96-well microtiter plate에서 포자현탁액을 6시간 동안 배양하여 포자를 발아시킨 후에 약제를 처리한 실험 (microtiter plate method II, MPM II)에서의 항균활성은 균사생장 억제효과와 일치하는 경향을 보였다. 따라서 기존의 *in vitro* 항균활성 실험보다 편리하고 효율적인 MPM I과 II 방법은 각각 포자발아와 균사생장 억제실험을 대신할 수 있으리라 생각되었다.(1999년 7월 5일 접수, 1999년 9월 30일 수리)

Key words : *Botrytis cinerea*, *in vitro* bioassay, antifungal activity.

서론

*Botrytis cinerea*에 의해 발병하는 잿빛곰팡이병은 노지 재배보다는 비닐하우스와 같은 시설재배에서 많이 발생하며, 특히 온도가 낮고 습도가 높은 환경에서 대 발생하여 큰 피해를 주고 있는 병이다. 이 병은 주로 열매 끝의 시든 꽃잎을 통하여 감염되어 열매를 찌키며 심한 경우 큰 열매에도 발생한다. 또한 포장에서 뿐 만 아니라 저장 중에도 발생하여 큰 피해를 주고 있다. 잿빛곰팡이병의 방제는 주로 화학적 방제에 의존하고 있는데, 잿빛곰팡이병 방제약제는 sulphamide계 살균제와 benomyl, carbendazim, thiabendazole, thiophanate-methyl 등 benzimidazole계, dicarboximide계, N-phenylcarbamate계, phenylpyrrol계 살균제, anilinopyrimidine계 살균제 등 다양한 계열의 살균제가 개발되어 사용되고 있다. 그러나 최근에 도입된 phenylpyrrol계 살균제와 anilinopyrimidine계 살균제를 제외한 기타 약제들에 대하여 포장에서 저항성 균의 발생으로 방제효과가 크게 저하되고 있다 (Georgopoulos 등, 1987; Malathrakis, 1988; Beeve, 1989; Rewal 등, 1991; Elad 등, 1992; 김 등, 1993; Pommer 등, 1995). 따라서 이

저항성균에 대해서도 효과적으로 방제할 수 있는 새로운 살균제의 개발이 요구되고 있다.

살균제를 개발하기 위하여 효과를 검정하는 방법에는 크게 *in vivo*와 *in vitro* 검정방법이 있다. 식물체에서 발병 억제효과를 검정하는 *in vivo* 방법은 포장에서의 방제효과와 높은 상관관계를 보여 주지만, 온실과 같은 시설을 보호해야 하고 시간과 노동력이 많이 소요되는 단점이 있다 (Knight 등 1997). 반면에 균사생장억제법, 포자발아억제법, disc diffusion method, microplate automatized technics 등은 실험실에서 수행하는 *in vitro* 생물검정법으로 *in vivo* 방법에 비하여 시간과 노동력, 스크리닝을 위한 시설이 적게 소요되는 장점이 있다. 하지만 많은 연구자들은 *in vitro* 생물검정법에 의한 항균활성과 *in vivo*에서의 병 방제효과와의 상관 관계에 대해 의문을 제기하고 있으며, 또한 검정방법에 따라 상이한 결과를 보이는 보고도 있다 (Stiler 등, 1983; Richardson 등, 1985; Troke 등, 1988).

본 실험에서는 sulphamide계 살균제인 dichlofluanid와 tolylfluanid를, dicarboximide 살균제인 iprodione, vinclozolin, procymidone을 선발하여 *in vivo*와 *in vitro*에서 잿빛곰팡이병균에 대한 항균활성을 조사하였다. 또한 보다 효율적인 *in vitro* 생물검정법을 개발하기 위하여, *in vivo*

*연락처

검정법에서 유사한 방제효과를 보이는 이들 5종 살균제의 잣빛곰팡이병균에 대한 항균활성을 본 실험에서 제안한 microtiter plate method I 과 II (MPM I, II) 방법을 사용하여 검토하였으며, 기존의 3가지의 *in vitro* 생물검정법에 의한 항균효과와 비교하였다.

재료 및 방법

사용 약제

그림 1의 sulphamide계 살균제, dichlofluanid (*N*-dichlorofluoromethylthio-*N,N*-dimethyl-*N*-phenylsulfamide), tolylfluanid (*N*-dichlorofluoromethylthio-*N,N*-dimethyl-*N*-p-tolylsulfamide)와 dicarboximide계 살균제, iprodione [3-(3,5-dichlorophenyl)-*N*-isopropyl-2,4-dioximidazolidine-1-carboximide], vinclozolin [3-(3,5-dichlorophenyl)-5-methyl-5-vinyl-1,3-oxazolidine-2,4-dione], procymidone [*N*-(3,5-dichlorophenyl)-1,2-dimethylcyclopropane-1,2-dicarboximide]은 원제를 사용하였다. 감자한천배지 (potato dextrose agar) 와 감자즙액배지 (potato dextrose broth)는 Difco사의 제품을 사용하였으며, Tween 20 (polyoxyethylene sorbitan monolaurate)은 Junsei사 제품을 사용하였다.

