

잣빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*) 형태형 간의 생리적 다양성

김병섭* · 박은우¹ · 노성환 · 조광연

한국화학연구소 스크리닝연구부, ¹서울대학교 농생물학과

Physiological Diversity between Morphological Phenotypes of *Botrytis cinerea*

Byung-Sup Kim*, Eun-Woo Park¹, Seong-Hwan Roh and Kwang-Yun Cho

Pesticide Screening Division, Korea Research Institute of Chemical Technology, Taejon 305-606,
¹Department of Agricultural Biology, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

ABSTRACT: *Botrytis cinerea* isolates obtained from infected plants of cucumber, tomato, and strawberry were divided into three groups (sporing, sclerotial, and mycelial types). Of which sclerotial types were the major group. There were no correlations between morphological phenotypes and responses to benzimidazole and dicarboximide fungicides. External structure of conidia of three phenotypes by scanning electron microscope was the same with verrucose surface. Mycelial type was the most virulent on fruits of eggplants. Comparative tests were carried out to examine correlations between the virulence and production of fungal enzymes such as phenol oxidases, pectin methyl esterases (PME), amylases, cellulases, ureases, β -glucosidases, and proteinases. There was no correlation among the phenotypes in production of phenol oxidases and β -glucosidases. However, there were significantly different from each other in PME, amylase, cellulase, urease, and protease activity.

KEYWORDS: *Botrytis cinerea*, Fungicide resistance, Morphological phenotypes

잣빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea* Pers.: Fr.)은 많은 원예작물 및 수목 및 곡류에 발생하는 다범성 균으로 기주 식물 및 병징과 발병 부위에 따라 다양하게 불려지고 있다(Agrios, 1988; Ellis 등, 1974).

이 균에 대한 감염 과정에 대한 연구로 Sasaki와 Nakayama(1994)는 β -glucosidase의 활성과 병원성과 관계가 있다고 보고하였으며, Wasfy 등(1978)은 세포벽 분해 효소가 병원성에 중요하다고 하였으나 다른 연구 결과에서는 이러한 효소의 중요성을 확인할 수 없었다(최 등, 1995; Edlich 등, 1989; Elad와 Evensen, 1995). Edlich 등(1989)과 Elad와 Evensen(1995)은 감염 과정에서 병원균에 의하여 분비되는 과산화 수소와 같은 활성 산소가 중요한 역할을 한다고 보고한 바가 있으며, Elad(1992)는 여러 식물에서 *B. cinerea*와 *S. sclerotiorum*의 방제를 위하여 항산화제를 처리한

결과 발병이 억제되었으며 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 기구으로써 ethylene 생합성 및 활성의 억제는 이 병의 방제 효과가 있음이 보고되었다(Elad, 1993; Hoffman 등, 1988; Sharrock와 Labavitch, 1994). 분생포자의 기생력은 경엽 및 과실의 전전부에는 약하고, 주로 상처나 활력이 없는 조직으로 쉽게 직접 침입하여 병을 일으킨다. 포도의 경우 잣빛곰팡이병균은 개화기 끝무렵부터 침입하여 과실의 성숙 초기까지 잠복상태로 있다가 그 이후부터 발병한다. 이 시기까지 발병하지 않는 이유는 glycolic acid, tannins, phytoalexins와 같은 여러 가지 천연 항균 물질 때문에 균의 생장이 억제되는 것으로 알려져 있다(Leroux, 1995).

잣빛곰팡이병균 간에 이제까지 기생성에 따른 차

*Corresponding author

이는 없는 것으로 알려져 있으며, Horiuchi 등 (1978)과 Arai(1996)는 *Botrytis* 속균 6종의 분류에 주사형 전자 현미경을 이용하여 분생포자의 표면구조를 비교한 결과 봉상 구조 및 모상 구조로 크게 분류하였으며, *B. cinerea*는 봉상 구조에 속하는 것으로 보고하고 있다. 방제 약제인 benzimidazole, dicarboximide, *N*-phenylcarbamate계 등에 대한 감수성 및 저항성 반응에 따라 약제 반응형을 분류하기도 하며, Paul(1928)은 순전히 배지에서서의 포자 형성, 균핵형성 및 균사 형태 등과 같은 형태적 특성에 따라 분류하였다. 포자만을 많이 형성하고 균핵은 형성하지 않는 균은 포자형(sporing type), 균핵을 많이 형성하는 균을 균핵형(sclerotial type), 기중 균사를 많이 형성하는 균을 균사형(mycelial type)으로 나누었다. 이러한 표현형적 다양성은 유전자 수준에서의 다양성을 나타낼 것으로 생각된다(Buttner 등, 1994; Faratra et al., 1988; Faratra and Pollastro, 1993; Van Der Vlugt-Bergmans 등, 1993). Buttner 등 (1994)은 *B. cinerea* 균주들간의 ploidy 수준에서의 다양성을 조사하였는데, 한 핵당 DNA 량에 있어서 균주들간에 상당히 차이를 나타냄을 보고하였다. 그들은 이러한 근거를 바탕으로 많은 포장 분리 균주들의 변이성 및 표현형적 불안정성을 설명할 수 있다고 보고하였다.

Georgopoulos와 Skylakakis(1986)는 곰팡이에 있어서 살균제 저항성은 이용 가능한 유전자의 다양성에 달려있다고 보고했다. 따라서 저항성 연구에 있어서 곰팡이의 다양성을 이해하는 것은 중요하다.

