

고추에서 분리한 탄저병균의 스테롤 생합성 저해 살균제에 대한 감수성 반응과 포장 적응력

박성우 · 김준태 · 김재정 · 김홍태 *

충북대학교 농과대학 농생물학과 식물진균병학실험실

Sensitivity of *Colletotrichum* spp. Isolated from Red-pepper to Sterol Biosynthesis Inhibiting-Fungicides and Their Field Fitness

Seong Woo Park, Joon Tae Kim, Jae Jung Kim and Heung Tae Kim*

Laboratory of Plant Fungal Disease, Department of Agricultural Biology, College of Agriculture,
Chungbuk National University, Chongju Chungbuk 361-763, Korea

(Received on November 22, 2002)

Among 34 isolates of *Colletotrichum* spp., 20 from red pepper and 14 from apple, only one isolate 2001-45 was identified as the isolate resistant to sterol biosynthesis inhibiting fungicides. EC₅₀ values of the isolate 2001-45 were 153.5, 42.7, 34.0, and 17.1 µg/ml for myclobutanil, tebuconazole, hexaconazole and nuarimol, respectively. The resistance factor of the isolate 2001-45 against the other isolate 2001-44 to 4 above fungicides was ranged from 17 to 57. However, EC₅₀ value of the 2001-45 for prochloraz was 0.07 µg/ml, which was lower than those of the 2001-44 and the isolate JC24. For the fitness test of the 2001-45, mycelial growth, sporulation on PDA and pathogenicity on fruits were investigated. No difference in mycelial growth was found between 2001-45 and 2001-44, but great difference in sporulation. No symptom was developed by 2001-45 even by wound inoculation of pepper fruit. Therefore, this study indicated that the isolate 2001-45 was inferior to the other isolates in the fitness, although the isolate 2001-45 was highly resistant to sterol biosynthesis inhibiting fungicides.

Keywords : fungicide resistance, sterol biosynthesis inhibiting fungicides, *Colletotrichum* sp. field fitness

국내에서 재배되는 고추의 면적은 75,574 ha로 전체 채소 재배면적의 20%이상을 차지하는 가장 대표적인 양념채소이다. 국내에서 고추에 발생하는 병해로는 약 30여종 정도가 보고되어 있는데(한국식물병리학회, 1998), 고추 탄저병은 역병과 함께 고추재배에서 큰 문제가 되는 병으로, 6월 하순 내지 7월에 장마가 시작되면서 주로 과실에 발생하기 시작하여 8월과 9월에 직접적이고 심한 피해를 유발한다. 탄저병을 방제하는 효과적인 방법으로는 살균제를 사용하는 화학적인 방제가 사용되고 있다. 고추 탄저병 방제용 살균제에는 보호 살균제, 스테롤 생합성 저해 살균제(Ergosterol Biosynthesis Inhibiting Fungicide, EBI), benzimidazole계 살균제, β-methoxyacrylate계 살균

제 등이 사용되고 있다. EBI는 식물병원 곰팡이의 스테롤 생합성을 저해하며 균사 생육을 억제한다(Köller, 1992). 특히 낮은 농도로 식물체에 예방 처리하였을 때 방제 효과가 우수할 뿐만 아니라, 높은 치료효과도 있다. 그러나 식물체에 고농도로 처리할 경우에는 식물체가 왜화되는 약해가 나타나기도 한다. 또한 EBI들은 주성분의 화학 구조가 매우 다양함에도 불구하고 병원 곰팡이의 스테롤 생합성을 저해하는 동일한 작용 기작을 보이는 특징을 가지고 있다. 이러한 EBI는 1981년 보리 흰가루병균(Fletcher 와 Wolfe, 1981)에서 처음 저항성균의 출현이 보고된 이후, 오이 흰가루병균(Schepers, 1983), 사과 검은별무늬병균(Stanis와 Jones, 1985), 포도 흰가루병균(Steva 등, 1990), 채소류의 잿빛곰팡이병균(Elad, 1992) 등에서 계속 보고되고 있다. EBI는 국내에서도 이미 다년간 고추 탄저병의 방제를 위해서 사용되어 왔고, 또 최근에 EBI 이외의 살균제가 포장에서 탄저병에 대한 방제 효과가 떨어진다

*Corresponding author
Phone)+82-43-261-2556, FAX)+82-43-271-4414
E-mail)htkim@chungbuk.ac.kr

는 보고가 있기 때문에, 저항성 발현에 대한 조사와 저항성균의 포장에서의 적응력 등에 대한 실험이 필요하다.

