

Prochloraz에 저항성인 잣빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*)의 유기 및 이들 균의 생물학적 특성

김병섭* · 박은우¹ · 박정현 · 노성환 · 조광연
한국화학연구소 스크리닝연구부, ¹서울대학교 농생물학과

Induction of Prochloraz-Resistant Isolates of *Botrytis cinerea* in Vitro and Their Biological Properties

Byung Sup Kim*, Eun Woo Park¹, Jung Hun Park, Seong Hwan Roh and Kwang Yun Cho
Agrochemical Screening Division, Korea Research Institute of Chemical Technology,
Taejon 305-606, Korea

¹Department of Agricultural Biology, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

ABSTRACT : A total of 1,504 isolates of *Botrytis cinerea* were obtained from diseased strawberries, tomatoes and cucumbers in 1994-1995 in Taejon, Gongju, Puyo, Nonsan and Kimhae in Korea, and their responses to fungicides were examined on potato-dextrose agar media (PDA) containing 10 µg/ml of benomyl, procymidone or prochloraz. Among them, 1,147 (76.3%) isolates were benomyl-resistant, 614 (40.8%) procymidone-resistant, and 189 (12.6%) prochloraz-resistant (PR). In the minimum inhibitory concentration (MIC) test, PR isolates induced by UV irradiation and by continuous culturing on prochloraz-containing media showed mycelial growth on PDA incorporated with 8-32 µg/ml of prochloraz, while prochloraz-sensitive (PS) isolates did not grow on PDA containing even 2 µg/ml of prochloraz. In comparison of fitness-related characteristics such as virulence, spore germination and sclerotial formation, PR isolates were equivalent or inferior to PS isolates.

Key words : *Botrytis cinerea*, prochloraz, resistant, fitness.

*Botrytis cinerea*는 오이, 토마토, 딸기 등 우리나라 주요 시설 원예작물뿐만 아니라, 화훼와 과수 등 각종 작물에 잣빛곰팡이병을 일으키는 대표적인 다범성 병원균으로 작물의 생육 시기뿐만 아니라 저장 및 수송 중에도 피해가 심하여 이 병의 방제는 대단히 중요하다.

이 병의 방제를 위해서는 살균제에 의한 화학적 방법이 실제적으로 가장 효과적으로 이용되고 있는데, 방제 약제로 널리 사용되는 benzimidazole계 및 dicarboximide계는 저항성균의 발생으로 약효가 현저히 떨어지고 있는 실정이다. Benzimidazole계 살균제의 저항성균에만 특이적으로 약효를 나타내어 benzimidazole계 살균제와 합제의 형태로 널리 이용되는 *N*-phenylcarbamate계의 살균제도 두 계열 모두에 저항성을 나타내는 다중 저항성균의 발생으로 방제에 어려움을 겪고 있다(12, 16, 21, 23). 그러므로 약제 저항성

균의 방제를 위해서는 작용 메커니즘이 다른 약제의 사용이 필요하다. 김 등(13)은 prochloraz의 잣빛곰팡이병균에 대한 높은 방제효과를 보고했는데, 이 약제는 살균 작용 범위가 넓고, 침투 이행성과 치료효과가 있으며 낮은 농도에서도 좋은 약효를 나타냄으로서 여러 면에서 많이 이용되고 있다. 이 약제는 사과와 검은무늬병과 흰가루병, 배의 *Monilinia*에 의한 병 등 과수병의 방제 및 맥류의 그물무늬병, 잎마름병, 흰가루병 등과 같은 병방제 약제로 널리 사용되고 있다 (10, 18, 20).

Prochloraz의 작용 메커니즘은 ergosterol 생합성 과정 중 lanosterol의 C-14 demethylation 저해하는 작용을 나타내므로 이 살균제는 포자 발아보다는 균사 생장을 억제하며, 발아된 포자의 발아관의 팽대 (swelling) 및 기형(deformation)을 유발하는 것으로 알려져 있다(2, 6, 9, 11, 18, 19). Ergosterol 생합성 저해제(EBI제)에 대한 저항성은 포장 및 시설 재배 하우스

*Corresponding author.

