

사과 겹무늬썩음병균(*Botryosphaeria dothidea*)의 Benomyl에 대한 저항성

이창은 · 박석희

영남대학교 농축산대학 원예학과

Resistance of *Botryosphaeria dothidea* to Benomyl

Chang-Un Lee and Seok-Hee Park

Department of Horticulture, College of Agriculture and Animal Science
Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea

ABSTRACT: Since around 1980 apple rot caused by *Botryosphaeria dothidea* has become prevalent throughout the growing areas in Korea, during which period chemical controls have been executed with no notable improvement. Results of investigations on resistance of the causal fungus to its control chemical are as followings; The susceptible fungal isolates showed no mycelial growth at 150 µg/ml of benomyl whereas the resistant isolates showed 7-13 mm growth at 300 µg/ml and 6-8 mm at 2,400 µg/ml of this fungicide. At the latter high concentration, spore germination of the resistant isolates was 5-9% while that of the susceptible isolates was 0%. Within the range of 20-2,400 µg/ml tested, the susceptible isolates were unable to form pycnidia, but the resistant isolates formed abundant pycnidia at the lower concentration with decreasing pycnidia along with the higher concentration.

KEYWORDS: *Botryosphaeria dothidea*, benomyl, resistance

대구지방에서 사과겹무늬썩음병의 발생을 1977년에 이준탁(1977)이 처음으로 보고한 이래, 해를 거듭함에 따라 그 발생이 전국의 사과 재배지역으로 확산되고 그 피해도 점점 더 심하여졌다. 1979-1980년에 김성봉 등(1979, 1980)이 본병의 방제를 위하여 실시한 약제시험 결과 benomyl의 효과가 있다고 하였으며 그후 다른 연구자들도 같은 결과를 보고하였다(김승철 등, 1981; 윤재탁 등, 1982). 이두형 등(1985)은 1985년에 본 약제의 효과가 높다고 하였으며, 1992년에도 김기홍 등(1992)에 의하여 그 효과가 있는 것이 보고되었다. 그러나 본 살균제를 포함한 benzimidazole계 살균제에 대한 *Penicillium expansum* 균 및 *Botrytis cinerea* 균의 저항성 발생이 국내외에서 보고되고(Wicks, 1977; Burton, 1981; Rosenburger, 1991; 박인철 등, 1992; 김병섭 등,

1993) 근년에 필자가 실시한 *Botryosphaeria dothidea*에 대한 살균제의 효과에 관한 시험에서도 본 병원균에 대한 benomyl의 억제효과가 저하함을 확인하였다(이창은 등, 1992). 이것은 그 동안 사과겹무늬썩음병 방제용으로 계속하여 사용하여 온 본 약제에 대하여 병원균의 저항성이 발생하였기 때문으로 생각된다. 따라서 본 연구에서는 benomyl에 대한 저항성균의 발생여부와 저항성정도를 조사함으로써 저항성균에 대한 대책과 합리적인 농약수급을 위한 기초자료를 얻기 위하여 실시하였다.

材料 및 方法

병원균

본 시험에서 사용한 사과겹무늬썩음병균(*Botryosphaeria dothidea*)은 1993년에 우리나라의 주요 사과

*Corresponding author

산지인 대구, 예산, 정읍, 충주 등지에서 저장중인 이병과를 수집하여 분리하였으며, potato sucrose agar(PSA) 배지에 접종하여 27°C 에서 배양한 후 병원성 검정을 마친 균주를 4°C 에서 보관하면서 필요시 증식하여 사용하였다.

사용 살균제

사과검무늬썩음병 방제용으로 오랫동안 사용해 온 benomyl(Active ingredient: Methyl-1-(butyl carbamoyl)-2-benzimidazole-carbamate WP50)을 공시하여 병원균의 저항성을 조사하였다.

Benomyl 저항성 균주의 분리

Benomyl에 저항성인 균주의 분리는 0-10,000 a.i. µg/ml까지 9수준의 농도로 benomyl을 첨가한 PSA를 Petri dish에 분주하여 굳힌 후 상기 4지역에서 분리하여 미리 배양한 병원균의 균총에서 직경 4 mm의 cork borer로 찍어 낸 함균한천원판을 접종하여 7일간 배양한 다음 균사생장 여부를 조사하여 저항성균주와 감수성균주를 선별하였다.

