

Research Article

Open Access

세포벽의 형태학적 변화와 ABC Transporter에 기초한 벼키다리병원균 *Fusarium fujikuroi* CF337의 살균제 prochloraz에 대한 저항성 반응

양유리,¹ 이시우,² 이세원,² 김인선^{1*}

¹전남대학교 농업생명과학대학 친환경농업연구소, ²국립농업과학원 농업생물부

Morphological Changes of Fungal Cell Wall and ABC Transporter as Resistance Responses of Rice Bakanae Disease Pathogen *Fusarium fujikuroi* CF337 to Prochloraz

You-Ri Yang,¹ Si-Woo Lee,² Se-Won Lee² and In-Seon Kim^{1*} (¹Institute of Environmentally-friendly Agriculture, College of Agriculture and Life Sciences, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Republic of Korea, ²Division of Agricultural Biology, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Republic of Korea)

Received: 3 March 2012 / Accepted: 21 March 2012

© 2012 The Korean Society of Environmental Agriculture

Abstract

BACKGROUND: The resistance of rice bakanae disease pathogens against the fungicide prochloraz has been reported. Understanding the resistance mechanisms is an important for better control of the pathogens. In the present study, we investigated the resistance mechanisms of *Fusarium fujikuroi* CF337 (CF337) against prochloraz.

METHODS AND RESULTS: Morphological changes in the cell wall of CF337 grown in potato dextrose broth (PDB) with or without prochloraz was investigated by transmission electron microscopy. Growth inhibition of CF337 was examined in PDB containing prochloraz or an ABC transporter inhibitor or both of them. Cell wall thickness of CF337 grown in PDB with prochloraz was significantly increased from 80.73±1.99 nm to 193.11±7.07 nm. Significant inhibition in the growth of CF337 was observed in the presence of both prochloraz and the inhibitor, but no growth inhibition was observed in the presence of the inhibitor or prochloraz. Sequence analysis of ATP-binding cassette transporter (ABC) gene of CF337

showed 70 to 80% similarities to the genes of the pathogens resistant to other fungicides.

CONCLUSION: Efflux transporter system and changes in cell wall thickness were suggested as resistance mechanisms of CF337 against prochloraz.

Key Words: Conazoles, Demethylation inhibitor, Fungicide resistance, Prochloraz, Rice bakanae disease

서론

Prochloraz (*N*-propyl-*N*[2-(2,4,6-trichlorophenoxy)ethyl]imidazole-1-carboxamide)는 식물병원균의 세포막 구성분인 ergosterol의 합성과정에서 lanosterol의 demethylation 과정을 저해하는 imidazole계 살균제이다(Henry and Sisler, 1984). Prochloraz는 1983년 종자 침종용 살균제로 국내에 등록되어 벼키다리병(rice bakanae disease)을 방제하기 위해 사용되고 있다. 또한, prochloraz는 침투이행성 약제로서 우리나라의 경우 우수한 방제효과에 힘입어 벼를 포함하여 사과, 난, 고추, 수박, 마늘 등의 다양한 작물에 발생하는 식물병을 방제하기 위해 널리 사용되고 있다. 하지만 최근 농촌진흥청에 따르면 prochloraz에 대해 저항성을 획득한 벼키다리병원균이 국내 벼 포장에서 전반적으로 발견되고 있는 것으로 보고되고 있다(Lee *et al.*, 2010). 이에 농촌진흥청에서는 주요 정책의 하나로 prochloraz에 대한 벼키다리병원

*교신저자(Corresponding author),
Phone: +82-62-530-2131; FAX: +82-62-530-2139;
E-mail: mindzero@chonnam.ac.kr

균의 저항성 기작을 밝히고 이를 기초로 저항성을 극복할 수 있는 방안을 연구하고 있다.

