

울산과 나주에서 채집한 배나무 검은별무늬병균의 ergosterol 생합성 저해제 5종에 대한 감수성 저하

권수민¹ · 여무일² · 최세훈³ · 김건용 · 전경진⁴ · 엄재열*

경북대학교, ¹(주)테크노그린 부설연구소, ²(주)경농 중앙연구소, ³국립식물검역원, ⁴(주)동부하이텍

Reduced Sensitivities of the Pear Scab Fungus (*Venturia nashicola*) Collected in Ulsan and Naju to Five Ergosterol-biosynthesis-inhibiting Fungicides

Soo Mean Kwon¹, Moo Ill Yeo², Se Hoon Choi³, Gun Woong Kim,
Kyung Jin Jun⁴ and Jae Youl Uhm*

School of Applied Biology and Chemistry, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

¹Technogreen Co., Ltd. Research Institute, Yongin 449-821, Korea

²Kyung Nong Co., Ltd. Research Institute, 226, Guhwang-Dong, Gyeongju, Gyeongbuk 780-110, Korea

³National Plant Quarantine Service, Sinsundae Container Terminal, 8-12, Yongdang-dong,
Nam-gu, Busan 608-741, Korea

⁴DongbuHiTek, Dongbu Finance Center, 891-10, Daechi-dong, Gangnam-gu, Seoul 135-523, Korea

(Received on February 22, 2010)

In Korea, EBI fungicides which are highly effective for control of pear scab and rust but of high risk for development of resistance have been frequently sprayed by majority of pear growers. To detect any possible resistance or reduced sensitivity in the field strains of scab fungus to five EBIs, difenoconazole, fluquinconazole, flusilazole, fenarimole and hexaconazole, sensitivity tests were conducted with fungal specimens collected in Ulsan and Naju where scab usually occurs and EBIs have been intensively sprayed for many years. As the strains for which EC₅₀ values of the EBIs were largely shifted from those of base-line were occasionally found, the resistant or less sensitive strains were supposed to be distributed. In the activity test for the EBIs by artificial inoculation, in which EBI-treated pear leaves on the potted seedlings were inoculated with fungal spores collected in the two regions, development of resistances to EBIs were confirmed. Since the fungal spores collected at 4 and 2 orchards in Naju and Ulsan, respectively, produced much higher disease incidence on the leaves treated with hexaconazole than those on the untreated control, those fungal specimens were determined as resistant to hexaconazole. Similar results were also obtained with two specimens from Ulsan for flusilazole.

Keywords : Resistance to EBIs, Reduced sensitivity, *Venturia nashicola*

배나무 검은별무늬병(병원균: *Venturia nashicola*)은 우리나라에서 발생하는 배 병 중에 가장 피해가 크고 방제가 어려운 병이다. 이 병은 대부분의 경우 배의 생육 초기에 감염되는데, 4, 5월에 비가 많이 내리고 서늘할 때 심하게 발생하며, 여름의 고온기에는 소강상태로 지나지만 9월에 기온이 낮아지고 습도가 높아지면 다시 발병하여 잎에 추계 병반이 형성된다(梅本, 1993; 御園生과 深

津, 1968). 이 병은 잎자루와 엽맥, 과경 및 과실표면에 주로 발생하고 어린가지에도 가끔 발생하나 흔하지는 않다(御園生과 深津, 1968). 과실에는 부정형 원형, 타원형의 흑색 병반이 생기며 엽맥이나 과경의 병반상에는 포자가 다량으로 형성되어 움 모양을 나타낸다(Shabi, 1990).

배나무 검은별무늬병에 대한 감수성은 품종 별로 큰 차이를 보이는데, 우리나라에서 재배되고 있는 품종 가운데 ‘감천’, ‘추황’, ‘신흥’, ‘영산배’ 등은 저항성이고, ‘신수’는 중간 정도의 이병성을 보이며, ‘신고’, ‘만삼길’, ‘황금’, ‘풍수’, ‘행수’, ‘장십랑’은 이병성으로 알려져 있다(박 등,

*Corresponding author
Phone) +82-53-950-5763, Fax) +82-53-950-6758
Email) jyuhm@knu.ac.kr

2003). 그런데 우리나라에서는 감수성이 높은 ‘신고’가 대부분을 차지하고 있고, 근년에 와서 역시 감수성이 높은 ‘황금배’의 재배 면적이 증가하고 있으므로 검은별무늬병의 방제는 우리나라 배 산업에 있어서 가장 중요한 과제가 되고 있다.

현재 이 병의 방제는 대부분 살균제의 정기적 살포에 의존하고 있는데, 2003년 및 2004년 전국의 89호의 배 재배 농가에서 2년간의 살균제 살포력을 수집하여 살균제의 사용 실태를 분석한 결과, 살포회수는 연간 4회에서 31회에 달했고 그중 50% 이상이 침투성 살균제인 ergosterol-biosynthesis inhibitor(EBI)였다(최, 2005). EBI가 우리나라에서 본격적으로 사용되기 시작한 것이 1980년대 후반이었으므로 이미 20년 이상 광범위한 작물에 사용되어 왔으며, 배나무 검은별무늬병 방제 약제로 등록되어 있는 EBI 및 EBI 함유 혼합제가 28종에 달하고 있다(농약공업협회, 2009). EBI는 일반적으로 저항성 발달이 용이하지 않고 또 감수성 저하도 급격히 이루어지지 않는 것으로 알려져 있으나(Barug와 Kerkennar, 1984), 이미 세계적으로 *Venturia inaequalis*(Thind 등, 1986; Kller 등, 1996) *Penicillium digitatum*(Eckert 등, 1994), *Uncinula necator*(Gubler 등, 1996) 등에서 저항성균이 발견되었고, 일본에서도 배나무 검은별무늬병균의 fenarimol에 대해 감수성이 낮아진 사례가 발견되었다(Ishii 등, 1990; Tomita와 Ishii, 1998). 따라서 일본에서는 저항성 발달 위험이 있으므로 EBI는 한 작기당 3회 이상을 초과하지 않도록 권장하고 있으나 일본에서도 연간 7~10회 살포하는 농가가 많은 것으로 알려져 있다(Tomita와 Ishii, 1998). 우리나라에서도 EBI를 연간 9~12회 살포하고 있으며, 연간 10회 이상 살포하는 농가가 적지 않다. 이러한 빈번한 살포에도 불구하고 2003년에 검은별무늬병이 전국적으로 대발생하였고, 또 저자 등이 2006년과 2007년에 울산지역에서 거의 방제불능 상태의 과수원을 수 개소씩 목격할 바 있다. 따라서 우리나라에서도 배나무 검은별무늬병균이 EBI에 대해 저항성이거나 감수성 저하 현상이 있을 것으로 생각되어 재배역사가 길고 또 검은별무늬병이 상습적으로 발

생하는 울산광역시와 전남 나주시에서 이병 표본을 채집, 병원균을 분리하여 EBI에 대한 저항성을 검정하였다.

재료 및 방법

균주의 수집. 2006년 울산광역시와 나주시 지역에서 이병표본을 채취하여 병원균을 분리했는데, 울산광역시에서는 서생면, 온양읍 및 청량면에서 17필지의 농가 과수원에서 엽병과 과정에 병반이 형성된 이병표본을 수집하였다. 나주시에서는 왕곡면, 금천면, 봉황면의 17농가 과수원에서 이병표본을 채집하였다.

