

청정 고추 재배를 위한 살균제 저항성 발현  
지도 작성과 저농약 방제 캘린더 확립

Monitoring for the Fungicide Resistance to  
Pepper Anthracnose Pathogen and  
Development of Fungicide Application  
Schedule for Controlling Pepper Anthracnose

연구기관

충북대학교  
농업생명환경대학

농림부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “청정 고추 재배를 위한 살균제 저항성 발현 지도 작성과 저농약 방제 캘린더 확립” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005 년 11 월 일

주관연구기관명 : 충북대학교

총괄연구책임자 : 김 흥 태

연 구 원 : 강 범 관

연 구 원 : 박 성 우

연 구 원 : 민 지 영

연 구 원 : 김 윤 식

연 구 원 : 정 해 연

연 구 원 : 조 인 준

위탁연구기관명 : 충북농업기술원

협동연구책임자 : 황 종 택

연 구 원 : 강 효 중

# 요 약 문

## I. 제 목

청정 고추 재배를 위한 살균제 저항성 발현 지도 작성과 저농약 방제 캘린더 확립

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 연구개발의 목적

포장에서 살균제에 대한 고추 탄저병균의 저항성 발현 정도를 모니터링하여 전국적인 저항성 지도를 작성하고, 실제 포장에서 저농약 사용으로 고추 탄저병을 방제할 수 있는 방제력을 작성하고자 한다.

### 2. 연구개발의 필요성

#### 가. 연구의 배경

1) 고추는 재배 작물 중에서 총 생산액이 가장 높다(미곡류 제외).

2000년의 농업 총 생산액은 31조8289억만원에 달하였다. 그 중 74.6%에 해당하는 23조7465억원이 경종에 해당한다. 경종 부문에서도 단연 높은 작물은 미곡류이지만, 채소류의 총생산액도 6조7242억원으로 경종 생산액의 28.3%를 차지하며 두 번째로 높은 생산액을 보이고 있다(그림 1).

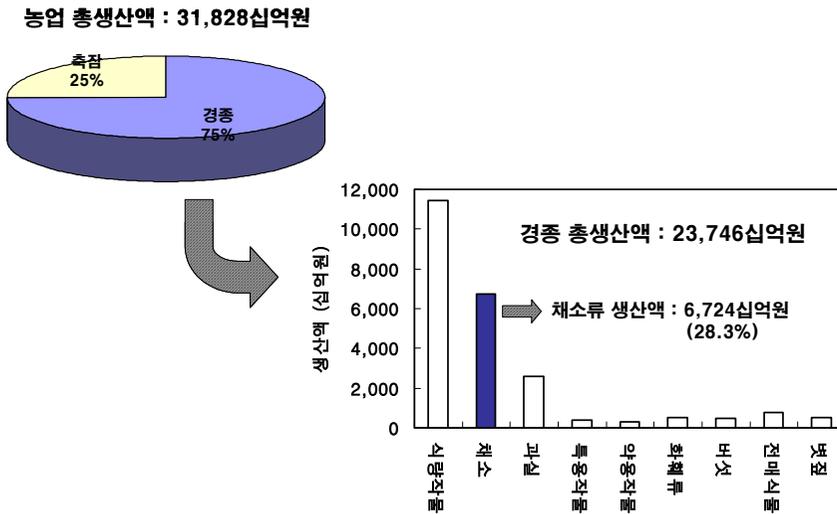


그림 1 농업 총생산액 및 경종 작물의 총 생산액

채소류는 표 1에서와 같이 엽채류, 과채류, 근채류, 조미채소, 양채류 등으로 나눌 수 있다. 이 중 고추가 속하는 조미채소는 채소류 총생산액의 34.7%에 해당하는 2조3355억원의 생산액을 보인다. 조미채소는 생산액뿐만 아니라 재배 면적에서도 16만7816 ha로 채소류 총 재배 면적 35만3725 ha의 47.4%를 점유하고 있다.

표 1 채소류의 생산액

	생산액 (십억원)	비율 (%)
엽채류	1,017	15.1
과채류	2,806	41.7
근채류	518	7.7
조미채류	2,336	34.7
양채류	46	0.7
총액	6,724	

조미채소에는 고추, 마늘, 파, 양파, 생강 등이 있는데, 그 중 고추는 재배 면적 8만130 ha, 총 생산액 1조438억6천만원으로, 조미채소 전체의 47.7%와 44.7%를 점유하고 있다. 또한 고추는 국내에서 재배하는 모든 작물 중에서 미곡류를 제외하고 그 생산량이 가장 큰 작물로 보고되어 있다(표 2).

표 2 각 작물 별 총 생산액 (2002년) (단위, 십억원)

작 물 명	생 산 액
고추	1,043
감귤	633
수박	559
배추	520
포도	513
사과	497
풋고추	466
딸기	430
엽연초	422
참외	420
파	401

이처럼 고추는 생산액과 재배면적으로 보더라도 국내의 생산 작물 중에서 그 중요도가 높은 작물이다. 특히 충청지역에서는 2000년 전국의 고추 재배 면적인 8만130 ha의 14.7%를 차지하며, 총생산량의 9.8%에 해당하는 38,500 t을 생산하고 있다. 그러나 충청지역은 총 고추 재배면적인 11,742 ha에서 시설 재배지를 제외한 노지의 면적이 11,547 ha인 98.3%에 달하는 특수한 구조를 보인다. 노지 재배하는 고추의 면적만을 계산한다면 경북지역 다음으로 넓은 면적으로 15.5%를 차지하며, 생산량도 전국의 노지 재배 고추의 18.2%인 35,321 t을 기록하고 있다.

**2) 고추 탄저병은 고추 열매에 발생하기 때문에 고추의 수확량에 직접적으로 영향을 미치며, 발생 즉시 방제 대책이 강구되어지는 중요한 식물병이다.**

농촌진흥청에서 1996년부터 1998년까지 3년간 실시한 “농작물병해충조사사업보고서”에 의하면 표 3에서 보는 바와 같이 매년 평균 45 - 60%의 이병과율

을 보이고 있다. 고추 탄저병은 농촌진흥청 발생 등급에 따르면 발견 즉시 방제 대책이 강구되어지는 가장 높은 등급인 9 등급에 해당하는 것으로, 탄저병에 의한 고추의 정확한 생산량 감소율에 대한 조사는 없지만 고추 재배에 있어서 치명적인 식물병임을 알 수 있다.

표 3 전국적인 고추 탄저병 발생 실태

년 도	지 역	시 기	발생등급	이병과율(%)
1996	인천, 김포	10. 9 - 10. 25	9	20 - 100
1997	홍천, 강화	8. 26	9	30 - 80
1998	전국	8월 - 9월	9	10 - 80

1998년 충북 지역에서 시기 별로 탄저병의 발생 정도를 조사한 결과, 충북 지역의 탄저병은 7월초부터 발생하기 시작하여 고추의 수확기인 8월 말과 9월에 심하게 발생하는 것으로 보고되어 있다. 이처럼 고추 탄저병은 고추의 수확기에 심하게 발생하여 고추의 수확량에 큰 피해를 주고 있다.

### 3) 고추 탄저병의 방제는 살균제를 사용하는 화학적 방제 방법에 의존하고 있다.

고추 탄저병의 방제는 대부분 살균제를 사용하는 화학적 방제가 수행되고 있다. 최근 미생물을 이용하는 생물학적 방제를 수행하고자 하는 연구가 진행되고 있지만, 아직까지 뚜렷한 결과를 얻고 있지는 못하다.

국내에 등록된 고추 탄저병 방제용 살균제는 혼합제를 포함하여 14개 품목이 등록되어 있다. 국내의 2000년의 살균제 시장은 3,376억원이었는데, 이 중 24.4%인 약 823억원이 탄저병의 방제에 사용되는 살균제의 시장으로 보고되어 있다. 물론 이 탄저병 살균제가 모두 고추에 사용되지는 않았으리라고 예상하지만, 다른 작물의 탄저병 방제용으로는 등록되어 있으나 고추에 대해서는 등록되지 않은 살균제는 모두 제외한 통계자료이기 때문에 신빙성이 높을 것으로 생각한다.

### 4) 2001년 충북 지역에서 분리한 고추 탄저병균은 등록되어 사용되는 몇 종류의 살균제에 대하여 저항성을 보였다.

본 실험실에서는 2001년 9월부터 10월에 걸쳐서 주로 충북 지역의 고추 재배지에서 탄저병에 감염된 고추를 채집한 후 병원균을 분리하였다. 분리한 탄저

병균을 다시 단포자 분리하여 총 374개의 균주를 확보하였다(그림 2). 확보한 균주는 국내에서 고추 탄저병의 방제에 사용하는 14개의 살균제를 대상으로 저항성 발현 여부를 검정하였다. 확보한 374 균주 중에서 benomyl에 대하여 감수성 반응을 보인 균주는 단 2 균주만 있었을 뿐 372개의 균주는 모두 benomyl에 대하여 저항성을 보이고 있었다(그림 3). 탄저병의 방제에 사용하는 다른 살균제들에 대한 탄저병균의 반응도 매우 다양하게 나타나며, 경우에 따라서는 높은 저항성을 보이는 균주들이 확인되었다. 탄저병의 방제에 사용하는 살균제에 대하여 병원균이 저항성 반응을 보인다는 사실은 매우 중요한 사항이며, 계속 주목하며 지속적으로 조사해야 하는 사건이다. 사용하는 살균제의 효율을 극대화하고 농가의 생산비를 절약하며 농촌 경제에 공헌하기 위해서라도 저항성 발현에 대한 검정이 필요한 시기가 되었다고 생각한다.

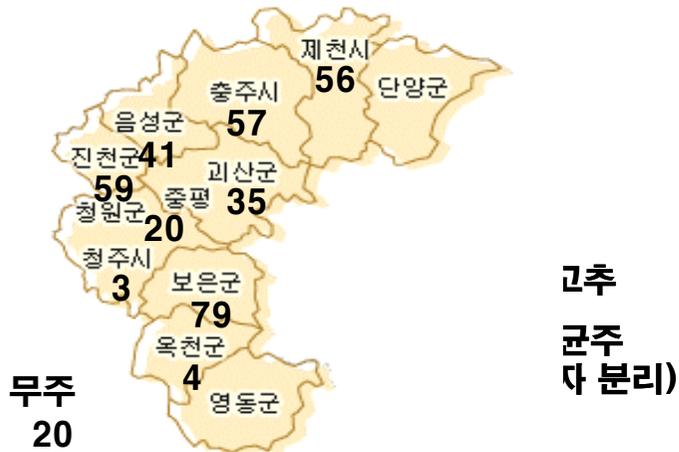
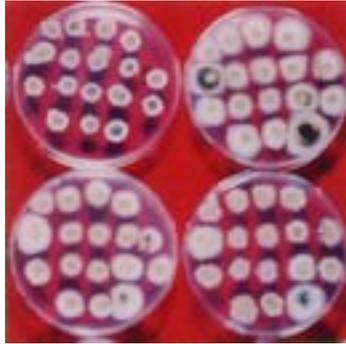
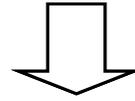


그림 2 2001년 고추 탄저병균 분리 현황 (충북 지역)



## 500 ppm Benomyl 첨가 PDA 배지



**372 개 균주의 MIC : > 500 ppm**

그림 3 Benomyl에 대한 저항성 검정

### 나. 연구개발의 필요성

#### 1) 기술적 측면

○ 사용하는 살균제의 저항성 모니터링이 수행되지 않고 있음.

⇒ 저항성 지도 작성의 필요성이 높음.

- 현재 사용되는 살균제의 저항성 모니터링 결과의 부재로 살균제의 효과를 정확하게 예측하거나, 효과의 감소에 대한 원인을 찾기가 어려움

- 효율적인 살균제의 시용이 이루어지고 있지 못함.

- 농약의 오용과 남용을 조장할 여지가 높음.

○ 다수의 균주에 대한 저항성을 모니터링하기 위한 대량 검정 시스템의 확립이 필요함.

- 정확한 저항성의 모니터링을 위해서는 넓은 지역에서 채집한 다수의 균주를 사용하여 실험을 수행하여야 함.

- 다수의 균주를 빠르고 효율적으로 모니터링할 수 있는 시스템의 확립이 요망됨.

○ 살균제의 효과와 특성을 조사할 수 있는 실험실 내의 실험 방법과 온실에서의 실험 방법을 표준화할 필요가 있음.

- 고추 탄저병의 주요 병원균인 *Colletotrichum gloeosporioides*는 고추 생육 후기에 고추 열매를 침입하는 병원균으로서, 잎이나 줄기에는 발병되지 않음.

- 따라서 유묘기의 고추를 이용한 살균제의 효과 검정이 어려움.

- 실제 포장에서 살균제의 효과 검정을 위한 스크리닝 단계가 온실 실험에서 필요하기 때문에, 정확한 방법의 표준화가 필요함.

○ **고추 탄저병 방제를 위한 포장 방제력의 부재.**

- 살균제의 오용과 남용을 줄이기 위해서 효과적인 방제력의 작성이 필요함.

**2) 경제·산업적 측면**

○ **고추의 생산비를 줄임으로써 농가의 경쟁력을 높여야 할 필요가 있음.**

- 농업경영비의 7.7%는 농약비로, 농기구비와 농지임차료 다음으로 높은 비율을 차지하고 있다.
- 현장에서 농민들은 연구 기관의 지도나, 다양한 전문 서적을 통한 지식에 의해서 탄저병 방제용 살균제를 선별하지 않고, 대부분 관행적인 살균제의 처리나 농약상이 추천하는 약제의 처리에 의존하고 있기 때문에 오용되거나 남용되는 살균제의 양이 많음.  
⇒ 농가의 고추 생산비 중에서 농약비의 비중이 높아가는 원인의 하나임. → 생산비 증가에 따라 농가의 경쟁력 하락
- 정확한 병의 원인과 살균제에 대한 병원균의 감수성 정도를 알고서, 정확한 살균제를 처방하여 처리한다면 고추의 생산비를 줄이며 농가 경쟁력 향상에 기여할 수 있음.  
⇒ 단순히 농약비만을 절약할 수 있는 것이 아니라 오용이나 남용되는 농약의 처리에 소요되는 노력비도 절약할 수 있음.

○ **농약 제조 회사들의 경쟁력있는 발전 방향의 수립이 필요함.**

- 세계적인 농약 회사들은 서로의 합병을 통하여 농약 전체 시장의 판도를 매년 바꾸고 있음.
- 국내의 농약 제조 회사들도 외국 기업에 합병되는 회사의 수가 증가하면서, 어쩔 수 없이 국제적인 경쟁 사회에 뛰어들게 되었음.
- 국내의 농약 시장에서 외국회사들과의 경쟁에서 이기기 위해서는 국내의 현장 상황에 대한 정확한 파악과 예측이 필요함.
- 농약 제조 회사의 제품 생산 계획과 시장 결정에 도움을 줄 수 있음.

**3) 사회·문화적 측면**

○ **청정 먹거리에 대한 소비자들의 요구 증가**

- 현대 농업이나 농약의 사용 목적은 안전한 농산물의 생산과 병해충에 대한 종합적 관리에 있음.
- 저농약 처리에 의한 청정 고추의 생산이 필요함.

○ **국민 보건 향상을 위한 주변 환경 조성이 필요함.**

- 노지 고추 재배 면적이 넓은 충북 지역에서는 특히 불필요하거나 과다한 살균제의 시용이 지양되어야함.
- 국민 건강 향상을 위하여 쾌적하고 안전한 생태 환경 조성이 필요함.

- 농약의 오용과 남용으로 인한 환경 오염의 방지 프로그램이 필요함.
  - 고추의 저농약 재배가 필요함.
  - 고추 탄저병균의 살균제 저항성 지도의 작성과 병 방제 칼런더 작성을 통하여 농약의 오용과 남용을 줄일 수 있음.
  - 살균제의 사용량과 횟수를 줄이고도 우수한 병방제 효과를 기대할 수 있음.
  - 살균제 사용량을 감소시킴으로써 해서 토양 중 농약 잔류나 생물 농축 등으로 인해서 야기될 수 있는 환경 문제의 해결 방안이 필요한 시기임.

### III. 연구개발 내용 및 범위

#### 1. 연구개발 목표와 내용

##### 가. 고추 탄저병의 살균제 저항성에 대한 전국적인 지도 작성

- 전국적으로 탄저병균의 균주 확보 :  
각 도별로 100 균주씩의 탄저병 균주를 단포자 분리를 통하여 확보함.
- 발병 시기에 따른 탄저병균 수집 (충북 지역) :
- 한천 희석 방법을 사용하여 분리한 균주들의 EC<sub>50</sub>(균사 생육 50% 억제 농도)과 MIC(Minimum Inhibition Concentration, 최소 억제 농도) 값 조사
- “고속 대량 저항성 검정법”의 확립 :  
많은 수의 탄저병균 균주의 살균제에 대한 저항성 발현 여부를 조사하기 위하여 96-well microtiter와 MTT를 사용하는 고속 대량 검정법 확립
- 저항성 발현 조사 대상 살균제
  - 보호용 살균제 :  
Dithianon, Chlorothalonil, Iminoctadine, Propineb, Mancozeb
  - Benzimidazole계 : Benomyl, Carbendazim, Thiophanate-methyl
  - Ergosterol 생합성 저해 살균제 :  
Myclobutanil, Hexaconazole, Tebuconazole, Nuarimol, Prochloraz

##### 나. 표준화된 효과 검정 체계 확립

- 실험실 내의 효과 검정 :  
96-well microtiter 사용 → 포자 발아 및 균사 성장 억제 효과 조사

한천 희석법 → 균사 생장 억제 효과 조사

- 온실에서 효과 검정
  - o 고추 열매와 유묘를 이용한 검정법
  - o 성체 식물을 이용한 검정법

#### 다. 저농약 사용 방제 체제 확립

- 포장에서 살균제의 치료 및 예방 효과 검정
  - 치료 효과와 예방 효과를 갖는 살균제를 구분하여 처리함.
- 포장에서 살균제의 지속성 조사
- 살균제의 특성을 고려하여 가능성 있는 고추 탄저병 방제력을 설계함.