Prochloraz와 같은 cytochrome P-450 효소 demethylation inhibitor (DMI) 계열 살균제에 대해 저항성을 갖는 병원균은 약제의 작용부위인 CYP51의 과발현 및 아미노산의 점돌연변이가 기작을 통해 저항성을 갖는다고 알려져 있다(Sanglard *et al.*, 1998; Ma *et al.*, 2006; Mellado *et al.*, 2007). 벚키다리병원균의 prochloraz에 대한 저항성 연구와 관련하여 2010년 농촌진흥청의 자료에 의하면 prochloraz에 대한 민감성 및 저항성 병원균의 lanosterol demethylase를 조사한 결과 두 병원균 사이에 아미노산서열이 동일한 것으로 보고되고 있다. 이는 prochloraz의 작용부위인 lanosterol demethylase의 돌연변이가 이 약제에 대한 저항성 기작이 아님을 의미한다. 이러한 상황에서 벚키다리병 유발 병원균의 prochloraz에 대한 저항성 기작의 구명에 관한 연구는 세계적으로 전무하다. 따라서 prochloraz에 대한 저항성을 극복할 수 있는 약제를 개발하여 벚키다리병을 성공적으로 방제하기 위해 병원균의 저항성 기작을 밝히는 연구가 필요하다. 이에 본 연구에서는 벚키다리병을 방제하기 위한 기초자료로 활용하고자 *Fusarium fujikuroi* CF337의 prochloraz에 대한 저항성 기작을 구명하고자 하였다.

재료 및 방법

약제 및 시약

본 실험에 사용된 살균제 prochloraz(순도 98.0%)는 Dr. Ehrenstorfer GmbH (Ausburg, Germany)에서 구입하였으며 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 실험에 사용하였다. ATP-binding cassette (ABC) transporter 저해제인 sodium azide (NaN_3)와 carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP)은 Sigma-Aldrich (MO, USA)에서 구입하였으며 각각 증류수와 demethylsulfoxide (DMSO)에 용해하여 실험에 사용하였다. 이외에 시약은 1급 분석시약으로서 Fisher Scientific (Pittsburgh, USA)에서 구입하여 사용하였다.

병원균 및 배양조건

Fusarium fujikuroi CF106 (CF106)과 *Fusarium fujikuroi* CF337 (CF337)은 국내 벚 포장에서 분리한 벚키다리병 유발 병원균으로서 농촌진흥청 국립농업과학원에서 분양받았다 (Lee *et al.*, 2010). CF106은 prochloraz 민감성, 그리고 CF337은 prochloraz 저항성 병원균이었으며 potato dextrose agar (PDA) 및 potato dextrose broth (PDB)를 배지로 하여 25°C 조건에서 배양하였다.

약제처리에 따른 병원균 세포벽의 형태학적 변화

Prochloraz에 대한 저항성 기작으로서 약제처리에 따른 병원균 세포벽의 형태학적 변화를 조사하였다. 이를 위해 PDA에서 7일 동안 배양한 CF106 및 CF337의 균사를 지름

7 mm이내의 조각으로 잘라 prochloraz를 함유한 PDB 배지에 접종하였다. 이때 prochloraz의 처리농도는 각각 병원균의 최대 성장농도로서 CF106의 경우 0.05 mg/L, CF337의 경우 0.5 mg/L이었으며 25°C와 150 rpm에서 1일 동안 배양하였다. 배양 후 배양액을 9,000 rpm에서 원심분리하여 균사체를 수거한 다음 2% (v/v) glutaraldehyde와 2% (v/v) *p*-formaldehyde가 함유된 0.05 M cacodylate buffer (pH 7.2)를 첨가하여 실온에서 4시간 동안 고정시켰다(Kim *et al.*, 2011). 고정된 시료를 0.05 M cacodylate buffer (pH 7.2)로 충분히 수세한 후 1% (v/v) osmium tetroxide가 함유된 0.05 M cacodylate buffer (pH 7.2)에 다시 고정시켰다. 시료는 ethanol으로 충분히 수세하여 LR white 수지에 최종적으로 고정시킨 후 4% (v/v) uranyl acetate와 1% (v/v) lead citrate로 염색하였다. 염색된 시료는 투과전자현미경 (Jeol, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

ATP-binding cassette (ABC) transporter 저해와 병원균의 생장

병원균의 prochloraz에 대한 저항성 기작으로서 ABC transporter의 efflux pump를 조사하기 위해 ABC transporter 저해제의 처리에 따른 병원균의 생장율을 조사하였다. 이를 위해 CF106 및 CF337의 균사조각을 상기와 같이 prochloraz와 ABC transporter 저해제를 각각 혹은 모두 함유한 PDB 배지에 접종한 후 10일 동안 배양하였다. 약제의 처리농도는 상기의 농도에 준하여 CF106의 경우 0.05 mg/L, CF337의 경우 0.05 mg/L 또는 0.5 mg/L이었다. 또한, ABC transporter 저해제는 병원균에 처리하였을 때 대조구 대비 유사한 생장율을 보인 농도조건으로서 CCCP는 10 μM , 그리고 NaN_3 는 20 μM 이었다. 배양 후 균사체를 상기와 같이 원심분리하여 얻은 다음 100°C에서 12시간 동안 건조시켰다. 병원균의 생장률은 건조된 균사체의 무게를 칭량한 후 대조구의 무게와 비교하여 상대적으로 산출하였다.

