

감귤 잿빛곰팡이병균의 살균제에 대한 저항성 및 유전적 다양성

고영진* · 이재균 · 서정규 · 문두길¹ · 한해룡¹
순천대학교 응용생물원예학부, ¹제주대학교 원예생명과학부

Fungicide Resistance and Genetic Diversity of *Botrytis cinerea* of Citrus

Young Jin Koh*, Jae Goon Lee, Jeong Kyu Seo, Doo-Khil Moon¹ and Hae-Ryong Han¹
Faculty of Applied Biology and Horticulture, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea
¹Faculty of Horticultural Life Science, Cheju National University, Cheju 690-756, Korea

ABSTRACT: Fungicide resistance of 48 isolates of *Botrytis cinerea* collected from citrus in Cheju was investigated and genetic diversity was analyzed with random amplified polymorphic DNA(RAPD). High levels of resistance to benzimidazole fungicides benomyl and thiophanate-methyl and *N*-phenylcarbamate fungicide diethofencarb were observed. Negative cross resistance was clear between benzimidazole and *N*-phenylcarbamate fungicides, and multiple resistance to the fungicides was also observed. There was cross resistance among the dicarboximide fungicides procymidone, vinclozolin and iprodione as it was observed between the benzimidazole fungicides benomyl and thiophanate-methyl. The lowest levels of resistance were to the dicarboximide fungicides, but no sensitive isolate to polyoxin B was observed. The isolates showed genetically diverse RAPD profiles according to the geographic origin collected, but there was no significant correlation between RAPD profiles of genomic DNA and the levels of fungicide resistance of the isolates. The isolates showed genetically diverse RAPD profiles, indicating that genetic differentiation had already occurred in the populations of *B. cinerea* distributed in Cheju.

Key words: *Botrytis cinerea*, citrus, fungicide resistance, genetic diversity, RAPD.

대표적인 다범성 식물병인 잿빛곰팡이병을 일으키는 *Botrytis cinerea* Pers.: Fr.(완전세대 학명 *Botryotinia fuckeliana*(de Bary) Whetz.)는 부생성이 강하여 노화된 식물체나 죽은 식물체 잔재물 등에서 균사조각, 균핵, 분생포자 또는 자낭포자의 형태로 월동을 하거나 월하를 하며, 다습하고 서늘한 환경조건에서 식물체에 감염을 일으킨다. 특히 축성재배를 목적으로 최근 재배면적이 급증하고 있는 시설재배에서는 가을에서 봄사이에 보온을 위하여 환기와 통풍이 이뤄지지 않는 밀폐된 상태가 지속되기 때문에 다습하고 서늘한 미기상 조건을 유지하게 되어 잿빛곰팡이병이 발생하여 큰 피해를 준다. 최근 감귤재배에서도 조기 수확과 고품질 감귤의 생산을 위하여 시설재배가 늘어나면서 감귤 잿빛곰팡이병의 발생 및 피해도 점차 증가하고 있는 실정이다.

고 등(15)에 의하면 제주도 주요 감귤재배지에서 잿빛곰팡이병의 발생과율이 약제방제 노지포장에서는 17.3%로 조사된 반면에 시설재배에서는 약제방제에도 불구하고 30.0%로 조사되었으며, 검은점무늬병과 더듬이병에 이어 감귤에 큰 피해를 주는 병으로 보고되었다. 감귤류

에서 잿빛곰팡이병은 주로 개화기에 꽃을 감염시키고 과실에까지 감염을 일으켜 유과기 뿐만 아니라 성숙과의 과실표면에서도 감염 흔적을 뚜렷하게 남김으로써 감귤류의 상품성을 떨어뜨려 감귤 재배 농가에 큰 피해를 주며 저장중인 과실에도 감염을 일으켜 큰 손실을 입힌다.

잿빛곰팡이병의 방제는 전염원을 제거하고 시설내 실내습도를 낮추도록 재배환경을 개선하는 경종적 방제법과 더불어 약제방제가 가장 보편적으로 이용되고 있다. 감귤 잿빛곰팡이병 방제약제로 benzimidazole계 살균제(benomyl, thiophanate-methyl 및 carbendazim), dicarboximide계 살균제(procymidone, vinclozolin 및 iprodione), *N*-phenylcarbamate계 살균제인 diethofencarb 및 항생제인 polyoxin 등이 단제 또는 합제로 많이 사용되고 있다. 그러나, 작용부위가 특이적인 살균제는 살균제에 대한 저항균의 발생으로 약효가 경감되어 방제비용을 증가시키고 방제시기를 놓치게 함으로써 경제적으로 커다란 손실을 일으키고 있어 심각한 문제로 대두되고 있는 실정이다. 또한 *B. cinerea*의 분생포자와 균사는 다핵성이고 분생포자의 발아관이나 균사끼리 융합이 빈번하게 발생하여 균주간에 유전적 변이가 아주 심하므로 기주식물의 병저항성 육종이 어렵고 살균제에 대한 저항

*Corresponding author.