채집한 이병표본의 병반 상에 형성된 포자를 멸균수에 현탁하고, 병원균의 분리 시 세균의 발육을 막기 위해 penicillin G potassium salt와 streptomycin sulfate를 각각 50 ppm이 되도록 첨가한 potato dextrose agar(PDA)에 전술의 포자현탁액을 도말한 다음, 20°C 배양기에서 48시간 배양한 후 실체 현미경 하에서 발아한 단포자를 항생제 미함유 PDA에 이식, 역시 20°C에서 약 60일간 배양하였다. 한 농가에서 채집한 이병표본으로부터 3균주씩을 분리하였다.

또 단일 과수원내에서 분리된 병원균의 EBI에 대한 저항성을 검정하기 위해 2007년도 울산과 나주에서 검은별무늬병이 심하게 발생한 농가 두 곳씩을 선정하고 각 농가로부터 이병엽을 50엽씩을 채취, 엽당 1균주씩을 전술의 방법으로 별도로 분리 배양하였다.

사용 살균제. 최(2005)가 수행한 농가 설문 조사에서 사용빈도가 높은 5종의 EBI를 선정하였는데, 그들 약제의 상세 기술을 Table 1에 나타내었다.

배지 상에서 병원균의 EBI에 대한 감수성 검정. 배나무 검은별무늬병균에 대한 5종 EBI의 base-line sensitivity data를 얻기 위해서는 아직 한번호 EBI에 노출된 적이 없는 균주가 필요한데, 그러한 균주는 국내에서는 구할 수 없었으므로 일본 농업환경연구소의 Dr. Hideo Ishii로부터 60균주를 분양받아 사용하였다. 균주의 수입을 위해서 국립식물검역소의 허가를 받았다(허가번호: 2007-27).

Table 1. Details of EBI fungicides used in this experiment

Common name	a.i. (%)	Formulation ^a	Recommended dosage (mg a.i litre ⁻¹)	Manufacturer	Abbreviation ^b
Difenoconazole	10	WG	50	Syngenta	Dif
Fluquinconazole	10	WP	67	Sung Bo	Flq
Flusilazole	20	WG	25	Dongbu HiTek	Fls
Fenarimol	12	WP	42	Dongbu HiTek	Fen
Hexaconazole	5	WP	20	Gyung Nong	Hex

^aWG, WP and SC represent water dispersible granule, wettable powder and suspension concentrate, respectively.

^bChemical names were abbreviated in the text

Base-line sensitivity를 검정하기 위한 60균주를 포함하여 2006년과 2007년에 분리한 51균주 모두를 PDA에 이식, 20°C에서 40일 간 배양한 후 접종원으로 사용하였다. 고압멸균한 PDA에 5종의 EBI(Table 1)를 0.0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100 mg a.i./l가 되도록 10가지 농도로 첨가하여 약제배지를 준비하였다. PDA에서 배양한 각 균주의 균사 선단을 지름 2.5 mm의 borer로 잘라 여러 가지 농도의 EBI가 함유된 배지에 치상, 20°C, 암흑하에서 3주간 배양한 후, 개별 균주의 colony 지름을 측정하여 EBI에 대한 균사생장 억제율(%)을 계산한 후, Microsoft Excel의 EXP함수를 이용하여 EC_{50} 을 산출하였다.

배나무 잎에의 인공접종에 의한 EBI 저항성 검정. 2007년 5월과 6월에 울산과 나주에서 각각 채취한 이병 표본 상에 형성된 분생포자를 0.1% sucrose용액에 농후하게 현탁, Effendorf tube에 분주, -70°C의 deep freezer에 보관하였다(梅本, 1993). 실험에 앞서 냉동 보관된 포자의 발아력을 검정하기 위해 보관된 포자현탁액을 4°C의 냉장고에 24시간 보존하여 해동한 후 penicillin G potassium salt와 streptomycin sulfate를 각각 50 ppm이 되도록 첨가한 PDA에 병원균 현탁액을 도말, 20°C에서 48시간 보존 후 발아율을 조사, 높은 발아력을 보인 포자를 채집한 과수원으로 울산지역의 5필지와 나주지역의 4필

지를 저항성 검정 대상으로 결정하였다.

직경 30 cm pot에 재식한 3년생 배나무 묘목(품종: 신고)을 사용했는데, 검은별무늬병균은 경화된 잎에는 침입하기 어려우므로(梅本, 1993) 실험개시 3주전에 잎을 모두 제거하고 옥외에 방치하여 새잎이 돋아나게 하였다. 이 실험은 9월에 수행했는데 8월경의 기상조건에서는 3주 정도면 새잎이 완전히 전개되었다. 병원균의 접종에 앞서 각 포트에서 전형적인 형태를 갖는 40엽만 남기고 나머지 잎은 모두 제거하였다.

배지 상에서의 저항성 및 감수성저하 검정 실험에 사용한 5종의 EBI를 권장사용 농도로 희석하고 전착제(상표명: 라이트론, 경농)를 250 ppm이 되도록 첨가, 소형분무기로 식물체에 약액이 흘러내릴 때까지 고루 살포한 후, 그늘에서 3시간 동안 방치하여 약액이 완전히 건조되도록 하였다.

동결보존 중인 포자현탁액을 일단 4°C의 냉장고에서 24시간 보존하여 해동시킨 후 포자의 밀도가 $\sim 10^4$ spores/ml가 되도록 멸균 증류수로 희석, 살균제 처리 후 약액이 완전히 건조한 배나무잎에 소형분무기로 한 잎씩 분무접종 하였다. 접종이 완료된 포트는 20~21°C의 포화습도 chamber에서 48시간 보존, 그 후 같은 온도에서 3주간 보존하면서 이병엽율과 엽당 병반의 수를 조사하였다.

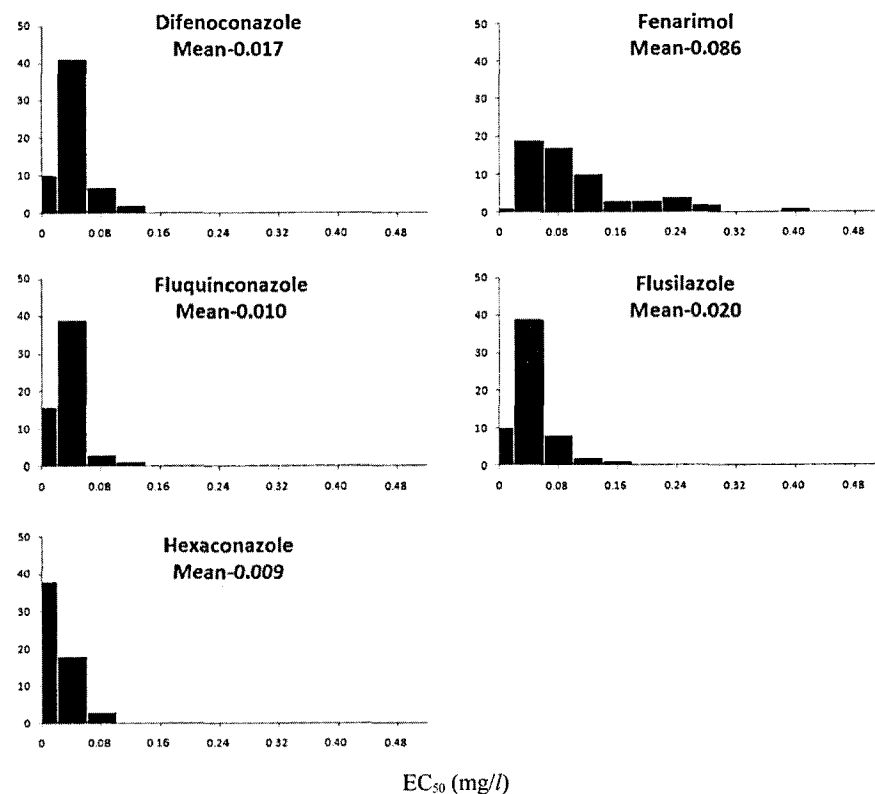


Fig. 1. Frequency distribution of the base-line sensitivity of *Venturia nashicola* strains to EBIs.