ABC transporter 유전자 분석

병원균의 ABC transporter 유전자를 조사하기 위해 Moslem 등(2010)의 방법에 따라 CF337의 genomic DNA를 사용하여 polymerase chain reaction (PCR) 분석을 수행하였다. PCR에 사용된 primer는 DMI 살균제를 제거하는데 관여하는 ABC transporter 유전자의 염기서열을 참고하여 제작하였다(Table 1). PCR을 통해 증폭된 DNA는 ethidium bromide로 염색된 1% (w/v)의 agarose gel에서 전기영동하여 그 크기를 관찰하였으며 AccuPrep PCR purification kit (Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 정제하였다. 정제된 DNA의 염기서열 분석은 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems, CA, USA)로 수행되었으며 NCBI database를 바탕으로 nucleotide BLAST를 수행하여 염기서열의 상동성을 분석하였다.

Table 1. Experimental conditions for PCR analysis of ABC transporter genes

PCR condition	Reaction temperature and primers for 35 cycles
Initial denaturation	94°C, 5 min
Denaturation	94°C, 40 sec
Annealing	55°C, 40 sec
Extension	72°C, 2 min
Final extension	72°C, 10 min
Primer sequences	5'-TACGTTTCAGCAACAGGATCT-3' (forward) 5'-CATCCATTCTGCAGGGTT-3' (reverse)

결 과

병원균 세포벽의 형태학적 관찰

Prochloraz 처리에 따른 CF106 및 CF337의 세포벽 관찰결과는 Fig. 1에 제시한 바와 같았다. Prochloraz에 대한 민감성인 CF106의 경우 대조구의 세포벽 두께는 약 135.12 nm이었으며 약제 처리구의 경우 약 150.51 nm로서 세포벽의 두께가 약 1.1배 증가하였다. Prochloraz 저항성인 CF337의 경우 대조구의 세포벽 두께는 약 80.73 nm이었으며 약제 처리구의 경우 약 193.11 nm로서 세포벽의 두께가 약 2.4배 증가하였다. 세포벽의 두께를 기준으로 볼 때 CF337이 현저한 변화를 보여 세포벽의 변화가 이 병원균의 prochloraz에 대한 저항성 기작의 하나임을 의미하였다.

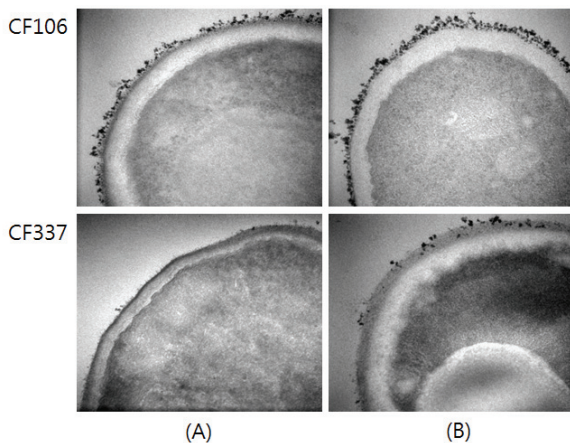


Fig. 1. Transmission electron micrographs of the cell walls of CF106 and CF337 grown in PDB with or without prochloraz. The strains were grown in PDB for 1 day in the absence (A) or presence (B) of prochloraz at 0.05 mg/L for CF106 and 0.5 mg/L for CF337.

