

잣빛곰팡이 병원균 *Botrytis cinerea* 균주의 분리기주별 표현형적 특성, 병원성 및 약제저항성 변이

최인실 · 정영륜* · 조광연¹

경상대학교 자연과학대학 미생물학과

¹한국화학연구소 스크리닝안전성센터

Variations in Phenotypic Characteristics, Pathogenicity and Fungicides Resistance of *Botrytis cinerea*, Gray Mold Rot Fungus, Isolated from Various Host Plants

In Sil Choi, Young Ryun Chung* and Kwang Yun Cho¹

Department of Microbiology, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

¹Screening and Toxicology Center, Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon 305-343, Korea

ABSTRACT: Phenotypic characteristics, pathogenicity and fungicides resistance of fifty one isolates of *Botrytis cinerea* obtained from various host plants were observed and determined. The relationships between these characteristics were also investigated on the basis of isolation host plants. The isolates of *B. cinerea* varied in the capacity of sclerotia formation and sporulation. The pathogenicity of 44 isolates from tomato, cucumber, and strawberry was significantly stronger with 3.2 cm in average diameter of necrotic lesions on cucumber leaves than that of seven isolates from other host plants such as orange, gerbera, ginseng, kiwi, grape, pear and from butter with 1.8 cm in average diameter of necrotic lesions. Benomyl resistance of 12 isolates from tomato plants was much higher with the EC₅₀, 562 ppm than that of 19 isolates from various host plants. Diethofencarb resistance, however, of 11 isolates from strawberry plants was highest with the EC₅₀, 210 ppm among isolates from other host plants. Polygalacturonase activity varied among isolates in the range of 0 to 103 unit and that of isolates from tomato, cucumber and strawberry was slightly lower than that of isolates from other host plants. No significant relationship between pathogenicity and fungicides resistance, polygalacturonase activity was found among 51 isolates of *B. cinerea*. Isozyme patterns of polygalacturonase produced from two strongly and weakly pathogenic isolates (FC122, KC6) were slightly different depending upon carbon sources during cultivation.

KEYWORDS: Pathogenicity, fungicides resistance, *Botrytis cinerea*, gray mold rot fungus, polygalacturonase

*Botrytis cinerea*는 불완전균류에 속하는 식물병원성 진균으로 완전세대는 자낭균류인 *Botryotinia fuckeliana*로 밝혀져 있다(Faretra and Antonacci, 1987). 이 병원균은 습도가 높고 18~20°C 정도의 서늘한 기온 하에서 딸기, 토마토 등의 과육질이 많은 과채류와 그 외 여러 종류의 식물체에 잣빛

곰팡이병을 일으켜 생산에 치명적인 손실을 주고 있기 때문에 국내외적으로 이 병의 방제를 위해 여러가지 살균제를 자주 사용하고 있다. 그러나, 최근 살균제에 대한 저항성 균주의 발생으로 병에 대한 방제효과가 급격히 감소하여 더욱 피해가 심해지고 있는 실정이며(Faretra and Pollastro, 1993; Irino et al, 1991; Kim and Kwon, 1993; 김 등, 1993), 김 등(1993)은 국내 균주의 대부분이 benzimida-

*Corresponding author

zole계와 dicarboximide계 살균제에 대하여 저항성을 보고하였다.

살균제 저항성을 보이는 균주의 기생적 적응력은 procymidone 저항성 균주의 경우 균주에 따라 변이가 심하였으나 저항성과 감수성 균주간에 유의성 있는 차이는 없다고 하였다(Kim and Kwon, 1993). *B. cinerea*는 다핵성으로 균사융합에 의해 핵교합이 이루어지기 때문에 균주간의 유전적 변이가 매우 심하고, 따라서 기주저항성, 약제저항성 유전 등 병원균의 생물학적 특성 및 방제연구에 많은 어려움이 있다(Faretra and Grindle, 1992). 특히, *B. cinerea*의 기주는 많이 알려져 있으나 기주-병원균 특이성에 관한 연구는 거의 없는데, 아마도 균주간의 높은 변이율로 인한 연구방법상의 어려움 때문으로 생각되고 있다. 또한 이 병원균은 수신품종의 작물에 발병시킬 수 있기 때문에 부생균으로 생각되기도 하였으나 지금은 방제가 어려운 중요한 병원성 균으로 인식되어, 최근 침입과정에서 생성되는 pectin질 분해 효소 polygalacturonase 분리 및 유전학적, 분자생물학적 측면에서의 기본적인 연구가 많이 수행되고 있다(Bussink *et al.*, 1991; 나 등, 1994; Leone and Heuvel, 1987; Leone *et al.*, 1994; Urbaneck, 1975).

잣빛곰팡이병균 *B. cinerea*에 의해 생산되는 polygalacturonase는 pectin을 탄소원으로 하여 액체배양하였을 때 4개 정도의 동위효소를 갖고 있는 것으로 보고되었으며(나 등, 1994; Johnston and Williamson, 1992b), 기주식물의 세포벽을 추출하여 탄소원으로 배양하면 polygalacturonase의 생산이 많다고 하였다(Cooper *et al.*, 1981). 일반적으로 식물 세포벽에서 pectin질은 cellulose, hemicellulose, lignin 등과 함께 세포간극의 가장 중요한 구성분으로서 세포의 유지에 필수적인 역할을 하며, 식물병원균의 침입시 분해되는 것으로 알려져 있다. Pectin을 분해하는 효소로는 methyl ester linkages를 잘라서 polygalacturonic acid chain과 methanol을 생성하는 pectin methyl esterase, 가수분해 반응에 의하여 polygalacturonic acid chain을 분해하는 polygalacturonase, 그리고 탈수반응에 의하여 polygalacturonic acid chain을 분해하는 pectin lyase 등을 들 수 있다(Collmer, 1986; Sakai, 1992).