Benomyl 저항성 균주의 저항성 정도

균사 생장 저항성 : PSA에 benomyl을 각각 0-3,000 a.i.µg/ml 농도로 첨가하고, 직경 9 cm Petri dish에 분주하여 굳힌 후 선별된 저항성균주의 함균한천원판을 균총면이 배지면에 닿도록 접종하여 7일간 배양한 후 균사생장을 조사하여 살균제에 대한 저항성 정도를 조사하였다.

포자 발아 저항성 : 포자발아 저항성 조사는 저항성균주와 감수성균주를 각각 배지에 접종하여 21일간 배양한 후 형성된 병자각을 분리하여 slide glass 상에서 마쇄하여 병포자를 모았다. 병포자의 현탁액을 2.0×10³ spore/ml의 농도로 희석하여 0-3,000 a.i.µg/ml의 살균제를 가한 PSA 배지상에서 0.2 ml 씩 점적하여 퍼뜨린 것을 16-24시간 배양하면서 발아율을 조사하였다. 이때 발아관의 길이가 포자폭의 2배 이상인 것을 발아한 것으로 간주하였으며 처리당 450개의 포자를 관찰, 조사하였다.

포자 형성 저항성 : 포자형성의 저항성 조사는 균사생장의 저항성 조사를 마친 후 14일간 더 배양하여 균총 내부의 기중균사 밑에 형성된 병자각의 수를 조사하였다.

Minimum Inhibitory Concentration(MIC)과 50% Effective Concentration(EC₅₀) : Benomyl을 0-3,000 a.i.µg/ml까지 12 수준의 농도로 PSA에 가하여 혼합한 다음 저항성 균주의 균총으로부터 찍어 낸 함균한천원판을 각 농도의 배지에 접종하여 7일간 배양한 후 균사직경을 측정하여 EC₅₀과 MIC 값을 구하였다. 이때 대조구는 감수성균주를 사용하였다.

結果 및 考察

각 지역별로 수집한 부패과에서 병원균의 분리

우리나라의 주요 사과산지인 대구, 예산, 정읍, 충주에서 1993년에 총 485개의 부패과를 수집하여 병원균을 분리한 결과(Fig. 1), 대구에서는 검무늬썩음병균이 45%로서 균핵병균 19%와 탄저병균 14%인 것에 비하여 다른 병원균보다 비교적 높은 비율을 차지하였다. 예산에서 수집한 부패과에서는 검무늬썩음병균이 28%, 균핵병균이 25%로 이들 두 병원균이 총 부패과의 53%를 차지하였고, 정읍에서는 검무늬썩음병균이 33%에 달했으며, 균핵병균이 23%로 나타났다. 또한 충주에서 수집한 부패과에서는 검무늬썩음병균이 25%, 균핵병균이 15%로 나타나 이들 두 병원균의 비율이 타 지역보다 낮은 경향이었으나, 이차 감염으로 생각되는 *Alternaria*

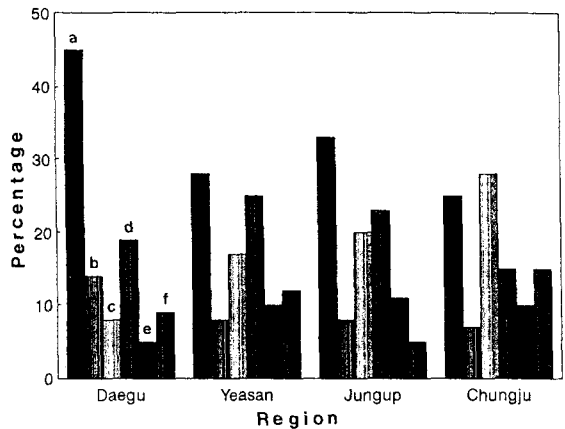


Fig. 1. Percentage of fungi isolated from rotten apples collected in four regions in 1993. a: *Botryosphaeria dothidea*, b: *Glomerella cingulata*, c: *Alternaria* sp., d: *Sclerotinia* sp., e: *Penicillium* sp., f: Others