에서 fenarimol 등에 대한 오이 흰가루병에서 처음 보고된 후 많은 보고가 있었다(4, 21). EBI에 대한 저항성 메커니즘은 저항성균의 경우 이러한 살균제의 흡수 자체를 감소시키는 작용에 의한다고 보고되었다(1, 2, 14, 15, 22).

Benzimidazole계 및 dicarboximide계를 대체할 수 있는 방제 약제로 ergosterol 생합성 저해제인 prochloraz를 잿빛곰팡이병균 방제 약제로 이용하기 위하여 이러한 약제에 대한 저항성균의 특성을 조사하는 것이 필요하다. 따라서 본 연구에서는 ergosterol 합성 저해제 (EBI)인 prochloraz에 대한 포장에서 분리한 병원균의 저항성 밀도를 조사하고, 연구에 필요한 저항성 균주를 얻기 위하여 자외선(UV) 조사와 약제 배지에서 누대배양을 통하여 저항성 균주를 얻었으며, 이러한 균주들의 적응력을 감수성 균주와 비교 조사하였다.

재료 및 방법

병원균의 분리 및 약제반응 조사. 실험에 사용한 *B. cinerea* 균주는 1994~1995년에 대전, 충남 논산, 부여, 공주와 경남 김해 등의 오이, 토마토, 딸기의 시설 재배 포장으로부터 병든 식물을 채집하여 분리하였다. 채집된 병반을 20°C, 상대 습도 90% 이상의 항온 항습실에서 3일간 습실 처리 후 streptomycin(200 µg/ml)이 첨가된 PDA(potato-dextrose agar) 배지에 올려 놓아 병반에서 자라나온 곰팡이를 이식하여 20°C 배양기에서 3일간 배양하여 병원균을 분리하였다. 본 실험에 사용한 약제는 benzimidazole계 약제 benomyl(50% 수화제), dicarboximide계 약제로 procymidone(50% 수화제)과 prochloraz(98% 원제) 및 diethofencarb(98.3% 원제)를 사용하였다. 약제 배지의 제조는 멸균된 PDA 배지를 50~60°C까지 식힌 후 적정 농도로 약제를 첨가하여 잘 혼합한 후 일회용 Petri dish(직경 9 cm)에 15 ml씩 분주하여 제조하였다. 분리균의 약제에 대한 반응은 각각의 약제가 10 µg/ml로 함유된 PDA에 직경 5 mm의 균사 조각을 접종하여 20°C 배양기에서 3일간 배양 후 균사의 생육 여부를 조사하였다.

자외선(UV) 조사 및 약제 배지에서의 누대배양에 의한 저항성균주 선발. 잿빛곰팡이병균을 PDA 배지에 접종하여 20°C에서 7일간 배양한 후 형성된 포자의 현탁액을 10^5 spores/ml 농도로 조정하여 Petri dish에 5 ml씩 주입 후 UV등(NIS, G10T8 10W Germicide, Japan) 30 cm 아래에서 30분 동안 조사 후 생존한 균을 공시 약제(prochloraz)가 2 µg/ml 첨가된 PDA

배지에 유리 막대로 도말 접종한 후 배양하여 생장하는 균을 선발하였다. 누대배양을 통한 약제 저항성균 선발은 PDA 배지상에 4일간 배양한 공시균주(직경 5 mm)의 agar disc를 취하여 약제가 2 µg/ml 첨가된 배지에 접종하고 20°C 배양기에서 5일간 배양한 후 약제 배지에서 자란 균총 선단 부위를 다시 PDA 배지에 옮겨 5일간 배양하여 접종원으로서 사용하면서 같은 방법으로 계대배양하였다.

최소 억제 농도(minimum inhibitory concentration, MIC)는 2, 4, 8, 16, 32 µg/ml 농도의 prochloraz를 함유한 PDA 약제 배지에 공시 균주를 이식하여 20°C에서 5일간 배양한 후 균사의 생장을 조사하였다.