결과 및 고찰

배나무 검은별무늬병균의 EBI에 대한 base-line sensitivity 검정. 실험에 사용된 5종 EBI의 배나무 검은별무늬병균에 대한 base-line activity를 조사하기 위해 EBI에 노출된 적이 없는 60균주에 대한 5종 EBI의 EC₅₀ 값을 Fig. 1에 나타내었다. 이들 균주는 대체로 EBI에 대해 대단히 민감하여 difenoconazole의 경우 60균주 중 11균주가 0.01 mg/l에서 발육이 거의 완전히 억제되었고, EC₅₀ 값의 평

균은 0.017 mg/l이었다. 그런데 fenarimol에서는 0.01 mg/l에서 발육이 억제된 균은 1균주 뿐이었고, EC₅₀ 값이 비교적 넓게 분포하고 있었으며 평균은 0.086 mg/l로 타 약제에 비해 크게 높았다. 검정균주는 fluquinconazole에 대해서는 비교적 민감하여 60균주 중 17균주가 0.01 mg/l에서 발육이 거의 완전히 억제되었고, 이 약제의 EC₅₀ 평균값은 0.010 mg/l이었다. Flusilazole에 대해서는 60균주 중 11균주가 0.01 mg/l에서 발육이 거의 완전히 억제되었고, flusilazole의 EC₅₀ 평균값은 0.02 mg/l로 difenoconazole이나

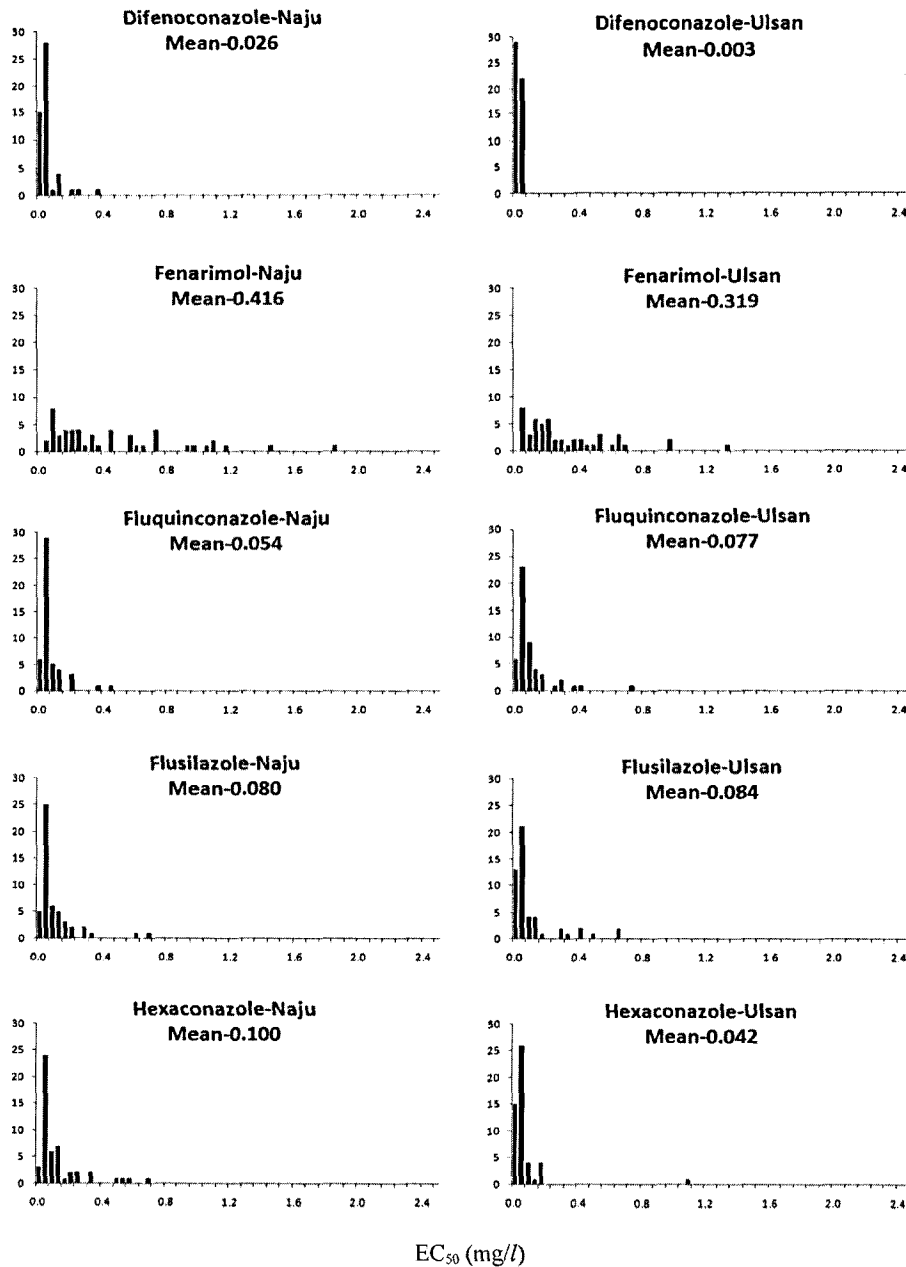


Fig. 2. Distribution of EC₅₀ values of EBIs for mycelial growth of monoconidial strains of *Ventria nashicola* isolated Naju and Ulsan (2006).

fluquinconazole 보다 높게 나타났다. 한편 공시균주는 hexaconazole에 대해서도 대단히 민감하여 39균주가 0.01 mg/l 이하에서 발육이 거의 완전히 억제되었으며, hexaconazole의 EC₅₀ 평균값은 0.009 mg/l로 5종의 약제 중 가장 낮았다. 이상의 결과로 본다면 EBI에 노출된 적이 없는 균주는 대체로 민감하였으나, fenarimol의 EC₅₀ 값만 그 분포가 넓었다.

배지상에서의 배나무 검은별무늬병균의 EBI에 대한 감수성 검정. 2006년도에 울산과 나주에서 각각 수집한 51 균주씩의 단포자 계통에 대한 5종 EBI의 EC₅₀ 값 분포를 Fig. 2에 나타내었다.

나주에서 채집한 균주에 대한 difenoconazole의 EC₅₀ 값의 평균은 0.026 mg/l로 base-line sensitivity test에서 EC₅₀ 평균값인 0.017 mg/l 보다 크게 높지 않았다. 그러나 일부 균주에 대한 EC₅₀ 값은 base-line 평균치보다 상당정도 높아져 있었고, 그중 한 균주에 대해서는 EC₅₀ 값이 base-line 평균값을 20배 이상 벗어나 있었으므로 이는 저항성 균으로 생각되었다(Fig. 2). 울산에서 채집된 균주에 대한 EC₅₀ 값의 평균은 base-line sensitivity test에서의 평균값보다 오히려 낮았고 평균치에서 크게 벗어난 균주도 발견되지 않았다(Fig. 2).