## 2. 연차별 연구개발 목표와 내용

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (02 - 03)	-고속 대량 저항성 검정법 개발 -전국적인 저항성 모니터링 및 발병 시기에 따른 탄저병 채집 -포장검정	·96-well microtiter와 MTT를 이용한 방법 ·7월부터 10월까지 매달 병원균 분리 ; 중복으로 국한하여 실시 ·모니터링 대상 살균제 : Benzimidazole계 EBI, 보호용 살균제 ·살균제의 치료 및 예방 효과 실험 ·실험 살균제 : EBI, Benzimidazole계, MOA계 Plant activator, 보호용 살균제
2차 년도 (03 - 04)	-저항성 모니터링 -실험실 및 온실 검정법 표준화 -저농약 처리를 위한 방제력의 구성과 포장 실험	·전국적으로 저항성 모니터링 : 지역별, 시기별 고속대량 저항성 검정법을 이용한 신속한 검정 ·96-well microtiter, 고추 유묘, 고추 열매, 성체 식물을 이용한 검정법의 표준화 ·살균제들의 특성 조사에 사용 ·온실 실험에서 조사한 특성을 포장에서 확인 ·포장에서의 지속 효과 조사
3차 년도 (04 - 05)	-저항성 모니터링 -포장 실험	·전국적인 저항성 지도 완성 - 지역에 따른 저항성 발현 지도의 작성 - 탄저병 발생 시기에 따른 저항성 발현 양상의 비교 ·저농약 사용 방제력 완성 - 다양한 특성을 지닌 살균제의 교호 처리를 통한 저농약 방제력 완성

## IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

### 1. 연구개발 결과

#### 가. 고추 탄저병균의 동정

1) 고추에서 분리한 탄저병균은 간상형의 곧은 분생포자를 만들며, 군사생육도 30℃보다는 25℃에서 더 빠른 것으로 나타났으며, 25℃에서의 군사의 성장속도도 6.7 - 8.1 mm/일로서 사과나 딸기에서 분리한 탄저병균보다 느렸다. 배지에서의 균총의 색은 대부분 회색이었다.

2) 고추에서 분리한 JC24 균주는 녹광 고추에 대해서 상처접종과 무상처접종 모두에서 강한 병원성을 나타내었다.

3) 고추에서 분리한 대부분의 균주들은 benzimidazole계 살균제에 대해서 비감수성 반응을 보였다.

4) 이상의 형태적인, 그리고 군사 성장과 살균제에 대한 감수성 반응 등을 통해서 고추에서 탄저병을 일으키며, 1999년부터 2005년까지 탄저병의 병반에서 단포자 분리하여 얻은 대부분의 균주들은 *Colletotrichum acutatum*으로 동정되었다.

#### 나. 탄저병균 종간의 살균제에 대한 반응

2002년에 고추에서 분리한 *C. acutatum*과 *C. gloeosporioides*, *C. coccodes*, *C. dematium* 그리고 사과와 딸기에서 분리한 *C. gloeosporioides*를 선발하여 실험에 사용하였다.

1) *C. acutatum*과 *C. coccodes*는 benzimidazole계 살균제에 대해서 비감수성이었다. 또한 역상관 교차 저항성 관계가 있다고 하는 *N*-phenylcarbamate계 살균제와의 사이에서도 전혀 역상관 교차 저항성 현상을 발견하지 못하였다.

2) 보호용 살균제로 알려져 있는 iminoctadine, dithianone, chlorothalonil, propineb 등의 *C. acutatum*과 *C. gloeosporioides*에 대한 군사 성장 억제 효과를 비교하여 보면, *C. acutatum*이 *C. gloeosporioides*보다 감수성이 떨어지는

결과를 얻었다.

3) Ergosterol 생합성 저해 살균제는 모든 종의 *Colletotrichum*에 대해서 비슷한 균사 생장 억제 효과를 보였다.

#### **다. 고추 탄저병균의 포자 발아와 부착, 균사의 생장에 미치는 화합물의 활성 검정법 확립**

식물병원균이 기주식물을 침입하기 위해서는 포자가 기주식물의 표피에 부착한 후, 발아하고, 균사가 자라 식물체 내에 정착할 수 있어야 한다. 식물병을 방제하기 위한 전략의 하나로 새로운 살균제를 개발하거나, 기존 살균제의 새로운 특성을 검정하기 위해서는 특별한 검정 시스템의 확립과, 그 검정을 대량으로 실시할 수 있는 체제의 확립이 필요하다.

1) 본 연구에서는 96-well microtiter plate를 이용하여 고추 탄저병균 분생포자의 부착, 발아 그리고 균사 생장을 대량으로 측정할 수 있는 방법을 확립하였다.

2) 96-well microtiter plate에서 1일간 배양한 균주는 MTT용액을 12시간 처리하고, 다시 propanoldyddor을 1시간 처리한 후, 595 nm에서의 흡광도를 조사하였다.

#### **라. 고추 탄저병균, *C. acutatum* JC24의 침입 구조 형성에 영향을 미치는 요인**

1) JC24의 분생포자는 cellophane막 상에서 포자 발아, 부착기 형성, 부착기의 멜라닌화가, Gel-bond의 소수성과 친수성 면보다도 왕성하게 일어났다.

2) 분생포자의 농도는  $1 \times 10^6$  개/ml일 때 발아율과 부착기 형성율, 부착기의 멜라닌화 등이 가장 높았다.

3) 배양 온도는 19°C의 낮은 온도에서는 세 가지의 침입 구조 형성율이 22, 25, 28°C보다 저조하였으며, 22, 25, 28°C에서는 차이가 없었다.

4) PDA 배지에서 7 - 14일간 배양한 JC24를 사용하는 것이 가장 양호한 결과를 얻을 수 있었다.

5) JC24의 분생포자는 영양분이 있는 상태에서는 부생적인 생활을 하여 많은

분생포자를 만들었다.

#### 마. 고추 탄저병의 방제에 사용되는 다양한 살균제의 특성

##### 1) Cellophane막 상에서의 살균제의 효과

보호용 살균제인 chlorothalonil과 BTH와 mancozeb의 혼합제인 Bion-M은 분생포자의 발아를 크게 억제하였다. Trifloxystrobin은 약간의 포자발아 억제 효과만을 보였다, 분생포자의 생성억제 효과는 없었다. 하지만 tebuconazole은 포자의 발아율은 억제하지 못하였지만, 새로운 포자의 형성을 억제하였다. 포자 발아관의 신장은 trifloxystrobin, tebuconazole 등에서 모두 확인할 수 있었다.

##### 2) 고추 열매에서의 효과

고추 열매를 이용하여 실험실에서 살균제의 효과를 조사한 결과, 살균제의 종류에 관계없이 병 방제 효과를 얻지 못하였다. 결국 살균제의 효과와 특성을 조사하기 위해서 실험실에서 고추 열매를 이용하여 수행하는 실험은 적절하지 못한 방법으로 생각한다.

##### 3) 온실에서의 효과 실험

Trifloxystrobin과 BTH의 혼합제가 우수한 병 방제 효과를 보였다.

#### 바. 포장 방제력의 작성

1) 포장에서의 반비가림 재배는 고추 재배 후기까지도 병 방제 효과가 우수하였다.

2) 대부분의 살균제는 7 - 10일 간격의 처리가 효과적이었으나, tebuconazole의 경우에는 14 - 20일 간격의 처리도 고추 생육 초기와 중기에는 7 - 10일보다 동일하거나 우수한 효과를 보였다.

3) 고추 탄저병의 방제에는 정식기부터 개화기까지의 처리와, 발병 직전후의 처리가 가장 중요하였다.

4) 확립한 살균제 처리 system(CBNU system)을 충북 청주, 괴산, 음성 그리고 경북 영양에서 실험한 결과, 각각 76.7, 59.6, 60.6, 83.6%의 효과를 보였다. 이러한 결과는 대조 살균제보다 우수하거나 동등한 결과로서, 고추 탄저병

방제에 중요한 정보를 제공할 것으로 생각한다.

#### 사. Ergosterol 생합성 저해(EBI) 살균제에 대한 저항성

*Colletotrichum gloeosporioides* 2001-45는 hexaconazole, tebuconazole, myclobutanol, nuarimol과 같은 EBI 살균제에 대해서 교차 저항성을 보였다. 그러나 ergosterol의 생합성을 저해하는 동일한 기작을 지닌 prochloraz와는 교차 저항성이 인정되지 못하였다. 또한 2001-45는 *C. gloeosporioides* 2001-44와 *C. acutatum* JC24와 비교하여 보았을 때, 포자 형성량이 매우 저조하여 포장에서의 적응력이 떨어질 것으로 예상된다.

#### 아. 고추 탄저병균의 살균제 모니터링

1999년의 분리 균주와 2002년의 균주를 비교할 때, 보호용 살균제에 대한 감수성 반응은 상승하고, EBI 살균제에 대한 감수성 반응은 감소하고 있었다. EBI 살균제에 대한 감수성 반응 저하는 2003년과 2004년 균주를 비교하여도 동일하게 나타났다.

#### 자. Benzothiadiazole(BTH)에 의한 탄저병 방제 효과

BTH와 mancozeb의 혼합제는 정식기에 유묘 침지와 토양관주를 통하여 탄저병의 발생을 7월하순부터 8월 초, 중순까지 억제하는 효과를 보였다. 이러한 결과는 CBNU system을 확립하는데 유용하게 이용하고 있다.

## 2. 활용에 대한 건의

고추 탄저병은 고추의 생산을 가장 크게 저해하는 중요한 식물병이다. 고추의 생산을 저해하는 또 다른 병으로 역병을 들 수 있지만, 역병은 저항성 품종의 개발, 접목 재배의 실용화 등을 통해서 어느 정도의 방제가 가능한 병이다. 그러나 고추 탄저병은 아직 저항성 품종이 개발되지 못하였으며, 특별하게 실용화된 방제법이 없는 실정이다. 그러다보니 살균제를 사용하는 화학적 방제법이 가장 효과적이며 실용적인 방법으로 현장에서 사용되고 있다. 하지만 살균제의 정확한

이해와 방제력이 부재한 상태에서 농민들의 경험과 비전문가의 조언을 통하여 살균제의 처리가 이루어진다면 포장에서 빛는 농약의 문제는 심각하게 우리에게 다시 돌아올 수 있을 것이다.

따라서 본 연구에서는 병원균의 전국적인 고추 포장에서의 살균제에 대한 저항성 발현을 조사하고, 지역별 저항성 지도를 작성하고자 하였으며, 탄저병을 효과적으로 방제할 수 있는 방제력을 작성하고자 하였다. 병원균의 살균제에 대한 저항성 모니터링은 계속적으로 지속해야하는 과제이며, 본 연구를 통해서 고추 탄저병균들이 benzimidazole계 살균제에 대해서 비감수성임과, EBI 살균제들에 대한 고추 탄저병균의 감수성이 저하하며, 점점 저항성화되어 가고 있는 결과를 얻었다. 이러한 결과는 각 지역 고추 단지의 고추 농가들의 교육이나 지역농림기술센터나 농업기술원 등을 통하여 현장에 적극적으로 적용될 수 있는 영농활용 자료로 이용되었으면 한다. 이러한 자료를 통하여 농가는 농업 생산액을 절약할 수 있으며, 청정 고추의 생산을 통하여 부가가치를 높일 수 있을 것으로 생각한다. 또한 농약의 사용을 최대한으로 억제하면서도 병 발생을 효과적으로 억제하여, 농약이 사회나, 환경에 있어서 갖는 역기능을 해소할 수 있을 것으로 기대한다.

# Summary

## (영문요약문)

### Mornitoring for the Fungicide Resistance to Pepper Anthracnose Pathogen and Development of Fungicide Application Schedule for Controlling Pepper Anthracnose

The genus *Colletotrichum* contains an extremely diverse number of fungi including both plant pathogens and saprophytes. Isolates of *Colletotrichum* spp. infect a wide range of crops causing disease commonly known as anthracnose disease in more than 197 species of plants including crops, weeds, and trees. In Korea, especially, this fungal pathogen causes serious diseases on pepper, strawberry, grapevine and apple. Several species of *Colletotrichum*, *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. dematium*, and *C. coccodes*, were known to have the ability to cause the disease on the pepper plants. Among those species, *C. gloeosporioides* was reported to be the major pathogen in Korean pepper fields. Recent surveys, however, suggested that the population in the fields has changed from *C. gloeosporioides* to *C. acutatum*. In reality, the pathogen isolates collected in years 2001 and 2002 were identified to be *C. acutatum*, based on the responses to benomyl and the cultural characteristics. Until now the continuous outbreak of pepper anthracnose resulted in the decrease of pepper product. Thus, it is very important to identify the major pathogen of pepper anthracnose for the early diagnosis and the management of its pathogens in the fields. And it is very important to develop the fungicide application system and to draw resistance map of *Colletotrichum* spp. to fungicides for controlling the disease.

1. In Korea, the major pathogen of pepper anthracnose was appeared to be *Colletotrichum acutatum*. *C. acutatum* was characterized by slow growth at 25°C and the insensitivity to benzimidazoles.

2. With benzimidazoles, *C. acutatum* and *C. coccodes* showed the insensitive reaction, whereas *C. gloeosporioides* and *C. dematium* was sensitive at very low concentration of the fungicides. Especially, *C. acutatum* also showed the low sensitivity to protective fungicides, such as iminoctadine, propineb, chlorothalonil, and dithianon. Against ergosterol biosynthesis inhibiting

fungicides, however, all the species of *Colletotrichum* were sensitive.

3. High throughput screening system was developed to assess the fungicide activity to adhesion, germination and mycelial growth of conidia of *C. acutatum* JC24 by using 96-well micrititer plate method.

4. Appressorium is very important structure for plant pathogenic fungi to infect host plants, of which the formation is determined by several factors. In the case of *C. acutatum* JC24, they were effective on appressorium formation, such as substrate membrane, spore concentration, spore age, and incubation temperature. Not only appressorium formation but also spore germination and melanization of appressorium were affected by above factors.

5. To assess fungicidal activities, it were conducted by using the cellophane membrane and detached fruits of pepper in the laboratory, and the adult plant of pepper in a greenhouse. On the cellophane membrane, tebuconazole inhibited the conidia formation, but it could not inhibit conidia germination. However, while trifloxystrobin showed a low activity against conidia germination, it could not do conidia formation, *vice versa*. Protective fungicide, such as chlorothalonil and the nixture BTH and mancozeb, inhibited conidia germination specifically. Detached fruits of pepper could not be used for assessing fungicide activities in the laboratory. Using adult plants of pepper cultivated in a greenhouse, it was possible to investigate fungicide activities precisely, which were almost same as them done in a field.

6. It was developed the fungicide application system (CBNU system) for controlling pepper anthracnose. CBNU system was composed by 4 times of fungicide application, which were conducted at transplanting period, flowering period, the right that day before and after infection of pathogen in a field, and disease developing period. CBNU system was confirmed in pepper fields located in Cheongju, Geosan and Umseong of Chungbuk, and Youngyang of Gyueongbuk in 2005. In each fields, good controlling activity was obtained against pepper anthracnose, compared with commercialized fungicides.

7. It was found the resistant isolate of *C. gloeosporioides* 2001-44 to ergosterol biosynthesis inhibiting (EBI) fungicide. It showed cross resistance to other EBI fungicides. However, it showed the low fitness in the field, because of the decrease of conidia formation.

8. In 1999 and 2002, 130 and 258 isolates of *Colletotrichum* spp. causing red pepper anthracnose were obtained from infected red pepper fruits, respectively. Their responses to 4 protective and 3 ergosterol biosynthesis-inhibiting (EBI) fungicides were investigated by observing their mycelial growth on PDA incorporated with different concentrations of each fungicide. The *Colletotrichum* isolates obtained in 1999 showed higher  $EC_{50}$  values than those isolated in 2002 against three protective fungicides such as dithianon, chlorothalonil, and propineb, whereas the response was reversed toward other protective fungicide, iminoctadine. On the other hand, the isolates of year 1999 were more resistant against three EBI fungicides such as tebuconazole, hexaconazole, and prochloraz than those of year 2002; the  $EC_{50}$  values of the former were 1.2 - 4.4 times higher than those of the latter. The responses of the *Colletotrichum* isolates toward protective and EBI fungicides were fluctuated according to regions, where the infected fruits were collected. On the other hand, the resistance of *Colletotrichum* isolates to protective fungicides increased during monitoring from July to September. However, their responses towards EBI fungicides were not changed.

9. BTH could delay the development of pepper anthracnose by the application of seedling deeping and soil drenching until middle of August.