정(1993, 1994)은 polygalacturonase의 억제물질

찾아내기 위한 검정방법 확립을 위하여 *B. cinerea*가 생산하는 polygalacturonase의 효소생산 조건 및 활성 측정방법을 확립하였고, polygalacturonase를 몇가지 방법을 이용하여 순화하였다. 본 연구에서는 잣빛곰팡이병균 균주가 지역, 기주별로 변이가 심하므로 국내 여러 곳에서 균주를 확보하여 polygalacturonase 활성, 병원성, 약제저항성과 동위효소 pattern 등 균주간의 변이를 조사하였다.

재료 및 방법

사용병원균의 분리 및 확보

국내의 잣빛곰팡이병 발생지역에서 병든 식물체를 채취하여 흐르는 수도물에서 가볍게 씻은 뒤, 1% NaOCl에서 1분간 표면살균 후 감자설탕한천 배지(PDA)에 올려 20°C에서 일주일 동안 배양하였다. 이때 생기는 포자를 수확하여 single colony를 분리할 수 있도록 살균 증류수로 적당히 희석한 후 PDA에 도말하고 배양초기에 생기는 single colony를 분리하였다. 그 외 여러 균주들은 한국화학연구소 스크리닝 안전성센터, 농업과학기술원 병리과, 충남대학교 농생물학과, 한국과학기술원 유전자은행 등에서 분양받아 실험에 사용하였으며, 사용된 총 균주는 여러 기주에서 분리된 *B. cinerea* 51개와 양파에서 분리된 *B. squamosa* 2개 이었다.

병원균주의 병원성 검정

병원성 검정은 오이유묘(가락만춘오이, 중앙종묘)를 본엽 2엽기까지 키운 후 오이 유묘 2번째 잎에 옆맥을 기준으로 양쪽에 *B. cinerea*의 0.5 mm 균사 절편을 접종하였으며, 접종 후 습실처리된 압상자 속에 넣어 20°C에서 3일간 둔 뒤 생기는 병반의 지름을 측정하였다. 이때 발병을 돕기 위하여 병원균 접종 5일 전에 1.5% 요소액을 식물체에 적당량 처리하였다.

Polygalacturonase 활성 측정

*B. cinerea*의 효소생산용 종균 배양은 PDA 배지에서 하였으며 20°C에서 5일 동안 배양 후 실험에 사용하였다. 효소 생산을 위한 배지는 citrus pectin (Sigma) 0.5 g, NaNO₃ 1 g, KH₂PO₄ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.25 g, CaCl₂ 0.1 g, yeast extract 0.05 g(/l)

이었다. 효소생산을 하기 위한 세포배양은 위의 액체 배지 50 ml를 250 ml 삼각플라스크에 넣고 PDA 배지에서 5일 동안 배양한 직경 5 mm 병원균 균사 절편 5개를 접종하여 20°C에서 12일간 100 rpm으로 진탕배양하였다. 배양후 균사체를 cheesecloth로 걸러내고 배양여액의 효소활성을 측정하였다.

Polygalacturonase의 측정을 위하여 기질로는 Na^+ -polygalacturonic acid(0.5%, w/v)를 0.1M sodium acetate(NaOAc) 완충용액(pH 5)에 잘 섞어서 미리 40°C에서 5분간 처리한 후 사용하였으며, 배양여액을 첨가하여 40°C에서 20분간 반응시켰다. 이때 전체 반응부피는 2 ml로 조절하였고, 반응이 끝난 후 준비된 DNS(dinitrosalicylic acid, Sigma) 시약을 5 ml 첨가하여 끓는 물에서 10분간 처리 후 상온에서 식혔다. 이를 3,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 취하고 530 nm에서 그 흡광도를 측정하였다. 효소반응의 생성물은 D-galacturonic acid를 표준물질로 하여 얻은 곡선으로 결정하였다. Unit의 정의는 위의 반응 조건에서 1분 동안 1 μg 의 galacturonic acid를 생성하는 효소량을 1 unit(U)으로 하였다(나 등, 1994). 단백질의 양은 Bradford 방법에 의해 제품사용 방법에 따라 정량하였고 표준시료로 bovine serum albumin을 사용하였다.

병원균주의 살균제 저항성 조사

각 균주의 살균제 저항성 조사를 위하여 benzimidazole계 benomyl(50% wp)과 dicarboximide계로 procymidone, vinclozoline(50% wp) 그리고 diethofencarb를 PDB에 각각 1000, 100, 10, 1 ppm으로 녹인 후 한천을 1.8%(w/w) 되게 첨가하여 살균 후 배지를 조제하였다. 이 배지에 20°C에서 3일간 키운 *B. cinerea*의 균사선단부 절편(직경 0.5 mm)을 접종하여 5일간 배양한 다음 농도별 균총직경을 측정하고 균사생장 저해율을 구하였으며, 이 값을 바탕으로 EC_{50} 값을 구하였다. 모든 값은 3반복의 평균값으로 하였다.

