

두 개의 새로운 phytotoxin의 *Botrytis cinerea* 병원성에서의 역할김금정^{1,2} · 윤미영^{1,2} · 김홍태² · 최경자¹ · 장경수¹ · 최용호¹ · 박명수¹ · 차병진² · 김진철^{1*}¹한국화학연구원 산업바이오화학연구센터, ²충북대학교 식물외과Role of Two New Phytotoxins in the Pathogenicity of *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, Daejeon 305-605, Korea²Department of Plant Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

(Received on April 2, 2009)

In the course of study on the roles of phytotoxins in the pathogenicity of *Botrytis cinerea*, we isolated two novel phytotoxins. They were identified as 3-*O*-acetyl botcinol and 3-*O*-acetyl botcinolide. In this study, we investigated correlation between the two phytotoxins and the pathogenicity of *B. cinerea*. In liquid cultures, the two phytotoxins were not produced by three low pathogenic isolates out of 25 *B. cinerea* isolates. Among strong or moderate pathogenic isolates, some produced the two phytotoxins, but the others did not. On the other hand, the ethyl acetate extracts of fermentation broths of 10 out of 25 isolates showed phytotoxic activity against various plants tested in a whole plant assay. The phytotoxins were detected in all of the 10 phytotoxic ethyl acetate extracts. *In planta*, the two phytotoxins were detected in all of the plant tissues infected with strong pathogenic isolates. However, there was no correlation between the ability of *B. cinerea* isolates to produce the two phytotoxins and their pathogenicities. The two phytotoxins began to detect in tomato plant tissues infected with *B. cinerea* 2-16 at 3 days after inoculation, increased gradually till 4 days after inoculation, and then decreased. The above results suggest that 3-*O*-acetyl botcinol and 3-*O*-acetyl botcinolide are one of pathogenicity factors for *B. cinerea*, but not a primary determinant of its pathogenicity.

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

최근 농업은 식량작물을 중심으로 하는 발작물 위주의 자급적 농업에서 소득이 높은 채소·화훼 등 원예작물을 중심으로 하는 상업적 농업으로 급격히 변모하여 왔다. 하지만 작물의 시설재배에 있어서 극히 제한적인 재배 여건 때문에 여러 문제점들이 발생하게 되었는데 특히, 잣빛곰팡이병(*Botrytis cinerea*)에 의한 생산량의 감소와 품질의 저하는 현재 우리나라의 시설재배에서 심각한 수준에 있다(Beever과 Pakers, 1993; Coley-Smith 등, 1980).

*B. cinerea*는 전 세계적으로 광범위하게 분포하며 여러 가지 초·목본식물의 꽃, 잎, 줄기, 신초, 과실 등 지상부의 여러 기관을 침입하여 부패 또는 말라 죽게 하는 균

으로써 잣빛곰팡이병을 일으킨다(Agrios, 2005; 권과 손, 2005). 이 병은 저온 다습한 환경에서 발병이 많고 이른 봄부터 발생하여 장마기까지 발생이 계속되다가 여름의 고온 건조기에는 일시적으로 병 발생이 중단 된다. 잣빛곰팡이병원균이 가장 문제시되는 작물로는 딸기 및 각종 채소류이며, 2차적으로 저장, 운송, 판매 과정에 과일류와 채소류의 무름병을 일으키기도 한다(Rosslensbroich과 Stuelbler, 2000; 구 등, 2006). 이러한 잣빛곰팡이병의 방제를 위하여 benzimidazole, dichloran, iprodion, captan 등의 여러 가지 살균제가 제시되고 있지만 대부분의 살균제에 대하여 약제저항성을 나타내기 때문에 살균제에 의한 방제가 어려운 실정에 있다(Talma 등, 1989; Faretra과 Pollastro, 1993). 따라서, 이 병을 효과적으로 방제하기 위해서는 *B. cinerea*가 식물체를 침입하여 병을 유발하는 과정에 대한 많은 연구가 요구된다.

