

*Botrytis cinerea*로부터 분리한 두 개의 새로운 phytotoxin의 구조 결정 및 생물활성

김금정^{1,2} · 윤미영^{1,2} · 김흥태² · 최경자¹ · 장경수¹ · 최용호¹ · 박명수¹ · 차병진² · 김진철^{1*}

¹한국화학연구원 산업바이오화학연구센터, ²충북대학교 식물의학과

Identification and Biological Activity of Two New Phytotoxins Isolated from *Botrytis cinerea*

Geum Jung Kim^{1,2}, Mi-Young Yoon^{1,2}, Heung Tae Kim², Gyung Ja Choi¹, Kyoung Soo Jang¹,
Yong Ho Choi¹, Myung Soo Park¹, Byeongjin Cha² and Jin-Cheol Kim^{1*}

¹Chemical Biotechnology Research Center, Korea Research Institute of Chemical Technology,
Yuseong-Gu, Daejeon 305-605, Korea

²Department of Plant Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

(Received on March 25, 2009)

We discovered two novel phytotoxins produced by the pathogenic fungus, *Botrytis cinerea*. Among the twenty-five *B. cinerea* isolates, which were obtained from various host plants in 1994 and 1996, twenty-two showed strong or moderate pathogenicity on five plants such as cucumber, tomato, red pepper, tobacco and Chinese cabbage. The culture filtrate of the *B. cinerea* 2-16 strain showed the most potent phytotoxic activity in a tobacco leaf-wounding assay. Two novel phytotoxins were isolated from the liquid cultures of *B. cinerea* 2-16 by ethyl acetate extraction, flash silica gel column chromatography, silica gel column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography, preparative TLC and subsequently preparative HPLC. Their chemical structures were determined to be 3-*O*-acetyl botcinol and 3-*O*-acetyl botcinolide, respectively, by mass and NMR spectral analyses. These two phytotoxins caused leaf necrosis in a leaf-wounding bioassay, and significant electrolyte leakage from leaf tissues of tobacco. In the two bioassays tested, 3-*O*-acetyl botcinol exhibited stronger phytotoxic activity than 3-*O*-acetyl botcinolide. This is the first report on the production of both 3-*O*-acetyl botcinol and 3-*O*-acetyl botcinolide from *B. cinerea*.

Keywords : 3-*O*-acetyl botcinol, 3-*O*-acetyl botcinolide, *Botrytis cinerea*, Phytotoxin

*Botrytis cinerea*는 시설 재배지의 과채류인 오이, 딸기 등 150여 종의 작물에 해를 끼치는 식물병원균으로서 우리나라 뿐만 아니라 전세계적으로 큰 문제를 일으키고 있다. 완전세대는 자낭균류인 *Botryotinia fuckeliana*로 밝혀져 있다. *B. cinerea*에 의한 식물병은 어린 잎부터 성숙한 열매 등 생육기 전반에 걸쳐 발생하며, 특히 18~20°C 내외의 서늘하고 다습한 기후에서 가장 잘 발생한다. 또한 저장과정과 수송 중에도 문제가 되어 경제적으로 큰 손실을 일으킨다. 이러한 잿빛곰팡이병의 방제에는 살균제를 이용한 화학적 방제가 대부분이지만 저항성균의 출현

등으로 인해 살균제에 의한 방제가 어려운 실정이다. 따라서 이 병을 효과적으로 방제하기 위해서는 *B. cinerea*가 식물체를 침입하여 병을 유발하는 과정에 대한 많은 연구가 필요하다.

*B. cinerea*의 병원성 기작과 관련하여 cutinase(Kan 등, 1997; Salinas 등, 1986), β -glucosidase(Sasaki와 Nagayama, 1994), pectinase(Wasfy 등, 1978), oxidase, polygalacturonase 및 laccase 등(Tonukari 등, 2000)의 세포벽 분해효소가 병원성과 깊은 관련이 있다고 보고되고 있다. 하지만 이들 주장에 대한 반대 결과도 많이 보고되고 있는 실정이다(김 등, 1997; Edlich 등, 1988; Elad 등, 1995). 병원성과 관련하여 또 다른 기작으로 많이 연구되고 있는 것이 저분자량의 phytotoxin이다. Rebordinos 등(1996)은 *B.*

*Corresponding author

Phone) +82-42-860-7436, Fax) +82-42-861-4913

E-mail) kjinc@kriict.re.kr

*cinerea*의 배양 여액으로부터 botrydial과 dihydrobotrydial을 분리하였으며, 이 두 phytotoxin이 *in vivo*상에서 병을 일으키는데 중요한 역할을 할 것이라고 보고하였다. Deighton 등(2001)은 *B. cinerea*에 감염된 식물에서 botrydial을 검출하였으며, 균주의 병원성 정도와 botrydial의 농도 사이의 관련성을 조사하였다. 그 결과 병반크기와 botrydial 농도 사이에는 상관관계가 없었다. 따라서 botrydial은 병원성과 연관성은 있지만, 병 진행 과정에서 일차적인 요인으로 작용하는 것은 아닐 것으로 추정하였다. Cutler 등(1993)은 *B. cinerea*로부터 생물활성을 가지는 새로운 phytotoxin을 분리하여 botcinolide로 명명하였고, Collado 등(1995)은 *B. cinerea*를 진탕배양하여 10-oxo-dihydrobotrydial, 4 β -acetoxy-9 β -10 β -15 α -trihydroxyprobotrydial, β -O-methyl-dihydrobotrydial 및 α -O-methyldihydrobotrydialone 등 4가지 새로운 대사산물을 분리하였다.