따라서 본 실험은 잣빛곰팡이병균의 변이성 및 표현형적 불안정성을 설명하기 위한 기초적인 자료로서 형태형이 다른 잣빛곰팡이병균(*B. cinerea*)의 생리적 특성을 조사하여 우리 나라에서 분리한 잣빛곰팡이병균의 형태적 생리적 다양성을 조사하였다. 또 병원성 및 다른 특성과 관련하여 중요한 몇 가지 효소 활성을 조사하여 이 균의 생리 생태적 다양성을 구명하고자 시험을 수행하였다.

재료 및 방법

병원균 분리

1994~1996년에 대전, 충남 논산, 부여, 공주와 경남 김해 등의 오이, 토마토, 딸기의 시설 재배 포장으로부터 병든 식물을 채집하여 병원균을 분리하였다. 병원균 분리는 채집된 병반을 20°C, 상대 습도 90% 이상의 항온항습실에서 3일간 습실 처리 후 streptomycin(200 µg/ml)이 첨가된 PDA (potato dextrose agar) plate에 올려놓아 병반에서 자라 나온 곰팡이의 균사 선단을 새로운 배지에 이식하였고, 분리된 균은 4°C의 저온실에 보관하며 실험에 사용하였다. 본 실험에 사용된 균주는 분리한 총 2,397균주 중 622균주를 형태형 분류에 이용하였고, 형태형간의 특성 비교에는 각 형태형 별로 3균주씩을 선발하여 실험에 공시하였다.

약제 반응형의 최소 억제 농도 조사

분리된 모든 균주의 각 약제에 대한 감수성 및 저항성 반응 양상을 분류하였고, 균생장을 완전히 억제하는 약제의 최소 농도(MIC, minimum inhibitory concentration)는 각 약제를 1, 10, 100, 1,000 µg/ml 첨가한 PDA배지에 각 반응형(phenotype)의 대표적인 균주를 접종한 후 24°C 배양기에서 5일간 배양 후 생육을 조사하였다.

형태적 특성에 따른 strain의 분류 및 전자현미경 관찰

순수 분리된 균주들을 Paul(1928)의 방법에 따라 포자형(sporing type), 균핵형(sclerotial type) 및 균사형(mycelial type)으로 분류하였다. 분생 포자의 표면 구조를 조사하기 위하여 Horiuchi 등 (1978)의 방법으로 조사하였는데, 조사 시료를 생명공학연구소의 전자현미경실에 의뢰하여 관찰하였다.

각 형태형 간의 병원성 및 균사생장 비교

포자형, 균핵형 및 균사형으로 분류한 균주 중 대표적인 균주를 3개씩 선발하여 실험에 이용하였다. 병원성 비교는 온실에서 재배하여 수확한 가지 열매(품종: 흑산호 가지)에 5 mm cork borer로 상처를 내고 PDA plate에서 3일간 배양한 선발된 균주의 균총 가장자리의 disc(직경, 5 mm)를 떼어 내어 상처낸 가지 열매에 접종하여 20°C 습실상에 넣어 5일간 발병시킨 후 병반 직경을 조사하였다.

균사 생장 조사 배지로는 PDA를 사용하였다. 접종된 PDA 배지는 3일간 20°C 배양기에서 배양 후 균층의 직경(mm)을 조사하였다.

효소활성 비교

Polyphenol oxidase 활성은 Rigling 등(1989)의 방법과 같이 Bavendamm's medium(0.5% tannic acid, 1.5% malt extract, 2% agar, pH 4.5)을 이용하였다. PDA plates에 접종하여 3일간 20°C 배양기에서 배양된 균층의 가장자리에서 직경 5 mm 균사 disc를 떼어 내어 Bavendamm 배지에 접종하여 암흑색으로 변하는 정도에 따라서 효소 활성을 조사하였다. 정량적인 실험은 Wasfy 등(1978)이 이용한 방법을 따랐다. Czapek-Dox broth 배지를 100 ml 삼각 flasks에 20 ml 넣고 멸균 후 균을 접종하여 20°C 배양기에서 6일간 정치 배양한 후 배양액을 10,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 배양여액을 얻어 배양 여액중의 효소 활성을 조사하였다. 반응액은 배양여액 1 ml에 2 ml borate buffer(pH 9), 1 ml 1% p-aminobenzoic acid, 2 ml 1% catechol을 넣어 45분간 반응시킨 후 spectrophotometer를 이용하여 575 nm에서 흡광도를 조사하였다.

Pectin methyl esterase 활성은 Wasfy 등(1978)이 Smith(1958) 방법을 변형하여 만든 방법으로 수행하였다. 1% citrus pectin을 넣은 Czapek-Dox broth 배지를 100 ml 삼각 flasks에 20 ml 넣고 멸균 후 균을 접종하여 20°C 배양기에서 8일간 정치 배양한 후 배양액을 10,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 배양여액을 얻어 효소 활성을 조사하였다. 효소 활성을 조사하기 위한 반응액은 0.5g citrus pectin, 9.58g NaCl, 2.5 ml의 0.05% bromothymol blue 용액을 넣어 총 100 ml 용액을 만들고 색을 1% NaOH로 초록색(pH 7)으로 조정한 후 이용하였다. 효소 활성은 배양여액 5 ml에 반응액 25 ml을 넣어 0.1% NaOH로 색을 초록으로 조정하여 30°C에서 24시간 배양 후 0.1% NaOH를 넣어 활성을 조사하였다. 이때 세균 오염을 막기 위하여 50 ppm streptomycin을 0.5 ml 넣었으며 효소 활성은 방출된 carboxylic groups

의 micro equivalent(μ eq)로 나타내었다.