*Corresponding author

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

E-mail) kjinc@kriict.re.kr

*B. cinerea*는 식물체를 감염시킬 때 cutinase의 분비와 압력에 의해 표피를 침입한다고 알려져 있다(Salinas 등, 1986). 또한 Van Kan 등(1997)은 cutinase A가 결여된 mutant를 이용해 cutinase가 기주조직을 침입해서 초기 병을 유발하는데 중요한 역할을 할 것이라고 보고하였다. Sasaki와 Nagayama(1994)는 *B. cinerea*에 감염된 사과 조직에서 cellulolytic enzyme의 생성량을 조사한 결과 β -glucosidase의 활성과 병원성이 상관관계가 있다고 보고한 바가 있으며, 반면 김 등(1997)은 *B. cinerea*가 생산하는 polygalacturonase, laccase, β -glucosidase와 병원성과는 상관관계가 없었으며, 다만 균사생장과 병원성과는 정의 상관관계가 있다고 보고하였다. Wasfy 등(1978)은 cell wall-degrading enzyme인 pectinase가 병원성에 중요하다고 하였으나 다른 연구 결과에서는 이러한 효소의 중요성을 확인할 수 없었다(최 등, 1995; Edlich 등, 1989; Elad 등, 1994). Phospholipase의 분비를 제외하고는 이 균에 대한 병원성을 위한 독소의 생성에 대한 보고는 없었으며(Ellis와 Waller, 1974), Edlich 등(1989)과 Elad와 Evensen(1995)는 감염 과정에서 병원균에 의하여 분비되는 과산화 수소와 같은 활성 산소가 중요한 역할을 한다고 보고한 바가 있다. 그리고 Elad(1992)는 여러 식물에서 *B. cinerea*와 *S. sclerotiorum*의 방제를 위하여 항산화제를 처리한 결과 발병을 억제하였으며 ethylene 생산도 억제되었음을 보고하였다. Poapst 등(1979)은 이 균이 ethylene 생성을 촉진하여 양배추의 노화를 촉진한다고 보고하였다. 따라서 *B. cinerea*에 의한 기주 조직의 감수성을 줄이는 기구로서 ethylene 생합성 및 활성의 억제는 이 병의 방제 효과가 있음이 보고되었다(Elad, 1993; Hoffman, 1988; Sharrock과 Labavitch, 1994).

Rebordinos 등(1996)은 *B. cinerea*의 배양여액으로부터 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 정도에 따른 botrydial의 농도 사이의 관련성을 조사하였다. 그 결과 상처 크기와 botrydial 농도 사이에는 상관관계가 없었다. 따라서 botrydial은 병원성과 연관성은 있지만, 병 진행 과정에서 일차적 요인은 아닐 것이라고 주장하였다. 이처럼 병원균의 침입 및 감염에 중요한 역할을 하는 여러 병원성 요인에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있으나 실험결과가 서로 상반되는 등 병원성과 관련된 직접적인 인자 규명이 어려운 실정이다.

본 연구실에서는 *B. cinerea* 균주의 병원성에 phytotoxin이 어떠한 역할을 하는지에 대한 연구를 수행하던 중에

두 개의 새로운 phytotoxin을 분리하고 동정하였다. 이 두 개의 물질은 질량분석과 핵자기공명분석을 통하여 지금까지 보고되지 않은 3-O-acetyl botcinol과 3-O-acetyl botcinolide로 동정되었다(Kim 등, 2009). 따라서 본 연구에서는 이 두 가지 phytotoxin이 *B. cinerea*의 병원성에서의 역할을 규명하고자 하였다. 이에 따라 본 논문에서는 서로 다른 병원성을 가진 25개의 *B. cinerea* 균주의 두 개의 phytotoxin의 생성능, 병든 식물체에서의 phytotoxin의 정량분석 및 병원성이 가장 강한 2-16균주의 감염시간에 따른 phytotoxin의 양적 변화 등을 보고하는 바이다.

재료 및 방법

사용 균주. 실험에 사용한 *B. cinerea*는 1994년부터 1996년 2월 사이에 대전, 논산, 부여 등의 오이(*Cucumis satibus* L.), 토마토(*Lycopersicon esculentum* Mill.), 딸기(*Fragaria* × *ananassa* Duchesne)의 시설재배 포장으로부터 이병주를 채집하여 실험실에서 분리하여 보관중인 것으로, 기주별, 지역별, 형태적 특성별로 분류하여 25개의 균주를 선발한 뒤 단포자 분리를 하여 4°C 저온실에 보관하며 실험에 사용하였다. 이들 25개 균주의 여러 작물에 대한 병원성은 김 등(2009)에 의해 이미 보고되었다.