$$\text{균사생장저해율} = 1 - \frac{\text{약제 처리구 균총 지름}}{\text{약제 무처리구 균총 지름}}$$

균주간 polygalacturonase 동위효소의 비교

균주간 polygalacturonase 동위효소의 pattern을

비교하기 위하여 토마토, 딸기, 오이에서 분리된 균주 중 병원성이 약한 3균주, BC-5, NS-1, FC-122와 강한 균주 JM-43, CS-107, KC-6을 선발하여 사용하였다. 각 균주가 분리된 식물의 세포벽을 탄소원으로 사용하여 배양한 후 생산된 효소를 activity staining 방법(Ried and Collmer, 1985)을 이용하여 동위효소 pattern을 조사하였다. 균 배양여액 20 ml를 동결건조하여 농축시킨 뒤 10 mM HEPES buffer(pH 7.2)를 이용 투석한 후, 이 조효소액에 sucrose dye를 10% 처리하고 Laemmli(1970)의 방법에 따라 polyacrylamide native gel electrophoresis를 수행하였다. Tris base-Glycine buffer(pH 8.3)를 electrode running buffer로 사용하였으며 200 volts로 전기영동 하였다. 약 45분 정도 시료 loading 후 10 mM sodium acetate buffer(pH 4.5)로 1시간 동안 pre-incubation 하였고 activity staining gel을 포개 후 37°C에서 2시간 반응시켰다. Activity staining gel 구성은 2% agarose와 2 mM EDTA(pH 8.0), 0.2% Na-polygalacturonic acid in 100 mM sodium acetate buffer(pH 4.5)를 같은 부피로 섞어서 만들었다. Activity staining gel 염색은 0.05% Ruthenium red로 약 1시간 동안 염색한 후 증류수로 발색시켰다. 기주 식물의 세포벽은 토마토 잎, 딸기 열매, 오이 잎을 채취하여 Cooper 등(1981)의 방법으로 세포벽을 추출하였다.

자료의 통계적 분석

균주간 효소활성, 병원성, 약제저항성 등의 상관관계 조사와 각 기주별 유의성 검정은 Minitab 통계 프로그램을 이용 분석하였다.

결 과

기주별 병원균의 분리 및 확보

국내에서 잭빛곰팡이병의 병원균으로 분리된 균주는 기주별로 딸기, 토마토, 오이에서 각각 19, 15, 10개 균주가 분리되었고, 그 외 귤, 포도, 거베라, 배나무, 양다래, 인삼에서 1균주씩 분리되었다(Table 1). 한국과학기술원 유전자은행에서 분양받은 균주 KCTC1937은 일본에서 butter로부터 분리된 균주였고, 양파에서 분리된 균주는 *B. squamosa*로 형태적으로 포자모양이 *B. cinerea*와는 다른 균주였

Table 1. Details of *Botrytis cinerea* and *Botrytis squamosa* isolates used in the study

Isolate	Host	Pathogenicity ^a (lesion diameter, cm)	Polygalacturonase activity (sp. act.=U/mg)	Collection	
				Location	Year
<i>B. cinerea</i> isolates					
T91-1	Tomato	4.30	31.25	Yusung	1991
BC-5	Tomato	1.70	44.95	Yusung	1988
KC-5	Cucumber	—	21.00	Yusung	1989
KC-6	Cucumber	4.73	28.53	Yusung	1989
S-1	Cucumber	3.48	47.76	Yusung	1991
V-1	Cucumber	1.43	54.15	Yusung	1991
BC-1	Cucumber	—	47.77	Suwon	1987
BC-2	Tomato	—	55.91	Suwon	1987
BC-4	Orange	—	103.10	Suwon	1987
SW-31	Grape	2.20	40.84	Suwon	1993
G-1	Gerbera	1.43	54.15	Kimhae	1990
KT-433	Tomato	2.85	24.82	Kimhae	1990
JT-104	Tomato	3.30	10.11	Daejeon	1990
JT-101	Tomato	3.70	19.47	Daejeon	1990
DJ-71	Strawberry	3.25	47.83	Daejeon	1994
DJ-49	Strawberry	3.60	64.76	Daejeon	1994
ZS-107	Strawberry	—	0.00	Daejeon	1990
NS-111	Strawberry	3.42	29.41	Yeongi	1990
FC-122	Cucumber	0.25	21.60	Pyungtaek	1990
PT-33	Pear	2.60	71.49	Pyungtaek	1992
DS-473	Strawberry	1.75	27.61	Damyang	1990
DS-522	Strawberry	3.80	36.82	Damyang	1990
JM-1	Tomato	4.05	30.21	Moonsan	1993
JM-2	Tomato	3.48	26.46	Moonsan	1993
JM-3	Tomato	3.65	31.65	Moonsan	1993
JM-4	Tomato	3.58	30.79	Moonsan	1993
JM-42	Tomato	2.23	49.98	Moonsan	1995
JM-43	Tomato	4.68	50.03	Moonsan	1995
CS-107	Strawberry	4.18	59.09	Nonsan	1990
NS-1	Strawberry	0.77	61.29	Nonsan	1994
NS-53	Strawberry	2.75	51.71	Nonsan	1994
S91-8	Strawberry	—	55.77	Nonsan	1991
S91-7	Strawberry	—	85.29	Nonsan	1991
S91-6	Strawberry	—	78.18	Nonsan	1991
S91-2	Strawberry	—	0.00	Nonsan	1991
JS-5	Strawberry	—	29.59	Sugok	1993