β -glucosidase 활성, urease 활성, cellulase 생성, gelatin 가수 분해는 Paterson과 Bridge(1994)가 사용한 고체 배지에서 효소 활성을 조사하는 방법으로 조사하였다.

Amylase 활성은 Wasfy 등(1978)의 방법에 따라 2% 전분을 넣은 Czapek-Dox broth 배지를 100 ml 삼각 flasks에 20 ml 넣고 멸균 후 균을 접종하여 20°C 배양기에서 6일간 정치 배양한 후 배양액을 10,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 배양여액을 얻어 전분의 이용을 조사하였다. 반응액은 3 ml의 배양여액에 0.05 ml iodine solution을 넣어 spectrophotometer를 이용하여 750 nm에서 transmittance(%)를 조사하였다.

삼투압 및 고온 감수성

삼투압에 대한 감수성은 Beever(1983)의 방법에 따라 0.68 M NaCl를 넣어 제조한 MEA(malt extract agar)와 넣지 않고 제조한 MEA에 균을 접종하여 배양한 후 넣지 않은 plate에서의 생장에 대한 상대치로 삼투압에 대한 감수성을 조사하였다.

조사를 위하여 먼저 PDA plate에 균을 접종하여 균이 생장할 수 없는 온도인 32°C에서 3일간 배양한 다음 24°C 배양기로 옮겨 배양하여 생육 여부를 관찰하였다.

결 과

형태에 따른 strains의 분류 및 특성

1994년부터 1996년 사이에 국내 여러 지역에서 분리된 균주중 622균주에 대한 PDA배지에서의 균생장 형태를 Paul(1928)의 기준에 따라 조사하였다. 균핵은 전혀 형성하지 않았고, 많은 분생포자를 형성한 포자형은 전체 622균주중 9균주(1.4%)였으며, 균핵을 전혀 형성하지 않으며, 거의 포자를 형성하지 않고 백회색의 균사만 무성한 균사형은 6균주(0.9%)로 나타났고 흰색의 균층에 많은 균핵을 형성하고, 균핵 주변에 포자를 형성한 균핵형은 462균주(74.2%)로 나타났다. 균핵 및 포자 복합형은 107균주(17.2%)였으며, 균핵 및 균사 복합형은 33균주(5.3%)였다(Table 1).

Table 1. Various morphological types of *Botrytis cinerea* isolates obtained from various locations

Location (Host plant)	Isolate number	Number of morphological form ^a				
		Sp	Sc	My	Sc+Sp	Sc+My
Kimhae (Tomato)	67	1(1.4) ^b	60(89.5)	1(1.4)	4(5.9)	1(1.4)
Buyo (Strawberry)	41	2(4.8)	27(65.8)	1(2.4)	9(21.9)	2(4.8)
Nonsan (Strawberry)	86	3(3.4)	57(66.2)	1(1.1)	22(25.5)	3(3.4)
Taejon (Strawberry)	118	1(0.8)	94(79.6)	0(0)	19(16.1)	4(3.3)
Taejon (Strawberry)	107	1(0.9)	91(85.0)	3(2.8)	5(4.6)	7(6.5)
Gongju (Strawberry)	203	1(0.4)	133(65.5)	5(2.4)	48(23.6)	16(7.8)
Total	622	9(1.4)	462(74.3)	11(1.7)	107(17.2)	33(5.3)

^aMorphological characteristics were observed on PDA. Sp; sporangium type, Sc; sclerotial type, My; mycelial type.

^bPercentage of each form in parentheses.

이들 분리한 균주를 형태적인 분류 기준에 따라 9개의 균주를 선발하였는데, 선발된 균주중 BC-2, BC-5, DS-522 균주는 PDA 배지에 배양할 때 암 회색이었으며, 이들 균주는 포자형 균주였다. GA-45, GA-35, BY-22 균주는 균핵형으로 분류되었고, DJ-21, KC-6, JPL-1은 균사형으로 분류되었다(Fig. 1, Table 2). 분생포자의 표면구조를 비교하기 위하여 포자형의 BC-2, 균핵형의 GA-45, 균

사형의 DJ-21의 분생포자를 주사 전자현미경으로 관찰한 결과 조사된 모든 균주는 그 표면 구조가 봉상으로 나타났다(Fig. 2). 포자의 크기는 포자형이 균핵형이나 균사형보다 다소 작고 가름한 타원형인 반면 균사형과 균핵형은 곤봉형으로 나타났다(Fig. 2).

선발 균주의 약제 반응

약제에 대한 감수성 및 저항성 반응은 형태형과는 무관한 것으로 나타났다. 약제에 대하여 저항성 반응을 나타내는 균주는 최소억제농도(MIC)가 1,000 µg/ml 이상이었으며, 감수성균의 경우는 1

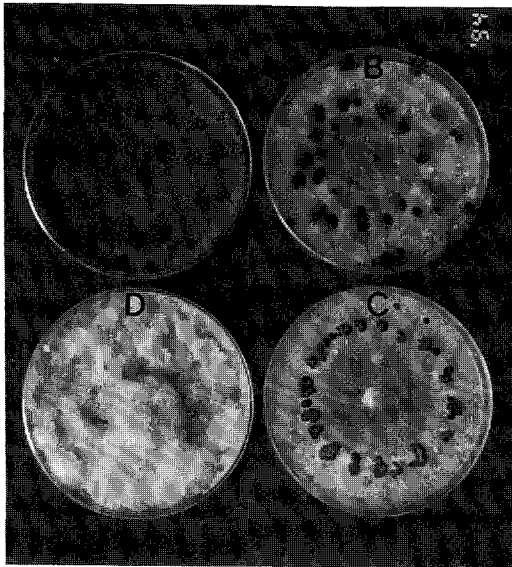


Fig. 1. Cultural morphology of *Botrytis cinerea* isolates on PDA medium. A; BC-2 isolate, B&C; GA-45 and BY-22 isolates, D; DJ-21 isolate.