균주의 배양과 phytotoxin의 추출. 25개의 *B. cinerea* 균주를 500 ml의 Erlenmeyer flask에 담긴 200 ml의 변형된 Czapek-Dox broth(CDB: Becton and Dickinson Company, Sparks, Maryland, USA) (5% glucose, 0.1% yeast extract, 0.05% KH_2PO_4 , 0.2% NaNO_3 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.001% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)에 1×10^4 conidia/ml의 포자 농도로 접종한 후 20°C에서 14일간 정지 배양하였다. 배양액은 거즈로 여과한 뒤 배양액 150 ml을 동량의 EtOAc로 2번씩 추출하였다. 추출액을 rotary vacuum evaporator로 감압, 농축한 후 CHCl_3 - CH_3OH (2:3, v/v) 5 ml로 용해한 후 1 ml를 취하여 SIM(Selected Ion Monitoring) mode GC/MS 분석을 실시하였다. 나머지 4 ml은 40°C에서 rotary vacuum evaporator로 감압, 농축한 후 7 ml의 acetone(최종농도 50%)과 7 ml의 Tween 20(최종농도 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 첨가하여 다음과 같이 제조 활성 검정을 실시하였다.

GC/MS 분석방법. 본 연구에서는 Shimadzu사의 Shimadzu GC-MS QP5050의 GC-MS를 사용하였다. 분석에 사용된 column은 Supelco사(Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA)의 Supelco SPB-5를 사용하였고, column 길이는 30 m이며 내경은 0.25 μm 이고, stationary phase의 두께는 0.25 μm 를 사용하였다. 운반 기체(carrier gas)는 초고순도(99.999%)의 helium을 사용하였다. Injector 온도

는 300°C, interface 온도는 250°C였으며, column 온도는 120°C에서 5분간 유지한 다음 6°C/min로 온도를 270°C까지 올린 다음 270°C에서 30분간 유지하였다. 유속은 1 ml/min이었다. SIM mode로 정량화 하였으며, 3-O-acetyl botcinol의 target ion은 m/z 379였으며, reference ion은 m/z 351과 208이었다. 3-O-acetyl botcinolide의 target ion은 m/z 351이었으며, reference ion은 m/z 323과 208이었다.

배양추출물의 제조활성 조사. 25개 균주의 ethyl acetate 추출물에 대하여 10종의 식물체에 대하여 제조활성을 조사하였다. 표면적 350 cm² 사각포트에 풍건 마쇄한 발토 양을 일정량씩 담고 파종구를 만들어 잡초종자를 파종 후 복토(0.5~1.0 cm)하였다. 잡초종자는 종류별로 휴면타파 및 보관방법이 다르지만 모두 발아력이 90% 이상인 것을 사용하였다. 수수(*Sorghum bident*), 돌피(*Echinochloa crusgalli*), 개밀(*Agropyron smithii*), 바랭이(*Digitaria sanguinalis*), 미국개기장(*Panicum decompositum*) 등 화본과 5종과 까마중(*Solanum nigrum*), 자귀풀(*Aeschynomene indica*), 어저귀(*Abutilon theophrasti*), 도꼬마리(*Xanthium strumarium*) 등 광엽 4종을 포함하여 총 9가지 잡초를 사용하였다. 파종 10일 후에 배양액 14 ml에 Tween 20을 1,000 µg/ml 수준으로 첨가한 다음 엽면 살포하였고, 처리 후 온실(25±5°C)에서 14일 동안 식물체를 키운 다음 제조활성을 달관 조사하였다(Faust 등, 1985).

병든 조직에서의 3-O-acetyl botcinol과 3-O-acetyl botcinolide의 분석. 배지에서 뿐만 아니라 8개의 *B. cinerea* 균주를 선발하여 식물체에 접종한 후 병든 조직에서 두 물질의 생성여부를 조사하기 위하여 PDB 배지에 1×10^5 conidia/ml로 *B. cinerea*의 포자를 조절한 후 오이(*Cucumis satibus* L.)와 토마토(*Lycopersicon esculentum* Mill.) 잎에 분무하여 접종하였다. 기주 식물로 사용한 오이와 토마토는 각각 1엽기와 3-5엽기의 식물체를 사용하였다. 병원균을 접종한 후 20°C의 습실상(절대습도 100%)에서 3일 동안 보관하며 발병을 유도한 후 엽당 병 발생률을 조사한 뒤 생체중을 측정하였다. 생체중 4 g당 MeOH 200 ml을 넣어 blender로 마쇄한 후 MeOH에 2시간 동안 정지하였다. 2시간 뒤 여과지로 여과하여 식물의 잔재물을 제거한 뒤 rotary vacuum evaporator로 감압, 농축하였다. MeOH 추출물을 다시 100 ml의 3차 증류수로 용해한 후 동량의 EtOAc로 2번씩 추출하였다. 추출물은 농축한 후 다시 80% methanol로 완전히 용해한 다음 동량의 *n*-hexane으로 2번씩 추출하였다. 80% methanol층을 농축한 후 CHCl₃:CH₃OH(1:1, v/v) 6 ml로 녹여 상기한 바와 같이 SIM mode로 GC/MS 분석을 실시하여, 두 물질을 정량화하였다. 실험은 3반복으로 실시하였다.