Prochloraz 저항성균과 감수성균의 적응력 비교. 오이 딱잎 및 가지 열매에 각 균주의 균총 절편을 접종하여 습실 처리된 plastic box 내에 두고 20°C에서 4일간 배양한 후 병반 직경을 조사하였다. 포자 발아를 조사하는 각 조사 균주의 분생포자가 형성된 PDA plate에 0.01% Tween 20이 함유된 살균수 50 ml를 부어 포자를 수확하여 PDA에 도말 접종한 후 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 배양기에서 6시간 배양한 후 광학현미경 하에서 포자 발아를 조사하였는데, 이때 발아관이 포자의 폭보다 긴 것을 발아한 것으로 간주하였다. 포자 발아 실험은 3반복으로 실시했으며 반복당 100개의 포자를 조사하였다. 균핵 형성은 PDA 배지에 공시 균주의 균총을 접종하고 20°C에서 20일간 배양한 후 균핵 형성 유무를 조사하였다.

결 과

병원균의 약제반응. 대전, 공주, 논산, 부여 및 김해에서 분리한 잿빛곰팡이병균의 benomyl에 대한 저항성균의 분리 비율은 68.2~100%로 평균 76.3%였으며, procymidone에 대하여는 0~69.0%로 평균 40.8%였고, prochloraz에 대하여는 5.8~34.3%로 평균 12.6%였다(Table 1). Benomyl 저항성 균주의 분포는 모든 지역에서 높았으나, procymidone은 지역적으로 차이가 커서 공주 지역에서 분리한 균주는 한 균주도 분리되지 않았으나, 김해 지역 분리 균주는 69.5%로 높았다. Prochloraz 저항성 균주의 분포는 대체로 낮았으나 김해에서 다소 높았고, 논산은 5% 정도로 매우 낮았다(Table 1).

UV 조사 및 누대배양을 통한 약제 저항성균 선발. 감수성균의 경우 prochloraz 2 µg/ml에서도 전혀 생장하지 못하였다. 그러나 UV를 30분 동안 조사하여 선발한 6개의 약제 저항성 변이 균주(BM-01, BM-02,

Table 1. Sensitivity reactions of the *Botrytis cinerea* isolates collected from various locations to fungicides^a

Location	No. of isolates tested	No. of resistant isolates		
		Benomyl	Procymidone	Prochloraz
Taejon	222	193 (86.9) ^b	60 (27.0)	46 (20.7)
Gonju	187	143 (76.4)	0 (0.0)	24 (12.8)
Nonsan	496	381 (76.8)	190 (38.3)	29 (5.8)
Puyo	532	363 (68.2)	304 (57.1)	67 (12.6)
Total	1504	1147 (76.3)	614 (40.8)	189 (12.6)

^a Resistance to benomyl, procymidone and prochloraz was examined on PDA media incorporated with 10 µg/ml of each fungicide.

^b Percentages of resistant isolates in parentheses.

Table 2. Sensitivity reactions of the prochloraz-resistant *Botrytis cinerea* isolates selected from UV irradiation and serial subculture on prochloraz-amended medium to several fungicides

Isolate ^a	Sensitivity reaction ^b			
	Procymidone	Benomyl	Diethofencarb	Prochloraz
BM-01	-	+	-	+
BM-02	-	+	-	+
BM-03	-	+	-	+
BM-04	-	+	-	+
BM-05	-	+	-	+
BM-06	-	+	-	+
XT-01	-	+	-	+
XT-02	+	+	-	+
XT-03	+	+	-	+
XT-04	-	+	-	+
GA-83	-	+	-	-
GA-92	-	+	-	-

^a BM isolates were selected from the vital isolates after UV irradiation for 30 min, XT isolates were selected from serial subculture on PDA medium amended with 2 µg/ml prochloraz, and GA isolates were wild type ones.

^b + : good growth, - : no growth on PDA medium amended with 10 µg/ml fungicide.