# CONTENTS

## (영문목차)

Chapter 1 Overview of the research project -----	1
Chapter 2 Current status of the technique development -----	8
Chapter 3 Research contents and results -----	12
I. Research contents -----	12
1. Isolation of pathogen -----	12
2. Identification of <i>Colletotrichum</i> spp.-----	13
3. Sensitivity of <i>Colletotrichum</i> spp. to fungicides -----	15
4. Development of assay method for assessing the specific activity of fungicides -----	17
5. Factors affecting on the infection structure of <i>Colletotrichum</i> <i>acutatum</i> JC24 -----	19
6. Specific activity of fungicides using the control of pepper anthracnose -----	21
7. Development of application schedule of fungicides -----	24
8. Resistant isolate of <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> to ergosterol biosynthesis inhibiting fungicide and its field fitness -----	29
9. Monitoring for fungicide resistance in <i>Colletotrichum acutatum</i> -	32
10. Controlling effect of Benzothiadiazole (BTH) -----	34
II. Research results -----	37
1. Identification of pepper anthracnose pathogen -----	37
2. Fungicidal reaction of <i>Colletotrichum</i> spp. -----	46
3. Development of assay method for assessing the specific activity of fungicides -----	56
4. Factors affecting on the infection structure of <i>Colletotrichum</i> <i>acutatum</i> JC24 -----	69
5. Specific activity of fungicides using the control of pepper anthracnose -----	81
6. Development of application schedule of fungicides -----	85
7. Resistant isolate of <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> to ergosterol biosynthesis inhibiting fungicide and its field fitness -----	96
8. Monitoring for fungicide resistance in <i>Colletotrichum acutatum</i> -	105
9. Controlling effect of Benzothiadiazole (BTH) -----	125

Chapter 4. Degree of accomplishment of the object -----	130
Chapter 5. Application plan of the results -----	131
Chapter 6. Reference -----	132

# 목 차

제1장 연구개발의 개요 -----	1
제2장 국내외 기술 현황 -----	8
제3장 연구개발 수행 내용 및 결과 -----	12
제1절 연구개발 수행 내용 -----	12
1. 병원균의 채집 및 분리 -----	12
2. 탄저병균의 동정 -----	13
3. 탄저병균의 종에 따른 살균제에 대한 감수성 조사 -----	15
4. 고추 탄저병균의 포자 발아와 부착, 균사 생장에 미치는 화합물의 활성 검정법 확립 및 살균제의 효과 -----	17
5. 고추 탄저병균, <i>Colletotrichum acutatum</i> JC24의 침입 구조 형성에 미치는 영향 -----	19
6. 고추 탄저병균의 방제에 사용되는 다양한 살균제의 작용 특성 ---	21
7. 고추 탄저병에 대한 포장 방제력 작성 -----	24
8. 고추에서 분리한 탄저병균의 스테롤 생합성 저해 살균제에 대 한 감수성 반응과 포장 적응력 -----	29
9. 고추 탄저병균의 살균제 저항성 모니터링 -----	32
10. Benzothiadiazole(BTH)의 토양 처리에 의한 고추 탄저병 방제 효과 -----	34
제2절 연구개발 결과 -----	37
1. 고추 탄저병균의 동정 -----	37
2. 탄저병균 종간의 살균제에 대한 반응 -----	46
3. 고추 탄저병균의 포자 발아와 부착, 균사 생장에 미치는 화합물의 활성 검정법 확립 및 살균제의 효과 -----	56
4. 고추 탄저병균, <i>Colletotrichum acutatum</i> JC24의 침입 구조 형성에 미치는 영향 -----	69
5. 고추 탄저병의 방제에 사용되는 다양한 살균제의 작용 특성 -----	81
6. 고추 탄저병에 대한 포장 방제력 작성 -----	85
7. Ergosterol 생합성 저해 살균제에 대한 고추 탄저병균의 반응과 저항성균의 포장 적응력 -----	96
8. 고추 탄저병균의 살균제 모니터링 -----	105
9. Benzothiadiazole의 고추 탄저병 방제 효과 -----	125

제4장 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도 -----	130
제5장 연구개발결과의 활용계획 -----	131
제6장 참고문헌 -----	132

## 제 1 장 연구개발의 개요

고추의 원산지는 멕시코일대로 알려져 있으며, Columbus에 의해 1493년 스페인으로 전해졌다. 고추는 후추보다 맵고 색깔이 붉은 후추(red pepper)라는 뜻으로, 아시아에는 서양문물이 들어오는 시기인 중국에는 17세기경, 일본에는 16세기경 전파되었다고 알려져 있다. 우리 나라에는 1614년(광해군6년)에 일본으로부터 도입되었다고 알려져 있다. 이렇게 전파된 고추는 고온성 작물로서 한반도 전역에 쉽게 퍼져나갔고 우리의 품종으로 개량되어 지금은 그 품종만 약 100여종에 이르게 되었다고 알려져 있다. 국내에서 고추는 단일 작물로는 벼를 제외한 생산과 소비가 가장 많은 채소 작물로 재배 면적이 75,754ha로 전체 채소 재배면적의 20% 이상을 차지하는 중요한 양념채소이다. 고추에 발생하는 병해에는 26종 정도가 보고되어 있는데(한국식물병리학회지, 1998), 고추 탄저병과 역병은 고추 재배에 있어서 심각한 피해를 주는 가장 중요한 병해이다. 고추 탄저병은 온난하고 비가 많을 때와 수확기에 접어들면서 많이 발생하는 병으로 지역에 따라 10~100%의 높은 이병과율을 보이며, 대부분 고추 열매 발생하여 품질 저해와 생산량 감소에 직접적으로 피해를 주는 병해이다(그림 4).

*Colletotrichum*은 주로 열대, 아열대와 온대 지역에서 발생하며, 곡류, 두류, 채소류, 과수 등 넓은 기주에 침입하여 탄저병을 일으키는 병해이다. *Colletotrichum*속에는 39종이 보고 되어 있으나, 실제로는 약 900여종이 존재할 것이라고 알려져 있다(Freeman 등, 1996). *Colletotrichum*에 의한 탄저병은 잎, 줄기, 과실 등에 발생하는데, 특히 과실에 발생하는 것에 의해서 심각한 피해가 발생한다. 정 등(1992)은 유자에서 분리한 유자 탄저병과 감귤 탄저병은 *C. gloeosporioides*로 동일한 병원균에 의해 발병한다고 보고하였는데 유자 탄저병균은 감귤 잎에도 상처 접촉에 의해 감염된다고 발표하였다. Freeman 등(1998)은 almond와 mango에 탄저병을 일으키는 것은 *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*등 2종의 탄저병균이 관여하다고 발표하였고, 커피(Derso 등, 2002), 박

과류(Freeman 등, 1988), 고추(박 등, 1992; Hadden 등, 1986), 토마토(Freeman 등, 1988) 등도 여러 종의 탄저병균에 동시에 침입을 받는다고 하였다. Denoyes 등(1995)은 딸기의 탄저병이 *C. fragariae*, *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* 등 3종의 탄저병균에 의해서 발병한다고 보고하였다. 박 등(1996)은 난 탄저병균은 *C. gloeosporioides*와 *C. coccodes*에 의해 발병한다고 보고되었다. 이와 같이 *Colletotrichum*은 하나의 종이 여러 기주를 침입하거나 한 기주에 여러 종이 침입하는 특성을 보이고 있었다. Adaskaveg 등(1997)과 박 등(1996)은 탄저병균의 benomyl에 대한 감수성 반응을 조사한 결과 *C. gloeosporioides*와 *C. acutatum*은 각각 감수성과 비감수성 반응을 보인다고 보고하였다. Ishii 등(1998)도 *C. acutatum*은 benomyl과 diethofencarb에 대한 반응에서도 모두 비감수성을 보인다고 하였고, *C. gloeosporioides*는 두 살균제에 대하여 역상관 교차 저항성을 보여 탄저병균의 종간에 살균제에 대한 반응에 차이가 있다고 보고하였다. 이처럼 동일한 기주를 여러 종의 *Colletotrichum*이 침입하여 탄저병을 일으키고, 또한 *Colletotrichum*의 종간에 살균제에 대한 반응의 차이를 보이기 때문에 탄저병균의 효과적인 방제를 위해서는 정확한 동정이 필요하다고 생각된다.

Sutton(1980)은 분생포자의 형태와 크기, 강모의 유무, 균핵 형성 유무, 부착기의 형태 및 분생포자 발아과정의 특징, 그리고 기타 배양적 특성, 기주범위 및 병원성 등의 차이에 따라 탄저병균을 동정하였다(Freeman 등, 1998). 그러나 Adaskaveg 등(1997)은 같은 종내에서도 종간에서도 분생포자의 크기를 가지고 탄저병균을 분류하는 것은 어려우며, 배지나 기질에 따라 같은 균주도 크기와 모양이 다르게 형성되고, 강모의 형성도 일관성이 없게 형성되기 때문에 탄저병균의 형태적인 특징은 분류의 정확한 기준이 될 수 없다고 보고하였다. 따라서 최근에는 PCR(Polymerase Chain Reaction), rDNA의 분석, RFLP, RAPD 등과 같은 분자생물학적인 방법을 이용하여 *Colletotrichum*의 동정 및 집단 변동에 대한 연구가 수행되고 있다. Adaskaveg 등(1997)과 Ishii 등(1998)은 *C. acutatum*과 *C. gloeosporioides*의 rDNA의 ITS(Internal Transcribed Spacer)영역을 PCR한 후, 종 특이적 primer를 사용하여 두 종의 *Colletotrichum*을 분류 할 수 있었다. Freeman 등(1998)은 ap-PCR(arbitrarily primed PCR), rDNA 분석,

mt(mitochondrial)DNA 분석, A+T-rich DNA 분석 등을 이용하여 *C. acutatum*, *C. gloeosporioides*, *C. fragariae*, *C. coccodes*, *C. kahawae*, *C. magna*, *C. orbiculare* 등을 동정하였다. 이처럼 최근에는 탄저병을 일으키는 *Colletotrichum* spp.의 동정이 형태적인 방법만으로는 한계가 따르기 때문에 분자생물학적인 기법을 이용하여 수행되고 있다.

국내 고추 탄저병균의 동정은 박 등(1992)이 고추에서 분리한 탄저병균을 아래와 같이 형태적인 특징을 비교하여 탄저병균을 분류하였다.

- 1. 포자 형태 원통형(cylindric)----- 2
- 1. 포자 형태 낫형(falcate) ----- *C. dematium*
  - 2. 자낭 세대(완전 세대) 있음----- *G. cingulata*
  - 2. 자낭 세대(완전 세대) 없음 ----- 3
    - 3. 강모 및 균핵 있음, 대부분 유묘에 발생 -----*C. coccodes*
    - 3. 강모 및 균핵 없음 ----- 4
      - 4. 병원성 약함, 포자는 짧고 끝이 뾰족함 ----- *C. acutatum*
      - 4. 병원성 강함, 포자는 길고 끝이 둥글다 ----- *C. gloeosporioides*

박 등(1992)은 고추에 탄저병을 일으키는 병원균으로 *C. gloeosporioides*, *C. dematium*, *C. coccodes*, *C. acutatum*, *G. cingulata* 등 5종이 포장에서 분리되었으며, 90%이상의 병원균이 *C. gloeosporioides*로 동정되었다고 발표하였다. 김 등(1992)은 딸기에서 분리한 탄저병균을 포자의 모양(타원형이며 끝이 둥글거나 좁은 모양)과 크기(평균 16.0 × 5.0μm), 적정 온도(26 ~ 28℃)를 완전 세대 유무 등을 조사하여 *C. gloeosporioides*(완전세대 : *G. cingulata*)로 동정하였다. 정 등(1992)은 유자 탄저병균을 포자의 모양(양끝이 둥글며 원통형) 및 크기(14.4~19.0 × 4.6~6.0), 균핵 형성(PDA배지에 다량 형성), 부착기의 모양, 적정온도(25~30℃), 병원성(상처에서만 발병) 등을 조사하여 *C. gloeosporioides*로 동정하였다. 한 등(1995)은 콩, 팥 및 녹두에서 분리한 탄저병균을 분생포자의 모양 및 크기, 강모 및 균핵의 형성 유무, 균사 생장율, 부착기의 모양 및 크기, 병원성

등을 조사하여 콩에는 *C. truncatum*, *C. destructivum* 및 *C. gloeosporioides*가 분리되었고, 팥에서는 *C. destructivum* 및 *C. frifolii*, 녹두에서는 *C. truncatum* 및 *C. gloeosporioides*가 각각 분리되었다고 보고하였다. 박 등(1996)은 난에서 분리한 탄저병균을 형태적 특성(Sutton과 비교), 병원성(무상처에서만 발병), 적정 온도(25℃), benomyl에 대한 반응(감수성)등을 조사하여 *C. gloeosporioides*로 동정하였다. 이 외에도 국내에서는 맥문동, 시클라멘, 소리쟁이의 탄저병균이 *C. liliacearum*, *C. gloeosporioides* 등으로 동정하였다(이두형 등, 1997; 김주희 등, 1997; 김병섭 등, 1998). 그러나 지금까지 국내의 탄저병균 동정은 모두가 형태적인 특징을 기준으로 동정하였기 때문에 정확한 탄저병균의 동정이 수행되었다고 보기에는 문제가 있었다.

국외의 탄저병균의 동정은 Beynon 등(1995)은 커피에서 분리한 탄저병균을 형태적 및 배양적 특징, 분생포자의 크기 및 모양, 균총색, 병원성 등을 비교하여 종을 구분하였으며, 정확한 종의 동정을 위하여 RFLP를 사용하여 *C. kahawae*, *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*으로 동정하였다. Adaskaveg 등(1997)은 *C. gloeosporioides*와 *C. acutatum*은 생육 적온이 각각 30℃와 25℃이었고, 적온에서의 성장율도 각각 일일당 10 mm이상과 10 mm이하로 차이를 보이고, benomyl에 대한 반응도 각각 감수성과 비감수성으로 구분되며 정확한 동정을 위하여 종 특이적 PCR 분석(Species-specific PCR)하여 동정하였다. Freeman 등(1998)은 여러 가지 기주에서 분리한 탄저병균을 균총색, 포자 크기 및 모양, 균사의 적정 온도 및 성장율, 유성세대의 유무 등을 이용하였으며, ap-PCR, rDNA 분석, mtDNA 분석, A+T-rich DNA 분석 등을 이용하여 정확한 동정을 수행하였다.

고추 탄저병의 방제를 위해서는 다양한 방법이 사용되고 있지만 효과적이면서 가장 실용적인 방법은 살균제를 이용하는 화학적 방법이다. 살균제는 작물재배에서 꼭 필요한 농업자재이지만, 현장에서는 남용과 오용에 따라 토양에서의 잔류, 인축 독성, 저항성균의 출현 등 여러 가지 문제점도 발생하고 있다. 국내에서도 다양한 살균제에 대하여 저항성인 식물병원균이 발생한 예가 많다. 이(1985)는 사과 푸른곰팡이병균(*Penicillium expansum*)의 살균제에 대한 저항성을 조사하

여 benomyl, carbendazim, thiophanate-methyl, polyoxin 등의 살균제에 대한 저항성은 낮으며, chlorothalonil, propineb, folpet 등의 살균제에 대한 저항성은 높다고 보고하였다. 이 등(1994)은 사과 겹무늬썩음병균(*Botryosphaeria dothidea*)의 benomyl에 대한 저항성 균주가 같은 계통의 carbendazim과 thiophanate-methyl에 대한 반응도 저항성으로 교차저항성을 보이며, captafol, captan, oxine-copper에 대한 반응도 저항성으로 이중저항성을 나타냈다고 보고하였다. 김 등(1995)은 채소 작물에서 분리한 잿빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*)을 서로 역상관 교차저항성을 보이는 것으로 알려진 benzimidazole계와 *N*-phenylcarbamate계 살균제에 대한 반응을 조사하여 1994년에 분리한 균주 중에서 상기 두 살균제에 대한 반응이 모두 저항성인 균주는 없었지만, 1995년에 분리한 균주 중에는 2.9%가 상기 두 살균제에 대해 모두 저항성 반응을 보이는 균주가 나타났다고 보고하였다. 또한 benzimidazole계 살균제에 대해 저항성 반응을 보이는 균주는 감수성 균주와 적응력(fitness)이 비슷하여 상기 살균제를 사용하지 않아도 밀도가 줄지 않는다는 것을 의미한다.

*N*-phenylcarbamate계 살균제인 diethofencarb는 benzimidazole계에 대한 반응이 저항성인 균에만 특이적으로 약효를 나타낸다는 것을 보고한 이래 benzimidazole계 살균제와 합제의 형태로 이용된 것이다. 그러나 이 합제를 먼저 사용하기 시작한 유럽 등지에서 저항성인 다중 저항성균의 출현이 보고되었다. 살균제에 대해서 저항성을 보이는 식물병원균 중에서는 포장에 대한 적응력이 높아서 병방제에 심각한 문제를 초래하는 경우가 있다. 오 등(1992)은 고추 역병균의 metalaxyl에 대한 감수성 정도를 조사하여 공시 약제에 대한 저항성균주는 10%이상 존재하며, 감수성 균주에 비해 적응성이 떨어지지 않으며 병원성은 감수성 균주보다는 강하였다고 하였으며, 이는 공시 약제를 자주 살포할 경우 저항성균이 우점종 될 가능성이 있을 것이라 보고하였다. 박 등(1992)은 딸기의 잿빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*)을 procymidone, vinclozolin과 benomyl등의 살균제에 대한 반응을 조사하여 저항성 균주의 비율이 각각 42%, 40%과 43%으로 높으며, procymidone 저항성 균주들은 감수성 균주에 비하여 적응성이 비슷하여 상기 약제의 사용에는 주의가 필요하다고 보고하였다. 임(2002)은 benzimidazole

계 살균제에 저항성인 잿빛무늬병균(*Monilinia fructicola*)은 감수성 균주와 비교하여 병원성, 계대 배양(16회), 저온 저장(4℃, 16주), 경합 실험 등에서 비슷한 결과를 보였다고 보고하였다. 이러한 이유 때문에 포장에서의 병원균 집단의 특성을 파악해야하는데 특히 방제를 위해서는 살균제 저항성에 대한 지속적인 모니터링이 필요하다.