약제 처리

토마토 유묘를 이용한 *in vivo* 방제효과 실험에서는 약제를 아세톤에 용해하여 사용하였으며, 아세톤의 최종농도는 10% 이내로 사용하였다. *In vitro* 생물검정 실험에서 공시 살균제는 dimethyl sulfoxide (DMSO) 및 아세톤에 용해하여 사용하였으며, DMSO의 최종농도는 1%로 하였다. 무처리구에는 약제 없이 약제처리구와 동량의 DMSO 나 아세톤만을 넣었다. 약제를 현탁시키기 위한 계면활성제로는 250 µg/ml 농도의 Tween 20을 사용하였다.

사용 균주 및 균배양

토마토로부터 분리한 *B. cinerea* BC2 균주를 사용하였다 (김 등, 1993). BC2균의 균사조각을 감자한천배지 증양에 놓고 20°C에서 7일 동안 배양하였다. 7일간 배양한 BC2는 포자형성을 위하여 하루에 16시간 썬 광을 조사하였다. 형성된 포자는 감자즙액배지를 붓고 붓으로 긁어 수확하였다. 실험에 사용한 포자현탁액은 4겹의 가제로 걸러 균체를 제거하여 준비하였다.

잣빛곰팡이병 방제효과

각 약제를 2, 10, 50, 250 µg/ml 농도로 조제하여, 온

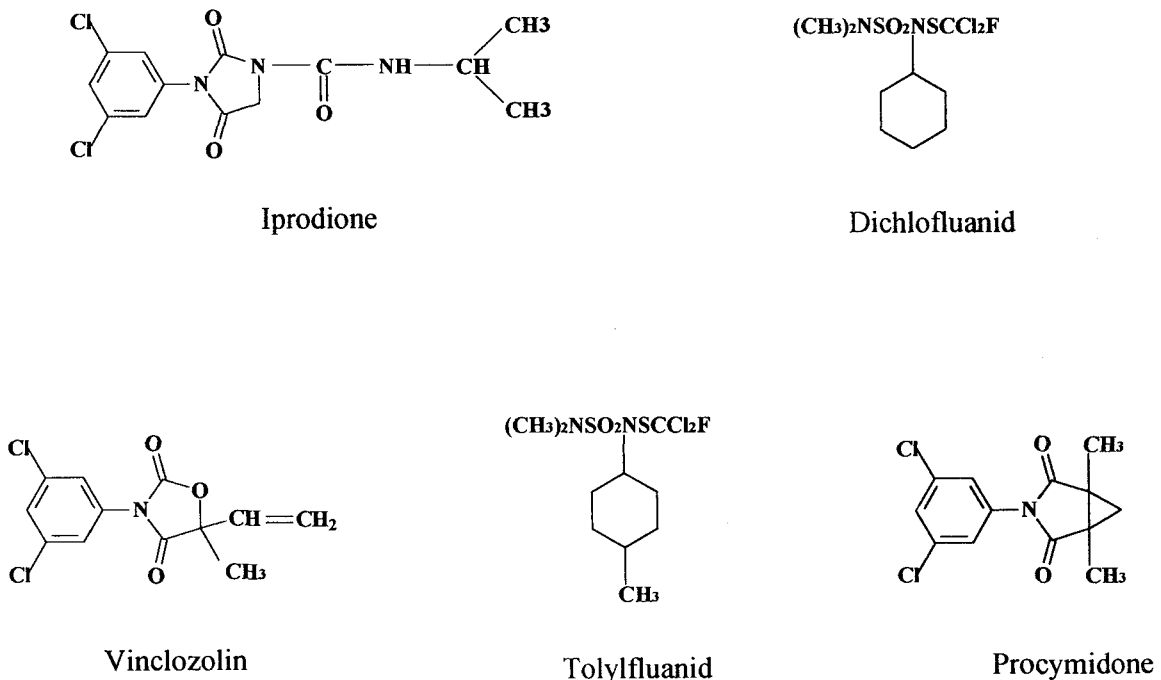


Fig. 1. Chemical structures of five fungicides used in this study.

실에서 재배한 2엽기 토마토 유묘에 살포하고 24시간 동안 풍건시킨 후 포자현탁액 (1×10^6 spores/ml)을 분무접종하였다. 접종한 토마토 유묘를 20°C 습실상 (상대습도 95% 이상)에 4일간 두어 발병을 유도시키고, 병반면적을 을 조사하였다. 방제기는 다음과 같은 식으로 구하였다.

$$\text{방제기(\%)} = \frac{\text{무처리구 발병율} - \text{처리구 발병율}}{\text{무처리구 발병율}} \times 100$$

포자발아 억제

멸균하여 충분히 식힌 물한천배지에 DMSO에 용해시킨 약제를 넣고 잘 흔들어 고르게 섞이도록 한 후에 멸균된 petri dish (직경 : 9 cm)에 부어 굳혀서 약제평판배지를 만들었다. 약제배지의 최종농도는 0.4, 2.0, 10, 50 $\mu\text{g/ml}$ 이 되도록 하였다. 이 약제배지 위에 준비한 포자현탁액 (1×10^7 spores/ml)을 고르게 분무한 후 20°C에서 24시간 배양한 후 광학현미경 하에서 발아율을 조사하였다. 발아관의 길이가 *B. cinerea* 포자 장경의 1/2을 초과할 경우 발아한 것으로 간주하였다.