본 연구실에서는 *B. cinerea*의 병원성 기작을 연구하던 중 2개의 새로운 phytotoxin을 발견하였다. 이에 따라 본 논문에서는 이들의 분리·정제, 구조 결정 및 생물활성에 대하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용 균주. 실험에 사용한 *B. cinerea*는 1994년부터 1996년 2월 사이에 대전, 논산, 부여 등의 오이(*Cucumis sativus*), 토마토(*Lycopersicon esculentum*), 딸기(*Fragaria xananassa*)의 시설재배 포장으로부터 이병주를 채집하여 실험실에서 분리하여 보관중인 것으로 기주별, 지역별, 형태적 특성에 따라 25개의 균주를 선발한 뒤 단포자 분리를 하여 4°C 저온실에 보관하였다.

균사 성장 속도. 균사의 성장 속도를 조사하기 위한 배지로는 감자한천배지(potato dextrose agar, PDA: Becton and Dickinson Company)를 사용했으며, 4°C에 보관 중이던 공시 균주를 1회 계대배양 후 균총의 가장자리로부터 직경 5 mm 한천 절편을 만들어 접종원으로 사용하였다. 균을 접종한 배지는 20°C 배양기에서 3일간 배양한 다음, 균총의 직경을 측정하여 생육 속도를 구하였다. 모든 실험은 5반복으로 실시하였다.

병원성 검정. 병원성 검정은 20±5°C에서 4주간 재배한 오이, 배추(*Brassica campestris*), 담배(*Nicotiana tabacum*), 고추(*Capsicum annuum*), 토마토 유묘를 이용하였다. 선발균주들을 PDA에 접종하여 20°C에서 3일간 배양한 후 10-15일간 광조건에서 포자형성을 유도하였다. 수확한 포자를 1×10⁵ conidia/ml로 조절하여 포자 현탁액을 접종원으로 사용하였다. 접종한 식물은 20°C, 상대습도 95% 이

상의 항온 항습실에서 3일간 발병을 유도한 후 발병률을 조사하였다. 병원성은 육안으로 관찰한 병반면적율(%)로 하였으며, 모든 실험은 3반복으로 실시하였다.

Leaf-wounding 분석을 통한 phytotoxicity 조사. 25개의 *B. cinerea* 균주를 이용하여 식물에 대한 독소 생성 여부 및 최대 독소 생산 균주를 선발하기 위하여 균 배양 여액을 이용한 leaf-wounding assay(Kim 등, 2000)를 실시하였다. 5% glucose, 0.1% yeast extract, 0.05% KH₂PO₄, 0.2% NaNO₃, 0.05% MgSO₄·H₂O, 0.001% FeSO₄·7H₂O로 구성된 변형된 Czapek-Dox broth(CDB: Becton and Dickinson Company, Sparks, Maryland, U.S.A) 배지 100 ml이 담긴 250 ml 삼각플라스크에 *B. cinerea* 균주를 각각 접종(포자 현탁액 1×10⁵ conidia/ml)하여 14일간 정치 배양하였다. 배양 후 4겹의 거즈를 이용하여 균사체를 제거한 후 배양 여액을 획득하였다. 온실에서 재배한 담배의 3엽을 떼어 5 cm 크기로 잘라 잎 표면에 바늘로 상처를 낸 후, 상처 당 10 μ l씩 배양 여액을 접종하였다. 대조구에는 균을 접종하지 않은 배지를 처리하였다.

B. cinerea 2-16 균주로부터 분리한 두 물질의 식물에 대한 독성 실험은 온실에서 한 달간 재배한 담배, 토마토, 보리(*Hordeum vulgare*), 수수(*Sorghum bicolor*), 바랭이(*Digitaria sanguinalis*) 등의 잎을 사용하여 leaf-wounding assay를 실시하였다. 시료는 10% acetone을 사용하여 용해하였고, 농도는 37, 111, 333 및 1,000 μ g/ml로 조정하였다. 대조구는 10% acetone을 사용하였다. 처리한 잎은 여과지를 깔아 습도를 유지시킨 Petri dish(또는 키친 타월을 깔아 습도를 유지시킨 사각 상자)에 넣고 밀봉한 후 25°C에서 72시간 보관하고 독성 정도를 평가하였다. 실험은 6반복으로 실시하였다.

항균물질의 분리. 식물에 대해 강력한 독성을 가진 *B. cinerea* 2-16 균주로부터 phytotoxin을 분리하였다. *B. cinerea* 2-16 균주의 포자(농도: 1×10⁴ conidia/ml)를 변형된 CDB배지에 접종한 후 20°C에서 14일간 총 8 l를 배양하였다. 배양액(8 l)을 거즈로 여과한 후 HCl 용액으로 pH 2.0에 맞춘 뒤 동량의 ethyl acetate, *n*-butanol 순서로 각각 2회 추출 및 분획하여 ethyl acetate 분획물, *n*-butanol 분획물을 얻었다. Leaf-wounding assay를 통하여 ethyl acetate 분획물(16.42 g)이 식물에 대해 독성을 나타내는 것을 확인하였고, ethyl acetate 분획물로부터 phytotoxin을 분리하기 위하여 flash silica gel column chromatography를 실시하였다. 시료를 용해한 후 300 g의 silica gel(Kiesel gel 60, 70-230 mesh: Merck, Darmstadt, Germany)이 충전된 진공펌프용 funnel에 가한 다음 *n*-hexane, *n*-hexane: EtOAc(3:1, 1:1, 1:3, v/v) 및 EtOAc 등을 이용하여 용출