성이 쉽게 발생함으로써 방제에 많은 어려움이 있다(2, 7, 18, 23).

따라서, 감귤 잿빛곰팡이병을 효율적으로 방제하기 위해서는 잿빛곰팡이병균의 유전적 특성과 함께 살균제에 대한 저항성균의 발생실태를 파악함으로써 감귤 잿빛곰팡이병 저항성 및 살균제 개발 연구 등을 위한 병리학적 기초자료로 확보하는 것이 시급한 실정이다. 본 연구는 감귤류에 경제적으로 가장 큰 피해를 주는 것으로 조사된 잿빛곰팡이병을 일으키는 *B. cinerea*의 주요 살균제에 대한 저항성균의 발생실태와 random amplified polymorphic DNA(RAPD)를 이용하여 병원균 집단의 유전적 다양성을 파악함으로써 농약 사용을 절감할 수 있는 환경보전적인 감귤 병해에 대한 효율적인 관리체계를 수립하기 위한 기초자료를 얻고자 수행하였다.

재료 및 방법

공시 균주. 1997년 제주도의 주요 감귤 재배지에서 재배되고 있는 온주밀감의 꽃과 과실로부터 *B. cinerea* 48균주를 수집하였다(Table 1). 병든 부위 절편을 70% ethanol로 표면살균한 후 PSA(Potato Sucrose Agar; potato 200 g, sucrose 20 g, agar 20 g, 증류수 1,000 ml) plate에 치상하여 23°C에서 4일 동안 배양하여 분생포자를 형성시켰다. 분생포자를 수확하여 살균수에 희석시킨 후 물한천배지에서 단포자를 분리하였으며, *B. cinerea*로 동정된 48균주를 PSA plate에서 배양하여 보관균주를 만들어 시험에 사용하였다. 수집한 48균주에 대하여 살균제에 대한 저항성을 조사하였으며, 48균주 중에서 지역별로 대표적인 24균주를 임의로 선발하여 RAPD를 분석하여 유전적 다양성을 평가하였고 살균제 저항성과의 관련성을 조사하였다.

살균제저항성 조사. 감귤 잿빛곰팡이병 방제약제로 농가에서 많이 사용되고 있는 약제 중에서 benzimidazole계 살균제인 베노밀 수화제(benomyl, a.i. 50%, 동양화학)와 지오판 수화제(thiophanate-methyl, a.i. 70%,

동부한농), dicarboximide계 살균제인 프로파 수화제(procymidione, a.i. 50%, 동방아그로), 빈졸 수화제(vin-clozolin, a.i. 50%, 한국삼공) 및 이프로 수화제(iprodione, a.i. 50%, 동양화학), *N*-phenylcarbamate계 살균제인 diethofencarb(원제, 동방아그로), *N*-phenylcarbamate계 살균제와 benzimidazole계 살균제의 합제인 깨끄탄 수화제(diethofencarb, a.i. 25%+carbendazim, a.i. 25%, 동방아그로) 및 항생제인 폴리옥신 수화제(polyoxin B, a.i. 10%, 동부한농) 등 8종의 살균제를 살균제저항성 검정에 공시하였다. 각 살균제별로 0, 1, 5, 25, 125, 625, 3,125 µg/ml의 약제가 들어 있는 PSA plate의 중앙에 10일 정도 배양한 신선한 균총의 가장자리에서 cork borer를 사용하여 떼어낸 직경 5 mm 크기의 균총 disk를 치상하여 25°C의 항온기에서 7일간 배양하였다. 각 농도에서 균주별 균사의 생육 유무를 조사하여 각 살균제별 균사생장 최소억제농도(MIC, minimum inhibitory concentration)를 산출하였다.

DNA의 추출 및 정제. RAPD 분석을 위한 DNA는 Sambrook 등(21)의 alkaline lysis 방법을 다소 변형하여 추출하였다. PD broth(potato 200 g, dextrose 20 g, 증류수 1,000 ml) 50 ml에서 2주간 27°C 조건에서 정제 배양시킨 균체는 cheese cloth에 짜서 갈대기에 위에 넣고 증류수 3,000 ml 정도를 부은 후 물기를 제거시켰으며, falcon tube에 넣어 하루 동안 freeze dry시킨 뒤 liquid nitrogen을 넣고 막자사발로 갈아 sample를 준비하였다. DNA추출을 위해 준비된 sample 중 0.04 g을 microtube에 담은 후 lysis buffer를 750 ml를 넣고 그 위에 동일 양의 phenol을 첨가하고 vortex하여 15,000 rpm에서 5분 동안 원심분리한 후 상층을 취해 새로운 microtube에 담고 phenol을 반복처리한 후 상층액을 회수하였다. 회수된 상층액에 phenol:chloroform:isoamylalcohol(25:24:1)을 넣고 잘 흔들어 준 다음 15,000 rpm에서 5분 동안 원심분리시켜서 상층액을 뽑아내었다. 분리된 상층에 sodium acetate 20 ml과 isopropanol 1 ml을 넣고 15,000 rpm에 5분 동안 원심분리하여 microtube 밑부분에 pellet이 생기면 조심스럽게 물층을 따른 후 vacuum dryer에서 20~30분 동안 말리고 TE buffer (pH 8.0) 500 µl를 넣고 DNA를 녹였다. 다시 RNase를 30 µl(250 unit/ml)을 첨가하여 살짝 tapping한 후 37°C에서 1 hr 보관하였다. 그 후에는 phenol, phenol:chloroform:isoamylalcohol(25:24:1), chloroform:isoamylalcohol(24:1) 용액들을 순서대로 처리한 후 각각 15,000 rpm에서 5분 동안 반복하며 원심분리시켰다. 회수된 상층액에 100% ethanol을 1 ml 넣고 10,000 rpm에서 2분 동안 원심분리시켰다. 이때 남은 pellet을 1 ml의 70% 냉각 ethanol로 세척하고 원심분리하여 pellet만 남기고 용액을 버리고, 남은 pellet은 vacuum dryer에서