ABC transporter 저해제의 처리가 병원균의 생장에 미치는 영향

ABC transporter 저해제의 처리에 따른 CF106과 CF337의 생장율을 조사한 결과는 Table 2와 같았다. CF106의 생장이 가능한 농도수준의 prochloraz 혹은 CCCP를 단독으로 처리하였을 경우 균의 생장율은 각각 97.1%와 89.1%이었

다. Prochloraz와 저해제를 함께 처리하였을 경우에도 CF106의 생장율이 94.0%로서 대조구와 유사하였다. 또한, CF337의 경우 CF106이 생장하는 농도수준의 prochloraz 혹은 NaN_3 를 단독으로 처리하였을 때 각각 102.4%와 110.8%의 생장율을 보였으며 약제와 저해제를 함께 처리하였을 경우에도 116.8%의 생장율을 보였다. 한편, 저항성 병원균인 CF337이 생장하는 농도수준의 prochloraz를 처리하였을 경우 이 균의 생장율이 대조구에 비해 88.7% 수준이었다. 하지만 저항성 병원균인 CF337이 생장하는 농도수준의 prochloraz와 NaN_3 를 함께 처리하였을 경우 균의 생장이 현저하게 저해되었다. 이러한 결과는 CF337의 prochloraz에 대한 저항성 기작으로서 ABC transporter의 efflux pump가 관여하고 있음을 의미하였다.

Table 2. Growth of fungal pathogens in PDB in the presence of prochloraz (PCZ) or ABC transporter inhibitor (INH) or PCZ + INH

Strains	Growth ratios (%) after chemical treatment*				
	PCZ (mg/L)		INH	INH + PCZ (mg/L)	
	0.05	0.5		0.05	0.5
CF106	97.1±1.7	No growth	89.1±4.9	94.0±2.4	No growth
CF337	102.4±6.8	88.7±5.0	110.8±3.6	116.8±14.6	No growth

* The values are means ± SD of triplicate. The values are relative to those of control pathogens grown in only PDB.

ABC transporter 유전자의 상동성 분석

Prochloraz 민감성 저항성 병원균의 ABC transporter를 조사하기 위해 이 유전자의 염기서열과 아미노산서열을 분석한 결과 Fig. 2에 보여준 바와 같았다. 유전자의 염기서열과 아미노산서열의 상동성은 두 병원균 사이에 각각 99.6%와 100%로서 거의 동일하였다. 또한, 분석된 유전자의 염기서열은 GenBank에 등록된 유전정보와 비교하였을 때 살균제 저항성과 관련한 다른 ABC transporter 유전자의 염기서열과 70~80%의 상동성을 보였다 (Table 3, Fig. 3). 이는 prochloraz가 함유된 배지에서 민감성 및 저항성 병원균의 생장은 ABC transporter와 관련이 있다는 것을 암시하였다. 본 실험에서 구명된 ABC transporter 유전정보는 현재 accession number JQ346073로 GenBank에 등록되어 있다.



Fig. 2. Partial sequences of nucleotide (A) and amino acid (B) of ABC transporter amplified from CF337 genomic DNA. The arrow symbol indicates the base different between the stains.

Fig. 3. Multiple alignments of ABC transporter sequences of CF337 compared to genes, *CS-20* and *32SK-3*, from other *Fusarium* strains.

Table 3. Homology of ABC transporter genes based on the GenBank database

Accession no.	Matching ABC transporter gene (Source)	Homology (%)
FJ753577.1	<i>ABC11 (Glomerella lindemuthiana)</i>	80
FN669166.1	<i>atr8 (Glomerella graminicola)</i>	79
XM_955460.1	<i>CDR4 (Neurospora crassa OR74A)</i>	79
EU543275.1	<i>Tabc1 (Trichoderma atroviride)</i>	79
AB010442.2	<i>PMR1⁺ (Penicillium digitatum)</i>	76
XM_001268825.1	putative (<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL1)	76
XM_001264322.1	putative (<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL181)	75
XM_003067022.1	putative (<i>Coccidioides posadasii</i> C735)	75
HM106507.1	<i>ABC1 (Nectria haematococca mpVI)</i>	75
XM_003005940.1	<i>CDR1 (Verticillium albo-atrum</i> VaMs.102)	75
XM_747710.1	<i>AFUA_1G14330 (Aspergillus fumigatus</i> Af293)	75
XM_002487510.1	putative (<i>Talaromyces stipitatus</i> ATCC10500)	75
XM_001931799.1	<i>CDR4 (Pyrenophora tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP)	74
XM_001264008.1	<i>AbcA (Neosartorya fischeri</i> NRRL181)	74
AJ272521.2	<i>BcatrD³ (Botryotinia fuckeliana)</i>	73
AJ243113.1	<i>atr2³ (Mycosphaerella graminicola)</i>	73
XM_002377627.1	putative (<i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357)	73
FN669163.1	<i>atr14 (Glomerella graminicola)</i>	73
XM_001276074.1	<i>AbcA (Aspergillus clavatus</i> NRRL1)	73
XM_002627230.1	<i>CDR4 (Ajellomyces dermatitidis</i> SLH14081)	73
XM_748018.1	<i>AbcA (Aspergillus fumigatus</i> Af293)	73
EU311563.1	<i>ABC2 (Fusarium oxysporum</i> CS-20)	73
EU311562.1	<i>ABC2 (Fusarium oxysporum</i> 32SK-3)	73
AF329852.1	<i>Atr4 (Mycosphaerella graminicola)</i>	73
XM_001214818.1	<i>CDR4 (Aspergillus terreus</i> NIH2624)	72