하고 농축하였다. 각 분획물을 담배 잎에 대해 leaf-wounding assay를 조사한 결과, *n*-hexane:EtOAc(1:1) 층과 *n*-hexane:EtOAc(1:3) 층에서 활성이 나타났으며, 활성이 있는 시료를 모아 농축한 결과 4.67 g의 시료를 획득하였다. 이 시료를 silica gel column(6 cm×60 cm; Kiesel gel 60, 230-400 mesh, 200 g; E. Merck)에 가한 다음 CHCl₃-CH₃OH (95:5, v/v)로 용출하여 4개의 소획분(F1-F4)을 얻었다. TLC 분석 결과와 leaf-wounding assay 결과를 토대로 활성분획들(F2, F3)을 모아 농축하여 780 mg의 시료를 획득하였다. 이 시료를 Sephadex LH-20 column chromatography (CH₂Cl₂:CH₃OH=9:1, v/v)하여 분획하였고, leaf-wounding assay를 통하여 활성이 있는 시료들을 합하였다. 이 column chromatography를 통하여 얻은 활성분획은 CHCl₃-CH₃OH (9:1, v/v)을 전개용매로 한 TLC 분석에서 단일 spot으로 보였지만, toluene:EtOAc:formic acid(5:4:1, v/v/v) 용매 조건에서는 2가지 물질로 나타났다. 따라서, 두 개의 물질을 각각 분리하기 위하여 toluene:EtOAc:formic acid(5:4:1, v/v/v) 조건으로 preparative TLC(20×20 cm, 0.5 mm, Kiesel gel 60, F₂₅₄; E. Merck)를 실시하였다. 또한 분리된 물질을 순수하게 정제하기 위하여 preparative HPLC(SCL-10A VP; Shimadzu Co., Kyoto, Japan)를 이용하여 최종 정제를 행하였다. 이때 사용한 column은 Shim-pack prep-ODS(20 mm×250 mm; Shimadzu Co.)였으며, photodiode array detector(SPD-M10A VP; Shimadzu Co.)를 이용하여 230 nm에서 분석하였다. 시료의 용출은 MeOH-H₂O(75:25, v/v)로 용출하였는데 이때의 유속은 10 ml/min 이었다. 이 과정을 통하여 각각 78.6 mg, 50.7 mg의 GJK-1, GJK-2 물질이라 명명된 물질을 분리하였다.

스펙트럼 측정. 분리한 물질들의 구조 분석을 위하여 질량분석은 double-focusing high-resolution(HR) mass spectrometer(JEOL JMS DX-303; JEOL Ltd, Tokyo, Japan)로 electron impact(EI) mode, chemical ionization(CI) mode에서 분석하였고, fast atom bombardment(FAB) mass 방법으로 분자량을 측정하였다. 시료의 matrix로는 glycerol 과 Xe를 혼합액으로 사용하였다. 핵자기공명(¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT, ¹H-¹H COSY, HMQC, HMBC) 분석은 Bruker AMX-500(500 MHz) NMR spectrometer(Bruker Analytische Messtechnik GmbH, Rheinstetten, Germany)로 측정하였다. 시료는 CD₃OD에 녹여 측정하였으며 내부표준 물질로는 TMS(Trimethyl silane; Cambridge isotope laboratory, Inc., USA)를 기준물질로 사용하였다.

전해질 누출 실험. 온실에서 한 달간 재배한 담배 잎을 이용하여 전해질 누출 실험을 수행하였다. 1% sucrose 가 첨가된 1 mM MES buffer[2-(N-morpholino) ethanesulfonic

acid, pH 6.5] 7 ml에 담배 잎에서 잘라낸 직경 7 mm의 잎 조각을 40개씩 넣은 후 1% acetone에 용해한 추출시료를 0.5 mM의 농도로 처리하였다. 대조구로는 1% acetone을 사용하였다. 처리한 Petri dish는 암상태의 25°C에서 배양하며 conductivity meter(Denki Kagaku Keiki Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하여 배지의 전기 전도도를 정기적으로 측정하였다. 처리당 3반복씩 실시하였다.

결과 및 고찰

균주 선발 및 균사 생장 속도 측정. *B. cinerea*가 생산하는 phytotoxin이 병원성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 본 실험실에 보관중인 균주 중 기주, 지역, 균사 생장 속도 및 형태적 특성 등에 따라 25균주를 선발하였다 (Table 1). 선발된 균주는 단포자 분리를 실시한 후 4°C에

Table 1. Isolates of *Botrytis cinerea* used in this study^a

Isolate	Host plant	Collection site	Mycelial growth (mm ²) ^b	Culture type
1-38	Tomato	Buyeo	69±1.2	Sclerotium
2-4	Tomato	Buyeo	71±1.1	Sclerotium
2-16	Tomato	Buyeo	68±0.6	Mycelium
C1	Cucumber	Buyeo	49±1.6	Spore
C19	Cucumber	Buyeo	5±4.3	Mycelium
H9	Tomato	Buyeo	74±2.1	Sclerotium
H30	Tomato	Buyeo	24±7	Mycelium
H42	Tomato	Buyeo	66±2.2	Sclerotium
K12	Strawberry	Nonsan	70±0.6	Sclerotium
K23	Strawberry	Nonsan	73±1.7	Mycelium
KJ	Strawberry	Daejeon	54±1.7	Spore
KOH46	Tomato	Buyeo	66±1.0	Spore
KOH76	Tomato	Buyeo	65±1.3	Mycelium
NSS3	Strawberry	Nonsan	69±1.8	Sclerotium
NSS106	Strawberry	Nonsan	70±1.2	Sclerotium
NSS111	Strawberry	Nonsan	69±1.2	Sclerotium
NY09	Strawberry	Nonsan	65±2.0	Sclerotium
NY23	Strawberry	Nonsan	44±5.5	Mycelium
NY76	Strawberry	Nonsan	64±1.6	Sclerotium
OH29	Tomato	Buyeo	72±1.1	Sclerotium
OH44	Tomato	Buyeo	39±4.1	Mycelium
P74	Strawberry	Nonsan	72±1.4	Sclerotium
P103	Strawberry	Nonsan	73±1.8	Mycelium
SJ28	Strawberry	Daejeon	42±1	Sclerotium
SJ58	Strawberry	Daejeon	61±1.6	Mycelium

^aMycelial growth was examined after incubation on potato dextrose agar medium for 3 days at 20°C.