Table 1. *Botrytis cinerea* isolates collected from citrus in 4 major cultivation areas of Cheju, Korea in 1997

Group ^a	Isolates	Geographic origins
A	A01~A03	Northwest Cheju (Hankyung-mycon and Aewol-eup)
B	B01~B03	Northeast Cheju (Cheju-si and Chochon-eup)
C	C01~C18	Southeast Cheju (Pyoson-mycon and Namwon-eup)
D	D01~D24	Southwest Cheju (Seogwipo-si and Andok-myeon)

^aGeographic group is classified according to 4 major citrus cultivation areas of Cheju Island.

20~30분 정도 말린 다음 멸균수에 녹여 4°C에서 보관하여 사용하였다.

DNA 증폭. DNA 증폭을 위한 random primer는 Operon사의 10-base Oligonucleotide Primer kit A와 Wako사의 12-base Oligonucleotide Primer kit A와 kit C를 이용하였다(Table 4). PCR 증폭은 5 ng/μl의 genomic DNA template와 7.5 ng의 primer, 0.4 U의 Taq polymerase, 1 μl의 10×reaction buffer, 2.0 mM dNTP(dCTP, dATP, dGTP, dTTP)를 혼합하여 제조한 총 10 μl의 reaction mixture를 0.2 ml PCR용 thinwall tube에 넣어 Williams 등(24)이 제시한 방법에 의해 수행하였다. PCR 증폭조건은 94°C에서 30초간 denaturation과 36°C에서 60초간 annealing, 72°C에서 90초간 extension의 단계를 거치는 조건으로 45 cycle 반복실행하였으며, 처음 denaturation 시간은 94°C에서 2분간, 마지막 extension시간은 72°C에서 5분간 연장시킨 후 4°C에 자동 저장되는 프로그램에 의해 수행하였다. PCR 산물은 TBE buffer에서 1.6% agarose gel을 이용하여 2시간 정도 전기영동으로 전개하였고 0.5 μg/ml의 ethidium bromide에서 40분 동안 염색하고 1 M의 MgCl₂에서 1시간 수세한 후 UV transilluminator에서 667 Polaroid film을 이용하여 사진을 찍었다. PCR 산물의 분자량은 1 kb DNA ladder(GIBCO BRL)를 이용하여 추정하였다.

RAPD 분석. PCR을 이용하여 얻은 RAPD의 data를 분석하기 위해 전기영동상의 band 유무(1 또는 0)에 따른 binomial data matrix를 NTSYS-pc, version 1.80을 이용하여 분석하였다(20). Jaccard s formula에 따라 산출된 유사계수의 값을 토대로 UPGMA clustering program에 의해 dendrogram을 작성하였다(22).

결과 및 고찰

감귤 잿빛곰팡이병균의 살균제저항성. 공시한 48 균주들의 균사생장 최소억제농도(MIC)를 조사하였을 때 benzimidazole계 살균제(benomyl과 thiophanate-methyl)와 N-phenylcarbamate계 살균제(diethofencarb)에 대해서는 MIC가 1,000 μg/ml까지 가장 높은 저항성 수준을 나타내었으며, 다음으로 항생제인 polyoxin B에 대해서는 MIC가 10~100 μg/ml 범위였으며, dicarboximide계 살균제(procymidone, vinclozolin 및 iprodione)와 N-phenylcarbamate계 살균제와 benzimidazole계 살균제의 합제인 diethofencarb+carbendazim에 대해서는 MIC가 0~10 μg/ml 범위에 속하는 것으로 조사되었다(Table 2).