sp.가 28%로 높은 비율을 차지하였다. *Alternaria* sp.는 각 지역에서 8-28%로 지역별 이병과 비율이 달랐으며, *Penicillium* sp.에 의한 부패과의 비율은 5-11%로 낮았다. 또한 탄저병균의 분리비율은 지역별로 7-14%였으며, 그 밖의 균주는 5-15%였다. 이상과 같이 각종 병원균에 의한 피해 가운데 검무늬썩음병균에 의한 피해가 지역별로 25-45% 정도로 가장 큰데, 이는 1980년경부터 본 병의 방제를 위해 살균제를 해마다 집중적으로 사용하여 온 것을 생각하면 본 병원균의 생육 및 번식을 억제할수 있는 탁월한 유효약제가 처음부터 없었거나, 있어도 현재는 균의 저항성이 발생하여 그 효과가 저하하였기 때문인 것으로 생각된다(김성봉 등, 1979; 윤재탁 등 1982; 김기홍 등, 1992).

Benomyl 저항성 균주의 분리

각 지역에서 분리한 *Botryosphaeria dothidea* 균

Table 1. Percentage of growth of *Botryosphaeria dothidea* isolates collected from Deagu, Yeasan, Jungup and Chungju incubated on PSA media contained with various concentration of benomyl for 7 days at 27°C

Region	Concentration(a.i.µg/ml)						
	0	20	200	500	1000	1500	3000
Daegu	100	87	43	13	5	3	0
Yeasan	100	85	22	9	1	1	0
Jungup	100	92	38	12	12	3	0
Chungju	100	89	52	20	3	1	0

주의 함균한천원판을 benomyl 0-3,000 a.i.µg/ml이 함유된 PSA 배지에 접종하여 7일간 배양한 후, 각 농도에서 균사생장을 조사한 결과, 권장농도(325 a.i.µg/ml)보다 높은 500 a.i.µg/ml에서는 대구에서 분리한 균주가 13% 정도의 생존율을 보였고, 예산 및 정읍 분리균주에서는 각각 9, 12%로 나타났으며, 충주에서 분리한 균주에서는 20%로서 비교적 저항성 정도가 높았다(Table 1). 권장농도의 약 3배인 1,000 a.i.µg/ml에서는 대구 분리균주는 5%의 균사생존율을 보였고, 정읍 분리균주에서는 12%로서 저항성 정도가 네 지역중에서 가장 높았다. 권장농도의 4배 이상인 1,500 a.i.µg/ml에서도 대구와 정읍에서의 균사생존율이 각각 3%로 나타나 비교적 저항성 정도가 높았으며, 예산과 충주에서도 각각 1%의 균사생존율을 보였다. 3,000 a.i.µg/ml의 농도에서는 네 지역의 모든 균주가 생장하지 못하였다. 이와같이 각 지역에서 수집한 균주를 mass transfer 하여 낮은 농도에서도 균사생장이 작거나, 생장하지 못한 것을 감수성균주, 권장농도보다 4배 이상의 농도에서도 생장한 균주를 저항성균주로 분리하였다. 본 병방제의 주요살균제의 하나인 benomyl에 대한 본 병원균의 저항성 발생은 예상한 바와 같으며, 그 저항성의 성격을 균의 생활환과 관련하여 균사생장, 포자형성 및 포자발아별로 구명하면 병의 방제방법 및 그 시기를 결정하기 위한 기초자료가 될 것이다.

Benomyl 저항성 균주의 생육단계별 특성

균사생장 저항성 : Table 1의 결과로부터 beno-

Table 2. Mycelia growth (mm) of benomyl-sensitive and resistant isolates of *Botryosphaeria dothidea* incubated on PSA media contained with various concentration of benomyl for 7 days at 27°C

Concentration (a.i.µg/ml)	Benomyl-sensitive isolates			Benomyl-resistant isolates				
	BS ₁	BS ₂	BS ₃	BR ₁	BR ₂	BR ₃	BR ₄	BR ₅
20	8 ^a	8	7	18	19	20	16	12
150	0	0	0	15	17	17	10	11
300	0	0	0	13	13	12	9	7
600	0	0	0	10	11	9	7	7
1,200	0	0	0	10	9	7	5	5
2,400	0	0	0	8	7	6	0	0

^aDiameter of colonies(mm) was average of three replicates.