Table 1. Continued

Isolate	Host	Pathogenicity ^a (lesion diameter, cm)	Polygalacturonase activity (sp. act. = U/mg)	Collection	
				Location	Year
JS-6	Strawberry	—	57.50	Sugok	1993
BT-300	Tomato	4.18	21.94	Buyoe	1990
BY-33	Cucumber	2.83	54.72	Buyoe	1994
BY-6	Cucumber	3.25	45.55	Buyoe	1994
BY-3	Cucumber	2.40	40.09	Buyoe	1994
BY-2	Cucumber	3.10	42.72	Buyoe	1994
IT-106	Tomato	3.85	20.95	Yongin	1990
SC-171	Strawberry	2.98	65.12	Suncheon	1990
SC-34	Strawberry	3.33	53.23	Suncheon	1993
SC-35	Tomato	3.58	51.69	Suncheon	1993
GJ4-3	Strawberry	3.65	54.78	Gongju	1994
GJ5-2	Strawberry	3.38	35.76	Gongju	1994
NH-32	Kiwi	2.70	57.19	Namhae	1992
CA-36	Ginseng	2.25	38.88	Chinahn	1980
KCTC1937	Butter	0.00	65.18	Japan	
<i>B. squamosa</i> isolates					
CN-24	Onion	0.00	70.88	Changnyung	1995
CN-25	Onion	0.44	78.97	Changnyung	1995

^aNecrotic lesions diameter of cucumber leaves inoculated with agar discs ($\phi=5$ mm) of the pathogen was measured 3 days after inoculation at 20°C.

다. 이들 균주는 지역별로는 경남 김해, 수곡을 포함하여 전국적으로 15개 지역에서 1980년부터 1995년도까지 분리된 것이었다.

균주별 형태적 특성 및 병원성

분리된 균주는 모두 흰색, 옅은 회색 또는 짙은 회색의 균총색을 보였고 균핵과 포자형성 정도가 다양하였다. NS-111, DS-473, FC-122 균주는 균핵형성량은 많았으나 포자형성량은 적었고, BC-5, KC-6 균주는 그 반대의 경향이였다(Table 2, Fig. 1).

오이 유묘를 이용한 병원성 검정에서는 양파에서 분리된 *B. squamosa*와 butter에서 분리된 KCTC 1937 균주가 전혀 병원성이 없었고, 오이와 토마토에서 분리된 KC-6와 JM-43 균주는 직경 4.7 cm 정도의 괴저병반을 보여 강한 병원성을 갖고 있었다(Table 1). 또 균주에 따라 0.25 cm에서 4.3 cm 이상

정도로 다양한 병원성을 보였으며, 분리된 균주들을 기주별로 구분하여 병원성을 비교한 결과는 Table 5와 같다. 토마토 분리균주가 괴저병반 직경 3.5 cm로 오이, 딸기 분리균주에 비해 병원성 정도가 강한 경향이였으나 오이 분리균주와는 유의성 있는 차이가 없었다. 인삼, 양다래를 비롯한 다른 기주분리 균주는 병원성 정도가 주요 3기주 균주에 비해 유의성 있게 낮았다.

균주의 살균제 저항성

잿빛곰팡이병의 방제를 위하여 농가에서 널리 사용되었거나 현재 사용되고 있는 살균제 4종에 대한 분리균주의 저항성 정도는 Table 3과 같다. Benomyl의 경우 BC-1, BC-4외 6균주가 EC₅₀ 1 ppm 이하로 감수성이었고, G-1, BC-2, KC-5, S91-2 균주는 EC₅₀ 52 ppm에서 92 ppm으로 중도 저항성을 보였

Table 2. Phenotypic differences between isolates of *Botrytis cinerea* isolated from various host plants

Isolate	Mycelial color	Sclerotia formation	Sporulation
BC-5	Dark grey	-	+++
DS-473	White	+++ (117 ^a)	-
FC-122	White	+++ (C ^b)	+
JT-101	White	++ (98)	+
JT-104	White	+	+
S-1	White	-	+
T91-1	White	++ (87)	+
G-1	White grey	-	-
KC-6	White grey	-	++
S91-2	White grey	-	-
BC-5	Dark grey	-	+++
NS-111	Dark grey	+++ (104)	++

^aThe number of sclerotia produced on PDA.

^bSclerotia were clustered to form a circle.

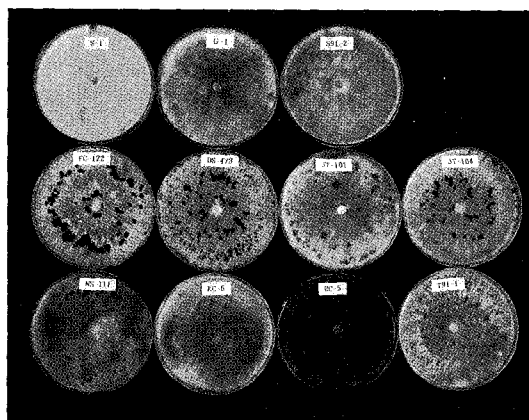


Fig. 1. Morphological differences between isolates of *B. cinerea* on PDA. All colonies were derived from mass-hyphal inocula, incubated at 20°C for 10 days.

다. 그 외 19개 균주는 EC₅₀ 350 ppm 이상으로 높은 저항성을 갖고 있었다. Procymidone의 경우에는 benomyl과 같이 뚜렷하지는 않으나 균주에 따라 100배 정도의 차이가 있었는데, JM-2는 EC₅₀가 37 ppm으로 다른 균주에 비해 상대적으로 저항성이

Table 3. Effective concentrations of four fungicides inhibiting 50% mycelial growth of *Botrytis cinerea* isolates obtained from various host plants