본 논문에서는 지난 2001년 9월에서 10월 동안 충북지역의 고추 재배 지역에서 탄저병이 발생한 고추로부터 탄저병균을 분리하여 EBI에 대한 감수성 반응을 조사하였고, EBI에 대하여 저항성을 보이는 탄저병균을 확보하여 포장에서의 적응력을 알아보았다.

재료 및 방법

병원균의 분리. 2001년 충북의 고추 재배 지역에서 탄저병균에 감염된 고추를 채집, 세척 후, 25°C의 습실에 보존하며 포자 형성을 유도하였다. 형성된 탄저병균의 포자를 살균 증류수에 100~200개/ml의 밀도로 혼탁한 후, 300 ppm의 streptomycin을 첨가한 감자 한천 배지(potato dextrose agar medium, PDA)에 0.1 ml/씩 도말하였다. 도말한 배지를 25°C의 암 상태에서 3일간 배양한 후 형성된 균총의 균사 선단 부위를 잘라 새로운 PDA에 이식하였다.

순수 분리된 탄저병균은 PDA 사면 배지에 배양, 4°C에 보관하면서 각종 실험에 사용하였고, 장기간 보관을 위하여 6%의 DMSO 용액에 넣어 -70°C에서 보관하였다.

한천 희석법에 의한 살균제의 균사 생장 억제 실험. 단포자 분리한 고추 탄저병균의 20 균주와 경북대학교에서 분양받은 14개의 사과 탄저병균(*Colletotrichum gloeosporioides*와 *C. acutatum*) 균주를 사용하여 EBI에 대한 감수성 정도를 조사하였다. 탄저병의 방제에 사용되는 EBI(Table 1)를 PDA에 최종농도가 50, 5, 0.5, 0.05 µg/ml가 되도록 배지에 첨가하는 한천희석법으로 살균제의 균사 생장 억제 효과를 조사하였다. 사용한 모든 EBI를 DMSO(demethyl sulfoxide)에 용해하여 멸균된 PDA(potato dextrose agar)에 소정 농도가 되도록 첨가하고, 직경 9 cm의 petri dish에 약 10 ml/씩 분주하였다. 이 때 DMSO의 최종농도는 1%가 되도록 조절하였다. 25°C의 PDA에서 배양한 균총의 선단을 직경 5 mm로 절취하여 살균제가 첨가된 PDA에 균사면이 배지에 닿게 접종하고 25°C에서 5~7일간 배양한 후, 균총의 직경을 측정하였다. 약

Table 1. Sterol biosynthesis inhibiting fungicides used in the experiment

General name	Chemical structure	Chemical name
Myclobutanil		2-p-chlorophenyl-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)hexanenitrile
Tebuconazole		(RS)-1-p-chlorophenyl-4,4-dimethyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)pentan-3-ol
Hexaconazole		(RS)-2-(2,4-dichlorophenyl)-1-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)hexan-2-ol
Nuarimol		(±)-2-chloro-4'-fluoro-α-(pyrimidin-5-yl)benzhydryl alcohol
Prochloraz		N-propyl-N-2-(2,4,6-trichlorophenoxy)ethylimidazole-1-carboxamide

제의 균사 생장 억제 효과는 1%의 DMSO만을 첨가한 PDA에서 자란 균총의 직경에 대한 억제 첨가 배지에서의 균총의 직경으로 아래의 식에서 균사 생장 억제율을 구하였다.

