

사과나무 腐爛病에 對한 Prochloraz와 Triadimefon의 抗菌性

홍종욱 · 이동진 · 김장익

慶北大學校 農科大學 農化學科

Antifungal Activity of Prochloraz and Triadimefon on *Valsa ceratosperma*

Hong, Jong Uck · Lee, Dong Jin · Kim, Jang Eok

Dept. of Agricultural Chemistry, Coll. of Agric., Kyungpook Natl. Univ.

Summary

In order to elucidate the antifungal activity of prochloraz(imidazole) and triadimefon(triazole), the mycelia of the *Valsa ceratosperma* were treated with the compounds in vitro.

Prochloraz applied to the target pathogen inhibited mycelial growth more than triadimefon. The concentration for the 50% inhibition of mycelial growth(I_{50}) was 1-5 ppm in treatment of prochloraz and 5-10 ppm in treatment of triadimefon.

The mycelia of *Valsa ceratosperma* treated with low concentration of prochloraz and triadimefon were morphologically abnormal as observed with an optical microscope.

Content of total lipid and fatty acids were not changed by the treatments of prochloraz and triadimefon, respectively, in liquid medium.

緒 論

사과나무 腐爛病(Japanese apple canker)은 1880年頃 日本에서 처음 報告된 것으로 官部等은 이 病의 病原菌을 *Valsa mali* Miyabeet Yamada라고 命名하였다. 그후 小林은 사과나무 腐爛病菌이 *Valsa ceratosperma*와 形態의으로 同一함을 發見하여 이 菌을 *Valsa ceratosperma*에 結合시켰다.^{21,22)}

사과나무 腐爛病은 주로 不完全世代에 의하여 傳染되며 孢子는 飛散하여 사과나무의 壞死組織을 통하여 感染되는 것으로 알려져 있다.^{3,6,19)}

우리나라에서는 1919년에 이 病이 처음 發見^{7,20)}된 이래로 그 被害程度가 점차적으로 擴散되어 현재는 사과 農事에서 가장 被害가 極甚한 病中の 하나가 되었다. 그 동안 이 病을 効果의으로 防除하고자 많은 研究가^{11~16,19)}있었으나 만족할 만한 藥劑는 많지 않고 chinosol等 몇가지 藥劑가 使用되고 있다. 최근 洪⁵⁾이 사과나무 腐爛病菌 防除를 위하여 berberine 및 그 유도체로 研究한 結果 腐爛病菌에 抗菌力이 있음을 확인하였고 또한 그 抗菌力의 作用機作을 밝힌바 있다. 最近에 開發되어 使用되고 있는 대부분의 殺菌劑들은 作用機作을 中心으로

研究^{1,17,18)}되어서 病을 좀더 効果的으로 防除하고 있다.

따라서 本人等은 사과나무 腐爛病菌을 効果的으로 防除할 수 있는 藥劑를 찾고 또한 그 作用機作을 밝히기 위하여 현재 浸透性殺菌劑로서 많이 使用되고 있는 triazole系 殺菌劑인 배의 붉은 별무늬병 (*Gymnosporangium haraeaeum*)과 오이 흰가루병 (*Sphaerotheca fuliginea*)防除劑로 使用되고 있는 triadimefon과 사과탄저병(*Glomerella cingulata*)防除劑로서 使用되고 있는 imidazole系인 prochloraz를 使用하여 우리나라의 사과나무 腐爛病菌에 어느정도 抗菌力이 있는지를 밝히고자 하였다. 또한 이 抗菌力의 作用機作을 규명하기 위한 基礎資料를 얻고자 菌體의 脂質成分中 脂肪酸의 組成變化에 어떤 影響을 미치는가를 밝히고자 本 研究를 修行하였다.

材料 및 方法

1. 實驗材料

1) 供試藥劑

Triadimefon은 Bayer社의 原劑(90%)를 使用하였고 prochloraz는 FMC社의 原劑(96.2%)를 使用하였다.