BM-03, BM-04, BM-05, BM-06)와 prochloraz 첨가 배지에서의 누대배양을 통하여 선발된 4개의 저항성 균주(XT-01, XT-02, XT-03, XT-04)는 prochloraz 8 µg/ml 이상의 농도에서도 생장하였다(Table 2). 선발된 prochloraz 저항성 균주는 모두 benomyl에 저항성을 나타내었으며, 누대배양에서 얻은 XT-02와 XT-03균주는 procymidone에도 저항성이었다(Table 2).

Prochloraz 저항성균과 감수성균의 적응력 비교. 약제 저항성 균주에 대한 prochloraz 약제의 균사 생육 최저 농도(MIC)는 BM-04, BM-05, BM-06, XT-01, XT-02, XT-03 균주는 8~32 µg/ml이었고, BM-01, BM-02, BM-03, XT-04 균주는 32 µg/ml 이상에서도 균사 생육이 가능한 반면, 감수성인 GA-83, GA-92 균주는 2 µg/ml에서 전혀 균사 생육을 하지 못하였다(Table 3). 오이 잎에 대한 병원력은 BM-01 균주를 제외하고 균주들간에 차이를 나타내지 않았으며, 가지 열매에 대한

병원력은 BM-05와 XT-01 균주가 다른 균주들보다 낮았으나 나머지 균주들은 비슷하였다. 공시균주의 PDA 배지에서의 포자 발아율과 균핵 형성 여부를 조사한 결과, 포자 발아율은 UV처리에 의하여 얻은 저항성 균주인 BM-1, BM-4 균주는 다른 균주들보다 낮았으나 전체적으로 균주들 간에는 차이가 없이 모두 95% 이상의 높은 발아율을 나타내었다. 균핵 형성은 균주간에 다소 차이가 있었는데, BM-03, XT-01, XT-02, XT-03 균주와 prochloraz에 감수성인 균주(GA-83, GA-92)를 제외한 나머지 균주(BM-01, BM-02, BM-04, BM-05, BM-06, XT-04)들은 균핵을 형성하지 못하였다(Table 3).

고 찰

갯빛곰팡이병균 방제약제로 널리 사용되는 ben-

Table 3. Biological properties of resistant and sensitive isolates of *Botrytis cinerea* to prochloraz

Isolates	MIC of prochloraz ($\mu\text{g/ml}$)	Lesion area (mm) ^a		Spore germination ^b (%)	Sclerotial formation ^c
		Cucumber	Eggplant		
BM-01	> 32	15.5	37.1	98.0	-
BM-02	> 32	30.5	40.2	99.6	-
BM-03	> 32	23.4	48.2	99.6	+
BM-04	8~16	24.1	45.8	99.0	-
BM-05	8~16	24.9	13.7	95.6	-
BM-06	16~32	31.3	36.7	100.0	-
XT-01	8~16	30.2	15.1	100.0	+
XT-02	8~16	23.1	47.9	100.0	+
XT-03	8~16	23.9	49.9	100.0	+
XT-04	> 32	24.0	38.9	100.0	-
GA-83	< 2	30.3	38.7	100.0	+
GA-92	< 2	25.1	39.8	100.0	+
LSD (p=0.05)		2.15	6.21	0.79	

^a Disease severity on cucumber leaves and eggplant fruits was examined at 3 days after inoculation with the mycelial disks.

^b Spore germination (%) after 20 hour incubation at 20°C.

^c Sclerotial formation was examined after incubation on PDA for 20 days at 20°C. - : no formation, + : good formation.

zimidazole계 및 dicarboximide계는 저항성균의 발생으로 약효가 현저히 떨어지고 있는 실정임이 여러 실험 결과에서 보고되었다(4, 7, 12, 16, 21, 23). 본 실험에서도 조사 지역에 따라 다르지만 두 계열의 약제에 대한 저항성이 심각함을 보였다. Benzimidazole계 및 dicarboximide계의 방제 대책으로는 작용 메커니즘이 다른 약제의 사용이 필요한데, prochloraz와 같은 ergosterol 생합성 저해제를 이용하는 것도 한 방법이 될 수 있을 것이다. 그러나 본 실험에서 ergosterol 생합성 저해제의 하나인 prochloraz는 잿빛곰팡이병 방제를 위하여 사용된 적이 없지만 조사된 균주 중 12.6%가 저항성인 것으로 나타났다. 따라서 이 약제에 대한 저항성인 개체는 이 약제의 직접 사용에 의한 저항성균이 유발된 것이 아니라 이 약제에 저항성인 균이 내재적으로 존재하는 것으로 생각된다. 비슷한 실험 보고로 Faretra 등(5)은 한번도 *N*-phenylcarbamate계 살균제를 사용한 적이 없는 지역에서 benzimidazole계 및 *N*-phenylcarbamate계 살균제에 다중 저항성균의 발생을 보고한 바가 있다.