(Table 3)

AJ306607.1	<i>abc1 (Gibberella pulicaris)</i>	72
XM_001209824.1	<i>CDR4 (Aspergillus terreus NIH2624)</i>	72
XM_002796730.1	<i>CDR4 (Paracoccidioides brasiliensis Pb01)</i>	72
XM_001270746.1	putative (<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL1)	71
XM_002375851.1	putative (<i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357)	71
XM_001941519.1	<i>CDR4 (Pyrenophora tritici-repentis)</i>	71
AJ309280.1	<i>atrE⁺ (Emericella nidulans)</i>	70
AF259075.2	<i>BcatrO (Botryotinia fuckeliana)</i>	70
XM_001217463.1	<i>CDR4 (Aspergillus terreus NIH2624)</i>	70

* Genes involved in efflux of DMI fungicides

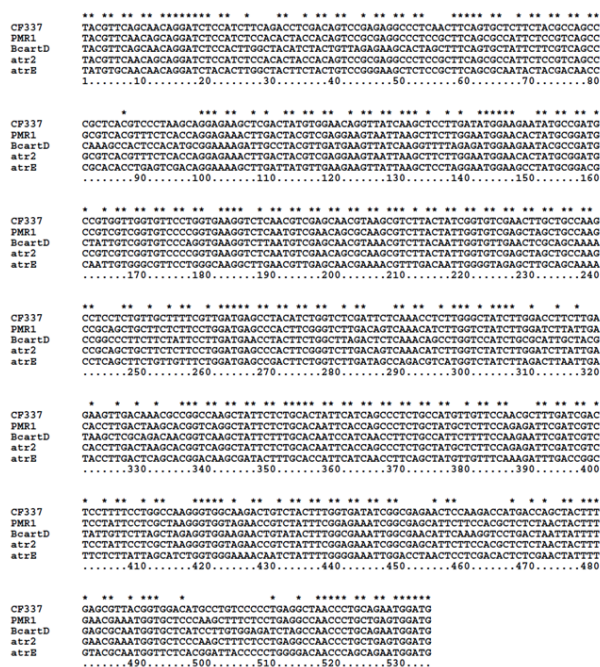


Fig. 4. Multiple alignments of ABC transporter sequences of CF337 compared to genes for efflux transport of other conazoles.

한편, 민감성 및 저항성 균주의 ABC transporter 염기서열은 prochloraz와 같은 계열인 DMI 살균제의 제거에 관여하는 ABC transporter 유전자인 *PMR1*, *BcatrD*, *atr2*, *atrE* (Hayashi *et al.*, 2002)와 각각 76%, 73%, 73%, 70%의 상동성을 보였다 (Fig. 4). 이는 민감성 균주 CF106와 저항성 균주 CF337가 매우 유사한 ABC transporter 유전자를 지니고 있다는 것을 재확인하여 주었다. 하지만 약제처리에 따른 병원균 세포벽의 변화에 대한 상기의 결과와 ABC transporter 유전자의 분석결과를 종합하여 고려해 볼 때, 민감성 CF106이 저항성 CF337의 ABC transporter와 유사한 유전자를 가지고 있다 할지라도 이 유전자가 CF106의 prochloraz에 대한 저항성 기작이 아닐 것으로 사료되었다.