2) 供試菌株 및 培地

사과나무 腐爛病菌(*Valsa ceratosperma*)은 羅病樹皮組織에서 분리하여 培養하였으며 1個月마다 PDA斜面培地에 繼代培養하여 4°C에 保管하면서 供試菌株로 使用하였다.

固體培地는 potato dextrose agar (PDA)로서 Fuliika 製品를 使用하였고 液體培地는 potato sucrose (PS)를 pH6.0으로 調節하여 使用하였다.

2. 實驗方法

1). 抗菌力 測定

PDA斜面培地에서 培養된 菌에 殺菌水로 10배 희석하여 이 희석액 0.1ml씩을 PS液體培地 5ml에 移殖하였다.

藥劑處理는 供試藥劑를 各各 acetone에 녹여 全體培養液中 藥劑의 濃度가 0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1, 5 및 10ppm이 되게 處理하고 이때 acetone의 含量은 0.6%를 넘지 않게 조절하였다. 이 배양액을 26±2°C의 왕복항온진탕기에서 120 stroke/min으로 7일간 배양한 후 濾過, 乾燥하여 各 處理別로 자란 菌絲의 무게를 秤量하여 菌의 供試農藥에 對한 抗菌力과 無處理에 對한 乾燥重量이 半으로 沮害되는 濃度인 I_{50} 값을 測定하였다.

2). 菌絲의 顯微鏡 觀察

抗菌力實驗과 同一한 方法으로 PS液體培地에 菌을 移殖하고 藥劑를 處理하였다. 藥劑處理는 I_{50} 濃度를 基準으로 하여 prochloraz는 0, 5 ppm, triadimefon은 10ppm을 處理하여 5日間 培養한 後 顯微鏡으로 菌絲의 형태를 觀察하였다.

3). 脂質成分의 變化實驗

500ml 삼각 flask에 200°C의 PS液體培地(pH6)을 넣고, 여기에 含菌 PDA 平板培地로부터 직경 0.5 cm의 cork borer로 찍어낸 含菌寒天片을 培養液에 移殖하고 6日間 培養하였다. 各 培養液에 藥劑의 濃度가 0, 0.5, 5 및 10ppm이 되게 處理하고 26±2°C의 恒溫器에서 배양하면서 0, 19時間, 1日, 3日 및 5日에 菌사를 取하여 分析試料로 하였다.

4) 脂質成分의 分析

사과나무 腐爛病(*Valsa ceratosperma*) 菌體中의 脂肪酸는 Baldwin과 Wiggins¹⁾의 方法을 一部 變更하여 Fig. 1과 같은 方法으로 定量하였다.

總脂質은 培養液을 millipore filter[®]로 여과하여 菌사를 얻은 후 이 菌사를 -60°C 100mmHg로 凍結乾燥하고 80mesh정도로 磨碎한 試料(0.8~1.0g)를 soxhlet장치를 利用하여 chloroform : methanol(2/1, v/v) 50ml로 24時間 還流시키면서 抽出하여 Fo-

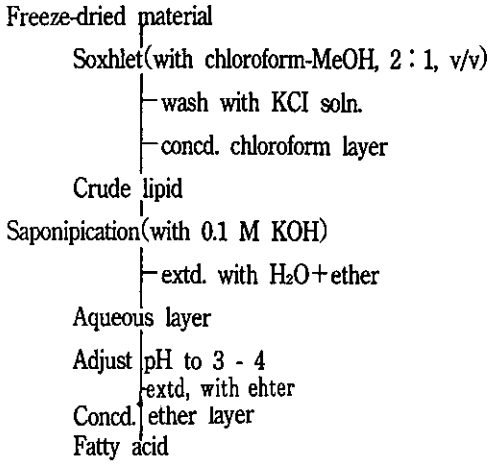


Fig. 1. Isolation of fatty acid from *Valsa ceratosperma*

Ich等²⁾의 방법에 따라 KCl 용액으로 세척한 다음 減壓濃縮하여 溶媒를 완전히 날려보낸 다음 恒量이 될 때까지 desiccator에서 건조시켜 總脂質의 무게를 秤量하였다.