myl에 감수성인 균주 3, 저항성인 균주 5 균주를 선발하여 균사생장에 대한 저항성을 조사해 본 결과 (Table 2), 감수성균주인 BS₁, BS₂, BS₃는 20 a.i.µg/ml에서 각각 8, 8, 7 mm의 균사생장을 보여 그 생장은 극히 미약하였고, 그 이상의 농도에서는 전혀 자라지 못하였다. 이와는 대조적으로 저항성으로 선발한 균주중에서 BR₁, BR₂, BR₃는 20 a.i.µg/ml의 농도에서 각각 18, 19, 20 mm로 감수성 균주에 비하여 균사생장이 왕성하였고, 권장농도의 약 7배 정도인 2,400 a.i.µg/ml에서도 6-8 mm의 생장을 보여 benomyl에 고도의 저항성을 나타내었다. 저항성균주중 BR₄, BR₅는 1,200 a.i.µg/ml에서 5-7 mm의 균사생장을 보여 BR₁, BR₂, BR₃ 균주보다는 정도가 낮았으나 비교적 높은 저항성을 보였다. 감수성 균주는 권장농도보다 훨씬 낮은 농도에서도 균의 생장이 억제되었는데 반하여, 저항성균주는 권장농도의 몇배나 되는 고농도에서도 생장이 억제되지 않았다. 이는 농가과수원에 이러한 저항성균이 만연하고 있으므로 본 약제살포로서는 사과과실내로 침입하는 균사생장을 저지할 수 없고 따라서 병반의 확대가 저지되지 않아서 병이 계속하여 발생하고 있을 가능성이 높다고 생각된다(이창은 등, 1992).

포자발아 저항성 : 포자발아는 20 a.i.µg/ml에서 감수성균주가 90-95% 정도의 발아율을 나타내어 균사생장과는 대조적이었고, 저항성균주 역시 92-98%의 높은 발아율을 보여 benomyl의 저농도에서는 차이가 없었다. Benomyl 농도가 증가함에 따라 감수성균주와 저항성균주간의 포자발아는 약간씩

차이를 내어 600 a.i.µg/ml에서는 감수성균주의 포자발아율이 29-35%, 저항성균주는 35-48%의 포자발아율을 보였다(Table 3). 권장농도의 약 7배 수준인 2,400 a.i.µg/ml에서는 감수성균주는 포자발아가 전혀 되지 않았으나, 저항성균주중 BR₁, BR₂, BR₃는 각각 5, 9, 6%의 포자발아율을 보여 benomyl에 대한 포자발아저항성도 나타났다. 포자발아저항성은 균사생장의 경우와는 달리 감수성균주의 포자발아억제력도 극히 낮으므로 본 약제로서는 과실표면에 부착한 포자가 발아해서 과실에 침입하기 이전에 저지하는 예방적 효과는 기대할 수 없을 것이다. 그리고 본 균의 포자가 발아하여 과실에 침입하기 직전에 부착기를 형성하는지 안하는 지에 대하여서는 현재까지 구명된 바가 없으나, 부착기를 형성하는 경우에는 이를 저지하는 효과에 대하여서도 조사하여야 할 것이다(Sutton and Arauz, 1991).

포자형성 저항성 : 포자형성도 측정은 기증균사 밑에 형성된 병자각의 다소를 조사하였다. 감수성균주는 저농도인 20 a.i.µg/ml에서 균사생장은 되었지만 병자각이 전혀 형성되지 않았고, 저항성균주는 모두 많은 병자각을 형성하였다. 저항성균주중 BR₃, BR₄, BR₅ 균주는 1,200 a.i.µg/ml의 농도에서 소수의 병자각이 보였고, BR₁과 BR₂ 균주는 600 a.i.µg/ml의 농도에서도 많은 병자각을 형성하였다. 이들 중 BR₂, BR₃ 균주는 2,400 a.i.µg/ml에서 균사생장은 되었으나 병자각은 형성되지 않았고, 특히 BR₁ 균주는 같은 농도에서도 병자각이 발견되어 고도의 저항성을 나타내었다(Table 4). 포자형성의 경우에는 균사생장의

Table 3. Spore germination ratio of benomyl-sensitive and resistant isolates of *Botryosphaeria dothidea* incubated on PSA media contained with various concentration of benomyl for 16-24 hr at 27°C