병 진전 상황에 따른 3-O-acetyl botcinol과 3-O-acetyl botcinolide 생산량 비교. *B. cinerea* 2-16 균주와 KJ 균주의 포자현탁액(1×10^5 conidia/ml)을 토마토의 3-5엽에 분무 접종하였다. 접종 후 24시간 간격으로 발병률을 조사하고, 접종한 잎으로부터 두 물질의 양을 위에서 제시한 방법으로 동일하게 조사하였다. 실험은 2반복으로 실시하였다.

결과 및 고찰

25개 *B. cinerea* 균주에서 3-O-acetyl botcinol과 3-O-acetyl botcinolide의 생산량 비교. *B. cinerea*를 CDB에서 14일간 정지 배양한 후 배양액 150 ml을 동량의 EtOAc로 2회씩 추출하여 배양액 30 ml에 해당하는 양으로 제조활성을 검정하였다. 그 결과 10개의 균주가 제조활성을 보였고, 특히 이 중에서 2-16, K23, KOH76, P103 및 SJ58 균주는 70% 이상의 강한 활성을 보였다(Table 1). H9과 NY76균주는 배양액을 처리하였을 때에는 활성을 보이지 않았지만(김 등, 2009), EtOAc 추출물에서는 제조활성을 보였다. 이는 독소의 양이 적어 crude 상태로 처리했을 때는 활성이 나타나지 않은 것으로 생각되어진다. Fig. 1은 *B. cinerea* 2-16균주의 액체배양체의 EtOAc 추출물을 10가지 잡초에 처리했을 때의 제조활성을 보여준다. 대조구는 식물체의 생장에 전혀 영향을 주지 않았지만 2-16의 배양액 추출물은 대부분의 식물 생장을 크게 저해하였으며, 황화와 괴사도 일으켰다.

Phytotoxin 생산량을 비교하기 위하여 EtOAc 추출물을 SIM mode로 GC/MS 분석을 실시하였다. 그 결과 제조활성을 보이는 10균주 모두에서 3-O-acetyl botcinol과 3-O-acetyl botcinolide이 검출되었다(Table 2). 양적인 면에서는 2-16균주가 3-O-acetyl botcinol을 75.4 µg/ml, 3-O-acetyl botcinolide를 67.7 µg/ml로 가장 많이 생산하였으며, 그 다음으로 KOH76, P103, K23 및 SJ58 순이었다.

본 실험결과 배지상에서 phytotoxin을 생산했던 균주는 모두 병원성이 있었다. 하지만 병원성이 강한 균주들 중에서 *in vitro*에서 phytotoxin을 생산하지 않는 균주도 있었다. 한편 병원성이 약한 균주는 모두 phytotoxin을 생산하지 않았다.

병든 조직에서 3-O-acetyl botcinol과 3-O-acetyl botcinolide의 생산량 비교. 병원성 균주들이 식물체상에서 phytotoxin을 생산하는 양을 비교하기 위하여 오이와 토마토에 균을 접종하고 3일 후에 병든 조직으로부터 phytotoxin을 분석하였다. 그 결과, 모든 병든 조직에서 phytotoxin이 검출되었으며(Table 3, 4), *B. cinerea* 2-16 균주가 오이와 토

Table 1. Herbicidal activities of ethyl acetate extracts obtained from liquid cultures of *Botrytis cinerea* against 9 weeds^a

Isolate	Herbicidal activity (%) ^b								
	PAN	DIG	SOR	ECH	AGR	SOL	AES	ABU	XAN
1-38	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-16	50	70	90	80	10	70	90	70	60
C1	40	50	10	45	0	0	75	0	25
C19	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H9	30	45	35	40	0	15	70	0	0
H30	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H42	30	50	30	40	0	5	70	0	10
K12	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K23	50	90	75	65	10	95	90	60	40
KJ	0	0	0	0	0	0	0	0	0
KOH46	20	30	20	10	0	0	30	0	0
KOH76	60	90	70	65	10	60	85	40	50
NSS3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NSS106	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NSS111	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NY09	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NY23	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NY76	20	20	20	20	0	0	40	0	0
OH29	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OH44	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P74	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P103	60	75	45	55	10	90	90	35	55
SJ28	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SJ58	50	70	40	50	0	35	85	10	20

^aThe weeds were treated with EtOAc extract by foliar spraying.