脂肪酸의 抽出은 먼저 總脂質을 鹼化하여 ethyl ether로 水층을 분리한 다음 이 水층에 0.1N HCl을 가하여 pH 3~4로 되게한 후 ethyl ether 15ml로 2回 반복 추출하여 減壓濃縮하고 methanol 5ml에 再溶解하였다. 이 溶液에 BF₃methanol溶液 0.2ml를 넣고 85°C의 恒溫水槽에서 1時間 反應시켜 methyl ester화한 다음 ethyl ether 2ml로 抽出하고 이것을 減壓濃縮한 후 5ml의 hexane에 再溶解하여 GLC分析用 試料로 하였으며 이때의 GLC의 分析條件은 Table 1과 같았다.

Table 1 GLC parameter for analysis of fatty acid with packed column

Item	Condition
Column	15% DEGS, glass 3mm(ID)×2m(L)
Detector	F. I. D.
Carrier gas(N ₂)	45 ml/min.
Chart speed	5 mm/min.
Column temp.	180°C
Injector temp.	200°C
Detector temp.	200°C

材料 및 考察

1. 藥劑에 對한 抗菌力

Imidazole 系인 prochloraz와 triazole系인 triadimefon에 對한 I₅₀ 및 抗菌力을 測定하기 위하여 PS 液體培地에 菌을 接種하고 藥劑를 處理한 후 26±2 °C의 恒溫器內에서 7日間 振盪培養한 後 菌體의 乾燥重量을 調査한 結果는 Fig. 2 및 Fig. 3과 같았다.

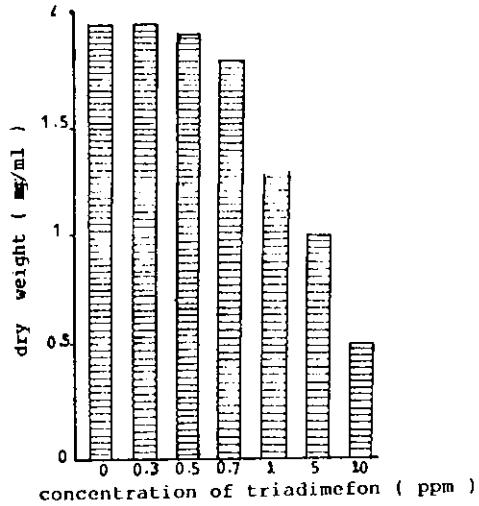


Fig. 2. Inhibitory effect of triadimefon on mycelial growth after 7 days culture of *Valsa ceratosperma* in liquid medium.

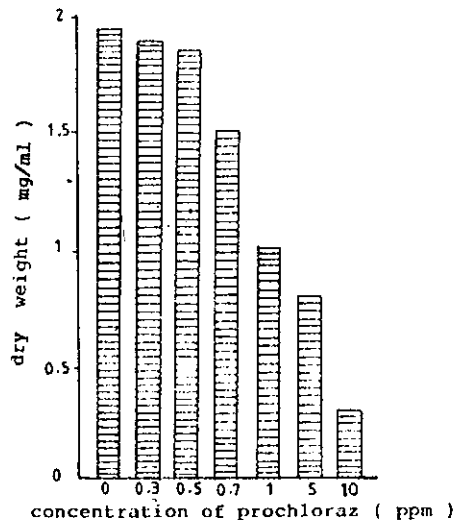


Fig 3. Inhibitory effect of prochloraz on mycelial growth after 7 days culture of *Valsa ceratosperma* in liquid medium.