본 연구의 목표는 고추에서 분리한 탄저병균과 그 외의 탄저병을 이용하여 고추 탄저병균의 동정을 재조명하고 포장에서 탄저병균의 밀도를 추정하고자 하였다. 또한 탄저병균의 종간에 살균제에 대한 반응이 차이가 있는지를 알아보고자 하였으며, 전국과 충북의 고추 재배지역에서 탄저병균을 분리하여 지역과 시기별로 살균제에 대한 반응을 모니터링하였다.



그림 4. 고추 탄저병의 전형적인 병징

본 연구개발 과제의 연구 범위는 다음과 같다.

#### 1. 탄저병균의 동정

- 가. 균사 생장 및 균총색
- 나. 분생포자의 모양 및 크기
- 다. 병원성
- 라. Benomyl에 대한 감수성 조사

2. *Colletotrichum*속 탄저병균 종 간의 살균제에 대한 반응
  - 가. Benzimidazole계 살균제에 대한 *Colletotrichum*속 탄저병균의 반응
  - 나. 보호용 살균제에 대한 반응
  - 다. Ergosterol 생합성 저해 살균제에 대한 반응
  
3. 고추 탄저병균의 포자 발아와 부착, 균사 생장에 미치는 살균제의 효과 검정 및 대량 검정법 확립
  - 가. MTT와 propanol의 처리가 병원균의 흡광도에 미치는 영향
  - 나. 접종한 포자 농도와 배양 시간이 흡광도에 미치는 영향
  - 다. 병원균의 기주 침입 단계의 특이적 형태에 대한 기존 살균제의 억제 효과
  
4. 고추 탄저병균, *Colletotrichum acutatum* JC24의 침입 구조 형성에 미치는 영향
  - 가. 분생포자가 부착하는 기질
  - 나. 분생포자의 농도가 미치는 영향
  - 다. 배양 온도가 미치는 영향
  - 라. 포자를 수확하는 *C. acutatum*의 배양 일수
  - 마. 영양분이 미치는 영향
  
5. 고추 탄저병의 방제에 사용되는 다양한 살균제의 작용 특성
  - 가. Cellophane막에서의 작용특성 조사
  - 나. 고추 열매를 이용한 실험실에서의 살균제의 병 방제 효과
  - 다. 온실에서의 살균제 방제 효과 실험
  
6. 고추 탄저병에 대한 포장 방제력 작성
  - 가. 골 피복과 반비가림의 고추 탄저병 방제 효과
  - 나. 살균제 처리 간격에 따른 병 방제 효과

- 다. 살균제 처리 조합에 따른 병 방제 효과
- 라. 고추 탄저병에 대한 충북대학교 방제력의 효과 검증

7. Ergosterol 생합성 저해 살균제에 대한 고추 탄저병균의 반응과 저항성균의 포장 적응력

- 가. 병원균 분리와 균사 생장 억제실험을 통한 균주 선발
- 나. 저항성균의 생리적 특성과 포장 적응성 실험

8. 고추 탄저병균의 살균제 모니터링

- 가. Chlorothalonil에 대한 고추 탄저병균의 감수성 변화
- 나. 보호용 살균제와 ergosterol 생합성 저해 살균제에 대한 고추 탄저병균의 저항성 모니터링

9. Benzothiadiazole의 고추 탄저병 방제 효과

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 1. 탄저병에 대한 국내 연구 (최근 10년의 결과)

탄저병의 병원균인 *Colletotrichum*은 여러 가지의 작물에 병을 일으키며 큰 피해를 미친다는 것으로 보고되어 있으나, 조미채소에 속하며 재배 면적이나 생산량에 있어서 중요한 채소인 고추는 국내에는 많은 연구가 수행되지 않았다. 모든 작물에서 수행된 국내의 탄저병 연구는 새로운 탄저병의 보고, 탄저병균의 생태적인 연구, 방제를 위한 예찰 체계, 병원성, 화학적 방제 등에서 수행되었다. 그러나 살균제에 대한 저항성의 연구나 저농약 사용을 위한 방제체계 확립을 위한 연구는 시도되지 않았다.

#### 가. 새로운 탄저병의 보고

표 4와 같이 유자, 딸기, 잔디, 난, 시클라멘, 맥문동, 소리쟁이 등에서 *Colletotrichum* spp.에 의한 탄저병이 보고되었다.

표 4. 국내에서 보고된 *Colletotrichum*에 의한 식물병

기주 식물	병원균	연구자	연구 연도
유자	<i>C. gloeosporioides</i>	정희정, 고영진	1992
딸기	<i>C. gloeosporioides</i>	김완규 등	1992
잔디	<i>C. graminicola</i>	김진원 등	1993
	<i>C. caudatum</i>		
	<i>C. truncatum</i>		
두과 작물	<i>C. destructivum</i>	한경숙, 이두형	1995
	<i>C. trifolii</i>		
	<i>C. gloeosporioides</i>		
난	<i>C. gloeosporioides</i>	박숙영 등	1996
시클라멘	<i>C. gloeosporioides</i>	김주희 등	1997
맥문동	<i>C. liliacearum</i>	이두형	1997
소리쟁이	<i>C. gloeosporioides</i>	김병섭 등	1998
땅콩	<i>C. gloeosporioides</i>	김주희 등	1998

#### 나. 고추 탄저병의 생태학적 연구

박과 김(1992)은 고추에서 탄저병을 일으키는 병원균을 *C. gloeosporioides*, *C. coccodes*, *C. dematium*, *C. acutatum* *G. cingulata* 등으로 동정하였으며, 각각의 병원균의 발생 현황을 조사하여 발표하였다. 박과 김에 의하면 고추 탄저병의 주된 병원균은 *C. gloeosporioides*로서 고추 열매에서 분리한 병원균의 90%이상이었다고 보고하였다.

#### 다. 예찰 체계 연구

고추와 포도 탄저병의 발생에 미치는 환경 요인을 통한 예찰 시스템 확립을 위한 연구가 진행되었다. 박 등(1992)은 일평균 기온과 식물체 표면의 수분 존재 시간을 이용하여 *C. gloeosporioides*의 포도 감염 가능성을 예고하는 RIPEROT라는 예찰 시스템을 개발하여 보고하였다. 김과 박 등(1988)은 고추에서 최고온도가 25℃를 넘어가는 누계치, 습도가 80% 이상을 넘어가는 누계치, 강우일 수의 누계치 등을 구하여 병 발생 주율을 예측하였다.

#### 라. 병원성 연구

탄저병균이 기주 식물을 침입할 때의 병태조직학적인 연구와 병원성에 관련된 효소 등이 보고되어 있다. 김과 이 등(1992)은 병원성과 관련이 있을 것으로 보고된 cutinase를 사과 탄저병균으로부터 분리 정제하여 그 생화학적 특성을 조사하여 보고하였다. 박 등(1988, 1989)은 고추가 성숙되면서 감수성에 변화가 나

타나는 현상을 생리적인 성질의 변화로 해석하고자 하였다. 또한 박과 김 등(1988)은 구기자 탄저병균인 *C. gloeosporioides*가 구기자에 보이는 감수성의 차이를 구기자의 형태적인 차이를 가지고서 설명하였다.

#### 마. 탄저병균의 분류

1987년에 박 등은 *C. gloeosporioides*, *C. dematium*, *Gloeosporium* 등을 esterase, leucine aminopeptidase, acid phosphatase 등을 가지고 분류하였으며, 특히 붉은 고추와 푸른 고추에 대한 병원성의 차이를 가지고서 *C. gloeosporioides*를 G strain과 R strain으로 분류하였다.

#### 바. 탄저병의 화학적 방제

김 등(2002)은 최근 딸기의 정식 후에 문제가 되는 탄저병의 방제를 위하여 azoxystrobin 등의 살균제를 사용하여 실험실과 포장에서 실험하였다. 그들은 포장에서 tricyclazole과 azoxystrobin의 효과가 우수하였다고 보고하였다.

#### 사. 탄저병균의 저항성 모니터링과 방제 체계 확립

미곡류를 제외한 작물 중에서 가장 큰 시장을 형성하는 고추의 탄저병에 대해서 살균제에 대한 저항성 모니터링이나 저농약 방제를 위한 방제 실험은 지금까지 수행된 바가 없다.

## 2. 국외의 연구 현황

#### 가. 탄저병균의 기주 다양성

o 단일 기주 식물에 서로 다른 탄저병균이 침입하고 있음

Howard 등(1992)은 딸기의 탄저병균을 *Colletotrichum fragariae*, *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* 등 세 가지의 탄저병균이 병을 유발하는 것으로 보고하였다. Almond의 경우도 *C. gloeosporioides*와 *C. acutatum*이 동시에 병을 일으킨다.

o 동일한 탄저병균이 다양한 기주 식물을 침입함.

위와는 반대로 동일한 한 종류의 탄저병균이 다양한 기주를 침입하는 보고도 있다. 한 종류의 탄저병균이 다양한 기주 식물을 침입하는 것은 매우 흔한 일로서 *C. gloeosporioides*는 almond, avocado, 사과, 딸기, 고추 등을 침입하는 다범성 병원균으로 보고되어 있다(Freeman 등, 1998).

#### 나. 탄저병균의 동정 및 특성 연구

o 전통적인 분류 및 특성 연구

과거에는 두 종류의 *Colletotrichum*을 분류하기 위해서 포자의 형태와 크기가 분류의 기준으로 사용되기도 하였지만, 최근에는 그 기준이 탄저병균을 분류하는 key로서 인정받지 못하고 있다. 따라서 배양기에서의 형태, 적정 생육 온도, 살균제인 benomyl에 대한 감수성 등의 특징을 조사하여 *Colletotrichum* spp.의 동정과 특성을 조사하고 있다. Smith와 Black(1990)은 딸기 탄저병균의 형태적, 배양적 변이와 병원성의 변화에 대해서 보고하면서, *C. acutatum*이 *C. gloeosporioides*보다 느리게 성장한다는 것을 보고하였다. Peres 등(2002)은 감귤에서 분리한 *Colletotrichum* spp.에 대하여 benomyl의 감수성 정도를 조사하였다. 1.0 µg/ml의 benomyl을 처리하였을 때 100% 생육이 억제되는 감수성을 보이는 탄저병균을 *C. gloeosporioides*, 비감수성인 탄저병균을 *C. acutatum*으로 보고하였다.

o 병원균 집단의 다양성 조사

- 기주의 특이성 조사

Alahakoon 등(1994)은 *C. gloeosporioides*의 열대 과일에 대한 병원성을 조사하여 유전적인 다양한 집단이 존재할 가능성을 보고하였다. 실제로 avocado, durian, mango에서 분리한 *C. gloeosporioides*의 병원성은 변이가 매우 크게 나타났지만, mangosteen과 pini jambu에서 분리한 병원균의 병원성은 매우 크게 나타났다. 이러한 기주 식물에 대한 동일한 탄저병균의 병원성의 차이와 변이는 포장에서의 형질이 다른 집단의 존재 가능성을 이야기한다.

- Vegetative compatibility grouping(VCG) 실험에 의한 다양성 조사

Katan과 Shabi(1996)는 VCG 실험을 통하여 almond에서 분리한 *C. gloeosporioides*과 avocado에서 분리한 병원균 간에는 친화성이 없음을, 즉 subspecific group으로 구별되어야 한다고 보고하였다. 반면에 Shabi 등(1996)은 almond에서 분리한 탄저병균의 *nit* 돌연변이를 이용한 실험에서 *C. gloeosporioides*과 *C. acutatum*은 하나의 VCG에 속한다고 보고하였다. 이러한 VCG 실험은 *Colletotrichum* 속의 종을 분류하는데 이용할 수는 없지만, 포장에서의 유전적 집단 연구에는 유용하게 사용하고 있다.

o 유전자 분석에 의한 *Colletotrichum* sp의 동정과 종간에서의 다양성 연구

다양한 분자 생물학적인 기술들이 발달하면서 *Colletotrichum*의 다양한 연구에도 rDNA 분석, nuclear DNA의 RFLP, A+T-rich DNA 분석, ap-PCR, RAPD 등의 방법들이 이용되고 있다. Freeman 등(1998)은 ap-PCR을 통해서 *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. fragariae*를 구별하였다. 이러한 분자생물학적 방법은 탄저병균의 분류뿐만 아니라 집단 변동에 대한 연구를 수행하는데도 매우 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각한다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 연구개발 수행 내용

#### 1. 병원균의 채집 및 분리

우리 나라 고추 재배지역에서 탄저병의 전형적인 증상을 보이는 이병 고추 열매로부터 탄저병균을 단포자 분리하여 실험에 사용하였다.

##### 가. 병반 채집

2001년 9, 10월과 2002년 7, 8, 9월에(5회) 충북의 고추 재배지역에서 서로간의 거리가 적어도 5km 이상 떨어진 29개(10개 시, 군) 지역을 선정하여 전형적인 탄저병 증상을 보이는 병반을 채집하였다. 또한, 2002년 10월에 각 도별로 적어도 10 km이상 떨어진 9-10지역을 선정하여 이병 고추 열매를 채집하였다. 채집 방법은 각각의 고추 재배지를 10개의 지역으로 등분한 다음, 등분별 전형적인 병징을 보이는 한 개의 이병 고추 열매를 채집하였다.

##### 나. 병원균 분리

채집한 고추 열매는 플라스틱 용기(200 × 250 × 70 mm, L×W×H)에 넣고 24시간 동안 25℃에 습실 처리하여 병반 위에 포자를 형성시켰다. 플라스틱 용기에는 2겹의 키친타월를 깔고 증류수 50 ml를 부어 습실을 유지하였다. 24시간 습실 처리한 후에 고추 열매에 형성된 분생포자를 긁어내어 살균증류수에 현탁하였다. 분생포자 수는 광학현미경으로 조사하였는데, 100~200 개/ml로 조정 한 후, 300  $\mu\text{g/ml}$ 의 streptomycin이 첨가된 PDA(sPDA)에 100  $\mu\text{l}$ 를 도말하여 25℃ 항온기에서 배양하였다. 2~3일 뒤 PDA에서 자라 나온 균사 끝을 떼어내어 PDA(potato dextrose agar, Difco)로 옮겨 25℃ 항온기에서 배양하였다.

##### 다. 균주의 보관

분리한 탄저병균의 균주들은 새로운 PDA에 접종하여 25℃의 암상태에서 7일간 배양하였다. 균총의 균사 선단에서 지름 5 mm의 균사 조각을 떼어내어 Cryotube™ Vials(직경; 12 mm, 높이; 48 mm, Nunc)에 5조각씩 넣고, 1 ml의 멸균증류수를 부어 보관 균주를 만들어 상온에서 보관하였다. 또한 장기 보관을 위해서 멸균증류수 대신에 5% DMSO(dimethyl sulfoxide)를 사용하여 -70℃에 보관하였다. 새로운 실험을 위해서는 보관하는 균주를 25℃의 PDA에서 배양하여 접종원으로 사용하였다.

#### 라. 기타 균주

사과 (10균주), 딸기 (10균주), 고추·감자 (각 1균주)에서 분리한 탄저병균을 각각 경북대학교, 논산딸기시험장, 농촌진흥청에서 분양 받아 상기한 것과 같은 방법으로 보관하면서 사용하였다. 1999년 전국의 고추 재배지에서 분리한 고추 탄저병균 130개는 서울대학교 농과대학 원예학과에서 분양 받았다.

## 2. 탄저병균의 동정

PDA에서 배양한 탄저병균의 균사 생장율, 분생포자의 크기, benzimidazole계 살균제에 대한 감수성 등의 특성을 Adaskaveg 등 (2000)과 Ishii 등(1998)의 결과와 비교하여 동정하였다. 실험에는 12개의 고추 탄저병균 균주, 10개의 사과 균주와 10개의 딸기 균주를 실험에 사용하였다.

#### 가. 균사 생장 및 균총색

PDA에서 3일 동안 자란 균총의 가장자리에서 떼어낸 지름 5 mm의 균사 조각을 PDA 배지에 올려놓고 25℃와 30℃의 암조건에서 5일간 배양하면서 3, 5일에 2회 균총의 지름을 측정하였다. 각각의 처리는 모두 3반복으로 실험하였다. 탄저병균을 접종한 PDA를 25℃의 암상태에서 7일간 배양하고 균총의 색깔은 배지 뒷면을 조사하였다. 각 배지당 3반복으로 조사하였다.

#### 나. 분생포자의 모양 및 크기

25℃, 암상태의 PDA에서 7일간 배양한 탄저병균의 plate에 20 ml에 멸균증류수를 붓고 멸균한 붓으로 긁어 분생포자의 현탁액을 만들었다. 현탁액은 4겹의 가제(cheeze close)에 걸러 균사와 한천 조각을 제거한 후, 포자 현탁액을 준비한다. 분생포자 현탁액은 400배의 광학 현미경에서 각 균주당 100개의 포자를 관찰하여 포자 모양과 크기를 조사하였다.