특히 대표적인 tubulin 생합성 저해제인 benzimidazole계통의 benomyl과 thiophanate-methyl에 대한 저항성균주의 비율은 각각 72.9%와 81.3%였고 MIC가 1,000

Table 2. Fungicide resistance of 48 *Botrytis cinerea* isolates to 8 fungicides used for control of gray mold of citrus

Fungicides tested	Percentage of isolates				
	MIC ^a (μg/ml)				
	0~1	1~10	10~100	100~1,000	1,000~
Benomyl	20.8	6.3	0	0	72.9
Thiophanate-methyl	14.6	4.2	8.3	0	72.9
Diethofencarb	52.1	14.6	0	6.3	27.1
Procymidone	37.5	62.5	0	0	0
Vinclozolin	33.3	66.7	0	0	0
Iprodione	33.3	62.5	4.2	0	0
Diethofencarb+ Carbendazim	79.2	18.8	2.1	0	0
Polyoxin B	0	0	62.5	37.5	0

^aMinimum inhibitory concentration.

μg/ml 이상인 고도저항성균주의 비율이 모두 72.9%를 차지하고 있는 것으로 조사되었다. 우리나라에서 잿빛곰팡이병균에 대한 살균제저항성은 1984년에 백(3)에 의해 benzimidazole계 살균제에 대한 저항성 균주의 비율이 6.3%인 것으로 처음 보고되었으나 박 등(17)은 1991년 benzimidazole계 살균제에 대해 저항성인 딸기잿빛곰팡이균 균주의 비율이 73.2%에 이르는 것으로 보고한 바 있는데, 감귤에서도 유사하게 benzimidazole계통의 살균제에 대한 잿빛곰팡이균 저항성균주의 발생이 심각한 수준에 이르고 있는 것으로 확인되었다.

또한 benzimidazole계통의 살균제와 역상관 교차저항성(negative cross resistance)을 나타내는 것으로 보고(4, 8, 9, 16)된 N-phenylcarbamate계통의 diethofencarb에 대한 저항성균주의 비율은 33.3%였고 MIC가 1,000 μg/ml 이상인 고도저항성균주의 비율이 27.1%를 차지하고 있는 것으로 조사되어 N-phenylcarbamate계통의 살균제도 benzimidazole계통의 살균제와 마찬가지로 살균제저항성이 심각함을 알 수 있었다. 본 실험에서도 benzimidazole계 살균제인 benomyl과 thiophanate-methyl에 대해 MIC가 1,000 μg/ml인 균주들은 N-phenylcarbamate계 살균제인 diethofencarb에 대해서는 대부분 감수성을 나타내었으며, diethofencarb에 대해서 MIC가 1,000 μg/ml인 균주들은 benomyl과 thiophanate-methyl에 대해 대부분 감수성을 나타내어 두 계통의 살균제에 대한 역상관 교차저항성을 뚜렷하게 관찰할 수 있었다(Table 3).

한편 benzimidazole계통의 살균제와 N-phenylcarbamate계통의 살균제에 대한 역상관 교차저항성을 이용한 잿빛곰팡이병 방제 약제인 diethofencarb+carbendazim에 대해서는 수집 균주중에서 1균주만이 10 μg/ml에서 중도저항성을 나타내었을 뿐 고도저항성을 나타내는 균주는 발견되지 않아 현재까지는 두 계통 살균제

Table 3. Levels of resistance of selected 24 isolates of *Botrytis cinerea* to 8 fungicides used for control of gray mold of citrus

Code	Isolate	Resistance levels ^a							
		B ^b	T	D	Pr	V	I	DC	Po
1	C01	+++	+++	-	±	±	±	-	++
2	C07	+++	+++	-	±	±	±	-	+
3	C04	+++	+++	±	±	±	±	-	++
4	C14	-	+	+++	±	±	±	-	++
5	C16	-	-	+++	±	±	±	-	+
6	C12	+++	+++	±	±	±	±	±	++
7	C10	+++	+++	+	±	±	±	-	++
8	D01	-	+	+++	±	±	+	-	+
9	D05	+++	+++	-	±	±	±	-	+
10	D07	±	-	+++	-	-	±	-	+
11	D13	+++	+++	-	±	±	-	-	+
12	D10	-	-	+++	-	-	-	-	+
13	D12	-	-	+++	-	-	-	-	+
14	D03	±	±	+++	-	-	+	-	+
15	D15	+++	+++	-	±	±	-	-	++
16	D17	+++	+++	±	±	±	±	-	+
17	D21	±	-	+++	-	-	±	-	+
18	D24	+++	+++	-	-	-	-	-	+
19	A03	+++	+++	-	±	±	±	-	+
20	B02	+++	+++	-	±	±	±	-	+
21	B03	+++	+++	-	±	±	±	±	+
22	B01	+++	+++	-	±	±	±	±	+
23	A01	+++	+++	-	±	±	±	±	+
24	A02	+++	+++	-	±	±	±	±	+

^a-, 0~1 µg/ml, ±; 1~10 µg/ml, +; 10~100 µg/ml, ++; 100~1,000 µg/ml, and +++; over 1,000 µg/ml of minimum inhibitory concentration, respectively. ^bB: Benomyl, T: Thiophanate-methyl, D: Diethofencarb, Pr: Procymidone, V: Vinclozolin, I: Iprodione, DC: Diethofencarb+Carbendazim, Po: Polyoxin B.