^bValues followed by standard deviation are the means of five replicates each.

Table 2. Pathogenicity of *Botrytis cinerea* on several host plants^a and their phytotoxicity on tobacco leaves

Isolate	Pathogenicity ^b					Phyto-toxicity ^c
	Cucumber	Tomato	Pepper	Tobacco	Chinese cabbage	
1-38	85	83	90	77	27	0
2-4	90	90	90	77	18	0
2-16	90	85	90	80	18	4.7±0.8
C1	50	57	82	25	3	2.5±0.1
C19	60	1	45	1	1	0
H9	67	70	83	80	33	0
H30	2	2	3	7	1	0
H42	90	63	90	90	23	0.2±0.2
K12	85	73	90	88	20	0
K23	88	80	88	80	20	4.3±0.7
KJ	7	5	7	1	1	0
KOH46	45	50	40	25	5	1.3±0.9
KOH76	83	67	90	68	18	4.5±0.9
NSS3	88	43	90	37	53	0
NSS106	90	63	90	88	33	0
NSS111	90	70	90	88	17	0
NY09	83	80	90	90	22	0
NY23	73	77	90	81	15	0
NY76	90	70	90	81	30	0
OH29	90	77	88	90	30	0
OH44	63	83	90	88	15	0
P74	53	73	90	90	30	0
P103	50	70	90	70	20	3.4±0.5
SJ28	50	80	90	70	23	0
SJ58	90	80	85	80	20	4.5±1.0

^aPots of plant were inoculated with a conidial suspension (1×10^5 conidia/ml) and then incubated for 3 days in a humidity chamber.

^bPathogenicity was evaluated by measuring the disease area percentage 3 days after inoculation. Values are the means of three replicates each.

^cThe 5 cm sections of tobacco of leaves were placed on moistened filter papers in Petri dishes and incubated at 25°C for 3 days. A 10 µl aliquot of each culture filtrate was applied onto each pin hole, which was made by wounding centers of detached leaves with a pin. After incubation for 3 days, lesion sizes formed around pin holes were measured. Values followed by standard deviation are the means of six replicates each.

서 보관하며 실험에 사용하였다. 이들 균주를 이용하여 균사 성장 속도를 조사한 결과 Table 1에서 보는 바와 같이 74 mm²의 균총의 크기를 보인 H9 균주가 가장 균사 성장 속도가 빠른 것으로 나타났고, 5 mm²의 균총의 크기를 보인 C19 균주의 균사 성장 속도가 가장 느린 것으로 나타났다.

병원성 검정. 선별된 25균주를 이용하여 병원성 실험

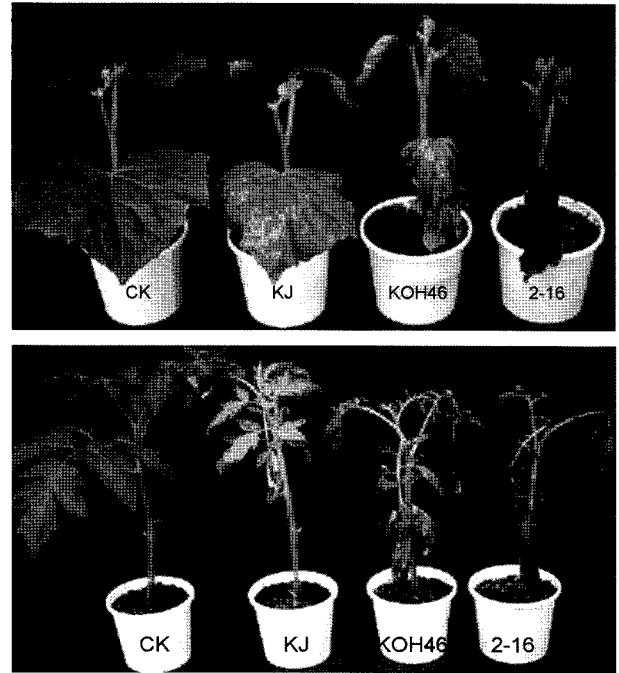


Fig. 1. Pathogenicity of several isolates of *Botrytis cinerea* on cucumber (**top**) and tomato (**bottom**). Pots of plant were inoculated with conidial suspensions (1×10^5 conidia/ml) and then incubated for 3 days in a humidity chamber.

을 실시한 결과 Table 2에서 보는 바와 같이 선별된 25 균주 중 22균주가 오이, 배추, 담배, 고추, 토마토에 잿빛 곰팡이병을 일으키는 것을 관찰하였다. 감염 증상은 초기에 수침상의 소형 병반이 생기고 점차 병반의 크기가 커지면서 접종 3일 후에는 조직이 무르게 되고, 5일 후에는 병반상에 회갈색의 포자가 생성되는 것을 확인하였다. 접종한 기주식물 중에서는 고추가 가장 감수성이었고, 배추의 감수성이 가장 낮았다. 또한 Fig. 1은 오이와 토마토에서의 발병 형태를 나타내는 것으로서, 병원성이 강한 2-16 균주, 병원성이 중간 정도인 KOH46 균주, 병원성이 약한 KJ 균주와 아무것도 접종하지 않은 대조구를 보여 주고 있다. 이 결과를 바탕으로 균사 성장 속도와 병원성 간의 관계를 확인해 본 결과, 가장 생육이 느렸던 C19 균주는 오이와 고추에서 60%와 45%의 발병률을 보이는 반면, 54 mm²의 균총의 크기를 나타낸 KJ 균주는 모든 기주 식물에서의 발병률이 매우 낮은 것으로 보아 균사의 성장과 병원성간에는 뚜렷한 상관관계가 없는 것으로 사료된다.