균사 생장 억제율(%) =

$$1 - \frac{\text{약제 배지에서의 균총의 직경}}{\text{무처리 배지에서의 균총의 직경}} \times 100$$

온도별 균사생장. 균사 생장 억제실험에서 EBI 저항성으로 판별된 2001-45와 감수성으로 판별된 2001-44, JC24 균주의 균사 생장에 미치는 온도의 영향을 조사하기 위하여 PDA배지에 이식하고, 20, 25, 30°C에서 배양하여, 7일 후 균총의 직경을 측정하였다.

탄저병균의 포자형성 실험. 2001-45, 2001-44, JC24 균주의 포자 형성능을 조사하기 위하여 PDA에 이식하여 25°C의 암 상태에서 5, 10, 15일간 배양한 후, 20 ml의 증류수를 가하고 배지 표면을 긁어 균사와 포자를 혼탁하였다. 혼탁액은 4겹의 가제에 걸러서 균사와 배지의 찌꺼기를 제거하고, 혼탁액 중의 포자 수를 혈구계산기로 조사하였다.

고추에 대한 병원성 실험. 선발된 2001-45, 2001-44, JC24 균주의 고추에 대한 병원성 정도를 검정하기 위하여 청옥 고추(농우 바이오)를 실험에 사용하였다. 각 균주의 포자현탁액의 포자 농도를 1×10^6 개/ml로 조절한 후 고추의 표면에 5 µl씩 접종하여 접종하였다. 고추의 표면은 70%의 methanol로 잘 닦은 다음, 표면에 편으로 상처를 내고 접종하는 상처 접종과 무상처 접종을 실시하였다. 접종한 고추는 25°C의 암 상태의 습실에 1주일간 보관하고 발병 여부를 조사하였다.

보호 살균제에 대한 감수성. EBI에 대하여 저항성 균주와 감수성인 균주의 보호 살균제에 대한 감수성을 조사하였다. 보호용 살균제로 알려진 iminoctadine-triacetate, chlorothalonil, dithianon, propieneb를 사용하여 위에서 서술한 것과 같은 한천희석법으로 균사 생장 억제 효과를 조사하였다. Iminoctadine-triacetate, chlorothalonil, dithianon에 대하여는 첨가한 배지에서의 살균제의 최종 농도는 500, 50, 5, 0.5 µg/ml로 하였고, propieneb는 500, 250, 125, 62.5 µg/ml에서 실험하였다.

결 과

병원균 분리와 균사 생장 억제실험을 통한 균주 선발. 실험에 사용한 20개의 고추 탄저병균과 14개의 사과 탄

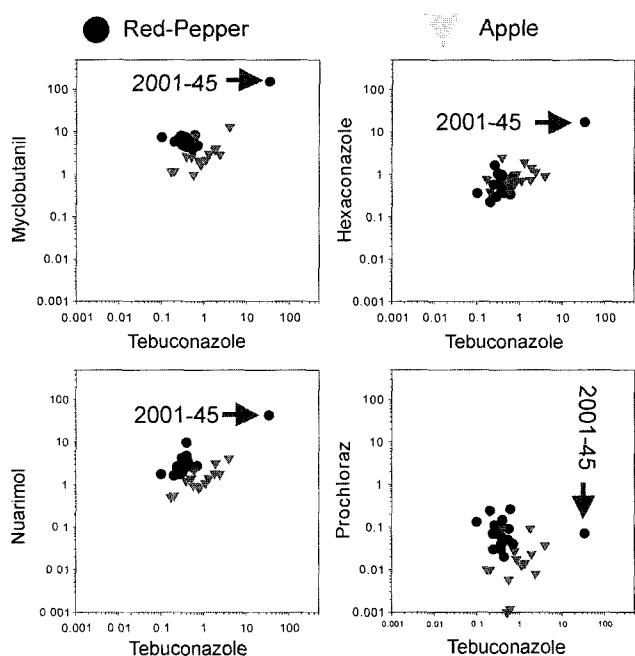


Fig. 1. EC₅₀ value of *Colletotrichum* spp. isolated from red-pepper and apple.