균사생장 억제

감자한천배지를 멸균하여 식히고 여기에 DMSO에 용해시킨 약제를 넣어 포자발아 억제실험에서와 같이 약제배지를 만들었다. *B. cinerea* 균총의 균사 선단부로부터 떼어낸 직경 8.5 mm의 균사조각을 약제배지 중앙에 올려 놓고 20°C에서 배양한 후 균총의 직경을 조사하였다. 억제율은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{억제율 (\%)} = \frac{\text{무처리구의 균총직경 (mm)} - \text{처리구의 균총직경 (mm)}}{\text{무처리구 균총직경 (mm)} - 8.5} \times 100$$

Disc diffusion method

멸균하여 충분히 식힌 감자한천배지에 수확한 *B. cinerea* 포자현탁액을 넣고 잘 흔들어 포자가 고르게 현탁되도록 한 후에 petri dish에 부어 포자배지를 만들었다. Paper disc당 0.20, 1.0, 5.0, 25 μg 이 되도록 아세톤에 용해시킨 살균제를 넣고 건조시켜 포자배지에 올려놓고 20°C에서 배양하였다. 무처리구에서 균총이 충분히 형성된 후에, 약제를 처리한 여과지 주변에 생긴 clear zone의 크기를 조사하였다.

Microtiter plate method I (MPM I)

기존의 포자발아 억제실험을 대체할 수 있는 *in vitro* 생물검정법을 개발하기 위하여 96-well microtiter plate를

이용하여 다음과 같은 방법으로 실험하였다. 96-well microtiter plate의 각 well에 0.4, 2.0, 10, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 100배 용액으로 준비된 각각의 약제 1 μl 씩을 넣고 여기에 *B. cinerea* 포자현탁액 (5×10^5 spores/ml) 99 μl 를 넣어 잘 흔들어 주었다. 20°C에서 3시간 동안 배양한 후, 배양액을 버리고 새 배지를 100 μl 씩 넣어 주었다. 이 때 약제가 함유된 배양액을 제거하는 방법은 microtiter plate를 거꾸로 하여 쏟아내고 여러 겹의 종이타올 위에 잠시 두었다. 이 때 접종한 *B. cinerea*의 포자는 제거되지 않고 접종한 well의 바닥에 부착되어 있음을 현미경으로 확인하였다. Microtiter plate를 다시 20°C 배양기에서 4일 동안 배양한 후 무처리구와 비교하여 균사생장 정도를 조사 하였다.

Microtiter plate method II (MPM II)

96-well microtiter plate에 *B. cinerea* 포자현탁액 (5×10^5 spores/ml)을 well 당 99 μl 씩을 넣고 20°C에서 6시간 동안 배양하여 포자를 발아시킨 후 DMSO로 용해시킨 약제 1 μl 을 처리하고 잘 흔들어 주었다. 이 때 *B. cinerea*의 포자는 90% 이상 발아하였음을 광학현미경 하에서 확인하였다. 약제를 처리한 microtiter plate는 20°C에서 다시 4일 동안 배양하여 균사생장 정도를 조사하였다.

결 과

토마토 잿빛곰팡이병 방제효과

2엽기 토마토 유묘에 살균제를 처리하고 잿빛곰팡이병 균을 접종하여 발병시킨 후 이들 살균제의 예방효과를 비교하였다 (그림 2). 살균제 농도를 자연 log로 환산하여 방제효과에 대한 회귀직선을 계산하고 이로부터 50% 발병 억제농도 (IC_{50})을 계산하였다. Sulphamide계 살균제인 dichlofluanid와 tolylfluanid의 IC_{50} 은 각각 25와 18 $\mu\text{g/ml}$ 이었으며, dicarboximide계 살균제인 iprodione, vinclozolin, procymidone은 24, 18, 23 $\mu\text{g/ml}$ 이었다.

포자발아 억제효과

B. cinerea 포자를 약제를 포함하고 있는 물한천배지에서 24시간 배양한 후에 발아율을 조사하였는데, dichlofluanid와 tolylfluanid는 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 전혀 포자가 발아되지 않았으나 dicarboximide계 살균제는 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서도 발아된 포자가 있었다 (그림 3). 실험한 살균제의 50% 포자발아 억제농도 (IC_{50})은 dichlofluanid와 tolylfluanid는 각각 1.3와 1.7 $\mu\text{g/ml}$ 이었으며, iprodione, vinclozolin, procymidone의 IC_{50} 은 각각 22, 9, 23 $\mu\text{g/ml}$ 이었다.