Phytotoxicity 조사. 담배 잎을 이용한 leaf-wounding assay를 통해 phytotoxicity를 조사한 결과, *B. cinerea* 균주 중 변형된 CDB배지에서 phytotoxin을 생산하는 균주는 총 8주로 확인되었으며, 2-16 균주가 가장 강력한

phytotoxicity를 나타내었다(Table 2). Phytotoxicity가 가장 강한 2-16, K23, KOH76, P103 그리고 SJ58의 5균주는 모든 기주에서 강력한 병원성을 나타내는 것으로 확인이 되었다. 이들 5균주 외에 C1, H42 그리고 KOH46 균주 등도 약한 phytotoxicity를 보였고, 나머지 17균주는 leaf-wounding assay에서 전혀 활성을 보이지 않았다. 이 결과를 종합하여 병원성도 강하면서 phytotoxicity 활성이 강한 2-16 균주를 선발하여 이후의 실험에 사용하였다.

분리한 phytotoxin의 구조 동정. *B. cinerea* 2-16 균주의 배양액으로부터 분리한 GJK-1과 GJK-2 물질의 구조 동정은 FAB질량분석, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ (Table 3), $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$, HMQC 그리고 HMBC 분석을 통하여 화학적인 구조분석을 시도하였다. GJK-1은 EI mode로 질량분석시 분자이온을 확인할 수 없었으므로, CI mode로 질량분석을 실시한 결과 $[\text{M-H}_2\text{O}+\text{C}_3\text{H}_5]^+$ 은 m/z 495에서 나타났고, $[\text{M-H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ 은 m/z 455에서 나타나 GJK-1의 분자량은 472

Table 3. NMR data of 3-*O*-acetyl botcinol and 3-*O*-acetyl botcinolide in CD_3OD

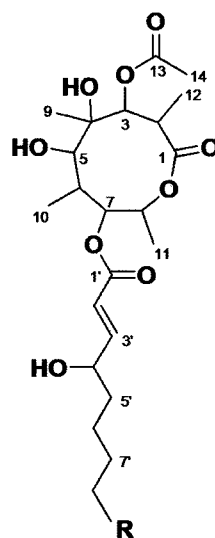
Position	3- <i>O</i> -acetyl botcinol		3- <i>O</i> -acetyl botcinolide	
	$^1\text{H}(J=\text{Hz})^b$	$^{13}\text{C}^a$	$^1\text{H}(J=\text{Hz})$	^{13}C
1	-	177.8 (s)	-	177.8 (s)
2	2.90 (dq, 3.8, 7.1)	40.8 (d)	2.90 (dq, 4, 7.1)	40.8 (d)
3	5.07 (d, 3.8)	78.1 (d)	5.07 (d, 4)	78.1 (d)
4	-	79.7 (s)	-	79.7 (s)
5	3.15 (d, 10.5)	72.9 (d)	3.15 (d, 10.5)	72.9 (d)
6	1.8 (m)	39.4 (d)	1.80 (m)	39.4 (d)
7	4.26 (dd, 9.7, 10.6)	78.1 (d)	4.26 (br.t, 10, 10.5)	78.1 (d)
8	3.56 (m)	69.4 (d)	-	69.4 (d)
9	1.24 (s)	14.8 (q)	5.93 (dd, 1.5, 15.5)	14.8 (q)
10	0.86 (d, 6.3)	14.6 (q)	6.89 (dd, 4.5, 15.5)	14.6 (q)
11	0.93 (d, 6.1)	18.1 (q)	4.23 (m)	18.1 (q)
12	1.10 (d, 7.1)	16.5 (q)	1.43 (m)	16.5 (q)
13	-	172.8 (s)	1.77 (m)	172.8 (s)
14	2.05 (s)	20.8 (q)	1.77 (m)	20.8 (q)
1'	-	167.7 (s)	-	167.7 (s)
2'	5.93 (dd, 1.7, 15.6)	120.1 (d)	5.93 (dd, 1.5, 15.5)	120.1 (d)
3'	6.89 (dd, 4.8, 15.6)	153.7 (d)	6.89 (dd, 4.5, 15.5)	153.7 (d)
4'	4.23 (m)	71.6 (d)	4.23 (m)	71.5 (d)
5'	1.42 (m), 1.22 (m)	26.4 (d)	1.43 (m)	37.2 (t)
6'	1.46 (m)	37.5 (t)	1.77 (m)	28.7 (t)
7'	1.22 (m)	32.93 (t)	1.77 (m)	23.6 (t)
8'	1.22 (m)	30.28 (t)	0.82 (br.t, 7.2)	14.4 (q)
9'	1.22 (m)	23.64 (t)	-	-
10'	0.81 (t, 7.1)	14.4 (q)	-	-

^a125 MHz.