Table 2. Inhibitory effect of several fungicides blocking the sterol biosynthesis on mycelial growth of *Colletotrichum* spp. causing pepper anthracnose

Fungicides\ Isolates	2001-45	2001-44	JC24
EC ₅₀ ^c			
Myclobutanol	153.5 ^a (18.3 ^b)	8.4	5.8
Tebuconazole	34.0 (56.7)	0.6	0.2
Hexaconazole	17.1 (57.0)	0.3	0.2
Nuarimol	42.7 (17.1)	2.5	1.6
Prochloraz	0.07 (0.2)	0.3	0.2
MIC ^d			
Myclobutanol	>50	>50	>50
Tebuconazole	>50	>50	50
Hexaconazole	>50	>50	50
Nuarimol	>50	>50	50
Prochloraz	5	50	5

^aNumbers indicate the inhibitory percentage of mycelial growth on PDA amended with each fungicides compared with that on PDA without fungicide.

^bNumbers mean resistance factor, which is calculated by following formula: Resistance factor = EC₅₀ of resistant isolate (2001-45)/EC₅₀ of sensitive isolate (2001-44).

^cFifty percentage of effective concentration.

^dMinimal inhibitory concentration.

저항균의 균주 중에서 고추 탄저병균인 *Colletotrichum* sp. 2001-45만이 myclobutanil, tebuconazole, hexaconazole, nuanimol에 대해서 교차 저항성을 보였다(Fig. 1). 그러나 prochloraz에 대해서는 0.07 µg/ml로 낮은 EC₅₀ 값(50%의 균사생장 억제 효과를 보이는 값)을 보였다. Table 2에서 보는 바와 같이 myclobutanil, tebuconazole, hexaconazole, nuanimol에 대한 2001-45의 EC₅₀ 값은 153.5, 42.7, 34.0, 17.1 µg/ml이었으며, 2001-44와 비교한 저항성 요인도 18.3, 56.7, 57.0, 17.1로서 감수성인 균주에 비하여 17배에서 57 배정도 높은 저항성을 나타냈다. 그러나 prochloraz의 EC₅₀ 값은 0.07 µg/ml로 4개의 EBI에 대해서 감수성으로 나타난 2001-44와 JC24보다도 낮았다. 사용한 EBI에 대한 JC24의 EC₅₀ 값은 5.8, 0.2, 0.2 1.6, 0.2 µg/ml로, 2001-44와 함께 감수성 균주로 확인되었다.

온도별 균사생장 실험. 선발된 2001-44, JC24, 2001-45을 20°C, 25°C, 30°C에서 각각 7일간 배양한 후 균총의 직경을 측정하였다. 저항성이인 2001-45는 감수성이인 2001-44와 모든 온도에서 비슷한 균사 생장을 보였다(Fig. 2). 또한 두 균주 모두 고온인 30°C에서 균사 생장이 활발하였다. 또 다른 감수성이인 JC24는 모든 온도에서 2001-45와 2001-44보다 균사생장이 느리게 나타났으며, 두 균주와는 다르게 25°C에서 가장 생장이 빠르게, 30°C의 고온에서는 균사 생장이 가장 느리게 나타났다.

포자 형성 실험. 2001-45는 PDA에서 5일, 10일, 15일간 배양하였을 때, 5.0, 3.8, 3.7×10⁴개/plate로 매우 낮게 나타났다(Fig. 3). 2001-44는 15일간 배양하였을 때 4.4×10⁶개/plate로 10일 이후 생성량이 급증하였다. 2001-44와 같이 EBI에 대하여 감수성이인 JC24는 배양 초기부터 다른 두 균주보다 많은 양의 포자를 형성하였다. 5, 10, 15

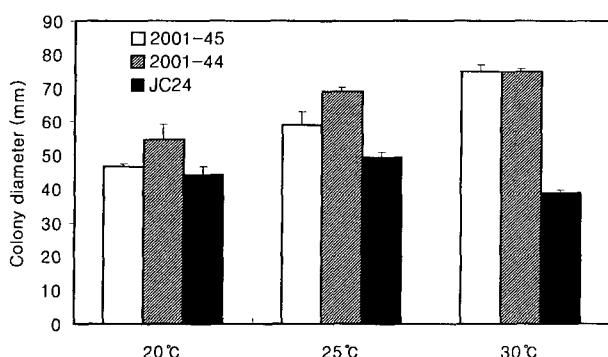


Fig. 2. Mycelial growth of three isolates of *Colletotrichum* spp. causing the pepper anthracnose at 20, 25, and 30°C. Seven days after incubation at 3 indicated temperatures, colony diameters of three isolates of *Colletotrichum* spp. were measured. At each temperatures, there were 5 replicates.