#### 다. 병원성

고추에서 분리한 JC24 균주를 PDA 배지에 접종하여 25℃ 암상태에서 7일간 배양한 후, 각각 20 ml의 멸균증류수를 병원균을 배양한 plate에 붓고 멸균한 붓으로 분생포자를 수확하여 현탁액을 만들었다. 분생포자 현탁액은 4겹의 가제(cheeze close)에 부어 균사조각을 제거하고, 분생포자 현탁액을 준비한다. 접종원의 분생포자 농도는 hemocytometer를 이용하여 광학현미경에서 분생포자의 수를 조사하여 현탁액의 농도를  $1 \times 10^6$  개/ml로 조정하였다. 고추(녹광)는 70% 메탄올로 표면을 세척하고 혈당측정계(ACCU-CHEK, Softclix<sup>R</sup>)를 이용하여 상처를 낸 후 5  $\mu$ l의 포자 현탁액을 점적하여 접종하였다. 동시에 준비한 분생포자 현탁액을 고추 열매에 흘러내릴 정도로 분무하여 고추 열매에 상처가 없을 때 병원균의 병원성을 조사하였다. 접종한 고추 열매는 플라스틱 용기에 넣고, 2주간 습실 상태로 25℃에서 보관하며 발병정도를 조사하였다.

#### 라. Benomyl에 대한 반응

PDA에 접종하여 25℃의 암상태에서 3일 동안 배양한 병원균의 균사 선단에서 직경 3 mm의 균사 조각을 떼내어 benomyl을 농도별로 첨가한 PDA 배지에 접종하였다. Benomyl(a. i. 96.1%, 원제)은 DMSO에 용해시켜 PDA 배지에서의 최종농도가 100, 10, 2, 1, 0.2, 0.1  $\mu$ g/ml가 되도록 희석하여 첨가하였으며, 모든 배지에서의 DMSO 농도는 1%가 되도록 조정하였다. 병원균을 접종한 PDA는 25℃의 암조건에서 7일간 배양한 후 아래 공식에 의해서 균사 생장 억제율을 구하였다.

$$\text{균사 성장 억제율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{살균제 배지에서의 균총의 지름}}{\text{무처리 배지에서의 균총의 지름}}\right) \times 100$$

### 3. 탄저병균의 종에 따른 살균제에 대한 감수성 조사

#### 가. 병원균 분리 및 사용한 균주

실험에는 고추, 사과, 딸기 등의 기주식물에서 단포자 분리한 *Colletotrichum coccodes*(2균주), *C. dematium*(6균주), *C. acutatum*(6균주), *C. gloeosporioides*(14균주) 등 4종의 탄저병균을 사용하였다. 고추에서 분리한 *C. gloeosporioides*와 *C. acutatum*은 고추 열매의 탄저병 병반에서 단포자 분리하여 실험에 사용하였다. 채집한 병든 고추 열매는 플라스틱 용기(200 × 250 × 70 mm, L×W×H)에 넣고 24시간 동안 25℃에 습실 처리하여 병반 위에 분생포자를 형성시켰다. 플라스틱 용기에는 2겹의 키친 타월을 깔고 증류수를 50 ml씩 부어 습실을 유지하였다. 고추 열매의 탄저병 병반 위에 형성된 분생포자를 긁어내어 살균 증류수에 현탁하였다. 분생포자 수는 hemacytometer를 이용하여 광학현미경 하에서 조사하면서, 포자의 농도를 약 100 개/ml로 조정하였다. 포자 현탁액은 300 µg/ml의 streptomycin이 첨가된 PDA(potato dextrose agar, Difco)에 100 µl를 도말하여 25℃ 항온기에서 배양하였다. 2~3일 후에 PDA에서 자라 나온 균사 끝을 떼어내어 새로운 PDA로 옮겨 25℃ 항온기에서 배양하였다. 사과와 딸기에서 분리한 탄저병균은 경북대학교와 논산의 딸기시험장으로부터 분양받아 실험에 사용하였다.

#### 나. 병원균의 균사 성장 및 균총색

PDA 배지에서 3일 동안 자란 균총의 가장자리에서 떼어낸 지름 5 mm의 균사 조각을 새로운 PDA 배지에 올려놓고 25℃와 30℃의 암조건에서 5일간 배양한 후에 균총의 직경을 측정하였다. 실험은 3반복으로 실시하였으며, 3회 실험한 결과 분석하였다. 탄저병균을 접종한 PDA 배지를 25℃의 암상태에서 14일간 배양하고 배지 뒷면에서의 균총의 색깔을 조사하였다.

#### 다. 실험에 사용한 살균제 및 살균제 배지 준비

고추 탄저병의 방제에 사용되는 10개의 살균제를 선발하여 실험에 사용하였다. Benzimidazole계 살균제 중에서는 benomyl(96.1%), carbendazim(90%), thiophanate-methyl(95% 이상)을 선발해서 사용하였으며, benzimidazole계와 N-phenylcarbamate계 살균제 사이의 역상관 교차 저항성을 조사하기 위하여 carbendazim과 diethofencarb의 혼합 수화제를 사용하였다. 보호용 살균제로는 dithianon(95% 이상), chlorothalonil(97%), propineb(93%) 등을 사용하였다. Ergosterol 생합성 저해(EBI) 살균제로는 tebuconazole(95% 이상), hexaconazole(92%), prochloraz(98.5%) 등을 선발하여 다양한 탄저병균인 *Colletotrichum* 속에 대한 감수성 정도를 조사하였다.

선발에 사용한 살균제의 원제는 DMSO에 용해시켜 적정 농도가 되게 PDA 배지에 희석하여 참가하였으며, 모든 배지에서의 DMSO 농도는 1%가 되도록 조정하였다. 병원균을 접종한 PDA는 25℃의 암조건에서 7일간 배양한 후 아래 공식에 의해서 균사 성장 억제율을 구하였다.

$$\text{균사 성장 억제율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{살균제 배지에서의 균총의 직경}}{\text{무처리 배지에서의 균총의 직경}}\right) \times 100$$

실험에 사용한 탄저병 균주들은 앞에서 기술한 10종의 살균제에 대한 균사 성장 억제 효과를 구하여 EC<sub>50</sub>값과 MIC값을 계산하였다.

#### 라. 병원균의 병원성 검정

실험에 사용한 *Colletotrichum* 균주들을 PDA 배지에 접종하여 25℃ 암상태에서 7일간 배양하였다. 각각 20 ml의 멸균증류수를 병원균을 배양한 plate에 붓고 멸균한 붓으로 분생포자를 수확하여 현탁액을 만들었다. 분생포자 현탁액은 4겹의 가제(cheeze close)에 부어 균사조각을 제거하고, 분생포자 현탁액을 준비한다. 접종원의 분생포자 농도는 hemocytometer를 이용하여 광학현미경에서 분생

포자 현탁액의 농도를  $1 \times 10^6$  개/ml로 조정하였다. 온실에서 재배한 고추(품종 : 녹광)의 열매는 70% 메탄올로 표면을 세척하고 혈당측정계(ACCU-CHEK, Softclix<sup>R</sup>)를 이용하여 상처를 낸 후 5  $\mu$ l의 포자 현탁액을 점적하여 접종하였다. 접종한 고추 열매는 플라스틱 용기에 넣고, 2주간 습실 상태로 25°C에서 보관하며 발병정도를 조사하였다.

#### 4. 고추 탄저병균의 포자 발아와 부착, 균사 생장에 미치는 화합물의 활성 검증법 확립 및 살균제의 효과

##### 가. 사용균주

2001년 충북 진천의 고추 재배지에서 탄저병에 심하게 감염된 고추를 채집하여 병원균을 분리하였다. 25°C에서 1일간 습실 처리한 이병 고추의 병반에서 형성된 분생포자를 단포자 분리하였으며, 이 균주를 JC24로 명명하였다. 분리한 탄저병균은 PDA(potato dextrose agar, Difco) 사면 배지에서 배양하여 4°C에서 보관하며 실험에 사용하였다.

##### 나. 접종원 준비

실험에 사용한 탄저병균 JC24의 포자를 수확하기 위하여 PDA에 접종하고 25°C의 암 상태에서 7일간 배양하였다. 병원균을 배양한 PDA 배지에 plate 당 1/10로 희석한 PDB(potato dextrose broth, Difco)를 20 ml씩 붓고, 멸균한 붓으로 포자를 수확한 후 거즈에 여과하여 균사체를 제거하였다. 현미경으로 포자 현탁액의 포자를 관찰하며  $1 \times 10^5$  개/ml로 포자의 농도를 조정하였다.

##### 다. 병원균의 생장 측정

수확한 JC24의 포자 현탁액( $1 \times 10^5$  개/ml)을 96 well microtiter plate(SPL Labware)의 한 well 당 90  $\mu$ l씩 접종하고, 25°C의 암 상태에서 24시간 배양하였다. 0.5 mg/ml의 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) 용액을 10  $\mu$ l씩 처리하고, 다시 25°C의 암 상태에서 12시간동안 배양하

였다. 배양 여액을 모두 제거하고 well 당 propanol을 100  $\mu$ l씩 분주한 후, 상온에서 1시간동안 보관하였다가 595 nm에서 흡광도를 조사하였다.

#### 라. 병원균의 흡광도에 미치는 탄저병원 포자 농도 및 MTT 첨가 효과

Microtiter plate에서 배양한 병원균의 흡광도를 측정할 때, MTT와 propanol을 처리하였을 때와 처리하지 않았을 때를 비교하였다. MTT와 propanol의 처리는 위에서 서술한 것과 동일하게 병원균을 24시간 배양하고 MTT를 12시간 처리한 다음, 1시간 동안 propanol을 처리하여 595 nm에서 흡광도를 조사하였다. 무처리구에서는 MTT와 propanol의 처리없이 병원균을 36시간 배양하여 595 nm에서 흡광도를 조사하였다. 또한 접종하는 포자의 농도와 병원균의 배양 시간이 병원균의 흡광도에 미치는 영향도 조사하였다. JC24의 포자 농도를  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  개/ml로 조절하여 microtiter plate에 접종하고, 12, 24, 36, 48 시간 동안 배양한 후, MTT를 12시간 처리하였다. MTT 용액을 세척한 후 propanol을 1시간 처리하고 595 nm에서 흡광도를 조사하였다.

#### 마. 탄저병원균의 기주 침입 초기 단계에 미치는 살균제의 특이적 억제 효과 조사

6종의 보호용 살균제와 6종의 스테릴 생합성 저해 살균제, 그리고 호흡을 저해하는 것으로 알려져 있는 kresoxim-methyl을 실험에 사용하였다. 실험용 살균제는 모두 원제를 사용하였으며, DMSO(dimethyl sulfoxide)에 용해시켜 병원균을 접종한 배지에 처리하였는데, DMSO의 최종 농도가 1%를 넘지 않도록 조절하였다. 사용한 살균제의 최종 농도는 100  $\mu$ g/ml부터 1/4씩 희석하여 0.02  $\mu$ g/ml까지 처리하였다.

포자농도를  $1 \times 10^5$  개/ml로 조정된 포자 현탁액을 microtiter plate에 99  $\mu$ l씩 접종하였다. 병원균의 포자를 접종함과 동시에 DMSO에 용해시킨 살균제를 1  $\mu$ l씩 처리하여, 병원균의 포자 발아에 미치는 효과를 조사하였다. 또 군사 생장 억제 효과만을 조사하기 위하여 병원균의 포자를 접종하고 25°C에서 6시간 배양한 후에 살균제를 처리하였다. 실험에 사용한 살균제가 병원균의 포자가 기주 식물

의 표면에 부착하는데 미치는 영향을 간접적으로 조사하기 위해서, 앞에서 서술한 것과 동일한 방법으로 microtiter plate에 접종한 병원균에 살균제를 처리하고 microtiter plate의 표면에 어느 정도 부착하는 지를 조사하였다. 살균제를 처리하고 25℃에서 2 시간동안 배양한 다음, microtiter plate를 1/10로 희석한 새로운 PDB로 2회 세척하였다. 다시 1/10로 희석한 PDB를 각 well 당 100  $\mu$ l씩 microtiter plate에 분주하고 25℃의 암상태에서 36시간 동안 배양하였다. 병원균의 성장 정도는 위에서 기술한 것과 같이 MTT와 propanol을 처리한 후, 흡광도를 측정하여 조사하였다.

각각의 실험에서 병원균의 포자 발아와 부착, 균사생장에 미치는 살균제의 억제율은 살균제 무처리구와 처리구의 흡광도를 다음의 식에 대입하여 구하였다.

$$\text{억제율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{살균제 처리구의 흡광도}}{\text{살균제 무처리구에서의 흡광도}}\right) \times 100$$

## 5. 고추 탄저병균, *Colletotrichum acutatum* JC24의 침입 구조 형성에 미치는 영향

### 가. 병원균의 보관 및 접종원 준비

고추 열매에 나타난 탄저병의 병반에서 단포자 분리하여 얻은 *C. acutatum* JC24는 25℃의 PDA 사면 배지에서 배양한 후, 4℃에서 보관하였다. 실험에 사용하기 위해서는 새로운 PDA에 접종하여 25℃에서 7일간 배양한 후, 다시 새로운 PDA의 동일한 조건에서 배양하여 실험에 사용하였다.

실험에는 *C. acutatum* JC24의 포자를 수확하여 사용하였다. JC24의 포자는 25℃의 PDA에서 7일간 배양한 배지에 살균증류수를 10 ml씩 붓고, 붓으로 배지를 긁어서 포자를 수확하였다. 포자의 현탁액에서 균사 조각을 제거하기 위해서 4겹의 cheese cloth로 여과하였으며, 3,000 x g로 2회 원심분리하면서 포자를 세척하였다. 현탁액에서의 포자의 농도는  $1 \times 10^6$  개/ml로 조절하였다.

#### 나. *Colletotrichum acutatum* JC24의 침입 구조 형성에 미치는 요인

탄저병균은 포자에 기주 식물체 표면에 전반하여 부착하게 되면 포자가 식물체를 침입하는데 필요한 구조를 형성하게 된다. 포자가 기질 표면에 부착하면 포자가 발아하고, 부착기를 형성하고, 부착기가 멜라닌화되는 일련의 과정을 거치게 된다. 이러한 포자 발아, 부착기 형성, 부착기의 멜라닌화, 분생포자의 형성이 부착하는 기질의 종류, 접종원에서의 분생포자의 농도, 배양 온도, 접종원의 배양 일수에 따라서 어떤 영향을 받는 지 조사하였다.

##### 1) 분생포자가 부착하는 기질

분생포자가 부착하는 인공적인 기질로는 소수성과 친수성의 표면을 모두 가지고 있는 gel bond와 cellophane막을 선발하여 실험에 사용하였다. Gel bond는 일정한 크기(2 x 2 cm)로 잘라서 소수성인 면과 친수성인 면을 모두 각각 실험에 사용하였다. Cellophane막 역시 gel bond와 동일한 크기로 잘라서 고압멸균하여 사용하였다. Petri dish(직경; 9 cm)에 한 장의 여과지를 깔고 살균 증류수를 5 ml씩 분주한 후, 동일한 크기로 자른 gel bond와 cellophane막을 여과지 위에 올려놓았다. Gel bond와 cellophane막 위에  $1 \times 10^6$  개/ml로 농도를 조절한 포자 현탁액을 60  $\mu$ l씩 점적하고, 25°C에서 배양하였다. *C. acutatum* JC24의 침입 구조인 포자 발아, 부착기 형성, 부착기의 멜라닌화는 한 개의 gel bond와 cellophane막에서 임의로 3곳을 정하여 각각에서 150개의 포자를 조사하였고, 각각의 gel bond와 cellophane막은 모두 3장씩 조사하였다. 직경보다 긴 발아관이 보일 때만 포자가 발아한 것으로 평가하였다.

##### 2) 분생포자의 농도가 미치는 영향

*C. acutatum* JC24를 25°C의 PDA에서 7일간 배양한 후, 본 실험의 서두에서 말한 것처럼 멸균 증류수를 이용하여 포자를 수확하고 포자현탁액을 준비한다. 이 때 포자 현탁액의 농도를  $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$  개/ml로 조절하였다. 바로 전의 실험에서와 동일하게 일정한 크기의 실험 기질에 각각의 농도로 조절한 포자 현탁액을 60  $\mu$ l씩 점적하여 고르게 묻게 도말하고 동일한 조건의 온도에서 배양하며 시간 별로 침입과정에서 나타나는 여러 가지의 분생포자의 구조를 조사하였다. 조사하는 방법은 위의 실험과 동일하였다.

### 3) 배양 온도가 미치는 영향

상기한 방법과 동일하게 수확하여 준비한 포자 현탁액의 농도를  $1 \times 10^6$  개/ml로 조절한 후, 습실처리하는 gel bond와 cellophane막의 조각에 60  $\mu$ l씩 접종하였다. 각각의 조각은 19, 22, 25, 28 $^{\circ}$ C에서 배양하며 정해진 시간에 침입 구조를 조사하였다.

### 4) *C. acutatum* JC24의 배양 일수가 미치는 영향

*C. acutatum* JC24를 25 $^{\circ}$ C의 PDA에서 7, 14, 21일간 배양한 후에 위의 실험과 동일한 방법으로 포자를 수확하여 포자 농도를  $1 \times 10^6$  개/ml로 조절하였다. 위의 실험과 마찬가지로 실험에 사용한 인공 기질의 표면에 접종하고 배양하면서 침입 구조를 관찰하였다.