의 합제가 감귤 잿빛곰팡이병의 방제에 효율적으로 이용할 수 있는 형태임을 시사해 주고 있다. 그러나 이러한 역상관 교차저항성을 이용한 방제약제를 먼저 사용하기 시작한 나라에서는 다중 저항성(multiple resistance)균의 출현이 보고되었다(5, 7, 10, 11, 18). 본 실험에서도 C10 균주의 경우는 benomyl과 thiophanate-methyl에 대해 MIC가 1,000 µg/ml로 고도저항성을 나타냄과 동시에 diethofencarb에 대해서도 MIC가 10 µg/ml 이상의 중도저항성을 나타내었고, diethofencarb에 대해 MIC가 1,000 µg/ml 이상의 고도저항성을 나타내는 C14과 D01 균주는 benomyl에 대해서는 감수성을 나타내었으나 thiophanate-methyl에 대해 MIC가 10 µg/ml 이상의 중도저항성을 나타내었다. 이러한 사실은 감귤 과수원에 분포하는 잿빛곰팡이병균 균주들에서도 benzimidazole계 살균제와 *N*-phenylcarbamate계 살균제에 대해 동시에 저항성을 지닌 다중 저항성균의 출현을 의미한다. 따라서 아직까지는 benzimidazole계 살균제와 *N*-phenylcarbamate계 살균제 모두에 저항성을 나타내는 다중 저항성균의 발생이 심각한 수준에 이른 것은 아니지만 다중 저항성균에 대한 장기적인 대책이 필요하다.

Dicarboximide계 살균제들 중에서는 procymidone과 vinclozolin에 대해서는 약제저항성균이 전혀 검출되지 않았고, iprodione에 대한 저항성균이 2균주(4.2%) 검출되었다(Table 2). 이러한 사실은 채소포장에서 1986년 김 등(12)에 의해 dicarboximide계 살균제 저항성균주의 비율이 32.0%라고 한 보고와 1994~1996년 동안 34.9~49.7%의 저항성균을 분리한 김(11)의 결과와는 달리 감귤에서는 dicarboximide계 살균제에 대한 저항성균의 발생수준이 경미함을 나타낸다. 한편 공시한 잿빛곰팡이병균 균주들 중 iprodione에 대한 저항성인 2균주를 제외한 균주들은 모두 세 가지 dicarboximide계 살균제들에 대해 동일한 저항성 반응을 보였다. 이와 같은 현상은 benzimidazole계 살균제인 benomyl과 thiophanate-methyl에 대해서도 관찰되었는데, 같은 계통의 약제에 대한 교차저항성은 이미 보고된 바 있다(6, 11, 19, 25).

한편, 항생제인 polyoxin B에 대해서는 감수성인 균주가 전혀 검출되지 않았고 모든 균주의 MIC가 10~100 µg/ml 범위에 속하는 것으로 밝혀져 앞으로 polyoxin B의 이용에도 한계가 있을 것으로 전망된다. 따라서 감귤 잿빛곰팡이병을 효율적으로 방제하기 위해서는 약제의 종류에 따른 저항성균의 발생 수준과 년차별 발생추

Table 4. Nucleotide sequence of the 8 primers used for RAPD analysis, with total number of amplified DNA fragments and size of polymorphic DNA fragments produced by each primer

Code	Nucleotide sequence (5' to 3')	No. of amplified fragments	Size of fragments (bp)	Remark
OPA-03	AGT CAG CCA C	5	560~1,450	Operon Tch. Inc.
OPA-13	CAG CAC CCA C	6	495~2,750	Operon Tch. Inc.
A-06	GCC AGC TGT ACG	12	600~5,000	Wako Co.
A-10	ACT GGC CGA GGG	9	650~2,100	Wako Co.
A-32	TTG CCG GGA CCA	5	490~1,900	Wako Co.
A-44	GAC GGT TCA AGC	8	700~3,450	Wako Co.
C-22	GGT CAC CGA TCC	12	550~11,200	Wako Co.
C-92	AGG CAC CCT TCG	12	490~2,850	Wako Co.
Total		69		

이를 약제 선택에 고려해야 함을 시사한다.

감굴 잣빛곰팡이병균의 유전적 다양성. 감굴 잣빛곰팡이병균 genomic DNA의 RAPD 분석에 공시한 primer들 중에서 DNA절편이 가장 뚜렷하고 재현성이 강한 RAPD pattern을 나타내는 대표적인 8개의 primer를 RAPD profile 분석에 사용하였다. DNA template, primer, dNTP 등의 농도는 명확한 band pattern을 나타내도록 초기실험을 통하여 조정하였으며, 모든 실험은 최소 2회 반복실험을 실시하여 감굴 잣빛곰팡이병균의 유전적 다양성을 분석한 결과 공시한 primer들은 모두 감굴 잣빛곰팡이병균 균주들을 분류하는데 유용한 poly-

morphism을 나타내었다. 8개 primer에 의해 생성된 fragment는 각 primer당 5~12개의 genomic DNA fragment를 형성하여 총 69개의 genomic DNA fragment를 형성하였는데, 증폭된 genomic DNA fragment의 크기는 약 0.5~11 kb였다(Table 4). 공시한 primer에 대한 감굴 잣빛곰팡이병균 24개 균주들의 genomic DNA의 RAPD pattern은 Fig. 1과 같다.