Table 2. Phenotypic differences between isolates of *Botrytis cinerea* selected in this study^a

Isolate	Mycelial color	Sclerotial formation	Sporulation
BC-2	Dark gray	-	+++
BC-5	Dark gray	-	+++
DS-522	Dark gray	-	+++
GA-45	White	+++	++
GA-35	White	++	++
BY-22	White	+++	++
DJ-21	White gray	-	+
KC-6	White gray	-	+
JPL-1	White gray	-	-

^aMycelial color, sclerotial formation, and sporulation of the fungi was inspected on PDA medium. + to +++; denotes increasing formation, -; no formation.

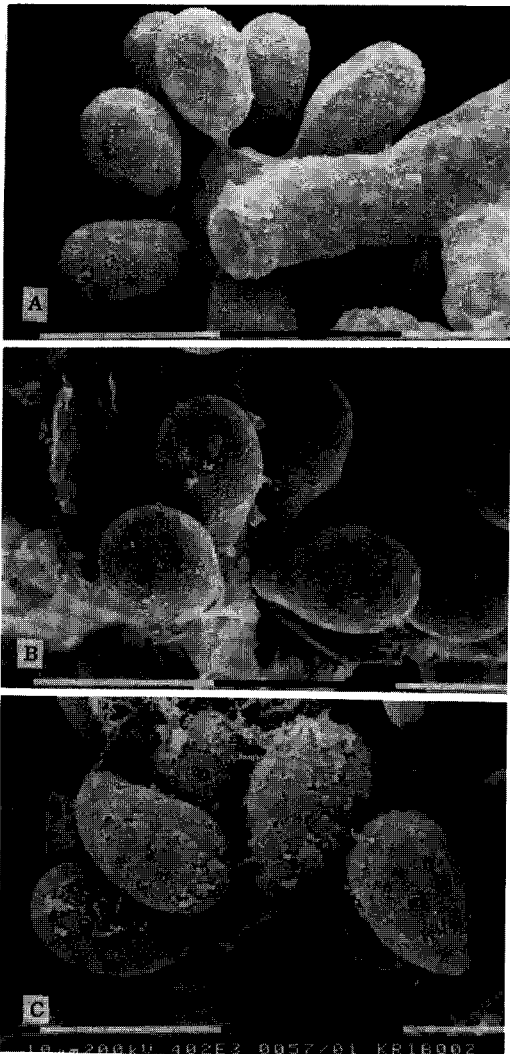


Fig. 2. External structure of conidia of *Botrytis cinerea* isolates by SEM. A; BC-2 isolate, B; DJ-21 isolate, C; GA-45 isolate, $\times 4,000$ (bar=10 μm).

$\mu\text{g/ml}$ 이하인 것으로 나타나 약제에 대한 반응에 있어서 균주들간의 다양성을 나타내었다(Table 3).

형태형 간의 생리적 특성 비교

균주들 간의 병원성을 비교할 때 균사형의 균주들이 가장 병원성이 크게 나타났으며, 포자형의 균주들은 다른 형들보다 병원성이 낮게 나타났다. PDA에서의 균사 성장도 병원성 실험과 비슷한 경향으로 나타났다. Phenol oxidase의 활성은 균주

Table 3. Minimum inhibitory concentration (MIC) of *Botrytis cinerea* isolates to benomyl, procymidone and diethofencarb

Isolate	Host plant	Pheno-type ^b	MIC ($\mu\text{g/ml}$) ^a		
			Beno-myl	Procy-midone	Diethofencarb
BC-2	Tomato	RSS-Sp	>1,000	1-10	<1
BC-5	Tomato	RSS-Sp	>1,000	1-10	<1
DS-522	Strawberry	RRS-Sp	>1,000	>1,000	<1
GA-45	Strawberry	SSR-Sc	<1	<1	>1,000
GA-35	Strawberry	RSS-Sc	>1,000	<1	<1
BY-22	Tomato	RRS-Sc	>1,000	10-100	<1
DJ-21	Strawberry	SSR-My	<1	<1	>1,000
KC-6	Cucumber	RSS-My	>1,000	<1	<1
JPL-1	Strawberry	RRS-My	>1,000	>1,000	1-10

^aMIC test was examined on PDA media incorporated with each fungicide.

^bResponses of isolates to 10 $\mu\text{g/ml}$ of chemicals in order of carbendazim, procymidone and diethofencarb. S; sensitive, R; resistant, Sp; sporulating type, Sc; sclerotial type, My; mycelial type according to Paul (1928).

및 형태별 차이를 보이지 않았으나, PME 활성과 amylase 활성은 포자형의 균주들이 낮았으며 균핵형과 균사형의 균주들은 비슷한 정도로 높게 나타났다. 삼투압에 대한 감수성을 비교할 때 포자형이 다른 형의 균주보다 민감하게 나타났으며, 32°C에서 배양 후 24°C로 옮겨 배양할 때 포자형의 DS-522균주는 성장하지 못하였으나 나머지 균주는 성장하였다(Table 4).