^bEach data recorded 5 days after treatment and values presented as visual rating based on a scale of 0 (no control) to 100 (complete control).

^cPAN, *Panicum dichotomiflorum*; DIG, *Digitaria sanguinalis*; SOR, *Sorghum bicolor*; ECH, *Echinochloa crus-galli*; AGR, *Agropyron smithii*; SOL, *Solanum nigrum*; AES, *Aeschynomene indica*; ABU, *Abutilon theophrasti*; XAN, *Xanthium strumarium*.

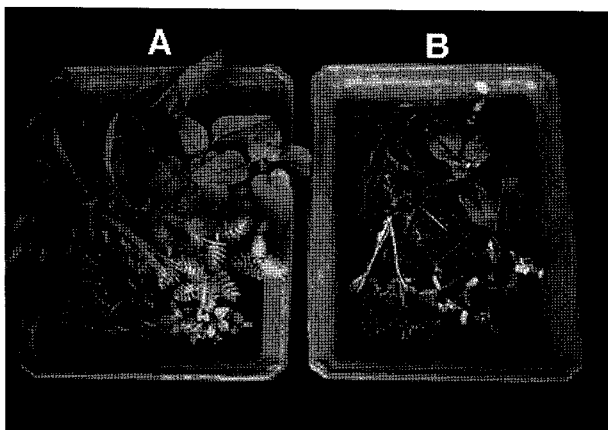


Fig. 1. Effect of an ethyl acetate extract of a liquid culture of *Botrytis cinerea* 2-16 against growth of 9 weeds (A: untreated control, B: treated).

마토에서 3-O-acetyl botcinol을 각각 236과 1,070 µg/g을 생산하였으며, 3-O-acetyl botcinolide를 153과 577 µg/g의 수준으로 가장 많이 생산하였다. 그 다음으로 *B. cinerea* SJ58과 2-4, NSS111 균주의 순으로 phytotoxin의 생산량이 많은 것을 확인하였다. 병원성은 오이에서는 *B. cinerea* NSS111 균주가 가장 강하였고, 다음으로 NY09, 2-16, SJ58 균주 순으로 병원성을 나타내었다. 한편 토마토에서는 *B. cinerea* 2-16, 2-4, NY09 균주 순으로 병원성이 높은 것으로 나타났다. *B. cinerea* 2-16 균주는 배지상과 식물체 상에서 모두 가장 많은 phytotoxin을 생산하였고, 병원성도 가장 강하였다. 하지만 NY09 균주의 경우 병원성은 강하지만 phytotoxin 생산량은 적은 것으로 나타났다. 반면 약병원성 균인 *B. cinerea* KJ-1 균주의 경우 *in vitro*와 *in vivo* 실험에서 모두 phytotoxin을 생산하지 않는 것

Table 2. Phytotoxin production by various strains of *Botrytis cinerea* in Czapek-Dox liquid medium^a

Isolate	Quantity (µg/ml)	
	3-O-acetyl botcinol	3-O-acetyl botcinolide
1-38	0.2	ND ^b
2-4	ND	ND
2-16	67.7	75.4
C1	0.2	ND
C19	ND	ND
H9	1.6	1.1
H30	ND	ND
H42	1.7	1.1
K12	0.1	ND
K23	16.6	20.1
KJ	ND	ND
KOH46	ND	ND
KOH76	36.6	48.2
NSS3	ND	ND
NSS106	0.1	ND
NSS111	ND	ND
NY09	ND	ND
NY23	0.6	0.3
NY76	0.5	0.7
OH29	ND	ND
OH44	ND	ND
P74	0.4	0.3
P103	16.5	22
SJ28	0.3	ND
SJ58	6.4	2.5

^aPhytotoxin were extracted with ethyl acetate from 14-day-old cultures in Czapek-Dox liquid medium. Values are the means of two replicates each.

^bNot detected.