고찰

병원균이 살균제에 대한 저항성을 획득하는 방법으로 약제의 작용부위 유전자에 돌연변이를 일으킬 수 있다. Benzimidazole계 약제에 대해 저항성인 잣뿔무늬병원균 *Monilinia fructicola* 균주들은 약제가 결합하는 β -tubulin 유전자의 돌연변이를 통해 저항성을 갖는다고 알려져 있다(Ma *et al.*, 2003). 또한, 흰가루병원균 *Uncinula necator*는 살균제 triadimenol의 작용부위인 14 α -demethylase 유전자의 돌연변이를 통해 저항성을 갖는다고 보고되었다(Delye *et al.*, 1997). Triadimenol은 본 연구에서 시험한 prochloraz와 같은 계열의 살균제이다. 하지만 농촌진흥청의 보고에 의하면 CF106 및 CF337의 작용부위 유전자의 염기서열이 서로 동일하다고 알려져 있다. 이에 본 연구에서는 CF337의 prochloraz에 대한 저항성 기작으로서 작용부위 유전자의 돌연변이가 아닌 다른 기작이 관여할 것으로 추측되어 병원균 세포벽의 형태학적 변화와 ABC transporter 저해제 처리에 따른 병원균의 성장율에 기초하여 저항성 기작을 구명하고자 하였다.

CF106과 CF337가 성장하는 농도수준의 prochloraz를 처리한 후 균의 세포벽을 관찰한 결과 CF106은 세포벽 두께의 변화가 미비하였으나 CF337은 세포벽의 두께가 2배 이상 증가함을 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 이러한 결과를 통해 저항성 병원균은 세포벽의 두께를 증가시켜 약제가 존재하는 외부환경으로부터 세포를 보호함으로써 약제에 대한 저항성을 갖는다는 것을 알 수 있었다. 세포벽의 형태학적 변화가 관여한다는 연구결과로서 polyhexamethylene biguanide 저항성 효모균 *Saccharomyces cerevisiae*는 세포벽의 유지에 관여하는 유전자의 발현이 민감성 균주에 비해 현저하게 높은 것으로 보고되었다(Elsztein *et al.*, 2011).

CF337의 prochloraz에 대한 저항성 기작으로서 ABC transporter의 efflux pump가 관여함을 조사하고자 efflux pump 저해제의 처리에 따른 병원균의 성장율을 조사하였다. 병원균의 efflux pump는 ATP에 의존하기 때문에 세포내 전자전달계를 저해하는 화합물을 처리함으로써 약제에 대한 저항성 기작의 하나로 연구되고 있다(Parkinson *et al.*, 1995; Albertson *et al.*, 1996; Prudêncio *et al.*, 2000; Kim *et*

al., 2002; Milano *et al.*, 2009). CF337을 CF106이 성장하는 농도수준의 prochloraz와 efflux pump 저해제를 동시에 처리하여 배양하였을 때 성장저해가 관찰되지 않았으나 CF337이 성장하는 농도수준의 prochloraz와 저해제를 동시에 처리하였을 경우 CF337의 현저한 성장저해가 관찰되었다(Table 2). 이는 병원균의 세포내로 prochloraz가 유입되었을 경우 저항성 균은 efflux pump를 이용해 세포 밖으로 약제를 제거하여 저항성을 갖는다는 것을 의미하였다. 이러한 결과는 ABC transporter 유전자의 분석결과에서도 뒷받침되었다(Fig. 2). 즉, ABC transporter 유전자의 염기서열을 분석한 결과 CF337의 유전자는 prochloraz와 같은 계열의 살균제를 제거하는데 관여하는 efflux pump 유전자인 *PMR1*, *BcatrD*, *atr2*, *atrE*와 각각 76%, 73%, 73%, 70%의 상동성을 보였다(Table 3). 이상의 결과를 종합해 볼 때 벼키다리병원균 *Fusarium fujikuroi* CF337은 약제를 분해하는 능력(Kim *et al.*, 2010)과 세포벽 합성, 그리고 ABC transporter의 efflux pump를 통해 prochloraz에 대한 저항성을 가짐을 알 수 있었다.

감사의 글

This work was supported by a grant (No. 20110401030530-0010400) from the Rural Development Administration, Republic of Korea.