포자형의 균주와 균핵형의 GA-45, GA-35 균주는 cellulase 활성이 없었으나, 균사형의 균주는 활성을 나타내었다. Urea를 분해하는 활성은 균사형이 가장 높았으며, 포자형은 어느 정도 분해하였으나 균핵형의 GA-45, GA-35 균주는 전혀 분해하지 못하였다. Phenol oxidase의 활성은 Baven-damn reaction을 통하여 조사할 때, 균주들간에 활성 차이를 나타내었으나, 형태형 간에는 차이가 없었다. Gelatin 가수 분해 활성은 균사형의 DJ-21, JPL-1 두 균주만이 gelatin을 액화시켰으며, casein 가수 분해 활성은 균사형이 높게 나타났으나 포자형은 낮게 나타났다. 그렇지만 β -glucosidase 활성은 DS-522균주는 없었으나 나머지 균주

Table 4. Mean lesion area, mycelial growth, phenoloxidase activity, pectin methyl esterase activity, amylase activity, osmotic sensitivity, and high temperature sensitivity of *Botrytis cinerea* isolates used in this study

Isolate	Mean lesion ^a size (mm)	Mycelial ^b growth (mm)	Phenol ^c oxidase	PME ^d activity	Amylase ^e activity (%)	Osmotic ^f sensitivity (%)	High temperature ^g sensitivity
Sporing type							
BC-02	10.4e	12.5e	0.025a	0.7	13.4cd	61.0b	+
BC-05	16.5d	11.9e	0.032a	0	3.9d	13.0c	+
DS-522	15.7d	29.1b	0.026a	0	11.4cd	50.2b	-
Sclerotial type							
GA-45	24.5c	25.9c	0.031a	9.2	92.7a	93.0a	+
GA-35	34.1b	27.4bc	0.062a	5.4	72.8b	65.0b	+
BY-22	29.8b	22.2cd	0.040a	5.2	97.6a	79.0a	+
Mycelial type							
DJ-21	35.1b	40.2a	0.027a	5.3	24.9c	94.0a	+
KC-06	34.3b	42.1a	0.045a	4.7	73.2b	59.0b	+
JPL-1	46.8a	42.9a	0.025a	9.0	98.9a	94.0a	+
LSD(P=0.05)	5.4	3.2	0.051		15.6	16.1	

^aMean lesion area were measured at 6 days after inoculation into fruits of eggplant

^bMycelial growth was inspected on PDA medium at 3 days after inoculation of each isolate.

^cPhenoloxidase activity was determined with 2, 6 dimethoxy phenol as substrate. The increase in absorbance at 468 nm was measured with spectrophotometer. Enzyme activity was given as relative activity (absorbance change per 5 mm per sample).

^dThe activity of PME was measured with a modified method of Smith (1958). Enzyme activity was expressed as micro equivalent (μ eq) of liberated carboxylic groups.

^eAmylase activity (transmission) was assayed with a spectrophotometer at 750 nm after 6 days incubation in Czapek-Dox broth containing 2% soluble starch.

^fOsmotic sensitivity (%) was compared the radial growth on MEA amended with 0.68 M NaCl to unamended.

^gHigh temperature sensitivity was inspected on PDA plate incubated at 24°C after preincubation in 32°C incubator for 3 days. +; growth, -; no growth.

는 활성이 나타났다(Table 5).

고 찰

임의로 선발한 622균주의 잣빛곰팡이병균을 형태에 따라 분류하면 전반적으로 볼 때 포자 및 균사형보다는 균핵형의 분포가 높게 나타났다. Maas (1969)는 *B. convoluta*의 균핵을 -70~25°C로 366일 저장 후 생존율을 조사한 결과 70% 이상이었으며, 30°C에서는 35%의 생존율을 나타냄을 보고하였다. 균핵은 병원균이 극한 환경에서 견딜 수 있는 조직이므로 균핵을 형성하는 균이 훨씬 생장하기 어려운 최저, 최고 온도 조건 및 건조한 환경

에서도 살아남을 수 있다. 따라서 균핵을 형성하는 균의 분포가 대부분을 차지하는 것으로 생각된다. Paul(1928)의 기준에 따라 분류할 때 2가지 복합형은 분류하기가 어려운데 이러한 분류는 인위적인 분류로서 이 또한 이 병원균의 형태적 다양성과 변이가 쉽게 일어남을 나타내는 증거이다. 또 이러한 형태적 다양성은 유전자 수준에서의 다양성을 나타낼 것으로 생각되며, 이러한 근거를 바탕으로 많은 포자 분리 균주들의 변이성 및 표현형적 불안정성을 설명할 수 있을 것이다. Grindle(1979)도 이 균의 균사 생장률, 포자 형성, 균핵 생산 및 약제에 대한 반응에 있어서 다양성이 있음을 보고하였으며 대부분의 형태적 변이형들이 표현형적으로 불안정

Table 5. Cellulase production, urea hydrolysis, Bavendamm reaction, gelatin hydrolysis, casein hydrolysis, and β -glucosidase activity of *Botrytis cinerea* isolates used in this study

Isolate	Cellulase ^a production	Urea ^b hydrolysis	Bavendamm ^c reaction	Gelatin ^d hydrolysis	Casein ^e hydrolysis	β -glucosidase ^f activity
Sporing type						
BC-02	-	+	++	-	+	+
BC-05	-	+	+++	-	+	+
DS-522	-	++	+	-	+	-
Sclerotial type						
GA-45	-	+	+	-	++	+
GA-35	-	-	+++	-	++	+
BY-22	+	-	++	-	++	+
Mycelial type						
DJ-21	+	++	++	+	+++	+
KC-06	+	++	++	-	+++	+
JPL-1	+	++	+	+	++	+

^aCellulase production was tested by dye diffusion methods (Paterson *et al.*, 1994). +; production, -; no production.