Isolate	EC ₅₀ (ppm)			
	Benomyl	Procymidone	Vinclozoline	Diethofencarb
T91-1	400	0.62	4.10	<1.00
BC-5	540	0.37	0.45	<1.00
KC-5	84	0.52	0.35	0.35
KC-6	370	0.35	0.45	0.35
BC-2	80	0.33	0.54	<1.00
BC-4	<1.00	0.36	0.41	8.50
BC-1	<1.00	0.39	3.20	110
G-1	52	0.37	0.76	<1.00
KT-433	940	3.20	3.60	<1.00
S-1	0.64	0.44	0.40	<1.00
V-1	540	3.60	4.10	<1.00
JT-104	700	0.37	0.37	<1.00
JT-101	1200	3.30	4.00	<1.00
NS-111	<1.00	0.36	0.48	>1000
FC-122	520	4.50	3.60	<1.00
DS-473	<1.00	0.35	0.37	>1000
DS-522	<1.00	<1.00	<1.00	92
JM-1	370	3.30	4.20	<1.00
JM-2	880	37	3.60	<1.00
JM-3	420	3.30	6.00	<1.00
JM-4	620	3.20	3.50	<1.00
JS-5	800	3.20	3.60	<1.00
JS-6	430	4.00	5.60	<1.00
CS-107	450	3.20	4.10	0.36
BT-300	490	3.20	<1.00	<1.00
ZS-107	660	0.35	6.40	<1.00
IT-106	<1.00	0.45	0.37	>1000
S91-8	370	4.00	<1.00	0.35
S91-7	410	3.70	5.80	0.37
S91-6	<1.00	<1.00	0.47	0.64
S91-2	92	5.00	9.60	<1.00

있고 BC-2는 0.33 ppm으로 감수성이었다. Vinclozoline에 대한 균주의 반응은 procymidone과 유사하

Table 4. Fungicides resistance of *Botrytis cinerea* isolates grouped on the basis of isolation hosts

Host	Isolate number	Mean of EC ₅₀ , ppm			
		Benomyl	Procyimidone	Vinclozoline	Diethofencarb
Tomato	12	562.2± 87.2 ^a	4.7 ± 2.5	2.9 ± 0.5	71.9± 71.4
Cucumber	6	199.0± 109.0	1.1 ± 0.6	1.7 ± 0.8	22.3± 21.9
Strawberry	11	250.4± 81.3	2.2 ± 0.6	3.2 ± 1.0	210.0± 132.0
Others ^b	2	26.2± 25.7	0.37± 0.01	0.59± 0.18	4.5± 4.0

^aStandard error of the mean, ^bTwo different hosts; ginseng and orange.

였지만, diethofencarb의 경우는 DS-473, IT-106, NS-111 균주가 1000 ppm 이상의 고도저항성을 보였고, BC-1과 DS-522는 중도저항성, 그 외 균주는 모두 감수성이었다.

분리된 균주를 기주별로 구분하여 각 살균제에 대한 저항성 정도를 비교하였는데 결과는 Table 4와 같다. Benomyl에 대한 저항성 정도는 토마토에서 분리된 균주가 562.2± 87.2 ppm으로 딸기균주의 250.4± 81.3 ppm, 오이균주의 199.0± 109.0 ppm에 비해 훨씬 높아 유의성 있는 차이를 보였으며, 다른 2기주로부터 분리된 균주는 위 3균주에 비해 감수성이었다. Procyimidone과 vinclozoline에 대한 저항성은 토마토, 딸기, 오이 균주간에 유의성 있는 차이는 없었으나 토마토 균주의 EC₅₀가 약간 높은 경향을 보였고, 다른 2균주는 3기주로부터 분리된 균주에 비해 EC₅₀가 0.37, 0.59 ppm으로 훨씬 낮았다. Diethofencarb의 경우에도 토마토, 오이, 딸기균주간에 유의성 있는 차이는 없었으나 딸기균주가 가장 저항성인 경향을 보였으며, 역시 다른 2균주는 감수성이었다.

균주의 polygalacturonase 활성

분리된 균주의 pectin질 분해효소 polygalacturonase의 specific activity는 ZS-107, S91-2 균주는 활성이 검출되지 않았으며, BC-4 균주는 103.1 unit로 가장 높았다. 나머지 균주 중에서 30 unit 이하인 균주가 13개, 30~60 unit인 균주가 28개, 60 unit 이상인 균주는 9개이었다(Table 1). 기주별로 구분하여 균주들간의 효소활성을 조사하였는데, 딸기 분리균주가 46.0 unit로 가장 높았으나 오이, 토

Table 5. Pathogenicity and polygalacturonase activity of *Botrytis cinerea* isolates grouped on the basis of isolation hosts

Host	Isolate number	Mean of	
		Pathogenicity (lesion diameter, cm)	Polygalacturonase (sp. act. = U/mg)
Tomato	15	3.5± 0.02 ^a	34.6± 3.5
Cucumber	10	3.3± 0.3	38.5± 4.3
Strawberry	19	2.9± 0.3	46.0± 5.6
Others ^b	7	1.8± 0.4	61.6± 8.2

^aStandard error of the mean. The pathogenicity was determined 3 days after inoculation of pathogen agar discs on cucumber leaves at 20°C.

^bSeven different hosts.

마토 균주와 유의성 있는 차이는 없었다. 그러나, 타 기주에서 분리된 7균주의 활성은 61.6 unit로 주요 3기주 분리 균주보다 훨씬 높았다(Table 5).

균주의 병원성, polygalacturonase 활성 및 저항성 간의 상관관계

균주들의 병원성과 polygalacturonase 활성, 살균제 저항성 간에 어떤 연관성이 있는지 알기 위하여 각 요인들 사이의 상관관계를 조사하였다. Table 6에서와 같이 각 요인들 사이에는 상관계수가 모두 0.4 이하로 서로 유의성 있는 상관관계가 발견되지 않았다.