모든 균주들의 전기영동에서 band 유무에 따라 NTSYS-pc의 UPGMA program을 이용하여 dendrogram을 작성하였다(Fig. 2). 그 결과 감굴 잣빛곰팡이병균 24균주들 모두 다양한 유전적 분화를 나타내었다. 이러한

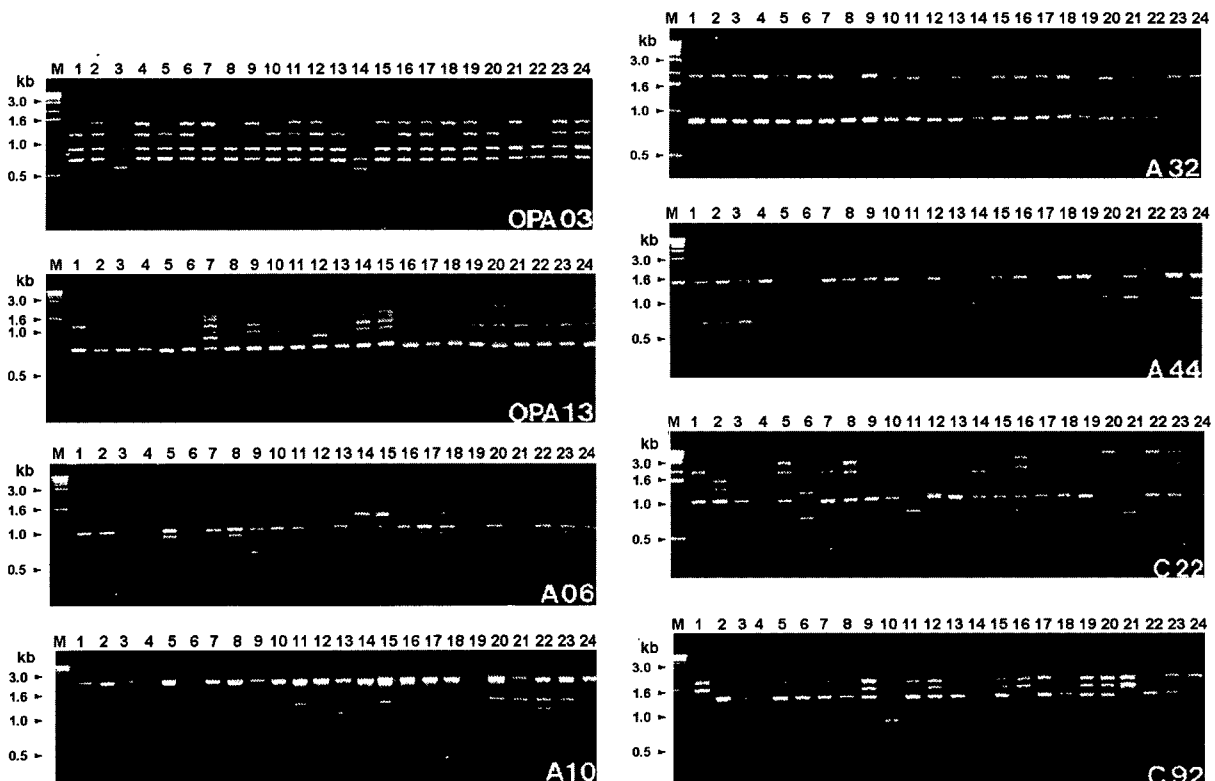


Fig. 1. Random amplified DNA polymorphisms of the selected 24 isolates of *Botrytis cinerea* generated by 8 random primers. Lanes marked 1 to 24 are isolates listed in Table 3. M indicates molecular marker of 1 kb DNA ladder.