Fenarimol에 있어서는 EC₅₀ 값이 널리 분포하고 있었는데, 이는 base-line activity test에서도 나타난 현상으로 그 약제의 일반적 특성으로 생각되었다. Fenarimol의 EC₅₀ 평균값이 나주와 울산에서 각각 0.416 mg/l와 0.319 mg/l로 base-line의 평균값인 0.086 mg/l 보다 각각 4.8배와 3.7배 더 높아져 있었으므로 감수성이 다소 저하한 것으로 판단되었다. 그리고 울산에서 채취한 균주 중에 EC₅₀ 값이 2.49 mg/l로 base-line 보다 29배나 높아져 있었으므로 이는 저항성 균주로 판단되었다. 또 나주에서 채집한 균주 중에도 fenarimol의 EC₅₀ 값이 1.0 mg/l를 넘는 균주가 3균주 발견되었고 그 중 한 균주에 대한 EC₅₀ 값은 base-line 평균값을 20배 이상 벗어나 역시 저항성을 획득한 것으로 판단되었다(Fig. 2).

나주와 울산의 두 지역 균주에 대한 fluquinconazole의 EC₅₀ 평균값은 base-line보다 각각 5.4배와 7.7배 높아져 있어 전반적으로 감수성이 저하된 것으로 판단되었고, 울산지역 균주 중에 평균치를 크게 벗어난 균주의 수가 나주보다 많았다. 또 울산에서 채집된 한 균주에 대한 EC₅₀ 값은 0.71 mg/l로 base-line 보다 71배나 높아져 있었으므로 이는 fluquinconazole에 대해 저항성인 균주로 판단되었다(Fig. 2).

Flusilazole에서 있어서도 두 지역 균주에 대한 EC₅₀ 평균값은 base-line의 평균값보다 4배 이상 높아져 있었고,

두 지역 모두에서 평균치에서 상당정도 벗어난 균주가 발견되어 감수성 저하가 우려되었다.

Hexaconazole의 경우, base-line sensitivity test에서 EC₅₀ 평균값이 0.009 mg/l로 매우 낮았으나 나주에서 채집한 균주에 대한 EC₅₀ 평균값이 0.1 mg/l로 무려 11배 이상 높아져 있었으므로 이 약제에 대해서는 저항성이 발달한 균주가 매우 높은 비율로 존재할 것으로 추정되었다. 또 상당수 균주에 있어서 EC₅₀ 값이 평균치로부터 크게 벗어나 있는 점으로 본다면 저항성이 발달한 균주의 존재가 거의 확실한 것으로 판단되었다. 한편 울산에서 수집한 균주에 대한 EC₅₀ 평균값 또한 base-line의 평균값 보다 약 4.7배 높아져 있었고, 그중 한 균주에 대한 EC₅₀ 값은 평균값 보다 무려 26배나 높아져 있었으므로 이는 저항성이 발달한 균주로 생각되었다.

이상과 같이 나주와 울산의 두 지역에서 채집한 균주에 대한 5종의 EBI의 EC₅₀ 평균값은 base-line sensitivity 보다 크게 높아져 있고, 또 두 지역 모두에서 평균치로부터 크게 벗어난 균주가 존재하는 점으로 보아 감수성 저하 또는 저항성 균주가 높은 비율로 존재할 것으로 판단되었다.

개별 과수원에서 분리한 균주의 EBI에 대한 감수성 분포. 배지상에서의 약제저항성 검정에서는 한 과수원에서 세 균주씩을 분리했는데, EC₅₀ 값이 평균치로부터 크게 벗어난 균주는 대부분의 경우 한 균주씩이었으므로 동일 과수원에서 분리된 균주의 약제에 대한 감수성이 다를 것으로 생각되었다. 개별 과수원에서 채집한 균주의 EBI에 대한 감수성의 차이를 검정하기 위해 2007년에 울산과 나주에서 병이 심하게 발생한 과수원을 2필지씩 선정하여 각 과수원에서 50개의 이병엽을 무작위로 채취, 개개의 잎에서 1균주씩을 분리하여 전향의 실험에서 사용한 EBI의 EC₅₀ 값의 분포를 조사한 결과를 Fig. 3~7에 나타내었다. 전반적 EC₅₀ 값의 분포양상은 지역별로 다수의 과수원에서 분리한 균주에서의 양상과 거의 차이가 없었다.

Difenoconazole은 배나무 검은별무늬병에 대해 가장 안정적인 효과를 나타내는 약제로 알려져 있으나, 2006년도 나주에서 채집한 균주 중에 EC₅₀ 값이 base-line 평균치의 22배를 상회하는 균주가 발견되어 저항성 균주의 존재가 우려되었으나 이 조사에서는 그러한 균주가 발견되지 않았다. 한편 울산에서는 2006년의 조사에서 EC₅₀ 값이 평균에서 크게 벗어난 균주가 없었으나 2007년도 U8에서 채취한 50균주 중 difenoconazole의 EC₅₀ 값이 base-line 평균치의 45배가 되는 균주가 발견되어(Fig. 3), 울산에서도 이 약제에 대한 저항성 균주의 존재가 우려되었다.

Fenarimol의 EC₅₀ 값의 분포 양상은 base-line sensitivity

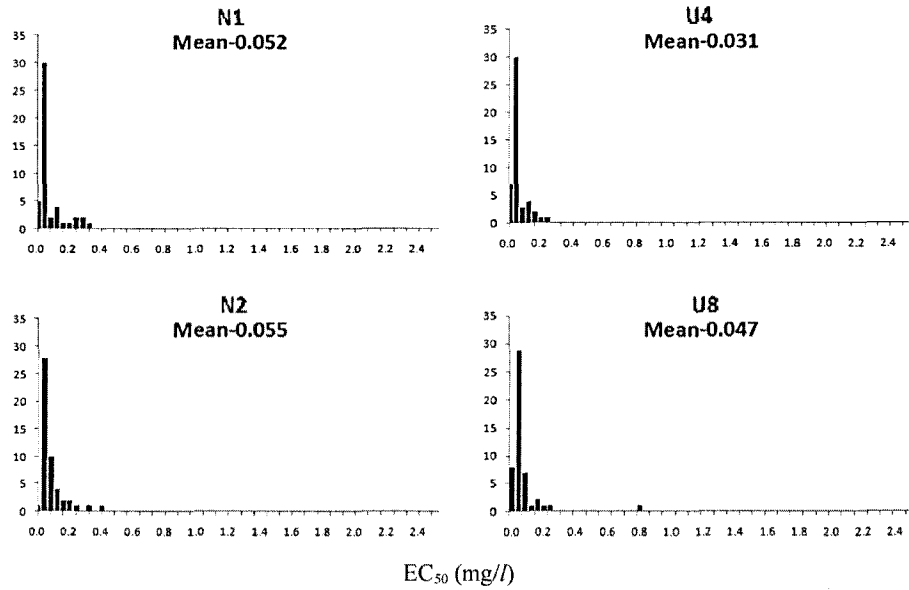


Fig. 3. Distribution of EC₅₀ values of difenoconazole for mycelial growth of monoconidial strains of *Ventria nashicola* isolated at two separate orchards in Naju and Ulsan, respectively (2007).