^b500 MHz.

dalton으로 추정되었다. FAB-mass 결과 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 은 m/z 495에서 나타나 분자량이 472 dalton인 것으로 결정되었다. 정확한 구조를 결정하기 위하여 $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ 분석을 실시한 결과, $^1\text{H-NMR}$ 분석에서 하나의 primary methyl group이 존재함을 알 수 있었고(Table 3), $^{13}\text{C-NMR}$ 분석에서 탄소수가 24개이며, 3개의 carboxyl group(δC 177.8 ppm, 172.8 ppm, 167.7 ppm)이 존재하는 것이 관찰되었다(Table 3). $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ 결과의 대부분은 Cutler와 Parker(1996)가 보고한 botcinol과 거의 유사한 것으로 나타났는데, 다만 GJK-1 물질에는 acetyl group(δC 172.8 ppm, δC 20.8 ppm, δH 2.05 ppm)이 하나 더 존재하는 것으로 나타났다. $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$ 분석을 통하여 양성자들 사이의 cross peak를 관찰하였다. 이상의 결과들을 정리한 결과, H-2와 H-3의 chemical shift가 각각 δH 2.74 ppm과 3.57 ppm에서 δH 2.90 ppm과 5.07 ppm으로 이동한 반면에 다른 수소들의 chemical shift는 변하지 않아 3번 위치에 acetyl group이 연결된 것을 확인할 수 있었고, GJK-1을 3-*O*-acetyl botcinol로 동정하였다(Fig. 2).

GJK-2 물질도 EI mode에서 분자이온을 확인할 수 없어 CI mode로 질량분석을 실시한 결과, $[\text{M-H}_2\text{O}+\text{C}_3\text{H}_5]^+$ 은 m/z 467에서 나타났고, $[\text{M-H}_2\text{O}+\text{C}_2\text{H}_5]^+$ 은 m/z 455, $[\text{M}+\text{H}]^+$ 은 m/z 445에서, $[\text{M-H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ 은 m/z 427에서, $[\text{M-2H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ 은 m/z 409에서 그리고 $[\text{M-2H}_2\text{O}+\text{COCH}_3]^+$ 은 m/z 367에서 나타나 분자량이 444 dalton으로 추정되었다. FAB-mass 분석시 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 은 m/z 467에서 확인이 되어 분자량은 444 dalton으로 결정되었다. 또한 $^1\text{H-}$, $^{13}\text{C-NMR}$,



3-*O*-acetyl botcinol (1) R = CH_2CH_3

3-*O*-acetyl botcinolide (2) R = H

Fig. 2. Chemical structures of 3-*O*-acetyl botcinol (1) and 3-*O*-acetyl botcinolide (2).

¹H-¹H COSY, HMBC, DEPT 135° 등의 핵자기 공명분석을 실시한 결과 ¹H-NMR에서는 GJK-2가 하나의 primary methyl group과 세 개의 secondary methyl group 및 두 개의 tertiary methyl group 등 총 6개의 methyl group을 가지고 있는 것으로 나타났다(Table 3). ¹³C-NMR 분석에서는 22개의 탄소 peak가 나타났으며, 구조 내에 3개의 carboxyl group(δ_c 177.8 ppm, 172.8 ppm, 167.7 ppm)이 존재함을 알 수 있었다(Table 3). ¹H-¹³C COSY와 DEPT 135° 분석을 통해 각각의 탄소에 붙어있는 수소를 결정지은 후 ¹H-¹H COSY 결과 및 3-O-acetyl botcinol 구조와 Collado 등(1996)이 보고한 3-O-acetyl-2-epibotcinolide의 결과를 근거로 탄소골격을 결정하였다. Botcinolide(Cutler 등, 1993; Jacyno, 1994)와 비교하였을 경우 GJK-2 물질은 acetyl group의 추가 외에 2번 탄소와 3번 탄소에 붙어있는 수소(H-2와 H-3)의 chemical shift 변화(δ_{H-2} 2.74에서 2.90으로, δ_{H-3} 3.57에서 5.07) 외에는 일치하였다. 그러나 3-O-acetyl-2-epibotcinolide(Collado 등 1996)와 비교했을 경우에는 H-2와 H-3 사이의 coupling constant, 즉 $J_{2,3}$ 에 큰 차이가 있었다. 즉, 3-O-acetyl-2-epibotcinolide의 $J_{2,3}$ 은 9.5 Hz인 반면에 GJK-2 물질의 $J_{2,3}$ 은 4.0 Hz였다. H-2, H-3 및 H-6 chemical shift에도 변화가 있었다. 따라서, GJK-2는 botcinolide 3번 탄소에 acetyl group이 붙어 있는 3-O-acetyl-2-epibotcinolide와 epimer 관계에 있는 물질로서 3-O-acetyl botcinolide로 동정되었다(Fig. 2).

Cutler 등(1993)은 botcinol과 botcinolide를 보고한 바 있으며, Collado 등(1996)은 botcinolide의 여러 유도체를 분리, 동정하였다. 이번 실험에서 분리한 3-O-acetyl botcinol과 3-O-acetyl botcinolide는 Cutler 등(1993)이 보고한 botcinol과 botcinolide의 3번 탄소에 각각 acetyl기가 붙어 있으며 3-O-acetyl botcinolide는 3-O-acetyl-2-epibotcinolide(Collado 등, 1996)와 비교했을 경우에는 H-2와 H-3 사이의 coupling constant, 즉 $J_{2,3}$ 에 차이가 있었으며 H-2, H-3 및 H-6 chemical shift에도 변화가 있었다. 따라서 GJK-2는 botcinolide 3번 탄소에 acetyl기가 붙어 있는 3-O-acetyl-2-epibotcinolide와 epimer 관계에 있는 물질로서 3-O-acetyl botcinolide로 동정되었다. 그 밖에 Collado 등(1995)이 *B. cinerea*를 진탕배양하여 10-oxo-dihydrobotrydial, 4 β -acetoxy-9 β -10 β -15 α -trihydroxyprobotrydial, β -O-methyl-dihydrobotrydialone 및 α -O-methyl dihydrobotrydialone를 보고하였고, Rebordinos 등(1996)이 botrydial과 dihydrobotrydial, 그리고 botrydial 등을 보고하는 등 *B. cinerea*의 독성 대사산물에 대한 연구가 꾸준히 진행되어 왔다. 하지만 3-O-acetyl botcinol과 3-O-acetyl botcinolide에 대한 보고는 이번이 최초이다.