균사생장 억제효과

B. cinerea 균사조각을 약제배지에서 배양한 후 균총의

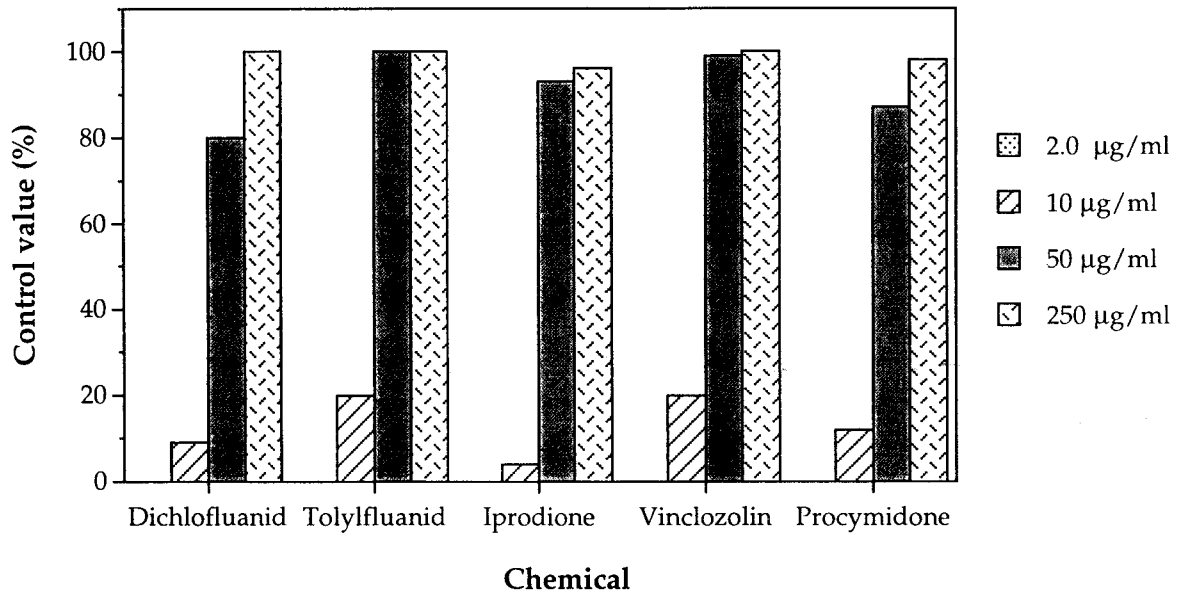


Fig. 2. Control efficacy of several fungicides on tomato gray mold.

길이를 조사하고 억제율을 조사한 결과, dichlofluamid와 tolyfluamid는 50 µg/ml에서도 균사생장이 일어났으나 dicarboximide계 살균제인 vinclozolin, procymidone는 2.0 µg/ml에서도 균사생장이 정지되었다 (그림 4). 50% 균사생장 억제농도 (IC₅₀)는 dichlofluamid와 tolyfluamid는 10, 11 µg/ml이고, iprodione, vinclozolin, procymidone은 각각 0.20, 0.023, 0.10 µg/ml 이었다.

Disc diffusion method

Paper disc에 아세톤에 용해시킨 살균제를 넣고 B.

cinerea 포자배지에 올려 배양한 후 clear zone의 크기를 조사한 결과, 처음에는 유사한 활성을 나타내었으나 나중에는 dicarboximide계 살균제 모두 sulphamide계 살균제보다 활성이 크게 나타났다 (표 1). Sulphamide계 살균제는 처음에 clear zone이 뚜렷하였으나 배양시간이 증가함에 따라 clear zone의 크기가 점차 작아졌다. 그러나 dicarboximide계 살균제는 sulphamide계 살균제와 달리 처음에는 clear zone이 분명하지 않았으나 배양시간이 길어짐에 따라 clear zone이 선명하고 크기도 점차 증가하였다.