으로 확인되었다. 이러한 결과는 *in vitro* 실험과는 달리 병원성이 있는 균주는 모두 *in vivo*에서 phytotoxin을 생산하였지만, 병원성과 phytotoxin 생산량과는 상관관계가 없다는 것을 나타낸다고 할 수 있다.

병진전 상황에 따른 phytotoxin 생산량 비교. *B. cinerea* 2-16 균주와 KJ 균주를 토마토에 접종한 뒤 시간의 흐름에 따른 병진전 상황과 3-O-acetyl botcinol과 3-O-acetyl botcinolide의 생산량을 비교하였다. Fig. 2의 결과와 같이, *B. cinera* 2-16 균주의 경우 접종 2일째부터 병이 발생하기 시작해 접종 3일째 급격히 증가한 후 접종 5일째부터는 85% 이상 감염되었으며, 병든 조직에서 많은 분생포자를 형성하였다. Phytotoxin 생산량을 살펴보면 3-O-acetyl botcinol은 병원균 접종 3일째부터 생산되기 시작해 접종 후 4일째 1,048 µg/g의 최대생산량을 나타냈고, 접종 후

Table 3. Quantification of two phytotoxins in cucumber leaf tissues infected by *Botrytis cinerea*^a

Isolate	Disease severity (%)	Concentration (µg/g of tissue)	
		3-O-acetyl botcinol	3-O-acetyl botcinolide
CK	0	ND ^b	ND
2-4	65±5	147±32	27±4
2-16	80±10	236±6	153±27
KJ	18±10.4	ND	ND
KOH46	40	ND	ND
KOH76	50	ND	ND
NSS111	80±17	108±21	1±2
NY09	83±2.5	17±6.5	ND
SJ58	70±10	162±66	100±38

^aTwo phytotoxins were detected in cucumber leaf tissues infected by *Botrytis cinerea*. Pots of plant were inoculated with a conidial suspension (1×10^5 conidia/ml) and then incubated for 3 days in a humidity chamber. Values followed by standard deviation are the means of three replicates each.

^bNot detected.

Table 4. Quantification of two phytotoxins in tomato leaf tissues infected by *Botrytis cinerea*^a

Isolate	Disease severity (%)	Concentration (µg/g of tissue)	
		3-O-acetyl botcinol	3-O-acetyl botcinolide
CK	0	ND ^b	ND
2-4	33±5.8	387±59	98±46
2-16	65±5.0	1070±25	577±112
KJ	7	ND	ND
KOH46	13±2.5	ND	ND
KOH76	18±2.5	38±12	19±6.5
NSS111	50	241±58	22±8.5
NY09	30±10	39±17	ND
SJ58	20	531±56	462±50

^aTwo phytotoxins were detected in cucumber leaf tissues infected by *Botrytis cinerea*. Pots of plant were inoculated with a conidial suspension (1×10^5 conidia/ml) and then incubated for 3 days in a humidity chamber. Values followed by standard deviation are the means of three replicates each.

^bNot detected.

5일째부터는 점차적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 3-O-acetyl botcinolide는 3일째 157 µg/g의 생산량을 나타냈고, 3-O-acetyl botcinol보다는 적은 양이 생산된 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 3-O-acetyl botcinol이 병 발생의 초기단계에 관여한다는 가능성을 보여준다. *B. cinerea* KJ 균주는 접종 2일째부터 소형병반을 형성한 후 조금씩 발병하기 시작하여 접종 7일째는 25%의 발병율을 보였다. 반면 병든 조직에서는 두 종류의 phytotoxin이

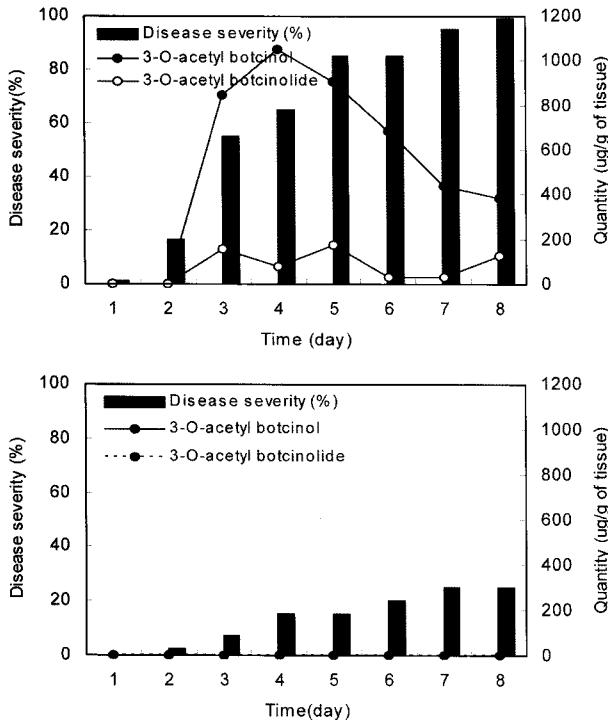


Fig. 2. Changes of phytotoxin quantity and disease severity in tomato tissues infected by *Botrytis cinerea* 2-16 (top) and KJ (bottom).