### 5) 영양분이 미치는 영향

25 $^{\circ}$ C의 PDA에서 7일간 배양한 *C. acutatum* JC24의 포자를 수확할 때, 살균 증류수 대신에 PD broth를 사용하였다. 이 때 살균 증류수를 이용하여 PD broth를 1/9, 1/27, 1/81로 희석하였으며, 각각의 농도의 PD broth로 포자를 수확하여 포자 농도를  $1 \times 10^6$  개/ml로 조절하였다. 준비한 포자 현탁액은 cellophane막 상에 25  $\mu$ l씩 점적한 후, 25 $^{\circ}$ C에서 배양하며, cellophane막의 단위면적당 발아하지 않은 분생포자, 발아한 분생포자, 부착기를 형성한 분생포자, 멜라닌화된 부착기를 갖는 분생포자의 수를 조사하였다.

## 6. 고추 탄저병균의 방제에 사용되는 다양한 살균제의 작용 특성

고추 탄저병의 방제 살균제로 등록되어 있는 benomyl(a.i. 25% WP), chlorothalonil(a.i. 75% WP), tebuconazole(a.i. 25% WP), trifloxystrobin(a.i. 22% SC), bion-M(a.i. 49% WP), tricyclazole(a.i. 75% WP) 등을 선발하여 cellophane막을 이용하여 *in vitro*에서의 작용 특성을 조사하였다. 또한 고추 열매와 온실에서 재배한 성체 식물, 그리고 고추를 재배하는 포장에서 선발한 살균제의 효과를 조사하였다.

### 가. Cellophane막에서의 작용 특성 조사

*C. acutatum* JC24를 실험에 사용하였다. *C. acutatum* JC24를 25°C의 PDA에서 7일간 배양한 후, 살균증류수를 이용하여 분생포자를 수확하였다. 분생포자는 4 겹의 cheese cloth에 여과하여 균사 조각을 제거하고, 3,000 rpm으로 15분간 2회 원심분리하여 세척하였다. 분생포자의 현탁액에서 포자의 농도는  $1 \times 10^6$  개/ml로 조정하였다. 실험에 사용한 살균제는 증류수에 고르게 현탁하고, benomyl, bion-M, chlorothalonil은 최종농도가 650, 1,000, 1,650  $\mu\text{g/ml}$ 가 되도록 준비한 분생포자 현탁액에 첨가하였다. 세가지의 살균제 이외의 살균제는 모두 500  $\mu\text{g/ml}$ 로 분생포자 현탁액에서의 살균제의 최종농도를 조정하였다.

일정한 크기(2 x 2 cm)로 자른 cellophane막은 고압멸균한 후에 실험에 사용하였다. Petri dish에 직경 9 cm의 여과지를 깔고 적정량의 증류수를 부어 습도를 유지하였다. Cellophane막에는 살균제를 적정 농도로 처리한 분생포자의 현탁액을 25  $\mu\text{l}$ 씩 접종하고 25°C에서 시간별로 침입 과정에서 나타나는 구조를 관찰하였다. 하나의 cellophane막에서 150개의 포자를 관찰하였고, 모든 실험은 3반복으로 실시하였다. 동일한 실험을 3회 반복하여 실시한 후, 통계처리하였다.

#### 나. 고추 열매를 이용한 실험실에서의 살균제의 병방제 효과 조사

*C. acutatum* JC24를 25°C의 PDA에서 10일간 배양한 후에 분생포자를 수확하여  $5 \times 10^5$  개/ml와  $5 \times 10^6$  개/ml로 포자의 농도를 조정하였다. 온실에서 재배한 고추에서 열매(품종; 녹광)를 수확한 후, 1% sodium hypochloride 용액으로 3분간 세척하고, 다시 증류수로 세척한 후 풍건시켜 실험에 사용하였다. Benomyl(a.i. 25% WP), chlorothalonil(a.i. 75% WP), tebuconazole(a.i. 25% WP), trifloxystrobin(a.i. 22% SC), bion-M(a.i. 49% WP)을 포장 사용 농도(N)로부터 1/2로 희석하여  $2^{-3}$ 까지 희석한 농도( $1/8 * N$ )의 처리 용액을 만든 후, 풍건시킨 고추에 분무 처리하였다. 하루 동안 다시 풍건시킨 후, 상처 접종하였다. 고추(녹광)는 표면을 세척하고 혈당측정계(ACCU-CHEK, Softclix<sup>R</sup>)를 이용하여 상처를 내었다. 준비한 접종원을 paper disc(직경; 6 mm, 두께; 1 mm)에 20  $\mu\text{l}$ 씩 점적한 후, paper disc를 상처 위에 올려놓고 투명한 테이프로 붙여서 고정하였다. 접종한 고추는 포화 습도가 유지되는 플라스틱 상자에 넣어 25°C의 배양기

(light/dark : 12 hrs/12 hrs)에서 발병을 유도하였다. 병원균을 접종하고 10일 후에 접종 부위에서 발생한 병징의 크기를 조사하여 병 방제 효과를 구하였다.

#### 다. 온실에서 의 살균제의 병 방제 효과

온실에서 과중한 녹광 고추의 유묘를 대형 포트(직경; 25 cm, 높이; 20 cm)에 이식한 후, 온실에서 성체까지 재배하였다. 고추가 주당 10개 내외의 열매를 맺게 되었을 때 실험에 사용하였다. 실험에 사용한 살균제와 살균제의 처리 수준은 표 5에서 보는 바와 같다.

표 5. 실험에 사용한 살균제와 농도

살균제	처리 농도 (g/L)
Chlorothalonil	1.65
Benomyl	0.65
Tebuconazole	0.5
Trifloxystrobin	0.5
Benzothiadiazole+Mancozeb	1.0
Tricyclazole	0.5

준비한 살균제 용액은 고추의 성체 식물에 잎과 열매가 충분히 묻도록, 흐르기 직전까지 살포하였다. 살균제를 처리하고 2일 후에 PDA에서 수확하여 포자의 농도를  $5 \times 10^6$  개/ml로 조정된 접종원을 고추의 열매에 상처 접종하였다. 고추 성체 한 주당 약 10개의 열매에 혈당측정계(ACCU-CHEK, Softclix<sup>R</sup>)를 이용하여 상처를 내고 접종원을 25  $\mu$ l씩 처리한 paper disc를 상처 부위에 투명한 테이프를 사용하여 부착하였다. 접종한 고추는 포화 상태가 유지되는 비닐 chamber에 넣고 2일 동안 처리하였다. 이를 후부터는 낮에 비닐 chamber의 비닐을 걷어주었다. 병원균을 접종하고 일주일 후에 상처 부위에 부착했던 병원균을 묻힌 paper disc를 떼어내고 병반의 길이를 측정하였다. 병반의 길이는 병원균을 접종

하고 14일 후에도 다시 조사하였다. 살균제의 병방제 효과는 살균제 처리구에서의 병반의 길이와 무처리구에서의 병반의 길이를 비교하여 계산하였다.

병방제 효과(%) = (1-살균제 처리구의 병반 길이/무처리구의 병반 길이) x 100

## 7. 고추 탄저병에 대한 포장 방제력 작성

고추(품종 : 청풍명월) 유묘를 충북대학교 부속농장의 고추 포장에 5월 6일 포장에 정식하여 관행으로 재배하며, 반비가림 재배와 골피복에 의한 고추 탄저병 방제 효과를 조사하였다. 또한 충북과 경북의 농가 포장을 임대하여 살균제를 이용한 포장 방제력 확립을 위한 시험을 실시하였다.

### 가. 골 피복과 반가림 재배의 병 방제 효과

골 피복과 반비가림 재배의 탄저병 방제 효과 실험은 난피법 3반복으로 충북대학교 부속농장에서 실시하였다. 고추 유묘를 정식하고 바로 그림 5에서와 같이 골 피복을 실시하였다. 반비가림 재배는 고추의 개화기에 높이 50 cm의 봉을 세우고 비닐 지붕을 만들어 비가림 시설을 설치하였다. 고추가 자라남에 따라서 비가림하는 봉의 크기도 다시 1 m의 것으로 교체하였다. 병 조사는 각 고추 주당 전체 열매의 수와 병든 열매의 수를 조사하여 발병주율을 계산하여 비교하였는데, 7월 27일과 8월 26일에 각각 두 차례 실시하였다.



포장 전체 모습



무처리



골 피복



반 비가림

정식 직후(5월 6일) 포장 정경



포장 전체 모습



무처리



골 피복



반 비가림

1차 조사 후(8월 3일) 포장 정경

그림 5 골피복과 반 비가림에 의한 탄저병 방제효과 실험 포장의 모습

#### 나. 살균제 처리 간격에 따른 병방제 효과

2003년(1차)과 2005년(2차), 두 차례에 걸쳐서 살균제를 처리하는 기간에 따라서 방제 효과가 변화하는지를 조사하였다. 2003년에 실시한 1차 시험은 충북대학교 부속농장에서, 그리고 2005년에 실시한 2차 시험은 충북 음성군 대소면에 위치한 음성시설농업시험장의 고추 포장에서 실시하였다. 1차 시험에서는 chlorothalonil, tebuconazole, trifloxystrobin, benomyl 등 4종의 살균제를 사용하였으며, 7, 10, 14일 간격으로 모두 4회 처리하였다. 포장에서의 병조사는 7일 간격으로 처리하는 마지막 4회 처리가 끝난 10일 후부터 조사하기 시작하여, 27일, 38일, 46일째까지 모두 4회 조사하였다. 각 살균제의 모든 처리는 마지막 살균제를 처리하고 약 40일되는 때의 방제 효과를 가지고서 비교하였다. 각 살균제의 모든 처리는 병진전곡선면적(AUDPC)을 구하여 비교하였다. 2차 시험에서는 propineb, carbendazim, tebuconazole, trifloxystrobin 등 4종의 살균제를 선발하여 실험하였는데, 각각의 살균제는 10일과 20일 간격으로 처리하였으며 병 조사는 7월 18일과 8월 24일, 총 2회 조사하였다. 조사는 각 반복당 50주 이상의 고추에서 주당 전체 열매의 수와 병든 열매의 수를 조사하였으며, 고추 주당 발병 주율을 계산하고, 무처리구와 비교하여 방제 효과를 계산하였다.

#### 다. 살균제 처리 순서에 따른 병방제 효과

고추 탄저병의 방제는 고추 재배 초기부터 고추 포장에서의 병원균의 밀도를 감소시키는 것이 중요하기 때문에, 정식 후 뿌리가 활착했다고 생각되는 시기(6월 10일), 개화기(6월 29일), 발병 직전(7월 19일), 그리고 발병 후(9월 19일)에 살균제를 처리하며 방제 효과를 조사하였다. 본 실험은 2004년 충북대학교 부속농장에서 실시하였다. 각 시기의 살균제 처리가 고추 탄저병의 방제에 어느 정도의 영향을 미치는지를 조사하기 위해서 총 4회 처리한 살균제의 처리에서 각각의 시기에 살균제의 처리를 제거하면서 방제 효과가 어떻게 변화하는지를 비교하였다. 병 조사는 9월 30일에 실시하였으며, 각 반복당 50주 이상의 고추에서 주당 전체 열매의 수와 병든 열매의 수를 조사하여 발병주율을 계산하였다.

병방제 효과(%) = (1-살균제 처리구의 병반 길이/무처리구의 병반 길이) x 100

### 라. 고추 탄저병 방제력의 효과 시험

2년간의 시험을 기초로 하여 고추 탄저병의 포장 방제력을 작성하였고, 충북의 청주, 괴산, 음성, 그리고 경북의 영양의 고추 포장에서 효과를 검정하였다(그림 6). 각각의 시험 포장에서는 기존에 탄저병 방제에 사용되는 살균제를 대조 약제로 처리하였다. 포장의 위치, 대조 살균제, 살균제의 처리시기, 조사일자 등은 표 6과 같았다. 지역에 따라서 고추 탄저병의 발생 시기가 차이가 있었기 때문에 살균제의 처리 일정과 병 조사 일정에 차이가 있었다. 병 조사시에는 각 반복당 50주 이상의 고추에서 주당 전체 열매의 수와 병든 열매의 수를 조사하여 발병주율을 계산하여, 무처리구에서의 발병주율과 비교함으로써 위에서 기술한 공식에 의해서 병 방제 효과를 구하였다.

표 6. 고추 탄저병 방제 효과를 실험한 4개의 고추 포장에서의 살균제 처리 일자와 병 조사 일자

	포장	살균제	살균제 처리 일자				조사 일자
			1st	2nd	3rd	4th	
I	충북 청주	CBNU system	30 May	21 Jun.	4 Jul.	8 Aug.	10 Aug.
		Trifloxystrobin	4 Jul.	15 Jul.	26 Jul	8 Aug.	10 Aug.
II	충북 괴산	CBNU system	10 Jun.	24 Jun.	4 Jul.	18 Jul.	31 Aug.
		Tebuconazole	4 Jul.	15 Jul.	26 Jul.	6 Aug.	31 Aug.
III	충북 음성	CBNU system	11 Jun.	22 Jun.	4 Jul.	18 Jul.	12 Aug.
		Propineb		4 Jul.	15 Jul.	26 Jul.	12 Aug.
IV	경북 영양	CBNU system	10 Jun.	23 Jun.	5 Jul.	25 Jul.	30 Aug.
		Tebuconazole		5 Jul.	14 Jul.	25 Jul.	30 Aug.



그림 6. 본 실험실에서 확립한 고추 탄저병 방제 체계(CBNU system)를 실험한 포장의 모습. A; 충북 청주시, B; 충북 괴산군, C; 충북 음성군, D; 경북 영양군.

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

가. 병원균의 분리. 2001년 충북의 고추 재배 지역에서 탄저병균에 감염된 고추를 채집, 세척 후, 25℃의 습실에 보존하며 포자 형성을 유도하였다. 형성된 탄저병균의 포자를 살균 증류수에 100 ~ 200 개/ml의 밀도로 현탁한 후, 300 ppm의 streptomycin을 첨가한 감자 한천 배지(potato dextrose agar medium, PDA)에 0.1 ml씩 도말하였다. 도말한 배지를 25℃의 암 상태에서 3일간 배양한 후 형성된 균총의 균사 선단 부위를 잘라 새로운 PDA에 이식하였다. 순수 분리된 탄저병균은 PDA 사면 배지에 배양, 4℃에 보관하면서 각종 실험에 사용하였고, 장기간 보관을 위하여 6%의 DMSO 용액에 넣어 -70℃에서 보관하였다.

나. 한천 희석법에 의한 살균제의 균사 성장 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(표 7)를 PDA에 최종 농도가 50, 5, 0.5, 0.05  $\mu\text{g/ml}$ 가 되도록 배지에 첨가하는 한천희석법으로 살균제의 균사 성장 억제 효과를 조사하였다. 사용한 모든 EBI를 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 용해하여 멸균된 PDA(potato dextrose agar)에 소정 농도가 되도록 첨가하고, 직경 9 cm의 petri dish에 약 10ml씩 분주하였다. 이 때 DMSO의 최종 농도는 1%가 되도록 조절하였다. 25℃의 PDA에서 배양한 균총의 선단을 직경 5 mm로 절취하여 살균제가 첨가된 PDA에 균사면이 배지에 닿게 접촉하고 25℃에서 5 ~ 7일간 배양한 후, 균총의 직경을 측정하였다. 약제의 균사 성장 억제 효과는 1%의 DMSO만을 첨가한 PDA에서 자란 균총의 직경에 대한 약제 첨가 배지에서의 균총의 직경으로 아래의 식에서 균사 성장 억제율을 구하였다.

$$\text{균사 성장 억제율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{약제 배지에서의 균총의 직경}}{\text{무처리 배지에서의 균총의 직경}}\right) \times 100$$

표 7. 실험에 사용한 스테롤 생합성 저해 살균제

일반명	화학 구조	화학명
Myclobutanil		2-( <i>p</i> -chlorophenyl)-2-(1 <i>H</i> -1,2,4-triazol-1-ylmethyl)hexanenitrile
Tebuconazole		( <i>RS</i> )-1-( <i>p</i> -chlorophenyl)-4,4-dimethyl-3-(1 <i>H</i> -1,2,4-triazol-1-ylmethyl)pentan-3-ol
Hexaconazole		( <i>RS</i> )-2-(2,4-dichlorophenyl)-1-(1 <i>H</i> -1,2,4-triazol-1-yl)hexan-2-ol
Nuarimol		(±)-2-chloro-4'-fluoro- <i>m</i> -(pyrimidin-5-yl)benzhydryl alcohol
Prochloraz		<i>N</i> -propyl- <i>N</i> -[2-(2,4,6-trichlorophenoxy)ethyl]imidazole-1-carboxamide

다. 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℃에서 배양하여, 7일 후 균총의 직경을 측정하였다.

라. 탄저병균의 포자형성 실험. 2001-45, 2001-44, JC24균주의 포자 형성능을 조사하기 위하여 PDA에 이식하여 25℃의 암 상태에서 5, 10, 15일간 배양한 후, 20 ml의 증류수를 가하고 배지 표면을 긁어 균사와 포자를 현탁하였다. 현탁액은 4겹의 가제에 걸러서 균사와 배지의 찌꺼기를 제거하고, 현탁액 중의 포자수를 혈구계산기로 조사하였다.

마. 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  $1 \times 10^6$  개/ml로 조절한 후 고추의 표면에 5 $\mu$ l 씩 점적하여 접종하였다. 고추의 표면은 70%의 methanol로 잘 닦은 다음, 표면에 핀으로 상처를 내고 접종하는 상처 접종과 무상처 접종을 실시하였다. 접종한 고추는 25℃의 암 상태의 습실에 1주일간 보관하고 발병 여부를 조사하였다.