^bUrease medium (Paterson *et al.*, 1994) was used for urea hydrolysis test. Color reaction on urease medium. + to +++ denotes increasing reaction, -; no reaction.

^cColor reaction on Bavendamm medium (Rigling *et al.*, 1989). + to +++ denotes increasing reaction, -; no reaction.

^dGelatin medium (Paterson *et al.*, 1994) was used as a presumptive test for protease activity. Color reaction on gelatin medium. + to +++ denotes increasing reaction, -; no reaction.

^eCasein hydrolysis medium (Paterson *et al.*, 1994) was used as a presumptive test for protease activity. Color reaction on casein hydrolysis medium. + to +++ denotes increasing reaction, -; no reaction.

^fAesculin agar (Paterson *et al.*, 1994) was used for presumptive β -glucosidase activity. Color reaction on aesculin agar. + to +++ denotes increasing reaction, -; no reaction.

함을 보고하였다. 본 연구에서 분리한 균주들도 형태적으로 안정한 균주들도 있었으나 대부분의 균주들이 다양한 모양을 나타내어 이 균의 표현형적 불안정성을 나타내었다.

Horiuchi 등(1978)과 Arai(1996)는 *Botrytis* 속 균의 분류에 주사형 전자 현미경을 이용하여 분생 포자의 표면구조를 비교한 결과 봉상 구조 및 모상 구조로 크게 분류하였다. *B. cinerea*는 봉상 구조에 속하는 것으로 보고하였는데 본 연구에서도 조사된 균주에서 형태형에 관계없이 모두 봉상 구조를 나타내어 분생포자의 표면 구조에 있어서는 형태형 간에 차이가 없는 것으로 생각된다. 그러나 포자의 크기는 포자형이 균핵형 및 균사형보다 다소 작고 가름한 것(narrower spore)으로 나타났다. 이러한 결과는 Paul(1928)이 관찰하였던 결과와 같았다.

이 균의 약제 반응에 있어서 다양성은 유전적 다

양성에 기인한 것이며 같은 형태형 내에 서로 다른 약제 반응을 나타내므로 형태형을 나타내는 유전자와 약제 반응형과는 무관한 것으로 생각되었다. Faretra 등(1988)은 이태리에서 분리한 잣빛곰팡이병균이 대부분 자웅이주체(heterothallic)로 MAT1-1, MAT1-2의 유전자를 가지며 포장 분리 균주의 16%와 자낭 포자의 6%만이 자웅동주체(homothallic)라고 보고하였다. 따라서 유전적 다양성의 원인이 유성 생식 및 meiotic recombination이라고 보고하였다.

Rigling 등(1989)은 밤나무동고병균(*Cryphonectria parasitica*)의 dsRNA를 가진 저병원성균에 있어서 laccase의 활성이 감소함을 보고하였다. *B. cinerea*에 있어서도 두 가지 분자 형태의 isoenzyme인 laccase를 분비한다(Zouari *et al.*, 1987). Bar Nun 등(1988)은 EDTA 처리에 의하여 lac-

case 형성을 억제하였으며, *Botrytis*에 의한 감염을 줄일 수 있었다고 한다. Elad와 Evensen(1995)은 *B. cinerea*가 분비하는 laccase가 기주 식물의 방어 메커니즘을 불활성화하는데 관여한다고 했다. 따라서 감염을 일으키는데 laccase 분비가 필요하다고 보고한 바가 있다. 그러나 Wasfy 등(1978)은 phenol oxidase가 phenols를 미생물에게 보다 독성이 높은 quinons이나 semiquinons로 산화시키므로 병원성이 높은 균주에서 phenol oxidase를 적게 분비하는 것은 병원성과 관련하여 일치한다는 결과를 발표함으로써 Bar Nun 등(1988)의 결과와는 상반된 결과를 발표하였다. 본 연구에서는 phenol oxidase의 활성은 균주들 간에 차이를 나타내지 않으므로 병원성과 관련성이 없는 것으로 나타났다.

그러나 PME의 활성과 amylase의 활성은 병원성이 높은 균주에서 활성이 높게 나타나 병원성과 관련이 있음을 나타내었다. 특히 pectinases는 여러 병을 일으키는데 관여하는 것으로 알려져있는데 특히 조직의 무름병징을 나타나게 하는 특징이 있다. Pectinases는 포자가 발아할 때 만들어지며, 병원균의 다른 대사 물질인 cutinase(Fourie and Holz, 1995; Shishiyama *et al.*, 1970), cellulase (Verhoeff *et al.*, 1983) 등과 함께 작용하여 기주체를 침입하는 것을 돕는다. Pectins의 분해에 의하여 식물 세포를 서로 지지하고있는 pectins가 액화되고 조직이 마쇄된다. 따라서 *B. cinerea*의 PME 활성은 병원성과 높은 상관관계를 가진다고 할 수 있다. Wasfy 등(1978)은 amylase 및 maltase의 활성이 높은 균주가 낮은 균주보다 병원성이 큼을 보고하였는데 본 실험에서도 병원성이 큰 균주가 낮은 균주보다 amylase의 활성이 높게 나타났으므로 그들의 결과와 일치하였다.