Table 4. Phytotoxicity of 3-O-acetyl botcinol and 3-O-acetyl botcinolide in a leaf-wounding assay^a

Plant	Conc. (μ g/ml)	Lesion size (mm)	
		3-O-acetyl botcinol	3-O-acetyl botcinolide
Tobacco	37	0 ^b	0.1 \pm 0.2
	111	0.9 \pm 0.9	0.6 \pm 0.4
	333	2.9 \pm 1.5	2.5 \pm 1.2
	1,000	4.1 \pm 0.3	4.7 \pm 1.3
Tomato	37	0	0
	111	0.2 \pm 0.4	0
	333	3.4 \pm 1.0	1.5 \pm 1.4
	1,000	3.8 \pm 1.6	4.5 \pm 0.3
Barley	37	0	0
	111	0	0
	333	0.2 \pm 0.1	0
	1,000	1.5 \pm 0.7	0
Grain sorghum	37	0	0
	111	0	0
	333	0	0
	1,000	2.5 \pm 0.7	0
Large crab grass	37	0	0
	111	0.2 \pm 0.2	0.2 \pm 0.2
	333	0.3 \pm 0.2	0.3 \pm 0.2
	1,000	1.1 \pm 0.8	1.9 \pm 1.7

^aThe 5 cm sections of leaves of tobacco, tomato, barley, grain sorghum and large crab grass were placed on moistened filter papers in Petri dishes and incubated at 25°C for 3 days. A 10 μ l aliquot of each solution of two phytochemicals was applied onto each pin hole, which was made by wounding centers of detached leaves with a pin. After incubation for 3 days, lesion sizes formed around pin holes were measured.

^bValues are the means \pm standard deviations of six replicates each.

분리된 물질의 생리활성 검정. *B. cinerea* 2-16 균주로부터 분리한 3-O-acetyl botcinol과 3-O-acetyl botcinolide의 leaf-wounding assay를 통하여 식물에 대한 활성 정도를 조사한 결과, 3-O-acetyl botcinol은 실험한 모든 식물체에 독소 활성을 보였다(Table 4). 특히 담배와 토마토 잎에 강한 독소활성을 보였다. 반면 3-O-acetyl botcinolide는 담배와 토마토, 그리고 바랭이에 대해 독소 활성을 보였으나, 보리와 수수에 대해서는 1000 μ g/ml 수준에서도 전혀 독소 활성을 보이지 않았다. 따라서 3-O-acetyl botcinol이 3-O-acetyl botcinolide 보다는 본 실험에서 사용한 5종류의 식물에 대한 독성이 강한 것으로 나타났다.

전해질 누출 실험에서는 두 물질을 각각 0.5 mM의 농도로 처리했을 때, 처리 후 조금씩 증가하기 시작해 처리 54시간 뒤에는 3-O-acetyl botcinol은 201 μ mo/cm, 3-O-

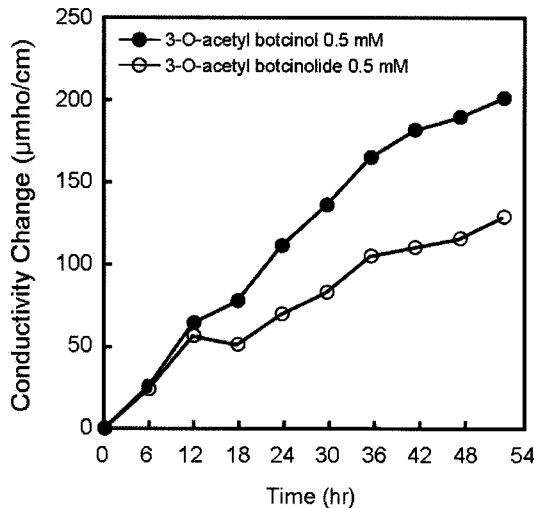


Fig. 3. Effects of 3-O-acetyl botcinol and 3-O-acetyl botcinolide on electrolyte leakage from the leaf tissues of tobacco.

acetyl botcinolide은 129 $\mu\text{mho/cm}$ 에 도달했다(Fig. 3). 이런 현상은 반응 60시간 이후까지 지속되었다. 본 실험에서도 3-O-acetyl botcinol이 3-O-acetyl botcinolide보다 phytotoxicity가 강함을 알 수 있었다. Cutler 등(1997)은 botcinol과 botcinolide를 비교하여 phytotoxicity를 조사한 결과 botcinol이 botcinolide보다 활성이 크다고 보고하였다. 따라서 본 실험 결과와 함께 생각할 때 3번 탄소의 acetyl기의 존재 여부에 상관없이 botcinol이 botcinolide보다 phytotoxicity가 크며, 이것은 side chain의 길이가 toxicity 발현에 중요하다는 것을 나타낸다.

이상의 결과 고추, 토마토, 오이, 담배 등의 다양한 식물체에 강력한 병원성을 보이는 *B. cinerea* 2-16 균주로부터 새로운 두 개의 phytotoxin인 3-O-acetyl botcinol과 3-O-acetyl botcinolide을 분리 동정하였다. 이들 두 물질은 leaf-wounding assay와 전해질 누출실험에서 phytotoxicity를 보였으며, 두 물질 중 3-O-acetyl botcinol이 3-O-acetyl botcinolide보다 활성이 강한 것으로 나타났다. 이것은 hydroxy fatty acid chain에서 길이가 길수록 활성이 강하다는 것을 나타낸다. 한편, 몇몇 학자들은 phytotoxin이 *B. cinerea*의 병원성과 관련이 있다고 보고하였다(Deighton 등, 2001; Rebordinos 등, 1996). 앞으로 본 연구에서 처음으로 보고하는 두 개의 phytotoxin이 병원성과 관련이 있는지에 대한 연구를 진행할 예정이다.