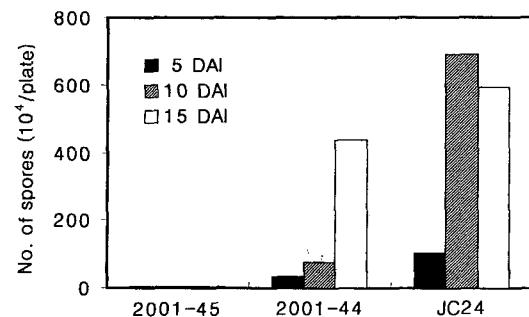


Fig. 3. Sporulation of three isolates of *Colletotrichum* spp. on PDA. After each isolates was incubated at 25°C for indicated period, the number of conidia was measured with haemacytometer under a light microscope. There were 5 plates per treatment.

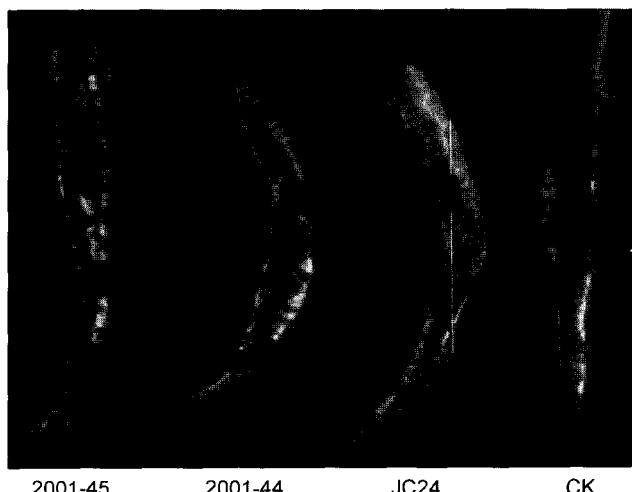


Fig. 4. Pathogenicity test of three isolates of *Colletotrichum* spp. Each pepper fruits was inoculated with pathogen by dropping 5 µl of the conidial suspension, adjusted to 1 × 10⁵ spores/ml. Inoculated peppers were kept in humidity plastic box for 7 days.

일간 배양하였을 때 plate당 형성된 포자의 수가 103.7, 691.7, 591.7×10⁴개로, 10일간 배양하였을 때 가장 많은 포자를 형성하고 15일째부터는 형성되는 수가 감소하였다.

고추에 대한 병원성 실험. 실험에 사용한 2001-45, 2001-44, JC24의 세 균주 모두 무상처 접종에서는 병을 일으키지 못하였고 상처 접종시에만 스테롤 생합성 저해제에 대하여 감수성이인 JC24에서 탄저병의 병징을 확인할 수 있었다(Fig. 4). JC24를 상처 접종하고 3일 후부터 접종 부위가 움푹 파이기 시작하다가 5일 후부터는 뚜렷한 병징을 관찰할 수 있었다. 그러나 다른 감수성이인 2001-44와 저항성이인 2001-45는 상처 부위가 갈변하기만 하였을 뿐, 뚜렷한 병반이 형성되지 않았다.

다른 살균제에 대한 감수성. 스테롤 생합성 저해 살균제에 대하여 저항성이인 2001-45의 보호용 살균제에 대

Table 3. Inhibitory effect of protective fungicides on mycelial growth of *Colletotrichum* spp. causing pepper anthracnose

Fungicides\ Isolates	2001-45	2001-44	JC24
EC ₅₀ ^c			
Propineb	10.2 ^a	- ^b	139.2
Chlorothalonil	952.1	61.9	412.1
Dithianon	61.7	33.8	185.2
Iminoctadine	0.2	0.01	506.6
MIC ^d			
Propineb	250	-	250
Chlorothalonil	>500	>500	>500
Dithianon	>500	>500	>500
Iminoctadine	>500	>500	>500

^aNumbers indicate the inhibitory percentage of mycelial growth on PDA amended with each fungicides compared with that on PDA without fungicide.