Verhoeff 등(1983)은 *in vitro* 및 *in vivo* 실험에서 잿빛곰팡이병균의 cellulose 분해 효소를 연구한 결과 곰팡이 포자의 발아 동안에 분비하는 것을 확인함으로써 감염 과정에서 중요한 역할을 한다고 보고하였다. 본 연구에서 병원성이 비교적 낮은 포자형의 균주들에서 검출되지 않았으나 균사형의 균주에서 검출되어 병원성과의 관련성을 간접적으로 시사했다.

Movahedi와 Heale(1990)은 aspartic proteinase 및 endopectin lyase가 *B. cinerea*의 감염 초기 및 병원성에 미치는 영향을 조사한 결과 이들 효소는 식물에 약해를 유발하며, aspartic proteinase에 특이적 저해제인 pepstatin을 전 처리한 곰팡이 포자는 감염이 크게 억제됨을 보고하였다. 또, 이러한 효소의 활성은 0°C에서도 최적 온도의 15% 정도의 활성을 나타내므로 저장 중에 심각한 피해를 유발하며, 곰팡이의 병원성과 관련하여 초기 감염과정에서 이 효소의 활성이 중요한 것으로 보고되고 있다(Elad and Evensen, 1995; Movahedi and Heale, 1990; Movahedi *et al.*, 1991).

또 본 연구에서는 gelatin 가수 분해는 병원성과 관련하여 일정한 경향을 알 수 없었으나 casein 가수 분해는 병원성이 큰 균주에서 높게 나타나 병원성과 관련성이 높음을 알 수 있었다. 그러나 Sasaki 등(1994)이 β -glucosidase의 활성과 병원균의 병원성과 높은 상관성이 있음을 보고한 바가 있으나 본 연구에서는 뚜렷한 차이를 나타내지 않았다.

병원 곰팡이가 분비하는 효소와 병원성과 관련성을 맺으려는 많은 연구가 되어 왔다. 그러나 이러한 연구는 실험자에 따라 일치하기도 하지만 상반된 결론을 보고하고 있기도 하다. 따라서 각각의 곰팡이가 분비하는 효소는 각각의 효소가 독자적으로 활성을 나타낼 수도 있지만 여러 가지 효소의 협력 작용의 결과 병원성에 영향을 나타내는 것이다. Urbanek 등(1984)은 사과의 세포막을 분해하는데 있어서 잿빛곰팡이병균이 분비하는 cellulase, xylanase, polygalacturonase, arabinase가 협력 작용을 한다고 보고한 바가 있다. 최근에 개발되어 잿빛곰팡이병 방제약으로 널리 사용되는 anilino-pyrimidine계 살균제는 그 작용 메커니즘이 곰팡이가 분비하는 효소의 활성을 억제함으로써 기주체의 침입을 억제한다고 보고하고 있다(Leroux, 1995; Milling and Richardson, 1995). 병원성과 관련된 효소 활성의 억제는 곰팡이의 새로운 작용점으로 새로운 살균제의 개발을 가능하게 할 것으로 기대된다.

본 연구에서 조사된 형태형 간의 PME, amylase, proteinase, cellulase 효소에 분비 차이는 형태형 간의 병원성의 차이를 어느 정도 설명할 수 있

었다. 형태형이 다른 균주를 실험 재료로 이용하여 이 곰팡이의 생리 생태적 다양성의 근거를 유전자 수준에서 구명하는 연구는 이후 수행되어야 할 것이다.

적 요

병든 오이, 토마토, 딸기로부터 분리한 *Botrytis cinerea*을 Paul(1928)의 형태형(morphological phenotypes) 분류 기준에 따라 포자형, 균핵형, 균사형으로 나눌 때 대부분의 균주는 균핵형으로 나타났다. Benzimidazole 및 dicarboximide계 살균제에 대한 감수성 및 저항성 반응 차이는 형태형과는 무관하였다. 포자의 표면 구조를 주사형 전자현미경으로 관찰한 결과 모두 봉상으로 형태형 간에 차이가 없었다. 형태형 간 병원성을 비교할 때, 균사형의 균주가 가장 병원성이 높았으며, 포자형은 병원성이 다른 형보다 낮게 나타났다. 병원성과 곰팡이의 phenol oxidase, pectin methyl esterases (PME), amylases, cellulases, ureases, glucosidases 및 proteinases 활성과의 관계를 조사하기 위하여 형태형이 다른 선발된 균주들의 효소 활성을 조사한 결과, Phenol oxidase, β -glucosidase는 각 형태형 간에 차이가 없었으나, PME, amylase, cellulase, urease, proteinase의 활성은 각 형태형 간에 차이를 나타내어 병원성과 이들 효소 활성의 관련성이 있었다.

참고문헌

최인실, 정영륜, 조광연. 1995. 잿빛곰팡이 병원균 *Botrytis cinerea* 균주의 분리 기주별 표현형적 특성, 병원성 및 약제 저항성 변이. 한국균학회지 **23**: 246-256.

堀内誠三, 堀 眞雄, 石井正義. 1978. 走査電顕觀察による數種*Botrytis*屬菌の同定. 中國農試報 **E13**: 53-87.

Agrios, G. N. 1988. Plant Pathology (3rd edition). Academic Press, Inc., New York, 803 p.