참고문헌

- Albertson, G. D., Niimi, M., Cannon, R. D., Jenkinson, H. F., 1996. Multiple efflux mechanisms are involved in *Candida albicans* fluconazole resistance, *Antimicrob. Agents Ch.* 40, 2835-2841.
- Délye, C., Laigret, F., Corio-Costet, M. F., 1997. A mutation in the 14 alpha-demethylase gene of *Uncinula necator* that correlates with resistance to a sterol biosynthesis inhibitor. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2966-2970.
- Elsztein, C., de Lucena, R. M., de Morais, M. A., Jr., 2011. The resistance of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to the biocide polyhexamethylene biguanide: involvement of cell wall integrity pathway and emerging role for YAP1. *BMC Mol. Biol.* 12, 1-10.
- Hayashi, K., Schoonbeek, H., Waard, M. A. D., 2002. Expression of the ABC transporter *BcatrD* from *Botrytis cinerea* reduces sensitivity to sterol demethylation inhibitor fungicides. *Pestic. Biochem. Phys.* 73, 110-121.
- Henry, M. J., Sisler, H. D., 1984. Effects of sterol biosynthesis-inhibiting (SBI) fungicides on cytochrome P-450 oxygenations in fungi. *Pestic. Biochem. Phys.* 22, 262-275.
- Kim, I. S., Foght, J. M., Gray, M. R., 2002. Selective transport and accumulation of alkanes by *Rhodococcus erythropolis* S+14He. *Biotechnol. Bioengineer.* 80, 650-659.
- Kim, S. H., Park, M. R., Kim, Y. C., Lee, S. W., Choi, B. R., Lee, S. W., Kim, I. S., 2010. Degradation of prochloraz by rice Bakanae disease pathogen *Fusarium fujikuroi* with differing sensitivity: a possible explanation for resistance mechanism. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 53, 433-439.
- Kim, S. K., Kim, Y. C., Lee, S., Kim, J. C., Yun, M. Y., Kim, I. S., 2011. Insecticidal activity of rhamnolipid isolated from *Pseudomonas* sp. EP-3 against green peach aphid (*Myzue persicae*). *J. Agric. Food Chem.* 59, 934-938.
- Lee, Y. H., Kim, S. Y., Choi, H. W., Lee, M. J., Ra, D. S., Kim, I. S., Park, J. W., Lee, S. W., 2010. Fungicide resistance of *Fusarium fujikuroi* isolated in Korea. *Korean J. Pestic. Sci.* 14, 427-432.
- Ma, Z., Proffer, T. J., Jacobs, J. L., Sundin, G. W., 2006. Overexpression of the 14alpha-demethylase target gene (*CYP51*) mediates fungicide resistance in *Blumeriella jaapii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 2581-2585.
- Ma, Z., Yoshimura, M. A., Michailides, T. J., 2003. Identification and characterization of benzimidazole resistance in *Monilinia fructicola* from stone fruit orchards in California. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7145-7152.
- Mellado, E., Garcia-Effron, G., Alcazar-Fuoli, L., Melchers, W. J., Verweij, P. E., Cuenca-Estrella, M., Rodriguez-Tudela, J. L., 2007. A new *Aspergillus fumigatus* resistance mechanism conferring in vitro cross-resistance to azole antifungals involves a combination of *cyp51A* alterations. *Antimicrob. Agents Ch.* 51, 1897-1904.
- Milano, A., Pasca, M. R., Proveddi, R., Lucarelli, A. P., Manina, G., de Jesus Lopes Ribeiro, A. L., Manganelli, R., Riccardi, G., 2009. Azole resistance in *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by the MmpS5-MmpL5 efflux system. *Tuberculosis* 89, 84-90.
- Moslem, M. A., Bahkali, A. H., Abd-Elsalam, K. A., Wit, P. J. G. M., 2010. An efficient method for DNA extraction from cladosporioid fungi. *Genet. Mol. Res.* 9, 2283-2291.
- Parkinson, T., Falconer, D. J., Hitchcock, C. A., 1995. Fluconazole resistance due to energy-dependent drug efflux in *Candida glabrata*. *Antimicrob. Agents Ch.* 39, 1696-1699.

Prudêncio, C., Sansonetty, F., Sousa, M. J., Côte-Real, M., Leão, C., 2000. Rapid detection of efflux pumps and their relation with drug resistance in yeast cells. *Cytometry*. 39, 26-35.

Sanglard, D., Ischer, F., Koymans, L., Bille, J., 1998.

Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14 α -demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. *Antimicrob. Agents Ch.* 42, 241-253.