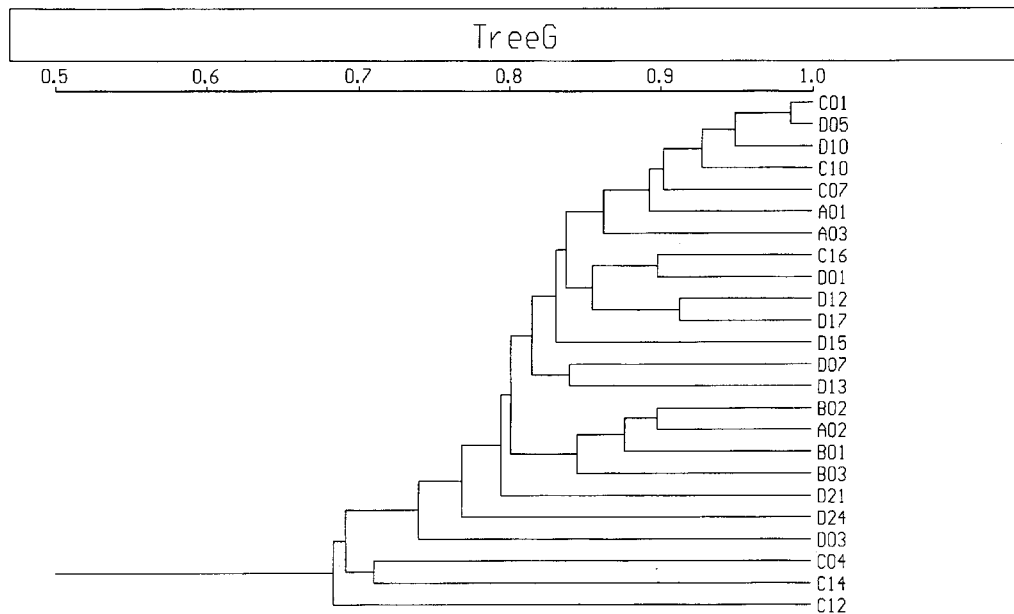


Fig. 2. UPGMA dendrogram derived from the RAPD profiles of genomic DNA of the selected 24 isolates of *Botrytis cinerea*.

genomic DNA의 RAPD profile은 비록 제주도라는 작은 지역내에서도 감귤 잿빛곰팡이병균 균주들에서 유전적 분화가 다양하게 발생하고 있음을 나타낸다. Van der Vlugt-Bergmans 등(23)은 RAPD를 이용하여 잿빛곰팡이병균의 DNA polymorphism을 조사하였고, Keressies 등(13)도 유리 온실 내외부에서 잿빛곰팡이병균을 채집하여 RAPD를 분석한 결과 유전적인 다양성을 관찰하였으나 병원성이나 채집 시간 및 장소와의 연관성을 찾을 수 없었다.

잿빛곰팡이병균의 살균제저항성은 각 약제의 작용기작에 따라 다르지만 저항성균과의 군사용합이나 저항성균의 배양여액에 의해 유기됨이 보고되었다(1,2). 이러한 살균제저항성 기작을 구명하는 것은 효율적인 잿빛곰팡이병 방제에 필수적인데, 본 실험에서 감귤 잿빛곰팡이병균의 살균제저항성 정도와 RAPD 사이에는 일정한 연관성을 찾을 수는 없었다. 이것은 random primer를 사용했기 때문에 나타나는 한계로 추정되며 살균제저항성과의 연관성을 찾기 위해서는 RAPD를 보완할 수 있는 RFLP 등 다른 marker의 활용을 검토할 수 있다. 최근에 Koenraadt와 Jones(14)는 allele-specific oligonucleotide probe를 이용하여 *Venturia inaequalis* 균주들의 benomyl 저항성 균주들의 특성을 효율적으로 조사한 바 있다.

본 실험에서 얻은 다양한 RAPD pattern과 살균제저항성 수준은 감귤 잿빛곰팡이병균의 집단내에 존재하는 유전적 다양성을 나타내어 감귤 잿빛곰팡이병에 대한 저항성 품종의 육성이나 신규 살균제 개발 연구에서 감귤 잿빛곰팡이병균의 유전적 변이를 충분히 고려해야 소기의 성과를 얻을 수 있음을 시사해준다.

요 약

감귤 잿빛곰팡이병균 48균주에 대한 살균제저항성을 조사하고 유전적 다양성을 random amplified polymorphic DNA(RAPD)을 이용하여 분석하였다. Benzimidazole계 살균제인 benomyl과 thiophanate-methyl 및 *N*-phenylcarbamate계 살균제인 diethofencarb에 대한 잿빛곰팡이균 저항성균주의 발생이 심각한 수준에 이르고 있는 것으로 확인되었다. 또한 benzimidazole계통의 살균제와 *N*-phenylcarbamate계통의 살균제에 대한 역상관 교차저항성을 뚜렷하게 관찰할 수 있었으며, 두 계통의 살균제에 대해 동시에 저항성을 지닌 다중 저항성균이 관찰되었다. Dicarboximide계 살균제인 procymidone, vinclozolin 및 iprodione 사이에서는 benzimidazole계 살균제인 benomyl과 thiophanate-methyl 사이에서처럼 교차저항성이 관찰되었으며 가장 저항성 수준이 낮은 것으로 확인되었으나, 항생제인 polyoxin B에서는 감수성인 균주가 검출되지 않았다. RAPD profile과 살균제저항성 수준 사이에는 상관이 없었으나, 감귤 잿빛곰팡이병균 균주들은 다양한 RAPD profile을 나타내어 제주도에 분포하는 감귤 잿빛곰팡이병균 집단에서 다양한 유전적 분화가 발생했음을 시사해주었다.

감사의 글

이 논문은 1995년도 교육부 학술연구조성비(농업과학: 농-95-23)에 의하여 연구되었음.