Arai, M. 1996. Gray mold of Hydrangea caused by *Botrytis cinerea*. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. **62**: 87-90.

Bar Nun, N., Tal Lev, A., Harel, E. and Mayer, A. M. 1988. Repression of laccase formation

in *Botrytis cinerea* and its possible relation to phytopathogenicity. Phytochemistry **27**: 2505-2509.

Beever, R. E. 1983. Osmotic sensitivity of fungal variants resistant to dicarboximide fungicides. Trans. Br. Mycol. Soc. **80**: 327-331.

Buttner, P., Koch, F., Voigt, K., Quidde, T., Risch, S., Blaich, R., Brücker, B., and Tudzynski, P. 1994. Variation in ploidy among isolates of *Botrytis cinerea*: implications for genetic and molecular analyses. Curr. Genet. **25**: 445-450.

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** (Suppl. 1): 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. Pl. 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. Pl. Pathol. **99**: 105-113.

Elad, Y. and Evensen, K. 1995. Physiological aspects of resistance to *Botrytis cinerea*. Phytopathology **85**: 637-643.

Ellis, M. B. and Waller, J. M. 1974. *Sclerotinia fuckeliana* (conidial stage: *Botrytis cinerea*). CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria N431.

Faretra, F., Antonacci, E., and Pollastro, S. 1988. Sexual behaviour and mating system of *Botryotinia fuckeliana*, teleomorph of *Botrytis cinerea*. J. Gen. Microbiol. **134**: 2543-2550.

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 Pathol. **42**: 48-57.

Fourie, J., F. and Holz, G. 1995. Initial infection processes by *Botrytis cinerea* on nectarine and plum fruit and the development of decay. Phytopathology **85**: 82-87.

Georgopoulos, S. G. and Skylakakis, G. 1986. Genetic variability in the fungi and the problem of fungicide resistance. Plant Prot. **5**: 299-305.

- Grindle, M. 1979. Phenotypic differences between natural and induced variants of *Botrytis cinerea*. *J. Gen. Microbiol.* **111**: 109-120.
- 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.
- Leroux, P. 1995. Progress and problems in the control of *Botrytis cinerea* in grapevine. *Pestic. Outlook*, October 1995: 13-19.
- Maas, J. L. 1969. Effect of time and temperature of storage on viability of *Botrytis convoluta* conidia and sclerotia. *Plant Dis. Rep.* **53**: 141-144.
- Milling, R. J. and Richardson, G. J. 1995. Mode of action of the anilino-pyrimidine fungicide pyrimethanil. 2. Effect on enzyme secretion in *Botrytis cinerea*. *Pesti. Sci.* **45**: 43-48.
- Movahedi, S. and Heale, J. B. 1990. The roles of aspartic proteinase and endo-pectin lyase enzymes in the primary stages of infection and pathogenesis of various host tissues by different isolates of *Botrytis cinerea* Pers ex. Pers. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **36**: 303-324.
- Movahedi, S., Norey, C. G., Kay, J., and Heale, J. B. 1991. Infection and pathogenesis of cash crops by *Botrytis cinerea*: primary role of an aspartic proteinase. *Adv. Exp. Med. Biol.* **306**: 213-216.
- Paterson, R. R. M. and Bridge, P. D. 1994. *Biochemical techniques for filamentous fungi*. International Mycological Institute, 125 p.
- Paul, W. R. C. 1928. A comparative morphological and physiological study of a number of strains of *Botrytis cinerea* Pers. with special reference to their virulence. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **15**: 118-135.
- Poapst, P. A., Ramsomair, 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.
- Rigling, D., Heiniger, U. and Hohl, H. R. 1989. Reduction of laccase activity in dsRNA-containing hypovirulent strains of *Cryphonectria (Endothia) parasitica*. *Phytopathology* **79**: 219-223.
- 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.
- Sharrock, K. R. and Labavitch, J. M. 1994. Polygalacturonase 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.
- Shishiyama, J. Araki, F. and Akai, S. 1970. Studies on cutin-esterase from *Botrytis cinerea* and its activity on tomato-cutin. *Plant Cell Physiol.* **11**: 937-945.
- Smith, W. K. 1958. A survey of the production of pectic enzymes by plant pathogenic and other bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **18**: 33-41.
- Urbanek, H. and Zalewska-Sobczak, J. 1984. Multiplicity of cell wall degrading glycosidic hydrolases produced by apple infecting *Botrytis cinerea*. *Phytopathol. Z.* **110**: 261-271.
- Van Der Vlugt-Bergmans, C. J. B., Brandwagt, B. F., Vant Klooster, J. W., Wagemakers, C. A. M., and Van Kan, J. A. L. 1993. Genetic variation and segregation of DNA polymorphisms in *Botrytis cinerea*. *Mycol. Res.* **97**: 1193-1200.
- Verhoeff, K., Liem, J. I., Scheffer, R. J., and Surya, I. 1983. Cellulolytic activity of *Botrytis cinerea* *in vitro* and *in vivo*. *Phytopath. Z.* **106**: 97-103.
- Wasfy, E. H., Farag, S. A., Tarabieh, M. A., and Abd-Elmoety, S. H. 1978. Studies on enzymes of different strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathol. Z.* **92**: 168-179.
- Zouari, N., Romette, J. L. and Thomas, D. 1987. Purification and properties of two laccase isoenzymes produced by *Botrytis cinerea*. *Appl. Biochem. Biotech.* **15**: 213-225.