^bSymbol indicates that the test was not conducted.

^cFifty percentage of effective concentration.

^dMinimal inhibitory concentration.

한 감수성 정도는 스테롤 생합성 저해 살균제에 대하여 감수성인 2001-44와 JC24와 비슷하거나 감수성이 높은 것으로 나타났다(Table 3). 특히 iminoctadine에 대한 EC₅₀ 값은 0.2 μg/ml로 506.6 μg/ml인 JC24에 비하여 매우 낮았다. 그러나 chlorothalonil에 대한 EC₅₀ 값은 952.1 μg/ml로 JC24와 2001-44에 비하면 매우 높았다. 이처럼 보호용 살균제 대한 감수성 반응이 다양하게 나타나는 것으로 보아, 2001-45는 보호용 살균제와 스테롤 생합성 저해 살균제에 대하여 교차 저항성을 보이지 않음을 알 수 있었다.

고 찰

2001년 충북의 고추 재배 지역에서 분리한 2001-45 균주는 myclobutanol, tebuconazole, hexaconazole과 같은 triazole계에 속하는 스테롤 생합성 저해 살균제와 pyrimidine 계에 속하는 nuarimol에 대해서는 서로 교차 저항성을 보이고 있었지만, imidazole계에 속하는 prochloraz에 대해서는 저항성을 보이지 않았다. Prochloraz는 본 실험에서 사용한 myclobutanol, tebuconazole, hexaconazole, nuarimol 등과 같이 C14-demethylase의 활성을 저해하는 것으로 알려져 있다(Kapteyn, 1994). 동일한 작용점을 지닌 prochloraz가 다른 EBI에 대해서 교차 저항성을 보이지 않는 이유는, 흰가루병균에 대해서 De Waard(1992)가 설명하고 있는 것처럼, *Colletotrichum* sp.에 대한 prochloraz의 효과가 다른 EBI에 비하여 절대적으로 높거나, prochloraz가 다른 EBI들과의 교차 저항성 정도가 적은 살균제일 가능성

이 있다. 이처럼 동일한 작용 기작을 갖는 EBI들 간에 교차 저항성을 보이는 탄저병 균주에 대해서 prochloraz가 교차 저항성을 보이지 않는 것과, De Waard(1992)의 보고처럼 최근에 개발된 새로운 EBI가 기존의 EBI에 대하여 저항성을 나타내는 흰가루병균에 대하여 교차 저항성을 나타내지 않는 것을 보면 아직도 새로운 활성을 보이는 EBI의 개발이 가능하고, EBI에 대하여 저항성을 보이는 병원균의 방제에 기존의 EBI 중에서 효과있는 살균제를 선발하여 방제할 수 있음을 보여주고 있다. 또한 2001-45는 prochloraz뿐만 아니라 propineb, dithianon, iminoctadine과 같은 보호 살균제에 대하여 EBI에 대하여 감수성 균주로 판명된 JC24보다도 낮은 감수성을 보이고 있어, EBI에 대한 저항성균의 방제에 보호 살균제를 사용할 수 있다는 가능성을 보여주고 있다.