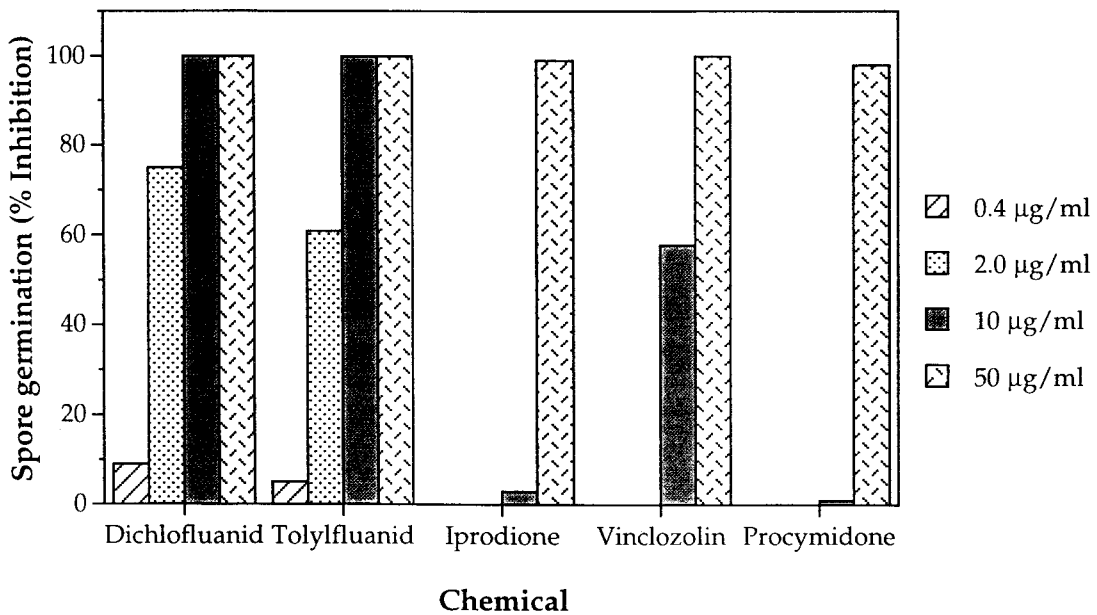


Fig. 3. Effect of several fungicides on spore germination of *B. cinerea* BC2.

Microtiter plate method I (MPM I)

96-well microtiter plate에 약제와 *B. cinerea* 포자현탁액을 넣고 3시간 배양 후에 약제를 제거하고 새로운 배지를 넣고 배양하여 *B. cinerea* 균사생육 억제정도를 조사하였다. Sulphamide계 살균제는 2.0 µg/ml 처리구에서 *B. cinerea*가 전혀 성장하지 못 하였으나, dicarboximide계 살균제는 50 µg/ml 처리구에서 균의 생육이 완전히 억제되었다 (표 2).

Microtiter plate method II (MPM II)

B. cinerea 포자현탁액을 6시간 배양하여 포자를 발아시킨 후에 약제를 처리하고 배양하여 균의 생육을 조사한 결과, sulphamide계 살균제는 10 µg/ml 농도에서 균의 생장이 완전히 억제되었으나 dicarboximide계 살균제는 2.0 µg/ml 처리구에서도 균의 생장이 억제되었다 (표 3).

고 찰

본 실험에서는 토마토를 이용한 생물검정에서 잣빛곰팡이병 방제효과가 유사하고 작용특성이 상이한 2계열의 5종 살균제, N-trihalomethylthio 그룹을 가지는 sulphamide계 살균제와 3, 5-dichlorophenyl 그룹을 가지는 dicarboximide계 살균제를 선별하여 여러 *in vitro* 생물검정법으로 이들 살균제의 활성을 실험하여, *in vivo* 방제효과와 여러 가지 *in vitro* 생물검정법과의 활성관계를 조사하였다. *B. cinerea* BC2 균주를 사용한 토마토 잣빛곰팡이병 방제효과 실험에서 위의 살균제들의 방제효과가 서로 유사하게 나타나므로, *in vivo* 방제효과와 *in vitro* 생물검정법과의 활성관계를 조사하는데 아주 유용하였다 (그림 2).

두 계열의 살균제를 기존의 *in vitro* 생물검정 방법으로 활성을 비교한 결과, sulphamide계 살균제, dichlofluanid와 tolylfluand는 같은 생물검정법에서는 유사한 항균활성을 나타내었으며, dicarboximide계 살균제, iprodione, vinclozolin, procymidone에서도 마찬가지로 경향을 보였다. 그러나 이들은 *in vitro* 생물검정법에 따라 다양한 활성을 보여, sulphamide계 살균제는 포자발아 억제에서 dicarboximide계 살균제보다 더 높은 활성을 나타내었으나 (그림 3, 표 2), dicarboximide계 살균제는 균사생장 억제에서 sulphamide계 살균제보다 더 높은 활성을 나타내었다 (그림 4, 표 3). 따라서 유사한 *in vivo* 잣빛곰팡이병 방제효과를 보이는 살균제도 *in vitro*에서의 효과는 검정방법에 따라서 크게 달라지는 것을 알 수 있었다.

*B. cinerea*에 미치는 화합물의 효과가 다른 이유는 이들 화합물의 작용기작을 가지고 설명할 수 있었다. Sulphamide계 살균제의 작용기구는 대사과정의 여러 단계를 저해하여 식물병원균을 죽이는 것으로 살균작용이 있다고 알려져 있다 (Lukens와 Sisler, 1958). 반면에 dicarboximide계 살균제는 개발된 이래 작용기구에 대해서 최근까지 많은 연구가 있었으며 (Hisada와 Kawase, 1977; Georgopoulos 등, 1979; Pappas와 Fisher, 1979), 여러 이견이 있으나 (Steel 등, 1993; Orth 등, 1992) 최근에는 막지질과산화작용에 의해 병원균의 생육을 저해 즉 정균작용을 한다고 보고되어 있다 (Lyr와 Edlich, 1986; Edlich 등, 1988; Lyr, 1988; Choi 등, 1996; Choi 등, 1997; Lee 등, 1998). 그러므로 sulphamide계 살균제같이 다작용점에서 살균작용을 보이는 약제는 균사생장보다 포자발아를 효과적으로 억제하고, dicarboximide계와 같이 막지질과산화작용으로 세포질 구성물질의 누출을 일으키는 살균제로