본 실험에서는 prochloraz 약제 저항성 균주를 선발하기 위해 포자에 UV를 조사하거나 약제를 첨가한 배지에서 누대배양을 통하여 저항성 균주를 선발하였으며, 감수성 균주들과 저항성 균주들의 적응력을 조사하였다. Prochloraz 저항성균 및 감수성균 모두 발아율은 차이를 나타내지 않았으며, 저항성 균주들은 병원력에 있어 다양하게 나타났다. Angela 등(1)은 pro-

chloraz에 저항성인 새순무늬병을 일으키는 *Pseudocercospora herpotrichoides*에 대한 실험에서 병원력을 비교한 결과 다양한 반응을 나타냄을 보고한 바가 있다. 다음 재배시기에 1차 전염원이 될 수 있는 균핵 형성은 저항성 균주에서 형성 능력 자체를 상실한 균주들이 나타났는데 이러한 결과는 중요한 대사 과정에 변이가 생기든지 세포막의 기능 변화에 따른 결과로 추정된다(1, 3, 19). Peever와 Milgroom(17)은 적응력과 ergosterol 합성 저해제에 대한 저항성과 상관이 없음을 보고한 결과도 있으나, 본 실험 결과로 볼 때 저항성 균주가 감수성 균주에 비하여 생태 적응력이 낮을 것으로 생각된다. 이러한 결과는 저항성 획득에 따라 적응력이 떨어진다는 다른 실험 보고와 일치한다(3, 4, 7, 8).

요 약

1994~1995년 사이에 대전, 공주, 논산, 부여와 김해 등지에서 채집한 병든 딸기, 토마토, 오이에서 총 1,504 균주의 잿빛곰팡이병균을 분리하여 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 약제를 넣은 PDA 배지에서 배양하면서 약제반응을 조사한 결과, benomyl에 대하여는 1,147(76.3%) 균주, procymidone에 대하여는 614(40.8%) 균주, prochloraz에 대하여는 189(12.6%) 균주가 저항성으로 나타났다. UV 처리 및 약제 배지에서의 누대배양을 통하여 prochloraz 저항성 균주를 선발하였는데, 이들의 생육 역

제 최소 농도(MIC)는 8 µg/ml 이상이었고, 감수성균의 MIC는 2 µg/ml 이하였다. 병원력, 포자 발아율, 균핵 형성과 같은 적응력과 관련된 생물학적 특성 비교에서 저항성 균주들은 감수성 균주보다 열등하거나 비슷한 정도로 나타났다.