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

## 9. 고추 탄저병균의 살균제 저항성 모니터링

1999년과 2002년에 전국적으로 분리한 130개와 258개의 균주를 사용하여 살균제에 대한 저항성 변화를 각 균주의 EC<sub>50</sub>값을 비교하여 모니터링하였다. 전국에서 분리한 고추 탄저병균의 살균제에 대한 저항성 변화를 1999년과 2002년의 시기와 2002년의 시기와 2002년의 지역(각 도별)간의 차이를 조사하였다, 또한 2002년 7, 8, 9월에 충북의 고추 노지재배 지역을 중심으로 단포자 분리한 39, 66, 145균주를 사용하여 특정지역 탄저병균의 살균제에 대한 저항성 변화를 조사하였다.

### 가. 살균제 chlorothalonil에 대한 고추 탄저병균의 감수성 변화

#### 1) 병원균의 채집

실험에 사용한 모든 탄저병균은 열매의 병반 위에 형성된 병원균을 단포자 분리하여 획득하였다. 1999년과 2002년 8월에 전국적인 고추 재배지를 방문하여 전형적인 탄저병 병징을 보이는 열매를 채집하였다. 채집한 열매는 25℃에서 48시간 습실처리한 후, 병징 위에 형성한 분생포자를 단포자 분리하였다. 단포자 분리한 병원균은 PDA 사면배지에 배양하여 4℃에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

#### 2) 탄저병균의 chlorothalonil에 대한 저항성 검정

살균제-PDA 배지를 준비하기 위해서 chlorothalonil의 원제를 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 녹인 후, PDA 배지에 적정 농도가 되게 희석하였다. 이 때 PDA에서의 chlorothalonil의 농도는 500, 50, 5, 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 조절하였으며, DMSO의 최종 농도는 1%가 되게 하였다.

보관하던 탄저병균을 PDA 평판배지에 접종하여 25℃의 암상태에서 배양하였다. 5일간 배양한 병원균은 다시 새로운 PDA 배지에서 5일간 배양한 후, 균사의 선단에서 직경 5 mm의 균사 조각을 떼어 정해진 농도의 chlorothalonil을 첨가한 PDA 배지에 접종하였다. 병원균은 다시 25℃의 암상태에서 7일간 배양한 후, 균총의 직경을 조사하여 chlorothalonil의 병원균에 대한 군사생장 억제효과를 계산하였다. 병원균에 대한 chlorothalonil의 군사생장 억제효과는 아래의 계산식을 사

용하여 구하였으며, 각 병원균에 대한 chlorothalonil의 균사생장 억제효과를 비교함으로써 chlorothalonil에 대한 병원균의 감수성 변화를 조사하였다. 모든 처리에는 3개의 반복을 두어 실험하였다.

$$\text{균사생장 억제효과(\%)} = \left( 1 - \frac{\text{살균제-PDA 배지에서의 균총의 직경}}{\text{PDA 배지에서의 균총의 직경}} \right) \times 100$$

#### 나. 보호용 살균제와 ergosterol 생합성 저해 살균제에 대한 고추 탄저병균의 감수성 변화(1999년과 2002년)

##### 1) 탄저병균의 살균제에 대한 감수성 조사

고추 탄저병 방제에 사용되는 살균제 중에서보호용 살균제와 ergosterol 생합성을 저해하는 살균제 중에서 7개의 살균제를 선발하여 실험에 사용하였다. 보호용 살균제에서는 dithianon(a.i. 95%), chlorothalonil(a.i. 97%), iminoctadine-tris-albesilate(a.i. 95%), propineb(a.i. 93%) 등을 선발하였고, Ergosterol 생합성을 저해하는 살균제 중에서는 tebuconazole(a.i. 95%)과 hexaconazole(a.i. 92%), prochloraz(a.i. 98.5%)를 선발하였다.

##### 2) 한천 희석법에 의한 살균제의 균사 생장 억제 실험

실험에 사용한 4종류의 보호용 살균제는 500, 50, 5, 0.5  $\mu\text{g/ml}$ 에서 균사생장억제 정도를 구하였다. EBI 살균제는 tebuconazole과 hexaconazole은 50, 5, 0.5, 0.05  $\mu\text{g/ml}$ , prochloraz는 10, 1, 0.1, 0.01  $\mu\text{g/ml}$ 에서 실험을 수행하였다. 공시한 모든 살균제는 DMSO에 용해시켜 PDA에 첨가하였으며, 배지 상에서 DMSO의 최종 농도는 1%가 되게 조정하였다. 병든 고추 열매에서 분리한 탄저병균들을 PDA에 접종하여 25°C의 암상태에서 7일 동안 배양하고, 접종원으로 사용하기 위해서 동일한 조건 하의 PDA에서 다시 한 번 배양하였다. 균총의 균사 선단에서 직경 5 mm의 균사 조각을 떼어내어 각각의 살균제를 농도별로 첨가한 PDA 배지에 접종하였다. 병원균을 접종한 PDA는 25°C의 암조건에서 7일간 배양한 후 아래 공식에 의해서 균사 생장 억제율을 구하였다.

$$\text{균사 생장 억제율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{살균제 배지에서의 균총의 직경}}{\text{무처리 배지에서의 균총의 직경}}\right) \times 100$$

### 3) 고추 탄저병균의 살균제 저항성 모니터링

1999년과 2002년에 전국적으로 분리한 130개와 258개의 균주를 사용하여 살균제에 대한 저항성 변화를 각 균주의 EC<sub>50</sub>값을 비교하여 검사하였다. 전국에서 분리한 고추 탄저병균의 살균제에 대한 저항성 변화를 1999년과 2002년의 시기와 2002년의 전국 각 지역(각 도별)간에 조사하였다, 또한 2002년 7, 8, 9월에 충북의 고추 노지재배 지역을 중심으로 단포자 분리한 39, 66, 145균주를 사용하여 단기간 동안에 탄저병균의 살균제에 대한 저항성 변화를 조사하기 위해서 ergosterol 생합성을 저해하는 hexaconazole, tebuconazole, prochloraz에 대한 모니터링을 실시하였다.

## 10. Benzothiadiazole(BTH)의 토양 처리에 의한 고추 탄저병 방제 효과

Benzothiadiazole(BTH)는 식물체에서 다양한 병에 대한 저항성을 유도하는 살균제로 보고되어 있다. BTH가 고추 재배 초기에 토양처리 또는 상토 처리 등을 통해서 탄저병에 대한 방제 효과를 보일 수 있는지를 조사하였다.

### 가. 정식전 침지 처리에 의한 탄저병 방제 효과(충북농업기술원, 2003)

토양 관주 처리시 유도 저항성을 나타내는 것으로 보고되어 있는 BTH와 mancozeb의 혼합제(상품명; Bion-M)와 벼 도열병 방제제이면서 벼의 다양한 병에 대해서 유도저항성을 일으키는 probenazole, 그리고 병원균에서 멜라닌 생합성을 억제하여 병 방제 효과를 보이는 tricyclazole을 선발하여 고추 탄저병에 대한 방제 효과를 실험하였다. 처리 약제와 처리 방법은 표 8에서와 같았다.

표 8. BTH를 비롯한 3 종의 살균제의 유묘 침지 및 유묘침지와 경엽살포의 조합처리에 의한 고추 탄저병 방제 효과

유효성분(함량)	상표명	희석 배수	처리 방법
BTH (1% WP)+ mancozeb (48% WP)	비온엠 수화제	1,000배	정식전 침지 처리(침지시간 : 30분)
		1,000배	정식전 침지 처리(침지시간 : 30분)+경엽살포 1회
probenazole (6% G)	오리자 입제	100배	정식전 침지 처리(침지시간 : 30분)
		100배	정식전 침지 처리(침지시간 : 30분)+경엽살포 1회
tricyclazole(75% WP)	가야빔 수화제	2,000배	정식전 침지 처리(침지시간 : 30분)
		2,000배	정식전 침지 처리(침지시간 : 30분)+경엽살포 1회
propineb (70% WP)	안트라콜수화제	500배	관행방제(발병초부터 10일 간격 4회) : 7/11, 7/21, 7/31, 8/6
무처리	-	-	무방제

실험에 사용한 BTH 혼합제, probenazole, tricyclazole은 5월 12일에 정식하기 직전에 30분간 고추 유묘를 침지 처리하였다. 또한 침지 처리한 일부의 고추는 6월 8일에 경엽 살포하고 7월 21일, 8월 6일, 8월 25일, 9월 9일 등 모두 4회에 걸쳐서 각 처리구 마다 50주의 고추에서 발병과율을 조사하였다. 대조 살균제로 propineb를 7월 11일부터 10일간격으로 4회 처리하였다.

#### 나. BTH의 침지, 토양관주 그리고 경엽분무 처리에 의한 탄저병 방제 효과 (충북농업기술원, 2004)

1차년도와 동일하게 BTH와 mancozeb의 혼합제(상품명; Bion-M)와 probenazole, tricyclazole을 선발하여, 유묘 침지 처리, 침지처리와 토양관주처리의 조합, 경엽에 분무 처리하여 각각의 효과를 비교하였다(표 9). 대조 살균제로는 역시 propineb를 사용하였다. 5월 11일에 고추 유묘를 본포에 정식하였는데,

정식할 때 유묘를 30분간 침지하여 각 살균제를 처리하였다. 정식하고 1주일 후에 일부의 고추 유묘는 주당 100 ml씩의 살균제 용액을 토양관주 처리하였다. 선발한 세 가지의 살균제는 6월 16일에 1회 경엽분무 처리하였다. Propineb는 7월 21일부터 10일 간격으로 4회 처리하였다. 병조사는 1차년도와 동일한 방법으로 수행하였으며, 7월 26일, 8월 9일, 8월 24일, 9월 9일 등 총 4회 실시하였다.

표 9. BTH 혼합제, probenazole, tricyclazole의 유묘침지, 토양관주, 경엽분무 처리의 단독 혹은 조합 처리에 의한 고추 탄저병 방제 효과

유효성분(함량)	상표명	희석 배수	처리 방법
BTH (1% WP)+ mancozeb (48% WP)	비온엠 수화제	1,000배	정식전 침지 처리(침지시간 : 30분)
		1,000배	정식전 침지 처리(침지시간 : 30분)+경엽살포 1회
		1,000배	경엽살포 1회(6/16)
probenazole (6% G)	오리자 입제	100배	정식전 침지 처리(침지시간 : 30분)
		100배	정식전 침지 처리(침지시간 : 30분)+경엽살포 1회
		100배	경엽살포 1회(6/16)
tricyclazole(75% WP)	가야빔 수화제	2,000배	정식전 침지 처리(침지시간 : 30분)
		2,000배	정식전 침지 처리(침지시간 : 30분)+경엽살포 1회
		2,000배	경엽살포 1회(6/16)
propineb (70% WP)	안트라콜수화제	500배	관행방제(발병초부터 10일 간격 4회) : 7월 21일부터 4회 처리
무처리	-	-	무방제

#### 다. BTH의 유묘침지, 토양관주, 상토와의 혼합 처리에 의한 고추 탄저병 방제 효과 (충북농업기술원, 2005)

연구 1차년과 2차년에서 모두 고추 탄저병의 발병을 초기에 억제하는 효과를 보인 BTH의 혼합제를 유묘침지, 토양관주, 상토와의 혼합 등을 통해서 처리하고 고추 탄저병에 대한 방제 효과를 비교하였다. BTH 혼합제를 고추 유묘를 재배하는 상토에 혼합하여 유묘를 재배하였으며, 정식하기 직전에 30분간 유묘침지 처리를 실시하였다.

## 제 2 절 연구개발 결과

### 1. 고추 탄저병균의 동정

#### 가. 균사 생장율과 균총색

고추, 사과 및 딸기의 탄저병균을 PDA 배지에 새롭게 접종하여 25℃와 30℃의 암상태에서 5일간 배양한 후 균총의 직경을 조사하였고, 동일한 조건에서 7일간 배양한 후 균총 색깔을 비교하였다(표 10와 그림 7). 실험에 사용한 탄저병균들은 균사생장에 따라서 두 group으로 구별할 수 있었다. 고추 탄저병균 10개의 균주와 사과 탄저병균 B88은 균사 생장이 30℃보다 25℃에서 빨랐으며, 25℃에서의 균사 생장이 6.7~8.1 mm/일로 나머지의 다른 탄저병균과 비교할 때 성장 속도가 늦었다(group 1). B88을 제외한 사과 탄저병균 9균주, 2001-44와 2001-45와 같은 고추 탄저병균과 그리고 실험에 사용한 딸기 탄저병균 모두는 25℃와 30℃에서의 균사 생장이 비슷하였으며, 30℃에서의 균사 생장은 9.7~ 16.0 mm/일로 1 group보다 빠르게 성장하는 것을 알 수 있었다(2 group).

#### 나. 분생포자의 크기 및 모양

분생포자의 평균크기는 사과에서 분리한 B88 균주가  $3.2 \times 10.5 \mu\text{m}$ 로 가장 작았다(표 11). 고추에서 분리한 탄저병균의 분생포자의 크기는 2001-44가 평균적

으로 가장 크게 나타났지만, 전체 포자의 크기가 너무 다양하여 서로 다른 종을 분류하는 기준으로 사용하기에는 어려움이 있었다. 사과와 딸기의 탄저병균에서도 기주별로, 또는 전체 탄저병균 사이에 뚜렷한 차이를 발견할 수 없었다. 분생 포자의 형태에도 고추, 사과, 딸기에서 분리한 탄저병균간에 차이는 찾아 볼 수 없었으며, 대부분의 포자가 간상이며 양끝이 둥근 포자 모양을 보이고 있었다(그림 7).

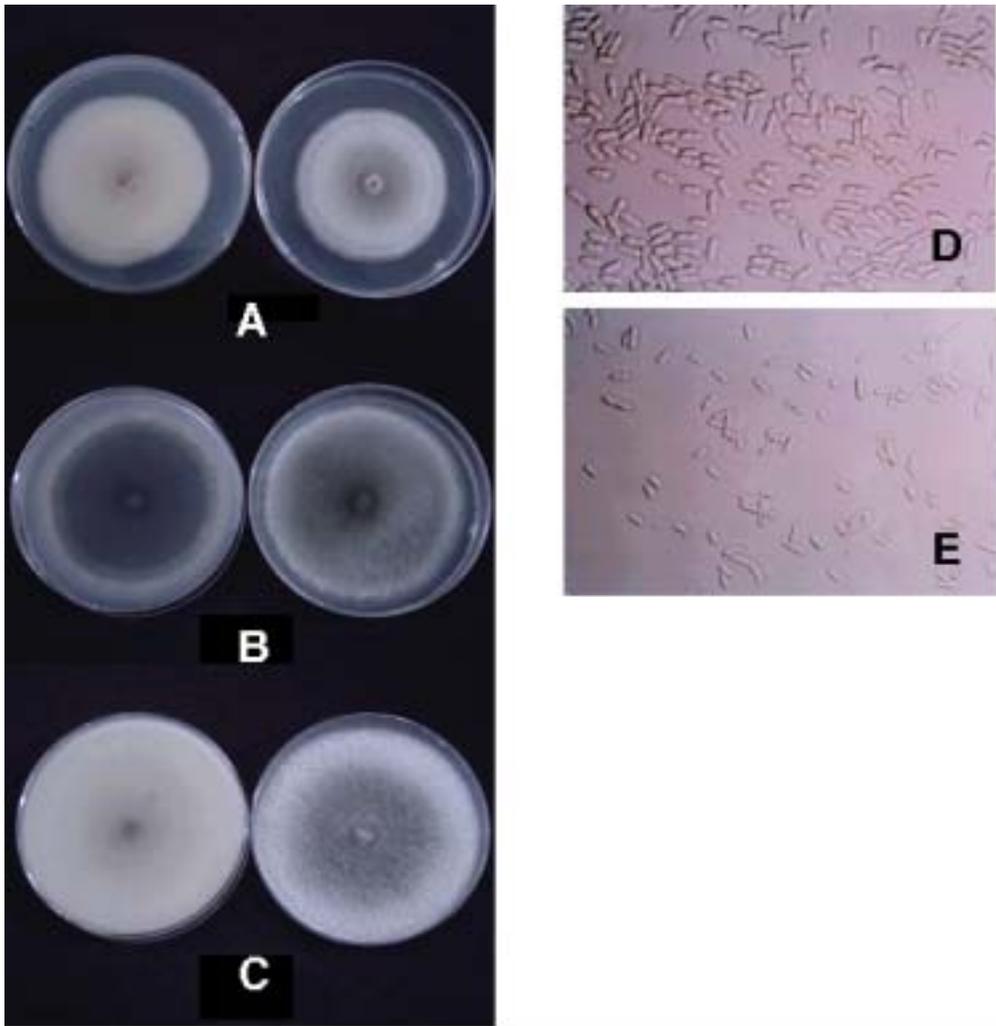


그림 7. 고추, 사과, 딸기의 탄저병 병반에서 분리한 *Colletotrichum* spp.의 균총과 포자의 모습. 균총은 25°C의 PDA에서 7일간 배양한 후 촬영한 모습임. 분생포자 역시 7일간 배양한 균체에서 수확한 모습임. A: JC24(고추에서 분리한 균주), B: B90(사과에서 분리한 균주), C: CGF50(사과에서 분리한 균주), D: JC24의 분생포자, E: CGF50의 분생포자.