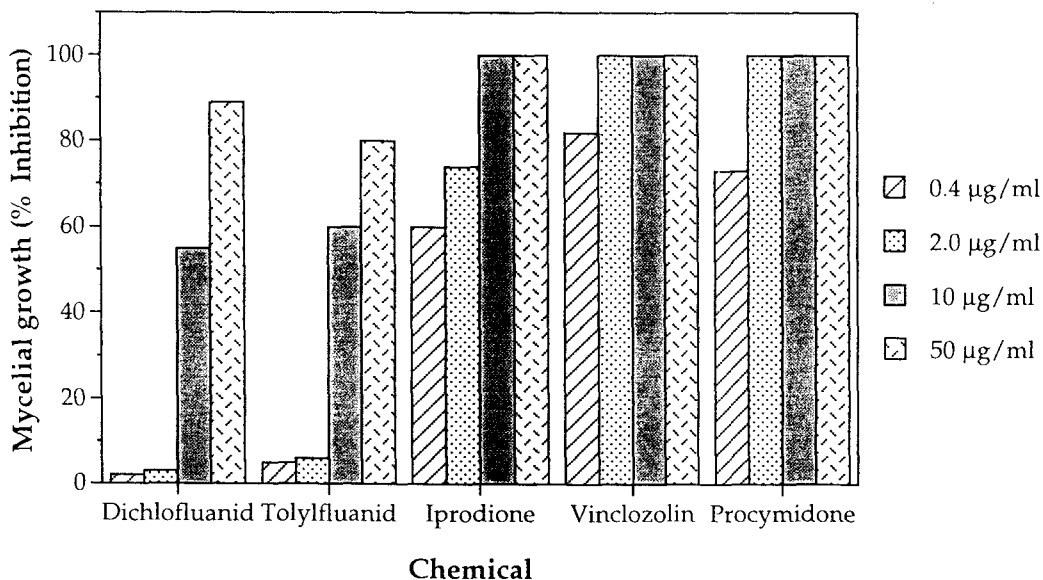


Fig. 4. Effect of several fungicides on mycelial growth of *B. cinerea* BC2.

Table 1. Fungal growth inhibition of *B. cinerea* BC2 by sulphamide and dicarboximide fungicides in disc diffusion method

Concentration ($\mu\text{g}/\text{disc}$)	Sulphamide		Dicarboximide		
	Dichlofluanid	Tolyfluanid	Iprodione	Vinclozolin	Procymidone
0.2	- ^{a)}	-	-	-	-
1	-	-	-	±	±
5	±	±	+	++	+++
25	+	++	+++	+++	+++

^{a)}Clear zone size: +++, >30 mm; ++, 20 mm to 30 mm; +, 10 mm to 20 mm; ±, 0.5 mm to 10 mm; -, <0.5 mm.

Table 2. Antifungal activity of chemicals on *B. cinerea* BC2 by microtiter plate method I

Concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Sulphamide		Dicarboximide		
	Dichlofluanid	Tolyfluanid	Iprodione	Vinclozolin	Procymidone
0.4	+ ^{a)}	+	-	-	-
2	++	++	-	-	-
10	++	++	-	±	-
50	++	++	++	++	++

^{a)}Mycelial growth: -, normal growth; ±, moderate growth; +, little growth; ++, no growth.

Table 3. Antifungal activity of chemicals on *B. cinerea* BC2 by microtiter plate method II

Concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Sulphamide		Dicarboximide		
	Dichlofluanid	Tolyfluanid	Iprodione	Vinclozolin	Procymidone
0.4	- ^{a)}	-	-	-	-
2	±	±	++	++	+
10	++	++	++	++	++
50	++	++	++	++	++

^{a)}Mycelial growth: -, normal growth; ±, moderate growth; +, little growth; ++, no growth.

병원균에 대하여 정균작용을 보이는 살균제는 포자발아보다는 균사생장을 효과적으로 억제함을 알 수 있었다.

기존의 *in vitro* 생물검정법 즉 포자발아와 균사생장 억제 실험은 노동 집약적이고, 시간이 많이 소요되며, 공간과 비용이 많이 든다. 그러나 Wilson 등 (1997)은 *B. cinerea*에 대한 345종의 식물추출물과 49종의 필수지방의 항균활성을 microtiter plate를 이용하여 실험하였는데, 이들은 automatic microtiter plate reader를 사용하여 600 nm에서 흡광도를 측정함으로써 손쉽게 활성을 조사하였고, 많은 수의 시료임에도 신속하게 활성을 조사할 수 있었다고 보고하였다.