Table 6. Relationship between pathogenicity and polygalacturonase activity and fungicide resistance of *Botrytis cinerea* isolates from various host plants

	Correlation Coefficient				
	Pathogenicity	PG ^a	Fungicide Resistance		
			Benomyl	Procydione	Vinclozoline
Polygalacturonase	-0.253				
Benomyl	0.061	-0.364			
Procydione	0.038	-0.115	0.397		
Vinclozoline	0.119	-0.262	0.371	0.236	
Diethofencarb	-0.086	-0.151	-0.399	-0.146	-0.312

^aPolygalacturonase activity

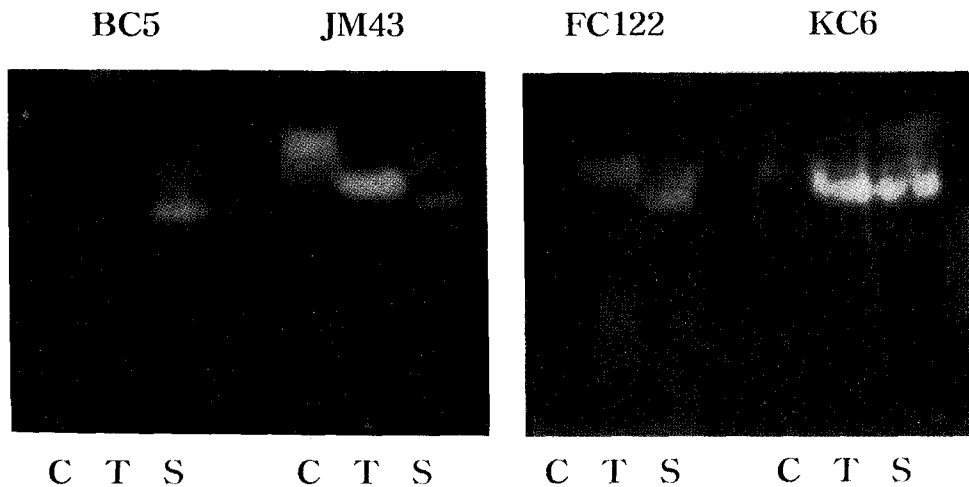


Fig. 2. Isozymes pattern of polygalacturonase produced by *B. cinerea* isolates in culture media containing cell-wall preparations of cucumber (C), tomato (T), and strawberry (S) as carbon sources. Host plants of BC5 and JM43 isolates were tomato and those of FC122 and KC6 were cucumber. Extracellular polygalacturonase was resolved by polyacrylamide native gel electrophoresis with polygalacturonic acid-agarose overlay.

균주간 polygalacturonase 동위효소의 pattern 비교

기주인 토마토에서 분리된 균주 중에서 병원성이 약한 BC-5와 강한 JM-43 균주의 polygalacturonase 동위효소 pattern은 Fig. 2A와 같다. 오이, 토마토, 딸기 등 기주세포벽 추출물을 탄소원으로 하여 배양하였을 때는 동일 균주라도 탄소원에 따라 band 모양이 서로 약간 다르게 나타났으나, 병원성 강약에 따른 2균주간에는 모양이 유사하였다. 오이에서 분

리된 균주 중 병원성이 약한 FC-122와 강한 KC-6 균주간에 약간의 차이가 있었고 전자의 경우 오이, 토마토, 딸기 세포벽추출물을 탄소원으로 하였을 때 모양이 다르게 나타났다(Fig. 2B).

고찰

햇빛곰팡이병균 *Botrytis cinerea*는 과채류, 화훼류 등 여러 식물을 기주로 하는 다범성으로 포장에서

분리되는 균주간에 변이가 아주 많고, 이러한 변이가 병원균의 생물학적 적응력에도 영향을 끼치는 것으로 알려져 있다(Faretra and Grindle, 1992; Kim and Kwon, 1993). 국내 균주들 대부분이 딸기, 토마토, 오이에서 분리되었으며 이 균주들은 배지에서의 균사색깔, 균핵 및 포자형성에 차이가 많았는데, Grindle(1979)의 보고와 같은 경향이었다. 여러 기주에서 분리된 각 균주들은 오이잎에 균사절편을 접종한 병원성 검정에서 병원성이 아주 약한 균주와 중간 정도, 그리고 강한 종류로 변이가 많았으나, 토마토, 딸기, 오이에서 분리된 균주간에는 기주별로 특별한 경향은 없었다(Table 5). 이것으로 볼 때 잭빛곰팡이 병원균은 3기주간에는 다른 병원균에서 볼 수 있는 것과 같은 기주 특이성은 없는 것으로 생각된다. 이 병원균이 기주 침입과정시 생성하는 것으로 알려진 pectin질 분해 효소 polygalacturonase 활성도 균주간에 변이가 심하였으나 병원성과 직접적인 상관관계는 없었다. 이것은 이 효소가 발병에 직접적으로 요구되지 않거나(Scott-Graig *et al.*, 1990) 또는 배양여액의 활성을 측정할 것이기 때문에 발병과 관련된 정확한 동위효소 부분이 구분되어 측정될 수 없었을 수도 있다(Köller와 개인 서신). 병원성과 유사하게 균주 효소활성의 기주별 구분에서도 일정한 경향이 없었다. 그러나, 위의 중요 3기주에서 분리된 균주 외 나머지 균주들은 병원성이 유의성 있게 낮았으며 polygalacturonase 활성도 유의성 있게 높았다. 이 결과는 타 기주에서 분리된 잭빛곰팡이 병원균 균주들이 토마토, 딸기, 오이 분리균주와는 다른 특성이 있음을 나타낸다고 볼 수 있으며, 이러한 균주간의 변이는 유전학적 분자생물학적 분석을 통하여 확인될 수 있을 것이다.