전혀 검출 되지 않은 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 따라서 phytotoxin은 *B. cinerea*의 병발생에 일차적 요인은 아닐지라도 감염을 도와주는 주요 인자로서 작용할 것이라고 사료된다.

이상의 결과, 본 연구에서 최초로 분리 정제한 3-O-acetyl botcinol과 3-O-acetyl botcinolide는 *B. cinerea*가 생산하는 phytotoxin으로써, 이 물질이 병 발생에 있어서 필수적이거나 결정적인 역할을 하지 않는 것으로 생각된다. 그러나 이 물질의 존재가 *B. cinerea*의 병원성을 높여준다는 것 또한 부인할 수 없는 사실이므로, 3-O-acetyl botcinol과 3-O-acetyl botcinolide는 어떤 방법으로든 병 발생에 기여하고 있다고 할 수 있다. 앞으로 이러한 사실을 확인하기 위해서는 이들 phytotoxin을 생산하지 않는 돌연변이체를 만들어 병원성의 변화를 관찰하고 *B. cinerea*가 생산하는 다른 독소 및 효소들과의 상관관계를 파악하는 등의 다각적인 연구가 이루어져야 할 것이다.

요 약

Botrytis cinerea 균주의 병원성에 있어서 phytotoxin의 역할을 규명하는 연구를 하던 중에 *B. cinerea* 2-16균주가 생산하는 새로운 phytotoxin을 분리 동정하였다. 두 개

의 물질은 3-O-acetyl botcinol과 3-O-acetyl botcinolide로 동정되었다. 본 연구는 두 개의 물질과 *B. cinerea*의 병원성과의 상관관계를 규명하고자 실시하였다. 25개의 *B. cinerea* 균주 중에서 병원성이 약한 3개의 *B. cinerea* 균주는 액체배지에서 두 phytotoxin을 생산하지 않았다. 병원성이 강하거나 중간정도인 균주들은 두 phytotoxin을 생산하는 균과 생산하지 않는 균으로 나뉘었다. 한편, 25개의 균주 중에서 10균주의 액체배양액 에틸아세테이트 추출물이 9개의 식물체를 이용한 whole plant assay에서 phytotoxicity를 나타냈으며, 이들 10개 추출물 모두에서 두 phytotoxin이 검출되었다. *In planta* 실험에서는 병원성이 강한 균주에 감염된 식물조직에서 모두 두 phytotoxin이 검출되었다. 하지만 두 phytotoxin의 생산량과 병원성과는 상관관계를 보이지 않았다. 두 phytotoxin은 *B. cinerea* 2-16 균주에 감염된 토마토 조직에서 3일째부터 검출되기 시작해 4일째는 가장 크게 증가하였으며 그 후 감소하였다. 이상의 실험 결과 3-O-acetyl botcinol과 3-O-acetyl botcinolide는 *B. cinerea*의 발병과정에 있어서 중요한 역할을 할 것으로 추정되지만 병을 일으키는데 일차적인 요인은 아닐 것으로 사료된다.

감사의 글

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

참고문헌

- Agrios, G. N. 2005. Plant pathology(5th edition). Academic press, Inc., New York. 431 pp.
- Beever, R. E. and Parkers, L. 1993. Mating behaviour and genetics of fungicide resistance of *Botrytis cinerea* in New Zealand. *New Zealand J. Crop & Horti. Sci.* 21: 303-310.
- 최인실, 정영륜, 조광연. 1995. 잭빛곰팡이 병원균 *Botrytis cinerea* 균주의 분리 기주별 표현형적 특성, 병원성 및 약제 저항성 변이. *한국균학회지* 23: 246-256.
- Coley-Smith, J. R., Verhoeff, K. and Jarvis, W. R. 1980. The biology of *Botrytis*. Academic Press, London. 318 pp.
- Deighton, N., Muckenschnabel, I. and Colmenares, A. J. 2001. Botrydial is produced in plant tissues infected by *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 57: 689-692.
- Edlich, W., Lorenz, G., Lyr, H., Nega, E. and Pommer, E. H. 1989. New aspects on the infection mechanism of *Botrytis cinerea* Pers. *Neth. J. Plant Pathol.* 95: 53-62.
- Elad, Y. 1992. The use of antioxidants (free radical scavengers) to control grey mould (*Botrytis cinerea*) and white mould (*Sclerotinia sclerotiorum*) in various crops. *Plant Pathol.* 41:

- 417-426.
- Elad, Y. 1993. Regulators of ethylene biosynthesis or activity as a tool for reducing susceptibility of host plant tissues to infection by *Botrytis cinerea*. *Neth. J. Plant Pathol.* 99: 105-113.
- Elad, Y. and Evensen, K. 1995. Physiological aspects of resistance to *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 85: 637-643.
- Elad, Y., Kohl, J. and Fokkema, N. J. 1994. Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic bacteria and fungi. *Eur. J. Plant Pathol.* 100: 315-336.
- Ellis, M. B. and Waller, J. M. 1974. *Sclerotinia fuckeliana* (Conidial stage: *Botrytis cinerea*). CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria No. 431.
- Faretra, F. and Pollastro, S. 1993. Genetics of sexual compatibility and resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in isolates of *Botryotinia fuckeliana* from nine countries. *Plant Pathol.* 42: 48-52.
- 구한모, 안승준, 신호철, 도은수, 신미호, 김유석, 김진희, 천세철. 2006. Benzimidazole과 dicarboximide계 살균제 저항성 잭빛곰팡이병원균(*Botrytis cinerea*)에 대한 mepanipyrim의 효과. *한국응용생명화학회지* 49: 259-265.
- 권진혁, 손경애. 2005. *Botrytis cinerea*에 의한 물레나물 잭빛곰팡이병 발생. *한국균학회지* 33: 89-91.
- Hoffman, R., Roebroek, E. and Heale, B. 1988. Effects of ethylene biosynthesis in carrot root slices on 6-methoxymellein accumulation and resistance to *Botrytis cinerea*. *Physiol. Planta.* 73: 71-76.
- 김금정, 윤미영, 김홍태, 최경자, 장경수, 최용호, 박명수, 차병진, 김진철. 2009. *Botrytis cinerea*로부터 분리한 두 개의 새로운 phytotoxin의 구조 결정 및 생물활성. *식물병연구* 15: 112-119.
- 김종진, 김재원, 이창원, 정영륜. 1997. *Botrytis cinerea* 균주들이 생산하는 polygalacturonase, laccase, β -glucosidase의 균주간 활성 및 병원성과의 상관관계. *한국식물병리학회지* 13: 225-231.
- Poapst, P. A., Ramsoomair, B. A. and Gourley, C. O. 1979. On the promotion of senescence in *Brassica oleracea* var. *capitata* by *Alternaria brassicicola* and *Botrytis cinerea*. *Can. J. Bot.* 57: 2378-2386.
- 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.
- Rosslensbroich, H. J. and Stuelbler, D. 2000. *Botrytis cinerea*-history of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Prot.* 19: 557-561.
- 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. Purification and characterization of β -glucosidase from *Botrytis cinerea*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59: 100-101.
- Sharrock, K. R. and Labavitch, J. M. 1994. Polygalacturonases inhibitors of Bartlett pear fruits: differential effects on *Botrytis cinerea* polygalacturonase isozymes, and influence on products of fungal hydrolysis of pear cell walls and on ethylene induction in cell culture. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 45: 305-319.
- Talma, K. Y., Elad, Y. and Yunis, H. 1989. Resistance to diethofencarb(NPC) in benomyl-resistant field isolates of *Botrytis cinerea*. *Plant Pathol.* 38: 86.
- van Kan, J. A., van't Klooster, J. W., Wagemakers, C. A., Dees, D. C. and van der Vlugt-Bergmans, C. J. 1997. Cutinase A of *Botrytis cinerea* is expressed, but not essential, during penetrating of gerbera and tomato. *Mol. Plant Microbe Interact.* 10: 30-38.
- Wasfy, E. H., Farag, S. A., Tarabieh, M. A. and Abd-Elmocty, S. G. 1978. Studies on enzymes of different strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 92: 168-179.