Wilson 등의 방법을 개선한다면 포장에서의 효과를 좀더 정확하게 예측할 수 있으며 많은 화합물을 효율적이고 신속하게 스크리닝 할 수 있는 검정법을 확립할 수 있으리라 생각한다. 최 등 (1990)은 20°C에서 *B. cinerea*의 포자를 배양하였을 경우, 3시간 후에는 5% 이하의 발아율을

보인 반면 4.5시간 배양하면 50% 이상의 발아율을 보이고, 6시간 배양 후에는 포자 발아율이 최대에 도달하여 거의 모든 포자가 발아하였다고 보고하였다. 본 실험에서는 작용기작이 다른 sulphamide계와 dicarboximide계의 살균제가 포자발아와 균사생장에 대한 저해효과가 반대로 나타나고 있기 때문에 두가지의 검정법을 동시에 실시한다면 효과적인 화합물이 선별에서 제외되는 위험성을 줄이며 신규화합물의 활성을 정확하게 검정할 수 있으리라 생각하였다. 두 종류의 검정법을 동시에 실시하기 위해서는 화합물을 처리하는 시기가 중요하리라 본다. 따라서 본 실험에서는 약제의 처리시간을 달리하는 microtiter plate I 과 II 방법을 고안하였다.

Microtiter plate I 방법에서는 약제가 *B. cinerea*의 발아에만 영향을 미치고 균사생장에 미치는 효과를 최소화하기 위하여, 포자에 약제를 처리하고 20°C에서 3시간 배양한 후에 약제를 처리한 배지를 제거하고 새로운 배지를

넣어 배양하였다. Microtiter plate II 방법에서는 약제가 포자의 발아에 영향을 미치지 않고 균사생장에 미치는 효과만을 보기 위하여, 90% 이상의 포자가 발아되는 시기인 6시간 배양 후에 약제를 처리하였다. 이와 같이 설계된 microtiter plate I과 II 방법으로 실험한 결과, microtiter plate I 방법은 포자발아 억제실험과 유사한 경향을 나타내었고 (그림 3, 표 2), microtiter plate II 방법은 균사생장 억제실험과 동일한 경향의 결과를 얻어 (그림 4, 표 3), microtiter plate I 방법은 포자발아 억제실험을 microtiter plate II 방법은 균사생장억제 실험을 대체할 수 있으리라 생각되었다. 따라서 microtiter plate I과 II 방법을 동시에 실험함으로써 작용기구가 다양한 많은 수의 화합물에 대하여 손쉽게 항균활성을 조사하고 포장에서의 병 방제효과를 추정할 수 있을 것이라 생각되었다.

인용문헌

- Beever, R. E. (1989) Strains of *Botrytis cinerea* resistant to dicarboximide and benzimidazole fungicides in New Zealand vineyards. *Plant Pathol.* 39:427~437.
- Choi, G. J., H. J. Lee and K. Y. Cho (1996) Lipid peroxidation and membrane disruption by vinclozolin in dicarboximide-susceptible and -resistant isolates of *Botrytis cinerea*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 55:29~39.
- Choi, G. J., H. J. Lee and K. Y. Cho (1997) Involvement of catalase and superoxide dismutase in resistance of *Botrytis cinerea* to dicarboximide fungicide vinclozolin. *Pestic. Biochem. Physiol.* 59:1~10.
- Edlich, W., G. Lorenz, H. Lyr and E.-H. Pommer (1988) Studies on the biochemical basis of resistance against dicarboximide fungicides. *Proc. Br. Crop Prot. Conf. Pests Dis.* 1:391~396.
- Elad, Y., H. Yunis and T. Katan (1992) Multiple fungicide resistance to benzimidazoles, dicarboximides and diethofencarb in field isolates of *Botrytis cinerea* in Israel. *Plant Pathol.* 41:41~46.
- Georgopoulos, S. G. (1987) The development of fungicide resistance. pp.239~251, *In Populations of Plant Pathogens: Their Dynamics and Genetics* (eds. M. S. Wolfe and C. E. Caten), Blackwell Sci., Oxford, England.
- Georgopoulos, S. G., M. Sarris and B. N. Ziogas (1979) Mitotic instability in *Aspergillus nidulans* caused by the fungicides iprodione, procymidone, and vinclozolin. *Pestic. Sci.* 10:389~392.
- Hisada, Y. and Y. Kawase (1977) Morphological studies on antifungal action of *N*-(3',5'-dichlorophenyl)-1,2-dimethyl-cyclopropane-1,2-dicarboximide on *Botrytis cinerea*. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 43:151~158.
- Knight, S. C., V. M. Anthony, A. M. Brady, A. J. Greenland, S. P. Heaney, D. C. Murray, K. A. Powell, M. A. Schulz, C. A. Spinks, P. A. Worthington and D. Youle (1997) Rational and perspectives on the development of fungicides. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35:349~372.
- Lee, H. J., G. J. Choi and K. Y. Cho (1998) Correlation of lipid peroxidation in *Botrytis cinerea* caused by dicarboximide fungicides with their fungicidal activity. *J. Agric. Food Chem.* 46:737~741.
- Luken, R. J. and H. D. Sisler (1958) Chemical reactions involved in the fungitoxicity of captan. *Phytopathol.* 48:235~244.
- Lyr, H. (1988) Lipid peroxidation: A side effect of sterol demethylation inhibitor fungicides in *Mucor mucedo*(L.) Fres and *Ustilago maydis*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 32:197~204.
- Lyr, H. and W. Edlich (1986) Lipid peroxidation, a consequence of the mechanism of action of aromatic hydrocarbon and dicarboximide fungicides and a side effect in DMI fungicide. *Proc. Br. Crop Prot. Conf. Pests Dis.* 1:879-885.
- Malathrakis, N. E. (1988) Resistance of *Botrytis cinerea* to dichlofluanid in greenhouse vegetables. *Plant Dis.* 73:138~141.
- Orth, A. B., A. Sfarra, E. J. Pell and M. Tien (1992) An investigation into the role of lipid peroxidation in the mode of action aromatic hydrocarbon and dicarboximide fungicides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 44:91~100.
- Pappas, A. C. and D. J. Fisher (1979) A comparison of the mechanisms of action of vinclozolin, procymidone, iprodione, and prochloraz against *Botrytis cinerea*. *Pestic. Sci.* 10:239~246.
- Pommer, E.-H. and G. Lorenz (1995) Dicarboximide fungicides. pp.99~118, *In Modern Selective Fungicides: Properties, Applications, and Mechanism of Action* (ed. H. Lyr), Gustav Fisher Verlag, Jena.
- Rewal, N., J. R. Coley-Smith and H. M. Sealy-Lewis (1991) Studies on resistance to dichlofluanid and other fungicides in *Botrytis cinerea*. *Plant Pathol.* 40:554~560.
- Richardson, K., K. W. Brammer, M. S. Marriott and P. F. Trok. (1985) Activity of UK-49,858, a bis-triazole derivative, against experimental infections with