Concentration (a.i.µg/ml)	Benomyl-sensitive isolates			Benomyl-resistant isolates				
	BS ₁	BS ₂	BS ₃	BR ₁	BR ₂	BR ₃	BR ₄	BR ₅
20	95 ^a	93	90	95	98	92	96	95
150	78	82	75	83	85	80	78	81
300	65	67	60	72	75	73	68	70
600	35	29	30	42	48	43	38	35
1,200	7	10	8	13	18	15	9	10
2,400	0	0	0	5	9	6	0	0

^aThe germination percentage was average 450 of pycnidiospores of *Botryosphaeria dothidea* obtained from colony incubated on 21 days at 27°C.

Table 4. Pycnidia formation of benomyl-sensitive and resistant isolates of *Botryosphaeria dothidea* incubated on PSA media contained with various concentration of benomyl for 21 days at 27°C

Concentration (a.i.µg/ml)	Benomyl-sensitive isolates			Benomyl-resistant isolates				
	BS ₁	BS ₂	BS ₃	BR ₁	BR ₂	BR ₃	BR ₄	BR ₅
20	- ^a	-	-	+++	+++	+++	+++	+++
150	.	.	.	+++	+++	+++	+++	+++
300	.	.	.	+++	+++	+++	++	++
600	.	.	.	+++	+++	++	++	+
1,200	.	.	.	++	+	+	+	+
2,400	.	.	.	+	-	-	.	.

^a. No colony grown and no pycnidium, - colony grown but no pycnidia formed, + low amount, ++ medium amount and +++ high amount of pycnidia formation.

Table 5. Minimum inhibitory concentration and effective concentration 50% of benomyl-sensitive and resistant isolates of *Botryosphaeria dothidea* incubated on PSA media contained with benomyl for 7 days at 27°C

Isolates	MIC ^b (a.i.µg/ml)	EC ₅₀ ^c (a.i.µg/ml)	PSA plus Benomyl (50 a.i.µg/ml)
BS ₁	30	0.29	0 ^d
BS ₂	35	0.29	0
BS ₃	28	0.33	0
BR ₁	2,800	12.20	18
BR ₂	2,700	10.80	17
BR ₃	2,800	11.00	17
BR ₄	2,250	9.40	14
BR ₅	2,300	9.80	13

^aBS₁, BS₂ and BS₃ are benomyl sensitive isolates, BR₁, BR₂, BR₃, BR₄ and BR₅ are benomyl resistant isolates.

^bMIC: Minimum Inhibitory Concentration, benomyl concentration required to completely inhibit mycelia growth on PSA media.

^cEC₅₀: Effective Concentration 50%, benomyl concentration required to inhibit mycelia growth on PSA media by fifty percent.

^dDiameter of colonies (mm).

경우와 비슷한 경향을 보여 권장농도보다 극히 더 낮은 농도에서도 감수성균주의 포자형성을 억제할 수 있었으나, 저항성균주의 포자형성은 권장 농도의 수배나 되는 고농도에서도 억제할 수 없었는데, 이는 약제저항성균의 증식과 직결되므로 현재 사과 과수

원에 저항성균이 점점 더 증식하여 만연하고 있는 원인일 수도 있을 것이다(Michailides, 1991).

EC₅₀과 MIC : 상기 4 지역에서 분리한 *Botryosphaeria dothidea*의 선발된 저항성균주의 저항성 정도를 균사생장실험을 통하여 조사해 본 결과(Table 5), 감수성균주인 BS₁, BS₂, BS₃ 세 균주 모두 35 a.i.µg/ml 정도의 낮은 농도에서도 자라지 못한 반면, 저항성균주중 BR₁, BR₂, BR₃ 균주의 EC₅₀ 값은 각각 12.20, 10.80, 11.00 a.i.µg/ml로 비교적 낮았으나, 그들의 MIC는 각각 2,800, 2,700, 2,800 a.i.µg/ml로 저항성 정도는 매우 높았다. BR₄, BR₅ 저항성균주는 EC₅₀ 값이 각각 9.40, 9.80 a.i.µg/ml로 비슷하였고, MIC는 2,250, 2,300 a.i.µg/ml로 감수성균주의 MIC 28-35 a.i.µg/ml보다 매우 높았다. 실내에서 배지를 사용한 이상의 결과는 배지의 성분이 사과와 성분과 다르므로 사과나무의 사과에 접종하여 약제를 처리한 시험결과와는 반드시 일치하지 않을 수도 있을 것이다. 그러므로 본 시험결과를 실제에 응용하기 이전에 야외 과수원에서의 시험결과를 보는 것이 안전할 것으로 생각된다.