Fig. 2와 Fig. 3에서 처럼 对照 및 triadimefon 0.3 ppm 处理時 菌體의 重量은 1.95mg/ml이었으나 prochloraz의 경우는 0.3ppm 處理에서 1.9mg/ml로서 약간 적었다. 농도가 증가함에 따라 prochloraz는 1~5ppm 사이, triadimefon은 5~10ppm 사이의 處理濃度에서 菌體의 乾燥重量이 無處理에 비해 반으로 줄어든 것을 볼때 prochloraz 및 triadimefon의 대략의 LD_{50} 濃度는 各各 1.0~5.0ppm사이인 2.4ppm 및 5.0~10.0ppm 사이 인 5.3ppm인 것으로 나타났다.

2. 菌絲의 形態的 變化

Prochloraz 및 triadimefon을 PS液體培地에 各各 5ppm과 10ppm을 處理한 것과 藥劑를 處理하지 않고 5日間 培養한 菌絲를 顯微鏡으로 觀察한 結果 Fig. 4와 같이 prochloraz 및 triadimefon을 各各 5ppm 및 10ppm을 處理한 경우에 菌絲의 異常生育現象이 나타났다.



A : Control



B : treated with prochloraz



C : treated with triadimefon

Fig 4. Morphological effect of pesticides on mycelia of *Valsa ceratosperma* A B C

이러한 菌絲의 異常生育現象은 A. Kerkenaar 등¹이 fenpropimorph와 imazalil을 *Penicillium italicum*에 處理하여 菌사의 異常生育現象을 관찰한 보고와 Kato²가 殺菌劑인 buthiobate를 *Sphaerothe fuliginea*에 處理하여 細胞膜의 구성成分인 ergosterol의 生合成이 阻害되어 특이한 異常形態를 관찰하였다는 報告로 미루어 볼때 두 藥劑 모두가 위의 藥劑와 같이 *Valsa ceratosperma*의 細胞膜構成成分인

ergosterol의 生合成을 阻害하여 菌絲의 細胞膜構成成分인 ergosterol이 결핍되어서 形態적으로 異常現象이 생긴 것으로 推定된다.

3. 脂肪酸 組成의 變化

Prochloraz 및 triadimefon을 腐爛病菌에 各各 5 ppm 및 10ppm의 濃度로 處理하여 經過時間別로 脂肪酸 組成을 分析한 結果는 Table 2 및 Table 3과 같았다.

Table 2. Effect of prochloraz(5ppm) on the composition of the total lipid & fatty acid of *Valsa ceratosperma* (6 days old) in liquid medium

Time after treatment (hrs)	Total lipid (% , dry wt)	Fatty acid composition(%)					
		16 : 0	18 : 0	18 : 1	18 : 2	18 : 3	others
0*	7.8	13.9	7.8	12.9	60.6	2.9	1.9
19	8.0	13.7	8.1	12.8	60.3	3.4	2.9
24	7.6	14.0	8.3	13.0	60.2	2.0	2.5
72	7.9	13.9	8.5	13.5	60.1	1.9	2.1
120	8.0	13.7	8.1	12.9	60.5	2.0	2.8
168	8.1	14.2	8.0	13.1	59.9	2.3	2.5

*Control

Table 3. Effect of triadimefon(10ppm) on the composition of the fatty acid & total lipid of *Valsa ceratosperma* (6 days old) in liquid medium

Time after treatment (hrs)	Total lipid (% , dry wt)	Fatty acid composition(%)					
		16 : 0	18 : 0	18 : 1	18 : 2	18 : 3	others
0*	7.8	13.9	8.5	12.4	60.9	2.6	1.7
19	7.5	14.8	9.3	12.0	59.3	2.1	2.5
24	8.0	13.6	8.1	12.5	60.2	3.1	3.0
72	7.5	14.1	8.5	13.0	60.3	1.9	2.2
120	8.0	14.3	8.4	13.7	59.1	2.4	2.1
168	7.9	13.0	8.0	12.5	61.5	2.0	3.0