참고문헌

1. Akutsu, K., Irino, T., Kubo, A., Okuyama, S. and Hibi, T. 1988. Induction of dicarboximide fungicide-resistance with filtrates of the resistant strains of *Botrytis cinerea*. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 54: 593-599.
2. Akutsu, K., Irino, T., Tskamoto, T. and Okuyama, S. 1987. Relationship between development of benomyl-resistance strains and hyphal fusion in *Botrytis cinerea*. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 53: 495-506.
3. 백수봉. 1984. 잣빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*)의 약제 내성에 관한 연구. 농자원개발연구소 농자원개발논집 9: 35-44.
4. Elad, Y., Shabi E. and Katan, T. 1988. Negative cross resistance between benzimidazole and *N*-phenylcarbamate fungicides and control of *Botrytis cinerea* on grapes. *Plant Pathol.* 37: 141-147.
5. Elad, Y., Yunis, H. and Katan, T. 1992. Multiple Fungicide resistance to benzimidazoles, dicarboximides and diethofencarb in field isolates of *Botrytis cinerea* in Israel. *Plant Pathol.* 41: 41-46.
6. El-Goorani, M. A., El-Kasheir, H. M., Kabeel, M. T. and Shoeib, A. A. 1984. Resistance to benzimidazole fungicides of *Penicillium italicum* and *P. digitatum* isolated from packinghouses and orchards in Egypt. *Plant Dis.* 68: 100-102.
7. Faretra, F., Pollastro, S. and Di Tonno, A. P. 1989. New natural variants of *Botrytinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) coupling benzimidazole-resistance to insensitivity toward the *N*-phenylcarbamate diethofencarb. *Phytopathol. Medit.* 28: 98-104.
8. Fujimura, M. 1993. A new fungicide diethofencarb to cope with benzimidazole resistance. *Jpn. Plant Prot.* 47: 26-29
9. Josepovits, G., Gasztonyi, M. and Mikite, G. 1992. Negative cross-resistance to *N*-phenylanilines in benzimidazole-resistant strains of *Botrytis cinerea*, *Venturia nashicola* and *Venturia inaequalis*. *Pestic. Sci.* 35: 237-242.
10. Katan, T., Elad, Y. and Yunis, H. 1989. Resistance to diethofencarb (NPC) in benomyl-resistant field isolates of *Botrytis cinerea*. *Plant Pathol.* 38: 86-92.
11. 김병섭. 1997. 잣빛곰팡이병균의 살균제 저항성 및 생리생태적 다양성. 서울대학교. 박사학위논문. 147p.
12. 김동길. 1986. 채소류 잣빛곰팡이병의 약제 내성을 조사하여 방제의 기초 자료 이용. 영남작물시험장 시험연구보고서(수도연구, 식물환경연구). pp. 527-529.
13. Keressies, A., Bosker-van Zessen, A. I., Wagemakers, C. A. M. and van Kan, J. A. L. 1997. Variation in pathogenicity and DNA polymorphism among *Botrytis cinerea* isolates sampled inside and outside a glasshouse. *Plant Dis.* 81: 781-786.
14. Koenraadt, H. and Jones, A. L. 1992. The use of allele-specific oligonucleotide probes to characterize resistance to benomyl in field strains of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 82: 1354-1358.
15. 고영진, 송장훈, 권혁모, 문덕영, 문두길, 한해룡. 1996. 우리나라 감귤 주요 병의 최근 발생 동향. *한식병지* 12(4): 466-470.
16. Nathaniels, N. Q. R., Wilson, K. and Fletcher, J. T. 1985. Negative cross-resistance between benomyl and MDPC in British isolates of *Botrytis cinerea*, *Pseudocercospora herpotrichoides* and *Verticillium fungicola* var. *fungicola*. *Ann. Appl. Biol.* 107: 151-154.
17. 박인철, 예완해, 김충희. 1992. Procymidone, vinclozolin, benomyl에 저항성인 딸기 잣빛곰팡이병균의 발생. *한식병지* 8: 41-46.
18. Pollastro, S. and Faretra, F. 1992. Genetic characterization of *Botrytinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) field isolates coupling high resistance to benzimidazoles to insensitivity toward the *N*-phenylcarbamate diethofencarb. *Phytopathol. Medit.* 31: 148-153.
19. Pommer, E. and Lorenz, G. 1995. Dicarboximide fungicides. In: *Modern Selective fungicides-Properties, applications, mechanisms of action*, ed. by Lyr, H., pp. 99-118. Gustav Fisher Verlag, New York, USA.
20. Rohlf, F. J. 1993. *NTSYS-pc, numerical taxonomy and multivariate analysis system*. State Univ. of New York, Stony Brook.
21. Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
22. Sneath, P. H. A. and Sokal, R. R. 1973. *Numerical Taxonomy*. Freeman. San Francisco. 573pp.
23. Van der Vlugt-Bergmans, C. J. B., Brandwagt, B. F., van't 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.
24. Williams, J. B. K., Kublelick, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
25. 유승현, 김홍기, 노태홍, 우인식, 인무성. 1990. 시설 원예 잣빛곰팡이병 약제내성균의 발생과 방제에 관한 연구. *농시논문집* 33: 141-151.

(Received December 5, 1998)