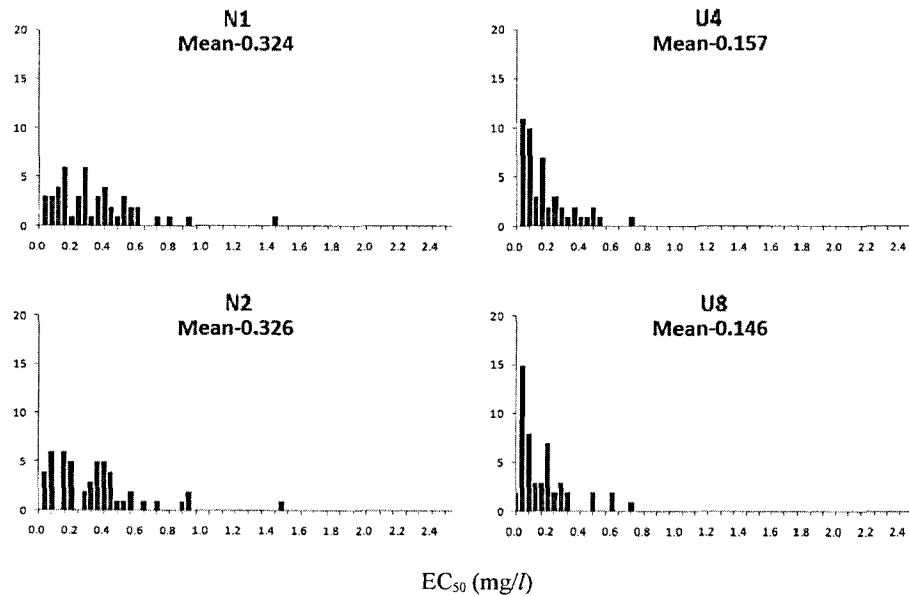


Fig. 4. Distribution of EC₅₀ values of fenarimol for mycelial growth of monoconidial strains of *Ventria nashicola* isolated at two separate orchards in Naju and Ulsan, respectively (2007).

검정에서와 마찬가지로 이 조사에서도 비슷한 양상을 보였으나(Fig. 4), 2006년에 여러 과수원에서 채집한 균주집단에 대한 조사에서 보다 EC₅₀ 값이 좁은 범위에 분포하고 있었다. 그러나 나주의 N1과 N2에서는 EC₅₀ 값이 1.0 mg/l를 초과하는 균주가 각각 1균주씩 발견되어 역시 감수성저하 우려가 있는 것으로 생각되었다.

Fluquinconazole에 대해서는 2006년에 울산지역에서 채집한 균주 중에는 EC₅₀ 값이 base-line 평균치를 크게 벗

어난 균주가 있었으나 이 조사에서는 EC₅₀ 값의 분포 양상은 4 과수원 모두 비슷하였다(Fig. 5).

Flusilazole에 대해서는 2006년에 채집한 균주 중에는 EC₅₀ 값이 높은 균주가 두 지역 모두에서 발견되었는데(Fig. 2), 이 조사에서도 울산의 U4와 나주의 N2에서 EC₅₀ 값이 base-line 평균치보다 각각 15.9배와 32.3배 더 높은 균주가 발견되었다(Fig. 6).

Hexaconazole의 EC₅₀ 값은 그 분포범위가 매우 넓어 U4

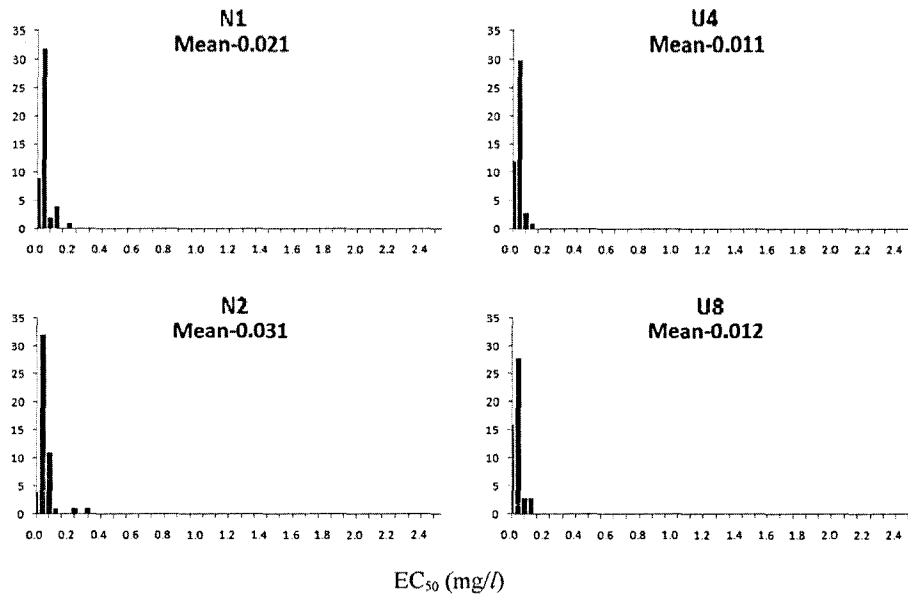


Fig. 5. Distribution of EC_{50} values of fluquinconazole for mycelial growth of monoconidial strains of *Ventria nashicola* isolated at two separate orchards in Naju and Ulsan, respectively (2007).

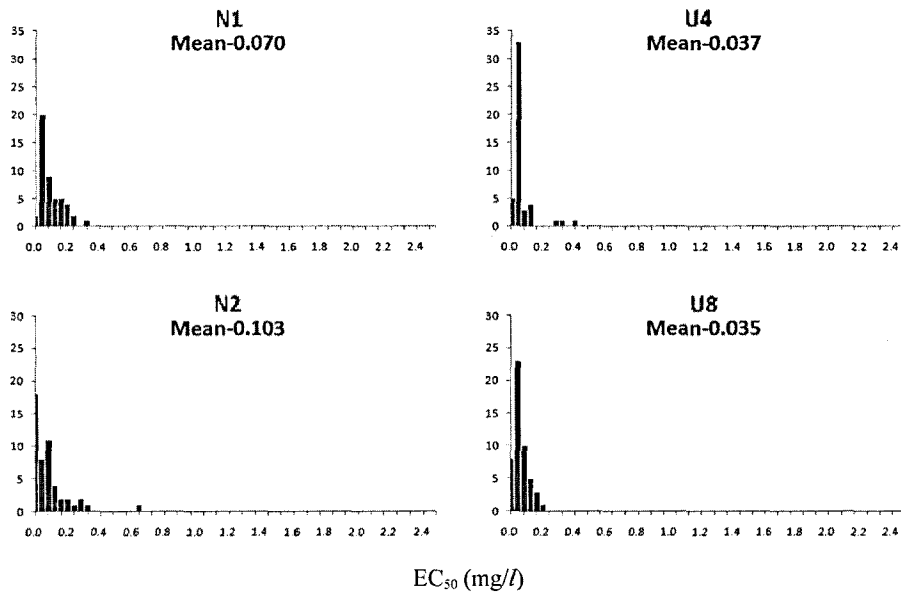


Fig. 6. Distribution of EC_{50} values of flusilazole for mycelial growth of monoconidial strains of *Ventria nashicola* isolated at two separate orchards in Naju and Ulsan, respectively (2007).