* Control

Prochloraz 5ppm 및 triadimefon 10ppm 處理時 經過日數別 乾燥重量에 對한 總脂質의 含量은 7.5~8.1%로서 時間經過에 따른 含量의 變化는 없었으며 脂肪酸 助成은 palmitic acid 13.7~14.8%, stearic acid 58.2~60.5%, linolenic acid 1.9~3.4% 이었고 其他 脂肪酸이 0.6~3.0%로서 時間經過에 따른 組成變化는 差異點이 나타나지 않았는데 이는 洪³⁾이 berberin so₄ 유도체가 부란병균의 지방산조성에 영향을 미치지 않는다는 報告와 類似한 傾向을 나타

내었다.

또한 John 等⁸⁾에 의하면 pyridazinone 置換體들에 의해 植物體 細胞膜의 構成成分인 脂肪酸中의 linolenic acid (18:3)의 含量이 줄어든 반면에 상대적으로 linoleic acid(18:2)의 含量이 증가된다는 相互轉換關係로 미루어 볼때 本 菌의 脂肪酸組成의 相關關係는 差異點을 發見할 수 없었다.

두 藥劑를 各各 濃度를 달리 處理한 後 脂肪酸의 組成을 分析한 結果는 Table 4 및 Table 5와 같았다.

Table 4. Effect of triadimefon (7 days after treatment) on the composition of the total lipid & fatty acid in *Valsa ceratosperma* (6 days old) in liquid medium

Concentration (ppm)	Total lipid (% dry wt)	Fatty acid composition(%)					
		16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	others
0	8.0	14.3	9.7	13.0	58.2	2.2	2.6
1	8.1	14.8	8.4	13.7	59.3	1.8	2.0
5	8.0	14.3	8.4	13.7	59.1	2.4	2.1
10	7.9	13.0	8.0	12.5	61.5	2.0	3.0

Table 5. Effect of prochloraz (7 days after treatment) on the composition of the total lipid & fatty acid in *Valsa ceratosperma* (6 days old) in liquid medium

Concentration (ppm)	Total lipid (% dry wt)	Fatty acid composition(%)					
		16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	others
0	7.8	13.9	9.8	13.5	60.1	2.1	0.6
1	8.0	14.2	8.4	13.1	60.2	2.0	2.1
5	8.1	14.2	8.0	13.1	59.9	2.3	2.5
10	7.5	13.8	9.7	12.9	61.0	2.0	0.6

總脂質의 菌體 乾燥重量에 對한 含量比는 7.5~8.1% 이었고 脂肪酸의 組成은 palmitic acid 13.0~14.8%, stearic acid 8.0~9.8%, oleic acid 12.5~13.7%, linoleic acid 58.2~61.5%, linolenic acid 1.8~2.4%

및 其他 0.6~3.0%로서 藥劑의 處理 有餘와 濃度에 關係없이 脂肪酸의 組成에는 變化가 없는 것으로 나타났다.

摘 要

Imidazole系 農藥인 prochloraz와 triazole系인 triadimefon의 사과나무 腐爛病菌(*Valsa ceratosperma*)에 대한 抗菌力 및 脂肪酸의 組成變化에 미치는 影響을 調査한 結果는 다음과 같다.

菌이 生育하고 있는 PS液體培地에 두 藥劑를 各各 處理하였을 때의 I_{50} 값은 prochloraz의 경우는 1~5 ppm이었고 triadimefon은 5~10ppm이었으며 prochloraz의 阻害能이 다소 높았다.

菌絲의 顯微鏡 觀察結果 藥劑 處理區에서는 모두 菌絲의 異常生育現象이 觀察되었다.

菌體에 藥劑를 處理함으로 인해서 脂質의 變化를 調査한 結果 菌體中の 總脂質 및 脂肪酸의 含量變化는 없는 것으로 나타났다.