잭빛곰팡이 병은 습하고 서늘한 온도에서 발병이 심한데 우리나라 또는 일본의 경우 특히 겨울과 봄 사이의 온실 작물재배에서 병이 많아 집중적으로 살균제를 사용해 왔다. 그래서 오래전부터 살균제 저항성이 문제되어 왔으며 균주집단의 상당부분이 살균제 저항성인 균으로 알려져 있다(김 등, 1993; Akutsu *et al.*, 1987; Akutsu *et al.*, 1988). 살균제 종류별로 볼때 분리된 균주들의 benomyl에 대한 저항성이 가장 높았고, 기주별로는 토마토 분리균주가 가장 높았다(Table 3, 4). 이것은 간접적으로 토마토 잭빛곰팡이병 방제를 위하여 benomyl이 가

장 많이 사용된 것을 나타내며, 실제 우리나라 온실재배 토마토병 중 제일 문제가 되고 있는 것이 잭빛곰팡이병이라는 사실이 이 결과를 뒷받침한다(유 등, 1990). Dicarboxymide 살균제인 procymidone, vinclozoline에 대한 저항성 정도는 중요 3기주별로는 유의성 있는 차이가 없었으며 benomyl에 비해 EC_{50} 값도 아주 낮았다. 이것은 이 약제가 benomyl에 비해 훨씬 늦게 개발되어 잭빛곰팡이병 방제에 사용되었기 때문에 균주집단간에 충분한 저항성확산이 이루어지지 않은 것 때문으로 생각된다. Diethofencarb의 경우 오이 분리균주가 다른 기주 분리균주에 비해 훨씬 저항성으로 나타났는데, 이 살균제는 사용되기 시작한지 오래되지 않았음에도 불구하고 저항성이 나타나 특히 딸기의 경우 사용에 유의해야 할 것이다. 토마토, 딸기, 오이 분리균주와 다른 균주들은 병원성과 polygalacturonase와 유사하게 살균제에 대한 반응도 아주 달라 감수성으로 나타났다. 이 균주들은 생리·생태학적 특성이 중요 3기주 분리 균주와는 다른 것으로 보인다.

이러한 균주간 표현형적 변이요인 간의 관계를 분석해 본 결과 병원성과 polygalacturonase 활성 및 살균제 저항성 등 간에 유의성 있는 상관관계가 없었다(Table 6). 이 결과는 위와 같은 균주간의 변이가 병원성에 직접적인 영향을 미치지 않음을 말하는 것이며, 균주내 다른 요인에 의해 병원성이 영향을 받음을 알 수 있다. 균주간 병원성이 강하고 약한 균주를 선택하여 polygalacturonase 동위 효소 pattern을 비교하였는데, 토마토, 오이, 딸기 세포벽 추출물을 탄소원으로 배양하였을 때 그 모양이 다르게 나타났다(Fig. 2). 이 동위효소 중 어느 한 효소가 발병과 직접적인 관련이 있을지도 모르며, 각 균주의 polygalacturonase 효소를 더 순수분리하여 병원성과 연관을 조사해야 할 필요가 있다. 이 병균의 방제를 위해서는 앞으로 병원균 침입과정 중 polygalacturonase 효소 생산과정(Johnston and Williamson, 1992a)을 더 연구하고, 이 효소의 억제기작을 가진 살균제의 개발도 바람직하다(Barmore, 1985; Bughee, 1993). 또한, 이상과 같은 여러 균주간의 변이를 표현형적인 특성외에 분자생물학적 또는 유전학적 방법으로도 조사하여 이것을 바탕으로 포장내에서의 균주간 집단 변이 및 특성을 더 연구해 볼 필요가 있다고 생각된다(Faretra and Pol-

lastro, 1993).

적 요

잣빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*) 51균주를 국내 여러곳에서 분리 또는 확보하여 이들 균주의 기주, 형태적 특성, 약제저항성 및 polygalacturonase 활성을 조사하였으며, 분리 기주별로 병원성을 포함한 이들 특성의 상호관계를 조사하였다. 분리된 균주들은 모두 흰색, 옅은 회색 또는 짙은 회색의 균총색을 보였고, 균주에 따라 균핵과 포자형성량이 달랐다. 병원성 검정에서는 토마토, 오이, 딸기로부터 분리된 균주들의 오이잎 괴사병반 지름이 평균 3.2 cm로 감귤, 양다래, 배 등 다른 기주로부터 분리된 균주의 1.8 cm보다 훨씬 컸다. 각 균주들의 살균제 저항성은 토마토 분리균주들의 benomyl 저항성이 EC₅₀ 562 ppm으로 다른 균주에 비해 훨씬 높았으며, 딸기 분리균주의 경우 사용되지 얼마되지 않은 die-thofencarb에 대하여 EC₅₀ 210 ppm으로 높은 저항성을 나타내었다. Polygalacturonase 활성은 균주간에 변이가 심하여 specific activity가 최저 0 unit부터 103 unit까지 걸쳐 있었으며, 토마토, 오이, 딸기 등 주요 기주로부터 분리된 균주가 그렇지 않은 균주에 비해 약간 낮은 경향을 보였다. 균주들의 효소활성, 살균제 저항성과 병원성간에는 직접적인 상관관계가 없었다. 그러나, 병원성이 강한 균주와 약한 균주의 polygalacturonase 동위효소 pattern은 배양시 탄소원에 따라 서로 약간의 차이가 있었다.