에서는 평균값이 0.004 mg/l인데 반해 나주 N2에서는 0.032 mg/l로 8배에 달했으며(Fig. 7) 각 농가마다 base-line 평균치보다 크게 높은 균주가 발견되어 이 약제에 대한 저항성균주가 존재함을 알 수 있었다.

이상과 같이 한 과수원내에서도 EBI에 대한 감수성이 각각 다른 균주가 존재한다는 사실이 확인되었다. 따라서 단포자계통 분리시 저항성을 획득한 균주가 선발되는 것은 기회의 문제이므로 소수의 단포자 계통으로는 저항성

발달 정도를 정확히 파악하기 어려운 것으로 생각되었다.

배나무 잎에의 인공접종에 의한 EBI 저항성 검정.

인공배지 상에서의 5종 EBI에 대한 저항성을 검정한 결과 감수성 저하 또는 저항성이 발달한 균주의 존재가 확인되었으나, 한정된 수의 단포자 계통으로 검정했으므로 그 빈도가 너무 낮아 실제 저항성 문제가 병 방제에 어느 정도 영향을 미칠 수 있는지 가늠하기 어려웠다. 또 배나무 검은별무늬병균은 배지 상에서의 발육속도가 매

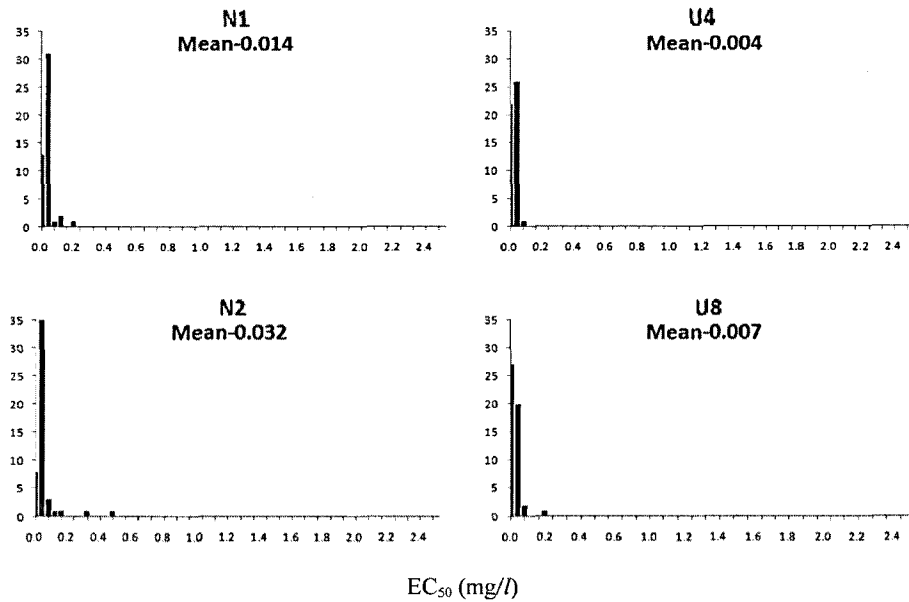


Fig. 7. Distribution of EC₅₀ values of hexaconazole to mycelial growth in *Ventria nashicola* monoconidial strains collected at individual orchard in Naju and Ulsan (2007).

Table 2. Sensitivities of pear scab fungus against EBIs applied just prior to the artificial inoculation of pear seedlings with fungal spores collected at Naju and Ulsan

Localities	Sites	Scab incidences on the leaves treated with EBIs (%)					
		EBIs ^a					
		DW	Dif	Fen	Flq	Fls	Hex
Naju	N2	95.0	30.0	10.0	30.0	5.0	100
	N3	95.0	27.8	26.3	25.0	12.0	100
	N4	100	25.0	35.0	15.0	4.8	100
	N5	80.0	0.0	28.6	0.0	0.0	100
Ulsan	U3	61.5	0.0	10.5	15.0	21.1	80.0
	U4	71.4	17.6	21.4	5.0	0.0	50.0
	U8	85.7	15.0	10.0	5.0	25.0	78.9
	U10	40.0	10.0	55.0	20.0	100	100
	U13	40.0	20.0	25.0	20.0	100	94.4

^aDW: distilled water, Dif: difenoconazole, Fen: fenarimol, Fls: flusilazole, Flq: fluquinconazole and Hex: hexaconazole.

우 늦어 농약을 함유한 배지에 치상하고서도 3주간은 지나야 균총의 직경을 측정할 수 있으므로 그 기간 중에 농약의 성분의 분해 등이 우려되었다. 그뿐만 아니고 배지 상에서의 검정을 위해서는 이병표본에서 병원균을 단포자로 분리해야 하는데, 일반적으로 EBI 저항성 균주는 자연상태에서 fitness가 낮고 균의 활력이 저하되어 있으므로 (Barug와 Kerkenaar, 1984) 단포자를 분리할 때 저항성을 획득한 균주가 분리되기 어려운 점이 있을 것으로 생각되었다. 따라서 이러한 점을 보완하기 위해 EBI를 권장사용농도로 살포한 배나무 옆에 자연발병한 병반상에

서 채취한 병원균의 포자로 직접 접종하여 저항성을 검정 했다. 병원균 접종 후 약 1주 후면 발병이 시작되나 그 후 지속적으로 병세가 진전되므로 접종 후 3주까지의 발병엽율을 Table 2에 나타내었다.

이 실험에서 전반적인 발병상황으로 감수성 저하 또는 저항성 발달이 확연하게 구분되었다. N5에서 채취한 병원균은 무처리에서 80.0%의 이병엽율을 보였으나, difenoconazole, fluquinconazole 및 flusilazole을 처리한 묘목에서는 발병이 완전히 억제되었고, 또 U3에서 채취한 균은 무처리에서 61.5%의 이병엽율을 보였는데에 반해

difenoconazole을 처리한 경우에는 발병이 완전히 억제되었으며, U4 채취균도 무처리에서 71.4%의 발병율을 보였으나 flusilazole을 처리한 묘목에서는 발병이 완전히 억제되었다(Table 2). 따라서 병원균이 특정 EBI에 대해 감수성이 낮아지거나 저항성이 발달하지 않으면 당해 EBI로 발병을 완전히 억제할 수 있는 것으로 볼 수 있으며, 무처리보다 낮지만 발병이 있는 경우는 감수성이 저하했거나 저항성을 획득 균주가 존재하는 것으로 볼 수 있고 무처리보다 발병율이 높은 경우는 저항성 균이 높은 비율로 존재하는 것으로 판단할 수 있었다.

이상의 기준으로 본다면 나주의 4개 과수원 모두와 울산의 U3, U10, U13의 세 과수원에서 채취한 균은 hexaconazole에 대해 저항성인 것으로 판단되었고, U10과 U13의 균은 flusilazole에 대해서도 저항성인 것으로 볼 수 있었다. 또 U10에서 채취한 균은 flusilazole 뿐만 아니고 fenarimol에 대해서도 저항성인 것으로 나타났다.