요 약

*Botrytis cinerea*가 생산하는 phytotoxin이 병원성에 미치는 영향을 조사하던 중에 두 개의 새로운 phytotoxin을

발견하였다. 1994년과 1996년에 여러 식물체로부터 분리한 *Botrytis cinerea* 균주들을 기주별, 지역별, 형태적 특성별로 25개의 균주를 선별한 후 단포자 분리를 실시하였다. 22균주는 오이, 토마토, 고추, 담배, 배추 등 5가지 식물에 대해 강하거나 중간 정도의 병원성을 보였다. 그러나 KJ 균주를 포함한 3균주는 병원성이 매우 약하였다. 식물에 대한 phytotoxicity를 조사하기 위하여 25균주의 배양 여액을 담배잎에 leaf-wounding assay를 실시한 결과 2-16균주가 가장 강한 활성을 보였다. 따라서 2-16 균주의 배양액을 ethyl acetate로 추출한 후 flash silica gel column chromatography, silica gel column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography, preparative TLC 및 preparative HPLC 등을 통하여 두 개의 phytotoxin을 분리하였다. 분리한 phytotoxin을 질량분석과 핵자기 공명 분석을 통해 구조동정을 실시한 결과 3-O-acetyl botcinol과 3-O-acetyl botcinolide로 동정하였다. 두 개의 물질은 leaf-wounding bioassay에서 잎에 피사를 일으켰으며, 또한 담배 잎에서 심각한 전해질 누출을 일으켰다. 두 생물검정에서 3-O-acetyl botcinol이 3-O-acetyl botcinolide보다 강한 활성을 보였다. *B. cinerea*가 생산한 두 개의 phytotoxin에 대해서는 본 논문에서 처음으로 보고하는 바이다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 바이오그린21사업(과제번호: 2007031034004)의 지원에 의해 이루어진 것임.

참고문헌

- Collado, I. G., Hernandex-Galan, R., Duran-Patron, R. and Cantoral, J. M. 1995. Metabolites from a shake culture of *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 38: 647-650.
- Collado, I. G., Aleu, J., Hernandez-Galan, R. and Hanson, J. R. 1996. Some metabolites of *Botrytis cinerea* related to botcinolide. *Phytochemistry* 42: 1621-1624.
- Cutler, H. G., Jacyno, J. M., Harwood, J. S., Dulik, D., Goodrich, P. D. and Roberts, R. G. 1993. Botcinolide: A biologically active natural product from *Botrytis cinerea*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57: 1980-1982.
- Cutler, H. G., Parker, S. R., Ross, S. A., Crumley, F. G. and Schpeiner, P. R. 1996. Homobotcinolide: A biologically active natural homolog of botcinolide from *Botrytis cinerea*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60: 656-658.
- Deighton, N., Muchenschnabel, I. and Colmenares, A. J. 2001. Botrydial is produced in plant tissues infected by *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 57: 689-692.
- Dickinson, S. 1969. Studies in the physiology of obligate

- parasitism. VI. Directed growth. *Phytopathol. Z.* 66: 38-49.
- Edlich, W., Lorenz, G., Lyr, H. and Pommer, E.-H. 1988. Studies on the biochemical basis of resistance against dicarboximide fungicides. *Brighton Crop Protection Conference-Pests and Diseases* 1: 391-396.
- Elad, Y. and Evensen, K. 1995. Physiological aspects of resistance to *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 85: 637-643.
- Jacyno, J. M., Harwood, J. S., Cutler, H. G. and Dulik, D. M. 1994. Structure and solution-state conformation of botcinolide, a new biologically active metabolite from the fungus *Botrytis cinerea*. *Tetrahedron* 50: 11585-11592.
- Kim, J.-C., Choi, G. J., Kim, H. T., Kim, H.-J. and Cho, K. Y. 2000. Pathogenicity and pyrenocine production of *Curvularia inaequalis* isolated from zoysia grass. *Plant Dis.* 84: 684-688.
- 김종진, 김재원, 이창원, 정영륜. 1997. *Botrytis cinerea* 균주들이 생산하는 polygalacturonase, laccase, β -glucosidase의 균주간 활성 및 병원성과의 상관관계. *한국식물병리학회지* 13: 255-231.
- Rebordinos, L., Cantoral, J. M., Prieto, M. V., Hanson, J. R. and Collado, I. G. 1996. The phytotoxic activity of some metabolites of *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 42: 383-387.
- Salinas, J., Warnaar, F. and Verhoeff, K. 1986. Production of cutin hydrolyzing enzymes by *Botrytis cinerea* in vitro. *Phytopathol. Z.* 116: 299-307.
- Sasaki, I. and Nagayama, H. 1994. β -glucosidase from *Botrytis cinerea*: Its relation to the pathogenicity of this fungus. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58: 616-620.
- Tonukari, N. J., Scott-Craig, J. S. and Walton, J. D. 2000. The *Cochliobolus carbonum* SNF1 gene is required for cell wall-degrading enzyme expression and virulence on maize. *Plant Cell* 12: 237-247.
- Van Kan, J. A. L., Van't Klooster, J. W., Wagemakers, C. A. M., Dees, D. C. T. and Van der Vlugtbergmans, C. J. B. 1997. Cutinase A of *Botrytis cinerea* is expressed, but not essential, during penetration of gerbera and tomato. *MPMI* 10: 30-38.
- Wasfy, E. H., Farag, S. A., Tarabieh, M. A. and Abd-Elmoety, S. H. 1978. Studies on enzymes of different strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 92: 168-179.