감사의 말

본 연구는 1995년 교육부에서 시행한 기초과학 연구소 학술연구조성비(과제번호 BSRI-95-4405) 지원과 과학기술처 선도기술개발사업의 일부지원으로 수행되었습니다. 연구에 사용된 병원균을 분양해 주신 농업과학기술원 병리과 조원대 연구관님, 충남대학교 농생물학과 유승헌 교수님께 감사드립니다.

参考文献

Akutsu, K., Irino, T., Tsukamoto, T. and Okuyama,

- S. 1987. Relationship between development of benomyl-resistant strains and hyphal fusion in *Botrytis cinerea*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **93**: 495-506.
- Akutsu, K., Irino, T., Kubo, A., Okuyama, S. and Tadaaki, H. 1988. Induction of dicarboximide fungicide-resistance with filtrates of the resistant strains of *Botrytis cinerea*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **94**: 593-599.
- Barmore, C.R. and Nguyen, T.K. 1985. Polygalacturonase inhibition in rind of valencia orange infected with *Diplodia natalensis*. *Phytopathology* **75**: 446-449.
- Bughee, W.M. 1993. A pectin lyase inhibitor protein from cell walls of sugar beet. *Phytopathology* **83**: 63-68.
- Bussink, H.J.D., Brouwer, K.B., L.H. de Graaff, Kester, H.C.M. and Visser, J. 1991. Identification and characterization of a second polygalacturonase gene of *Aspergillus niger*. *Curr. Genet.* **20**: 301-307.
- 정영륜. 1993, 1994. 식물병원균의 pectin질 분해효소를 이용한 새로운 살균제 스크리닝 방법개발. 한국화학 연구소 위탁연구과제 보고서.
- Collmer, A. 1986. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Ann. Rev. Phytopathol.* **24**: 383-409.
- Cooper, R.M., Wardman, P.A. and Skelton, J.E.M. 1981. The influence of cell walls from host and non-host plants on the production and activity of polygalacturonide-degrading enzymes from fungal pathogens. *Physiological Plant Pathology* **18**: 239-255.
- Faretra, F. and Antonacci, E. 1987. Production of apothecia of *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetz. under controlled environmental conditions. *Phytopath. medit.* **26**: 29-35.
- Faretra, F. and Grindle, M. 1992. Genetics studies of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). In: Recent advances in *Botrytis* research, ed. by K. Verhoeff, N.E. Malathrakakis, and B. Williamson, pp. 7-17. Pudoc Sci. Publisher, Wageningen.
- Faretra, F. and Pollastro, S. 1993. Genetics of sexual compatibility and resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in isolates of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) from nine countries. *Plant Pathology* **42**: 48-57.
- Grindle, M. 1979. Phenotypic differences between natural and induced variants of *Botrytis cinerea*. *J. Gen. Microbiol.* **111**: 109-120.
- Irino, T., Endo, T., Akutsu, K. and Okuyama, S. 1991. Characteristics of induced dicarboximide fungicide-

- resistant strains conferred by filtrates of the resistant strains of *Botrytis cinerea*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **57**: 17-23.
- Johnston, D.J. and Williamson, B. 1992a. An immunological study of the induction of polygalacturonases in *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiol. Lett.* **97**: 19-24.
- Johnston, D.J. and Williamson, B. 1992b. Purification and characterization of four polygalacturonases from *Botrytis cinerea*. *Mycol. Res.* **96**: 343-349.
- Kim, C.H. and Kwon, S.I. 1993. Parasitic fitness of procymidone-resistant isolates of *Botrytis cinerea* on strawberry. *Kor. J. Plant Pathol.* **9**: 26-30.
- 김병섭, 최경자, 조광연. 1993. Benzimidazole계 및 dicarboximide계 살균제에 저항성인 잭빛곰팡이병균 (*Botrytis cinerea*)의 몇가지 약제에 대한 반응. *한국 식물병리학회지* **9**: 98-103.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- 나유진, 김재원, 정영륜, 허남응, 조광연. 1994. 잭빛곰팡이병균 *Botrytis cinerea*가 분비하는 polygalacturonase의 부분정제와 특성. *한국식물병리학회지* **10**: 215-221.
- Leone, G. and Heuvel, J.V.D. 1987. Regulation by carbohydrates of the sequential in vitro production of pectic enzymes by *Botrytis cinerea*. *Can. J. Bot.* **65**: 2133-2141.
- Leone, G., Schoffemeer, E.A.M. and Heuvel, J.V.D. 1990. Purification and characterization of a constitutive polygalacturonase associated with the infection process of French bean leaves by *Botrytis cinerea*. *Can. J. Bot.* **68**: 1921-1930.
- Ried, J.L. and Collmer, A. 1985. Activity stain for rapid characterization of pectic enzymes in isoelectric focusing and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 615-622.
- Sakai, T. 1992. Degradation of pectins, In: Microbiological degradation of natural products, ed. by G. Winkolmann, pp. 57-82. VCH., Weinheim.
- Scott-Graig, J., Panaccione, D., Cervone, F. and Walton, J.D. 1990. Endopolygalacturonase is not required for pathogenicity of *Cochliobolus carbonum* on maize. *The Plant Cell* **2**: 1191-1200.
- Urbanek, H. and Zalewska-Sobczak, J. 1975. Polygalacturonase of *Botrytis cinerea* E-200 pers. *BBA.* **377**: 405-409.
- 유승현, 김홍기, 노태홍, 우인식, 인무성. 1990. 시설원에 잭빛곰팡이병 약제내성균의 발생과 방제에 관한 연구. *농시논문집(농업산학협동편)* **33**: 141-151.