배지 상에서의 검정에서 EC_{50} 값의 분포스펙트럼이 가장 넓었던 fenarimol에서 발병율이 가장 높을 것으로 예상했으나 U10에서 채취한 균만 발병율이 50%로 무처리의 40% 보다 높았다(Table 2). 그런데 fenarimol에 대한 EC_{50} 값의 분포가 넓기는 했으나 평균치로부터 크게 벗어나지 않아 N1과 N2에서 EC_{50} 값이 1.5 mg/l가 되는 균주가 각각 1균주씩 있었다. 그러나 이는 평균치의 4.6배에 지나지 않았으므로 실제 식물체 상에서는 발병이 적었던 것으로 판단되었다. 특히 N2에서 채취한 균은 식물체 접종에 의한 검정에 사용되었는데 fenarimol 처리구에서의 이병엽율은 10%로 무처리의 95.0%에 비해 크게 낮

았다(Table 2).

Difenoconazole을 처리한 경우의 발병율은 그리 높지 않아 N2에서 채취한 균의 발병율이 30%로 가장 높았고 N5와 U3에서 채취한 균은 발병이 전혀 없었다. 그런데 배지 상의 검정에서는 울산의 U8에서 분리한 균주 중에는 EC_{50} 값이 base-line 평균치를 45배 이상 상회하는 균주가 1균주 있었는데, U8에서 채취한 균을 접종한 배나무에서의 발병율은 15.0%에 지나지 않았다(Table 2). 따라서 U8에는 저항성을 획득한 균주가 존재하나 그 비율은 낮은 것으로 추정되었다.

Fluquinconazole을 처리한 경우 발병율은 대체로 낮았는데, N2 포장 균의 발병율이 30%로 가장 높았고, N5에서 채취한 균을 접종한 묘목에서는 발병이 전혀 없었다. 울산의 U4 및 U5에서 채취한 균의 발병율도 5%에 지나지 않아 비교적 안정적인 것으로 나타났으며(Table 2) 특히 U4에서 채취한 균은 배지 상에서의 검정에서 EC_{50} 값이 매우 낮고 평균치에서 크게 벗어난 균이 발견되지 않았다(Fig. 6).

Flusilazole을 살포한 경우의 발병율은 균주를 채취한 포장에 따라 상당한 차이를 보였는데, N5와 U4에서 채취한 균의 발병은 완전히 억제된 반면 U10과 U13에서 채취한 균의 발병율은 100%로 무처리의 40%에 비해 월등히 높았고(Table 2) Fig. 8에서 보는 바와 같이 발병정도도 매우 심했다. 이 실험의 결과도 배지 상에서의 검정결과와 상당한 차이가 있었는데, U4에서는 flusilazole의 EC_{50} 값이 평균치의 10배를 상회하는 균주가 발견되었으나, 같은 과수원에서 채취한 균의 접종에 의해서는 발병이 전



Fig. 8. Scab lesions appeared on the artificially inoculated pear leaves, to which inoculation was conducted 3 hrs after treatment of EBIs at the concentration of manufacturer's recommendation. (a) U13-DW, (b) U13-flusilazole, (c) N3-untreated, (d) N3-hexaconazole.

혀 없었다(Table 2). 이에 반해 N2에서는 전반적으로 EC₅₀ 값이 매우 높았으며 평균값이 0.103 mg/l나 되었고 그중에서도 EC₅₀ 값이 0.6 mg/l나 되는 균주가 있었으나, 접종 실험에서의 발병율은 5.0%로 매우 낮았다(Table 2).

Hexaconazole의 경우, U4와 U8을 제외한 모든 과수원에서 채취한 균은 무처리보다 훨씬 더 높은 발병을 보였는데, 나주의 4과수원과 울산의 U10에서 채취한 균을 접종한 경우 발병율이 100%였고 병세도 매우 심하여 잎의 가장자리에 엽소현상까지 나타났다(Fig. 8). 울산의 U4와 U8에서 채취한 균을 접종한 나무에서의 발병율은 DW처리구에서의 발병율보다 낮았지만 발병율이 각각 50%와 78.7%나 되어 결코 낮은 수준은 아니었다(Table 2). 그런데 hexaconazole은 배지 상에서의 검정 실험에서는 EC₅₀ 값의 평균치는 매우 낮았으나 개별과수원에서 채집한 균주에 대한 검정에서 4과수원 모두에서 EC₅₀ 값이 평균치의 10배를 넘는 균이 발견되었다(Fig. 7). 따라서 hexaconazole을 처리한 나무에서 유독 병이 많이 발생한 것으로 생각되었다. 또 나주의 N2에서의 EC₅₀ 평균값은 U4의 8배나 되었고 N1에서는 U4의 3.5배나 되어 나주 균의 EC₅₀ 평균치 자체가 울산 균보다 훨씬 높았다(Fig. 7). 따라서 발병정도 또한 나주에서 채집한 균주가 울산 균주에 비해 훨씬 높은 것으로 생각되었다. 이러한 결과를 보면 울산과 나주에서 채취한 검은별무늬병균은 hexaconazole에 대해 감수성이 크게 낮아졌거나 저항성균이 고빈도로 존재하는 것으로 추정되었다.

배나무 묘목에 EBI를 처리한 직후 개별과수원에서 채취한 병원균의 균주 집단을 인공 접종한 결과, 감수성 저하 또는 저항성 균주의 존재가 확실하며, 일부의 과수원에서는 hexaconazole이나 flusilazole의 처리는 무처리보다 더 높은 발병을 보였으므로 그러한 과수원에서는 이들 약제를 사용하면 병이 더 심해질 수 있는 것으로 나타났다.

EBI는 그 화학적 구조에 의해 4개의 균으로 대별되는데(Fuchs 등, 1983), 이 실험에서 사용한 5종의 EBI 중 fenarimol만 pyrimidine계이고 나머지 4약제는 모두 triazole계이며 이들의 작용 기작은 어느 것이나 ergosterol 합성 과정에서 24-methyldehydrolanosterol의 14 α -methyl기의 이탈을 저해 하는 DMI이다(Ragsdale, 1977). 그런데 DMI는 대부분 교차저항성을 나타내는 것으로 알려져 있는데(Barug와 Kerkenaar, 1984; Leroux 등, 1988; Thind 등, 1986.) 이 실험에서 4종의 DMI는 과수원에 따라 또 지역에 따라 복잡한 저항성 보였다. U10과 U13에서는 hexaconazole과 flusilazole의 처리에 의해 100% 또는 근접한 발병율을 보여 이들 약제는 교차저항성을 나타내는 것처럼 보였다. 그러나 N5에서는 hexaconazole 처리에

의해 100% 발병을 보였지만 flusilazole 처리에 의해서는 발병이 완전히 억제되었으므로 두 약제의 저항성 발현기작은 다른 것으로 생각되었다. 또 나주지방에서는 difenoconazole, fluquinconazole, flusilazole의 3종은 상당히 비슷한 경향을 보였고, 특히 N5에서는 이들 3종은 발병을 완전히 억제되었다는 점으로 본다면 교차저항성의 가능성이 높은 것으로 생각되었다. 그러나 울산의 경우 이들 3종이 거의 비슷한 경향을 보였으나 U10과 U13에서는 flusilazole은 100%의 발병을 보여 difenoconazole이나 fluquinconazole과 차이를 보였다. 이러한 점으로 본다면 이들 4종의 DMI가 교차저항성을 나타낸다고 보기는 어려운 것으로 생각되었다.