摘 要

1980년경부터 *Botryosphaeria dothidea*에 의한 사과검무늬썩음병이 전국적으로 만연하였는데 그 동안 화학적 방제를 하였으나 병해는 감소되지 않고 현재도 그 피해손실이 극심하다. 본 병의 주요 방제제인 benomyl에 대한 본 병원균의 저항성을 조사한

결과는 다음과 같다.

1. 감수성균은 150 µg/ml에서 균사생장을 할 수 없었으나, 저항성균은 300 µg/ml에서 7-13 mm, 2,400 µg/ml에서도 균총직경 6-8 mm의 균사생장을 보였다. 후자의 고농도에서 저항성균은 5-9%의 포자 발아를 보였으나 감수성균은 포자발아가 없었다.

2. 20-2,400 µg/ml의 모든 공시농도에서 감수성균은 병자각을 형성할 수 없었는데 반하여 저항성균은 저농도에서는 많은 병자각을 형성하였으나 약제농도가 높아질수록 적게 형성하였다.

謝 辭

이 논문은 1993년도 영남대학교 학술연구조성비에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

參考文獻

Burton, C. L. and Fillow, A. B. 1981. Patulin in apple infected with benomyl tolerant isolates of *Penicillium expansum*. *Phytopathology* **71**: 207(Abstr.).

Michailides, T. J. 1991. Pathogenicity, distribution, sources of inoculum and infection courts of *Botryosphaeria dothidea* on Pistachio. *Phytopathology* **81**: 566-573.

Park, I. C., Yeh, W. H. and Kim, C. H. 1992. Occurrence of isolates of *Botrytis cinerea* resistant to procymidone, vinclozolin and benomyl in strawberry fields in Korea. *Korea J. Plant Pathol.* **8**(1): 41-46.

Rosenberger, D. A. 1991. Pathogenicity and benzimidazole

resistance in *Penicillium* species recovered from flotation tanks in apple packinghouses. *Plant Dis.* **75**: 712-715.

Sutton, T. B. and Arauz, L. F. 1991. Influence of temperature and moisture on germination of ascospores and conidia of *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Dis.* **75**: 1146-1149.

Wicks, T. 1977. Tolerance to benzimidazole fungicides in blue mold *Penicillium expansum* on pears. *Plant Dis. Rep.* **61**: 447-449.

김병섭, 최경자, 조광연. 1993. Benzimidazole계 및 dicarboximide계 살균제에 저항성인 잭빛곰팡이균의 몇가지 약제에 대한 반응. *한국식물병리학회지* **9**(2): 98-103.

김성봉, 장준택, 이상백, 임업량. 1979. 사과 腐敗病의 發生生態와 防除에 관한시험. *원시시연보과* **1**(13): 90-93.

김성봉, 임명순, 임업량. 1980. 사과 腐敗病의 發生態와 방제에 관한 시험. *원시시연보과* **1**(13): 125-128.

김승철, 조원대. 1981. 사과검무늬병 방제藥劑效果試驗. 농약연 신청시보, 수원, 28-29.

김기홍, 장한익, 이상범, 김현난. 1992. 사과검무늬썩음病 安全 防除法 研究. *과수시시연보* **1**(5): 317-322.

윤재탁, 정기채. 1982. 사과腐敗病 방제效果試驗. 경북 농진원시연보 토양 255-256.

이두형, 조광동, 한만중. 1985. 사과검무늬썩음병의 防除藥劑에 관한 研究. *京畿農業研究* **3**: 205-208.

이준탁. 1977. *Macrophoma*屬 菌에 의한 사과 新病害. 경북대 교육대학원 논문집 **9**: 121-126.

이창은, 김기홍, 박석희. 1992. 사과검무늬썩음병균 *Botryosphaeria dothidea*에 대한 殺菌劑의 效果. 영남대 자원문제연구논문집 **11**(1): 63-68.