참고문헌

- Angela, M. J., Josephine, E. H. and John, A. L. 1994. The induction and characterization of isolates of *Pseudocercospora herpotrichoides* with altered sensitivity to the fungicide prochloraz. *Pestic. Sci.* 41 : 121-128.
- Dahmen, H., Hoch, H. C. and Staub, T. 1988. Differential effects of sterol inhibitors on growth, cell membrane permeability, and ultrastructure of two target fungi. *Phytopathology* 78 : 1033-1042.
- Dekker, J. and Gielink, A. J. 1979. Acquired resistance to pimaricin in *Cladosporium cucumerinum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *narcissi* associated with decreased virulence. *Neth. J. Plant Pathol.* 85 : 67-73.
- Delp, C. J. 1988. *Fungicide Resistance in North America*. The American Phytopathological Society. 133pp.
- Faretra, F., Pollastro, S. and Di Tonno, A. P. 1989. New natural variants of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) coupling benzimidazole-resistance to insensitivity toward the *N*-phenylcarbamate diethofencarb. *Phytopath. medit.* 28 : 98-104.
- Hirota, T., Satoru, I., Hiromichi, O., Katsuzo, K., Kiroku, K. and Akira, O. 1992. Effect of diniconazole isomers on biosyntheses of sterol and gibberellin in *Gibberella fujikuroi*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 58 : 691-698.
- Hisada, Y., Karo, T. and Noda, C. 1984. Biological properties of procymidone-resistant field isolates of *Botrytis cinerea*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 50 : 590-599.
- Holmes, G. J. and Eckert, J. W. 1995. Relative fitness of imazalil-resistant and -sensitive biotypes of *Penicillium digitatum*. *Plant Dis.* 79 : 1068-1073.
- Johan, C. K., Richard, J. M., Donald, J. S. and Maarten, A. D. 1994. Inhibition of sterol biosynthesis in cell-free extracts of *Botrytis cinerea* by prochloraz and prochloraz analogues. *Pestic. Sci.* 40 : 313-319.
- Julian, A. M., Hdardy, J. E. and Lucas, J. A. 1994. The Induction and characterization of isolates of *Pseudocercospora herpotrichoides* with altered sensitivity to the fungicide prochloraz. *Pestic. Sci.* 41 : 121-128.
- Kato, T., Tanaka, S., Ueda, M. and Kawase, Y. 1974. Effects of the fungicide, S-1358, on general metabolism and lipid biosynthesis in *Monilinia fructigena*. *Agric. Biol. Chem.* 38 : 2377-2384.
- 김병섭, 최경자, 조광연. 1993. Benzimidazole계 및 dicarboximide계 살균제에 저항성인 잭빛곰팡이병균 (*Botrytis cinerea*)의 몇가지 약제에 대한 반응. *한식병지* 9 : 98-103.
- 김홍태, 정영륜, 조광연. 1990. 오이 잭빛곰팡이병균 (*Botrytis cinerea*)에 대한 prochloraz의 억제 효과. *한식병지* 6 : 333-337.
- Leroux, P. and Gredt, M. 1984. Resistance to fungicides which inhibit ergosterol biosynthesis in laboratory strains of *Botrytis cinerea* and *Ustilago maydis*. *Pestic. Sci.* 15 : 85-89.
- Norio, O., Kazuhiro, S., Tesuo, A. and Yoshiaki, Y. 1988. Decreased sensitivity of cucumber powdery mildew to ergosterol biosynthesis inhibitors. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 54 : 629-632.
- 박인철, 예완해, 김충희. 1992. Procymidone, vinclozolin, benomyl에 저항성인 딸기잭빛곰팡이병균의 발생. *한식병지* 8 : 41-46.
- Peever, T. L. and Milgroom, M. G. 1994. Lack of correlation between fitness and resistance to sterol biosynthesis-inhibiting fungicides in *Pyrenophora teres*. *Phytopathology* 84 : 515-519.
- Pontzen, R. and Scheinpflug, H. 1989. Effect of triazole fungicides on sterol biosynthesis during spore germination of *Botrytis cinerea*, *Venturia inaequalis* and *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Neth. J. Pl. Path.* 95 Supplement 1 : 151-160.
- Richmond, D. V. 1984. Effects of triadimefon on the fine structure of germinating conidia of *Botrytis allii*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 21 : 74-83.
- Shabi, E., Elisha, S. and Zelig, Y. 1981. Control of pear and apple diseases of Israel with sterol-inhibiting fungicides. *Plant Dis.* 65 : 992-994.
- Staub, T. and Sozzi, D. 1984. Fungicide resistance: A continuing challenge. *Plant Dis.* 68 : 1026-1031.
- Szkolnik, M. 1981. Physical modes of action of sterol-inhibiting fungicides against apple diseases. *Plant Dis.* 65 : 981-985.
- 유승현, 김홍기, 노태홍, 우인식, 인무성. 1990. 시설원에 잭빛곰팡이병 약제 내성균의 발생과 방제에 관한 연구. *농시 논문집(산학협동권)* 33 : 141-151.