지금까지 밝혀진 EBI에 대한 저항성 기작은 에너지 의존형 유출계의 증대로 인한 EBI의 균체내 축적량의 감소(De Ward와 Nistelrooy, 1988)와 C-14 demethylase 및 Δ^{14} -reductase의 결실(Barug와 Kerkenaar, 1984)로 인한 정상적인 ergosterol의 합성을 저해하는 것으로 알려져 있다. 그런데 EBI에 대한 저항성 균주는 in vitro에서는 쉽게 출현하지만 이들 균주는 자연 상태에서 생존이 어렵고(Barug와 Kerkenaar 1984), 또 저항성유전자가 polygene이므로 저항성이 발현되기 위해서는 유전자의 집적이 일어나야 하는데 이들 유전자는 자연 상태에서의 적응성과 관련된 병원성 또는 포자형성 등의 형질에 대해 부의 효과를 미치므로 저항성을 획득한 균이 자연조건에서 생존하기 어려운 것으로 보고되어 있다(Kalamarakis 등, 1991). 그러나 밀폐된 환경에서 triadimefon, triflumizole, bitertanol 및 fenarimol을 일정 기간 동안 연속 살포한 결과 triadimefon의 흰가루병에 대한 감수성이 현저하게 저하되었고, triforine에 대해서도 교차저항성이 확인되었다(Ohtsuka 등, 1988). 이러한 점으로 본다면 EBI의 과도한 사용은 선택압을 증가시켜 저항성균 또는 감수성 저하균의 밀도를 높일 수 있는 것으로 생각된다.

따라서 울산과 나주의 일부 과수원에서 발견된 hexaconazole이나 flusilazole에 대한 저항성은 이들 EBI의 과도한 사용에 따른 저항성균의 밀도 증가로 판단되었다.

요 약

우리나라의 대부분의 배 재배 농가에서는 검은별무늬병과 붉은별무늬병의 방제를 위해 저항성 발달위험이 높은 EBI를 빈번하게 사용해 왔다. 검은별무늬병이 상습적으로 발생하고 EBI를 오랫동안 사용해 온 울산과 나주에서 검은별무늬병균을 채취하여 difenoconazole, fluquinconazole, flusilazole, fenarimol 및 hexaconazole의 5종 EBI에 대한

감수성을 검정했다. EBI를 함유하는 배지상에서 EC₅₀ 값이 base-line의 평균값 보다 크게 높아진 균주가 산발적으로 발견되었으므로 감수성 저하 또는 저항성 균주가 분포하는 것으로 추정되었다. 그런데 포트에 재배한 배나무 묘목에 5종의 EBI를 권장사용농도로 살포하고 3시간 동안 풍건시킨 후, 울산과 나주에서 채취한 포자를 직접 인공 접종한 결과, 울산의 5필지 중 3필지와 나주의 4필지 모두에서 채취한 균은 hexaconazole을 처리한 나무에서 무처리보다 더 높은 이병엽율을 보였으므로 그들 포장에서 채취한 균주집단에는 이 약제에 대해 고도의 저항성을 갖는 것이 포함된 것으로 판단되었다. 또 울산의 두 과수원에서 채취한 균은 flusilazole에 대해서도 같은 반응을 보였으므로 역시 그 약제에 대해 저항성인 것으로 밝혀졌다.

감사의 글

이 연구는 농림부 농림기술개발사업(2-104044-03)으로 수행된 연구 결과의 일부임.

참고문헌

- Barug, D. and Kerkenaar, A. 1984. Resistance in mutagen-induced mutants of *Ustilago maydis* to fungicides which inhibit ergosterol biosynthesis. *Pestic. Sci.* 15: 78-84.
- 최세훈. 2005. 배 병해에 대한 약제방제 체계의 합리화. 경북대학교 석사논문.
- De Waard, M. A. and van Nistelrooy, J. G. M. 1988. Accumulation of SBI fungicides in wild-type and fenarimol-resistant isolates of *Penicillium italicum*. *Pestic. Sci.* 22: 371-382.
- 御園生 尹, 深津量榮. 1968. ナシ黒星病の傳染と 防除. 千葉農試研報 8: 42-52.
- Erkert, J. W., Sievert, J. R. and Ratnayake, M. 1994. Reduction of imazalil effectiveness against citrus green mold in California packing houses by resistant biotypes of *Penicillium digitatum*. *Plant Dis.* 78: 971-974.
- Fuchs, A., Davidse, L. C., de Waard, M. A. and de Wit, P. J. M. 1983. Contemplation and speculations on novel approaches in the control of fungal plant diseases. *Pestic. Sci.* 14: 272-293.
- Gubler, W. D., Ypema, H. L. Ouimette, D. G. and Bettiga, L. J. 1996. Occurrence of resistance in *Uncinular necator* to triadimefon, myclobutanil, and fenarimol in California grapevines. *Lant Dis.* 80: 902-909.
- 한국작물보호협회. 2009. 2009 농약 사용지침서.
- Ishii, H., Takeda, H., Nagamatsu, Y. and Nakashima, H. 1990. Sensitivity of the pear scab fungus (*Venturia nashicola*) to three ergosteril-biosynthesis-inhibiting fungicides. *Pestic. Sci.* 30: 405-413.
- Kalamarakis, A. E., Waard, M. A. Ziogas, B. N. and Georgopoulos, S. G. 1991. Resistance to fenarimol in *Nectria haematococca* var. *cucurbitae*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 40: 212-220.
- Köller, W., Wilcox, W. F., Barnard, J., Jones, A. L. and Braun, P. G. 1997. Detection and quantification of resistance of *Venturia inaequalis* populations to sterol demethylation inhibitors. *Phytopathology* 87: 184-190.
- Leroux, P., Gredt, M. and Bocda, P. 1988. Resistance to inhibitors of sterol biosynthesis in field isolates or laboratory strains of the eyespot pathogen *Pseudocercospora herpotrichoides*. *Pestic. Sci.* 23: 119-129.
- 梅本清作. 1993. ニホンナシ黒星病の發生生態と防除に関する研究. 千葉農試特報 22: 1-99.
- Ohtsuka, N., Sou, K., Amano, M., Nakazawa, Y. and Yamata, Y. 1988. Decreased sensitivity of cucumber powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) to ergosterol biosynthesis inhibitors. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 54: 629-632.
- 박영섭, 홍경희, 조영식, 서홍수, 김정배. 2003. 검은별무늬병에 저항성 품종 및 발생소장. 원예과학기술지 제21권 별호 II: 84
- Rasdale, N. N. 1977. Inhibition of lipid synthesis : In Antifungal compounds Vol. 2. Interaction in biological and ecological systems. eds by Siiegel, M. R. and Sisler, H. D. Marcel Dekker, Inc., New York. pp. 333-363.
- Shabi, E. 1991. Pear scab : In Compendium of apple and pear diseases. eds by Jones A. L. and Aldwinckle, H. S. APS, St Paul, MN. pp. 22-23.
- Thind, T. S., Clerjeau, M. and Olivier, J. M. 1986. First observation on resistance in *Venturia inaequalis* and *Guignardia bidwelii* to ergosterol-biosynthesis inhibitors in France. *Proc. 1986 Brit. Crop Prot. Conf.* 2: 491-498.
- Tomita, Y. and Ishii, H. 1998. Reduced Sensitivity to Fenarimol in Japanese Field Strains of *Venturia nashicola*. *Pestic. Sci.* 54: 150-156.