- Candida albicans* and *Trichophyton mentagrophytes*. Antimicrob. Agents Chemother. 27:832~835.
- Steel, C. C. and N. G. (Tan) Nair (1993) The physiological basis of resistance to the dicarboximide fungicide iprodione in *Botrytis cinerea*. Pestic. Biochem. Physiol. 47:60~68.
- Stiler R. L., J. E. Bennett, H. J. Scholer, M. Wall, A. Polak and D. A. Stevens (1983) Correlation of *in vitro* susceptibility results with *in vivo* response: flucytosine therapy in a systemic candidiasis model. J. Infect. Dis. 147:1070~1077.
- Troke, P. F., M. S. Marriott, K. Richardson and M. H. Tarbit (1988) *In vitro* potency and *in vivo* activity of azoles. Ann. NY Acad. Sci. 544:284~293.
- Wilson, C. L., J. M. Solar, A. El. Ghaouth and M. E. Wisniewski (1997) Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. Plant Dis. 81:204~210.
- 김병섭, 최경자, 조광연 (1993) Benzimidazole계 및 dicarboximide계 살균제에 저항성인 잭빛곰팡이병균 (*Botrytis cinerea*)의 몇가지 약제에 대한 반응. 한국식물병리학회지 9(2):98~103.
- 최경자, 정영륜, 조광연 (1990) 오이 잭빛곰팡이병균 (*Botrytis cinerea*)의 포자형성 및 발병에 관여하는 몇가지 요인. 한국식물병리학회지 6(2):186~192.

Antifungal activities of sulphamide and dicarboximide fungicides against *Botrytis cinerea* in several *in vitro* bioassays

Gyung Ja Choi*, Heung Tae Kim, Jin-Cheol Kim and Kwang Yun Cho (Agrochemicals Screening Division, Korea Research Institute of Chemical Technology, Taejeon 305-600, Korea)

Abstract : Two sulphamide (dichlofluanid and tolylfluanid) and three dicarboximide fungicides (iprodione, vinclozolin, procymidone) were used to investigate the correlation between *in vitro* antifungal activities and *in vivo* disease controlling activities against *Botrytis cinerea*, a causal agent of tomato gray mold and to develop efficient *in vitro* assays. They controlled effectively the development of tomato gray mold disease *in vivo* and their controlling activities were similar one another. However, several *in vitro* assays revealed that their *in vitro* antifungal activities were quite different between sulphamide and dicarboximide fungicides; the formers showed stronger inhibition activities for spore germination than the latters, whereas the formers inhibited mycelial growth less severely than the latters. The results indicate that the fungicides having different modes of action can show different *in vitro* antifungal activities according to *in vitro* assays, even if they have similar *in vivo* disease controlling activities. On the other hand, two rapid and efficient *in vitro* assays named Microtiter plate methods I (MPM I) and II (MPM II) were developed for the evaluation of fungicides for inhibitory activities against spore germination and mycelial growth of *B. cinerea*, respectively. The antifungal activities of five fungicides of two chemical groups in MPM I and II were correlated with the inhibitory activities against spore germination and mycelial growth using solid media, respectively.

*Corresponding author (Fax : +82-42-861-4913, E-mail : kjchoi@pado.krict.re.kr)