引用文獻

1. Baldwin, B. C. and E. Wiggins. 1984. Action of fungicidal triazoles of the dichlobutrol series on *Ustilago maydis*. Pestic. Sci. 15 ; 156-166.
2. Folch, J., Lees, M. and G.H. Sloane-Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Bio. Chem 226 ; 497-509
3. George, N.A. 1978. Plant pathology, pp.278-289 Academic press.
4. Henry, M.J. and H.D. Sisler. 1981. Inhibition of ergosterol biosynthesis in *Ustilago maydis* by the fungicide 1-(2-(2,4-Dichlorophenyl)-4-ethyl-1, 3-dioxolan-2-ylmethyl-1H-1, 2, 4-triazole. Pestic. Sci. 12 ; 98-102.
5. 洪茂基. 1987. 慶北大學校 學位論文. 사과나무 腐爛病에 對한 天然生理 活性物質인 Berberine과 그 誘導體의 抗菌性.
6. 平良木武, 中野武夫. 1980. 剪定時期と發病 農林水産省 總合助成試驗. pp ; 900-932.
7. 鄭厚燮, 朴鍾聲, 金命午. 1973. 植物病理學. pp. 341-342. 鄉文社.
8. John, J. B., Ritting, F. R., Ashworth, E. N. and M. N. Christiansen. 1983. Pesticide Chemistry (human welfare and the environment. Vol. 2), pp.158-161. pergamon press, International Union of Pure and Applied Chemistry.
9. Toshiro Kato. 1982. Mechanism of action of the fungicide buthiobate. J. Pestic. Sci. 7 ; 427-437.
10. Kerkenaar, A., van Rossum, J. M., Versluis, G. and J. W. Marsman. 1984. Effect of enpropimorph and imazalil on sterol biosynthesis in *Penicillium italicum*. Pestic. Sci. 15 ; 177-187.
11. 金文鎬, 李準卓. 1974. 사과나무 腐爛病에 關한 研究 I. 慶北大 論文集(自然科學) 18 ; 91-98.
12. 金文鎬, 李準卓. 1975. 사과나무 腐爛病에 關한 研究 II. 慶北大 論文集(自然科學) 20 ; 115-121.
13. 金承哲, 元昌南, 李應權. 1972. 사과나무 腐爛性病害(腐爛病, 胴枯病, 胴腐病)에 關한 研究. 韓國植物保護學會誌. 9(2) ; 81-84.
14. 北島博. 1976. 果樹의 病害(5). 農業および園藝. 51(8) ; 1056-1060.
15. 金容九. 1967. 사과나무 腐爛病 防除에 關한 試驗. 園試研報. pp.575-582.
16. 金容九. 1970. 사과腐爛病 防除에 關한 試驗. 園試研報. pp.729-736.
17. Kodama, O., Yamada, H., Hata, T. and S. Omura. 1975. Inhibition of sequalene biosynthesis on yeast by the cerlenine. J. Antibiot., 25 ; 365-369.
18. Kodama, O., Yamashita, K. and T. Akatsuka. 1980. Edifenphos, inhibitor of phosphatidyl choline biosynthesis in *Pycularia oryzae*. Agric. Biol. Chem. 44 ; 1015-1021.

19. 權淳國, 張淳德, 孫埃秀, 權鍾. 1968. 사과腐爛病에 對한 發生環境調査. 慶北農試 研報. pp.900-932.
20. 中田覺五部, 龍元清透. 1928. 朝鮮作物病害目錄. 勤業模範農場報告書. 15; 113.
21. 佐久間勉, 高柔亮. 1983. 린츄 腐爛病. 植物防疫. 37(6): 227-230.
22. 齊藤 泉, 田对 修, 高柔亮. 1972. *Valsa ceratospora*によるナシ類の腐らん病. 日本植物病理學會報. 38(3): 258-260.
23. 원창남, 김승철, 한정길. 1972. 사과나무 부란성 병해(부란병, 동고별, 동부병)에 관한 연구(제2보). 병원균의 분포 및 몇가지 살균제의 방제 효과. 한국식물 보호학회지. 11(1); 19-23.