균사 생장, 포자 생성 능력, 병원성들을 조사한 균주의 포장 적응력 실험에서 저항성인 2001-45는 감수성 균주들보다 적응력이 떨어지는 것으로 판명되었다. 2001-45의 균사생장 정도는 감수성인 2001-44과 비교하여 20°C와 25°C에서는 느렸지만, 생장 적온인 30°C에서는 동일하였으며, 또 다른 감수성균인 JC24보다는 조사한 모든 온도에서 빨랐다. 이러한 결과는 포장 적응력을 비교하는데 있어서 균사 생육은 좋은 요인이 아님을 보여주고 있다. 그러나 2001-45의 PDA상에서의 포자 형성 능력과 고추에 대한 병원성이 약한 것으로 보아 포장에서의 적응력은 감수성인 다른 탄저병균들에 비하여 낮을 것으로 생각된다. 이러한 결과에 의하면 포장에서의 EBI에 대한 탄저병균의 저항성 발현이 크게 문제되지 않을 것으로 예상되지만, 2001년에 고추의 포장에서 분리한 탄저병균에서 EBI에 대한 저항성균이 발견되었기 때문에 포장에서 EBI에 대한 탄저병균의 지속적인 모니터링은 필요한 실정이다. 본 연구 결과 2001-45 균주는 스테롤 생합성 저해 살균제에 대하여 저항성이나, 적응력에 있어서 다른 균주들에 비해 열등한 것으로 나타났다.

요 약

고추와 사과에서 분리한 20개와 14개의 탄저병균 중에서 2001-45가 스테롤 생합성을 저해하는 살균제에 대하여 저항성 균주로 판명되었다. 2001-45는 myclobutanol, tebuconazole, hexaconazole, nuarimol 등에 대하여 153.5, 42.7, 34.0, 17.1 μg/ml로, 실험에 사용한 다른 탄저병균들보다 높은 EC₅₀ 값을 보이며, 서로간에 교차 저항성을 나타냈다. 하지만 prochloraz(스테롤 생합성 저해 살균제)에 대한 EC₅₀ 값은 0.07 μg/ml로, 감수성균인 2001-44와 JC24

보다도 감수성이 높았다. 20, 25, 30°C에서 스테롤 생합성 저해 살균제에 대하여 저항성인 2001-45의 균사 생장은 2001-44와 비슷하였으며, 또 다른 감수성인 JC24보다는 빨랐다. 그러나 PDA상에서의 포자 형성 능력과 고추열매에 대한 병원성은 JC24보다 현저하게 떨어졌다.

감사의 말씀

이 연구는 2002년도 농림부에서 시행하는 농림기술개발연구과제로 수행한 연구의 결과입니다. 또한 이 연구를 위하여 사과의 탄저병균을 분양하여 주신 경북대학교 엄재열 교수님과 충북대학교의 차병진 교수님께 감사를 드립니다.

참고문헌

- De Waard, M. A. 1994. Resistance to fungicides which inhibit sterol 14 α -demethylation, an historical perspective. In: *Fungicide resistance*, ed. by Heaney, S., Slawson, D., Holloman, D. W., Smith, M., Russell, P. E. and Parry, D. W., pp. 3-10. Nottingham, Britain.
- Elad, Y. 1992. Reduced sensitivity of *Botrytis cinerea* to two sterol biosynthesis-inhibiting fungicides: fenpropidin and fenpropimorph. *Plant Pathology* 41: 47-54.
- Fletcher, J. S. and Wolfe, M. S. 1981. Insensitivity of *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* to triadimenol and other fungicides. Brighton Crop Protection Conference; Pests and Diseases-1981, 2: 633-640.
- 한국식물병리학회. 1998. 한국식물병명목록. pp. 436.
- Kapteyn, J. C., Milling, R. J., Simpson, D. J. and De Waard, M. A. 1994. Inhibition of sterol biosynthesis in cell-free extracts of *Botrytis cinerea* by prochloraz and prochloraz analogues. *Pestic. Sci.* 40: 313-319.
- Köller, W. 1992. Antifungal agents with target sites in sterol functions and biosynthesis. In : *Target sites of fungicide action*, ed. by W. K. Iler, pp. 119-206. CRC Press, Florida, USA.
- Schepers, H. T. A. M. 1983. Decreased sensitivity of *Sphaerotheca fuliginea* to fungicides which inhibit ergosterol biosynthesis. *Neth. J. Plant Pathol.* 89: 185-187.
- Stanis, V. F. and Jones, A. L. 1985. Reduced sensitivity to sterol-inhibiting fungicides in field isolates of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 75: 1098-1101.
- Steva, H., Cartolaro, P. and Gomes da Silva, M. T. 1990. Tolerance of powdery mildew of SBI fungicides: situation for 1989. *Phytoma* 419: 41-44.