표 10. 고추, 사과, 딸기의 탄저병 병반에서 분리한 *Colletotrichum* spp.의 균사 성장 및 균총 색

병원균	기주	균사 성장 (mm/day) <sup>1</sup>		균총 색 <sup>2</sup>
		25℃	30℃	
FL001	red pepper	8.1	5.9	gray
KS21	red pepper	7.2	4.1	gray
JC24	red pepper	8.1	6.1	gray
CJ38	red pepper	7.3	4.4	gray
YS29	red pepper	7.0	4.2	gray
02GG01	red pepper	7.2	3.7	gray
02YY02	red pepper	6.7	4.6	gray
02OG04	red pepper	7.0	5.4	gray
02OG07	red pepper	7.1	4.0	gray
02CO01	red pepper	7.0	4.3	gray
2001-44	red pepper	10.3	9.7	gray
2001-45	red pepper	10.2	10.0	white
B88	apple	7.8	6.0	orange
B165	apple	11.7	11.8	gray
B13	apple	13.0	10.6	white
B138	apple	11.0	11.6	white
B161	apple	12.3	12.5	gray
B176	apple	11.7	11.2	gray
B90	apple	11.8	10.6	gray
B92	apple	13.8	12.8	gray
B143	apple	11.6	12.7	gray
B147	apple	12.5	11.8	gray
CGF225	strawberry	14.4	16.0	gray
CGF50	strawberry	12.9	12.0	gray
CGF56	strawberry	12.7	11.8	gray
CGF214	strawberry	11.7	10.5	gray
CGF210	strawberry	12.1	12.0	gray
CGF212	strawberry	11.3	11.6	gray
CGF215	strawberry	10.8	11.1	gray
CGF250	strawberry	11.8	12.4	gray
CGF253	strawberry	10.1	12.2	gray
CGF254	strawberry	11.0	12.8	gray

<sup>1</sup> 병원균의 균사 성장은 25℃의 PDA에서 5일간 배양한 후 측정하였다. 모든 처리는 3반복으로 실시하였다.

<sup>2</sup> 병원균의 균총의 색은 25℃의 PDA에서 7일간 배양한 후 조사하였다.

표 11. 고추, 사과, 딸기에서 분리한 탄저병균의 분생포자의 크기

균주	기주 식물	분생포자 크기 <sup>1</sup> ( $\mu\text{m}$ )
JC24	red pepper	4.2×14.7 (3-6×10.5-25.5)
YS29	red pepper	4.0×14.8 (3-6×9-24)
02GG01	red pepper	4.7×14.9 (3-6×9-21)
02CO01	red pepper	4.1×16.0 (3-6×7.5-25.5)
2001-44	red pepper	5.7×16.5 (3-7.5×9-22.5)
B88	apple	3.2×10.5 (3-4.5×6-22.5)
B165	apple	4.9×16.9 (3-6×9-24)
B161	apple	5.1×15.5 (3-7.5×7.5-27)
B176	apple	4.7×16.5 (3-6×13.5-21)
B90	apple	4.6×15.1 (3-6×10.5-24)
CGF56	strawberry	4.7×16.7 (3-7.5×10.5-30)
CGF212	strawberry	4.6×16.2 (3-6×10.5-25.5)
CGF215	strawberry	5.1×17.1 (3-7.5×12-22.5)
CGF253	strawberry	5.8×15.2 (3-7.5×9-2.5)
CGF254	strawberry	3.6×11.4 (3-6×7.5-18)

<sup>1</sup> 각 균주는 25°C의 PDA에서 7일간 배양한 후 포자를 수확하였음. 각각의 포자의 크기는 100개의 포자를 관찰하여 평균값으로 구하였음.

#### 다. 병원성 실험

고추(녹광)에 고추 탄저병균 JC24의 분생포자 현탁액( $1 \times 10^6$ 개/ml)을 상처와 무상처 접종하였다. JC24를 고추 열매에 상처와 무상처 접종하고 1주일간 습실처리하면 그림 8에서 보는 것과 같이 전형적인 탄저병균의 병징이 나타나는 것을 관찰하였다. 이때 발병도 표 12에서와 같이 상처와 무상처 접종 모두에서 66.7%이었다. 접종한지 2주 후에는 두 처리구 모두의 발병율이 80과 93%로 증가하였다.

#### 라. Benomyl에 대한 감수성의 차이

본 과제를 수행하면서 분리한 고추 탄저병균은 benzimidazole계의 살균제에 대한 반응이 기존에 알려져 있던 benzimidazole계의 반응과는 많은 차이를 보였다. 그림 5에서 보는 것과 같이 고추에서 분리한 두 종류의 탄저병균이 benomyl에 대한 다른 양상의 반응을 보여주고 있었다. 2001-45는  $1.0 \mu\text{g/ml}$ 의 benomyl-PDA 배지에서 전혀 생육이 되지 않았으며,  $0.1 \mu\text{g/ml}$ 의 처리구에서 무처리구에 비하여 60-70% 정도 균사생육이 억제하는 것을 알 수 있었다. 그러나 CB16은  $10.0 \mu\text{g/ml}$  처리에서도 균사가 성장하였다. 또한 무처리구에서 CB16의 균사성장 속도는 2001-45보다 월등히 떨어지는 것을 다시 확인하였다. 고추뿐만 아니라 사과와 딸기에서 분리한 몇 종류의 탄저병 균주를 선발하여 benomyl에 대한 감수성과 저항성의 양상을 구체적으로 알아보았다(그림 10). 2001-45, B161, CGF89 균주는 benomyl에 대한 균사생장억제율이 농도가 1-2  $\mu\text{g/ml}$ 에서 90% 이상 억제되고 10  $\mu\text{g/ml}$  이상에서는 균사 생장이 전혀 되지 않는 감수성 반응을 보였다. B90, CGF49 균주는 benomyl에 대한 균사생장억제율이 농도가 0.1-10  $\mu\text{g/ml}$ 에서 10%이하 억제되는 저항성 반응을 보였다. 그러나 CJ04균주는 benomyl에 대한 균사생장억제율이 농도가 1-100  $\mu\text{g/ml}$ 에서 50-70% 억제되는 비감수성 반응을 보였다. 사과와 딸기에서 분리한 탄저병균은 benomyl에 대한 감수성과 저항성 반응이 뚜렷하게 구분되는 반면에 고추에서 분리한 탄저병균인 CJ04의 저항성 반응은 다른 기주에서 분리한 저항성 균주와는 다른 경향의 저항성을 나타냈다. 2001년과 2002년 고추에서 분리한 탄저병균(633) 중 대부분(95% 이상)이 benomyl에 대한 비감수성 반응을 보인다.

CJ04는 1  $\mu\text{g/ml}$ 의 benomyl을 함유한 배지에서 59.8%의 균사 성장 억제 효과를 보이면서 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 benomyl 처리에서도 65.6%의 균사 성장 억제 효과를 보여, 저농도에서부터 고농도까지 거의 일정한 수준의 균사 성장 억제 효과를 보였다. 사과와 딸기에서 분리한 benomyl 저항성균인 B90과 CGF49는 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 benomyl이 함유된 PDA에서 균사 성장에 대한 억제 효과가 10%이하였다. 이들은 100  $\mu\text{g/ml}$ 에서도 무처리구에서의 균사생장율보다 48.9%와 74.3% 억제함을 알 수 있었다.



그림 8. 고추에서 분리한 *Colletotrichum* sp. JC24의 고추에 대한 병원성. JC24의 분생포자는 25°C의 PDA에서 7일간 배양한 균총에서 수확하였으며, 포자 농도는  $1 \times 10^6$  개/ml로 조정하였음. A; 녹광 고추에 상처를 내고 상처 위에 포자 현탁액을 5  $\mu\text{l}$ 씩 점적한 후, 25°C의 포화 상태에 보관하여 발병을 유도함. B; 준비한 포자 현탁액을 녹광 고추에 분무 접종하고 동일한 조건에서 발병을 유도하였음. 접종하고 7일 후에 촬영한 사진임.

표 12.. 고추에서 분리한 *Colletotrichum* sp. JC24의 병원성

접종 방법	발병도 (%)			
	1주일 후		2주일 후	
	발병 수	발병도 (%)	발병 수	발병도 (%)
무상처, 분무 접종 <sup>1</sup>	10/15 <sup>3</sup>	66.7%	14/15	93%
상처, 점적 접종 <sup>2</sup>	10/15	66.7%	12/15	80%

<sup>1</sup> 준비한 포자 현탁액을 녹광 고추에 분무 접종하고, 25℃의 포화 상태에 보관하여 발병을 유도함.

<sup>2</sup> 녹광 고추에 상처를 내고 상처 위에 포자 현탁액을 5  $\mu$ l씩 점적한 후, 동일한 조건에서 발병을 유도하였음. 접종하고 7일 후와 14일 후에 발병도를 조사하였음.

<sup>3</sup> 총 15개의 고추 열매를 실험에 사용하였으며, 15개 중에서 병이 발생한 고추의 수를 조사하였음.

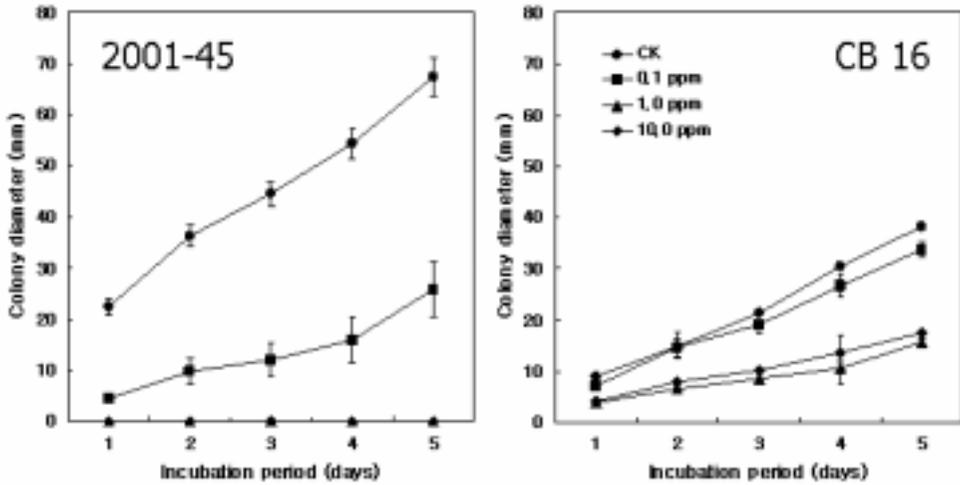


그림 9. 고추에서 분리한 *Colletotrichum* sp. 2001-45와 CB16의 benomyl에 대한 반응. PDA 배지에 0.1, 1.0, 10.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 benomyl을 첨가한 배지에, 7일간 배양한 균주의 균사 선단에서 직경 5 mm의 균사 조각을 떼어내어 접종하였음. 25°C에서 배양하면서 시간별로 균총의 직경을 조사하였음.

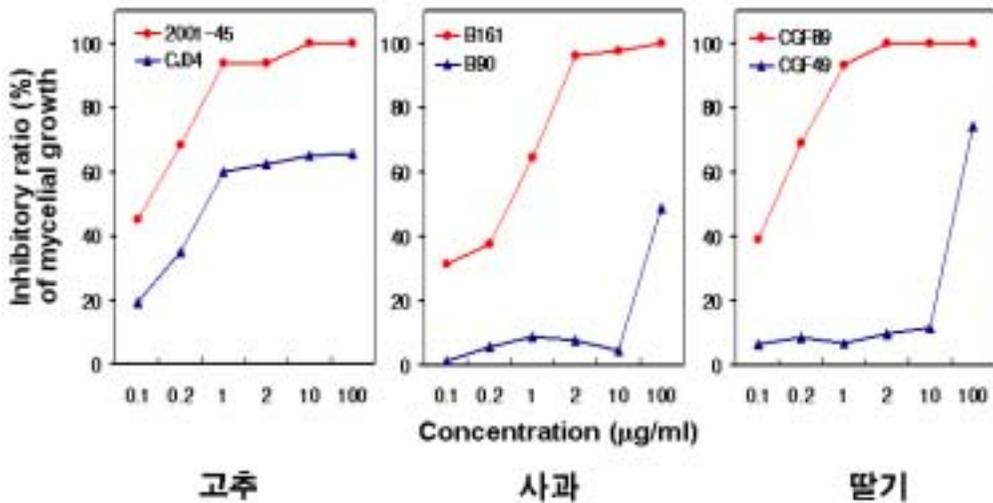


그림 10. 고추와 사과, 딸기에서 분리한 탄저병균에 대한 benomyl의 균사 생장 억제 효과. 7일간 배양한 균주의 균사 선단에서 직경 5 mm의 균사 조각을 떼어내어 benomyl-PDA에 접종하였고, 7일 후에 균총의 직경을 조사하였음.

## 2. 탄저병균 종간의 살균제에 대한 반응

식물병의 여러 가지 방제 방법 중에서 가장 실질적인 방법은 농약을 사용하는 화학적 방제 방법일 것이다. 농약을 처리하는 화학적 방제를 통하여 농업 생산성이 질적으로, 또 양적으로 향상된 것이 사실이지만, 더불어 농약의 잔류와 환경오염이라는 문제를 야기하기도 하였다. 농약 사용에 있어서의 이러한 문제의 주된 원인은 농약의 남용과 오용의 문제라고 생각한다. 농약의 남용과 오용을 방지하기 위해서는 병원균의 확실한 동정과 효과적인 저농약 방제 시스템의 확립이 필요하다.

국내에서 고추 탄저병을 일으키는 병원균으로는 *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. coccodes*, *C. dematium*, 그리고 완전세대인 *Glomerella cingulata* 등이 보고되어 있다(박과 김, 1992). 이러한 고추 탄저병균은 *Colletotrichum*이 갖는 형태적인 특징을 기준으로 하여 분류와 동정을 수행하여 왔다(Freeman 등, 1998). 그러나 *Colletotrichum*속 안에서 종을 분류하는 것이 형태적인 특징만으로는 한계를 드러내는 종들이 나타나면서, 정확한 동정을 위해서는 형태적인 특징의 관찰과 더불어 생리적인 특성(Denoyes와 Baudry, 1995)과 ITS 영역의 염기서열 분석을 통한 동정 방법(Talhinhas 등, 2002, Vinnere 등, 2002)이나, 종 특이적인 primer를 사용한 PCR(Adaskaveg와 Hartin, 1997, Forster와 Adaskaveg, 1999)과 같은 분자생물학적인 다양한 기술을 이용한 동정 방법이 사용되기 시작하였다. 다양한 동정의 방법들이 도입되면서 탄저병균의 동정이 보다 정확하고 효과적으로 진행되며, 국내에서 고추 탄저병균의 우점종이 *C. gloeosporioides*에서 *C. acutatum*으로 변화하였다고 보고되었다(김과 김, 2004). *C. acutatum*이 국내 고추 탄저병균의 우점종으로 변화하면서 화학적 방제를 위한 살균제의 처리에도 어려움이 따르게 되었다. Benzimidazole계의 살균제는 작용범위가 넓은 살균제로서 다양한 식물병원진균의 미세소관의 형성을 억제하기 때문에 세포 분열이 증기에서 정지되어 낮은 처리 농도에서도 균사 생장을 억제하는 살균제로 알려져 있다(Burland와 Gull, 1984, Fujimura 등, 1992). 고추 탄저병균으로 보고되어 있는 *C. gloeosporioides*도 benzimidazole계 살균제의 낮은 처리 농도에서 균사의 생육이 억제되지만, *C. acutatum*은 benzimidazole

계의 살균제에 대해서 비감수성 반응을 보인다는 보고가 있다(Ishii 등, 1988). 동일한 *Colletotrichum*의 속에 속하지만, 살균제에 대한 반응이 서로 다른 것이다.

이처럼 동일한 속에 또는 동일한 종에 속하는 식물병원진균 중에는 살균제에 대한 반응이 서로 다른 경우가 보고되어 있다. Kataria 등(1991)은 다양한 살균제를 가지고서 *Rhizoctonia solani*의 여러 군사 융합군(AG, anastomosis group)에 대한 군사 성장 억제 효과를 조사하였는데, pencycuron은 AG 2-2, AG 3, AG 6에 속하는 군주에 대해서 군사 성장을 90% 억제하는 농도가 0.2, 0.2, 0.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인 반면에, AG 1, AG 4, AG 5 등에 대해서는 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상이었다고 하였다. 대부분의 진균의 군사생장을 저해하는 것으로 알려진 ergosterol 생합성 저해 살균제인 fenarimol은 pencycuron과는 다르게 AG 1과 AG 7에 대해서 2.5와 14.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 군사의 성장을 90% 억제하였으나, AG 2-1, AG 2-2, AG 3, AG 4, AG 5에 대해서는 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서도 90%의 군사 성장 억제 효과는 보이지 않았다고 보고하였었다. Lyr(1995)는 난균문에 속하는 *Phytophthora*속의 다양한 종을 가지고서 난균문의 방제를 위해서 등록되어 있는 살균제들의 실험을 수행하였다. Metalaxyl을 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  첨가한 배지에서 *P. cactorum*은 100% 군사의 생육이 억제되었지만, *P. infestans*는 85%만 군사 생장이 억제 되었지만, cymoxanil은 *P. infestans*는 100% 군사 성장을 억제하면서 *P. cactorum*은 3%밖에 군사의 생육을 억제하였다고 발표하였다. 이처럼 살균제는 그 종류에 따라서 병원균의 종간에, 또는 가까운 근연 그룹간에서도 그 감수성의 차이가 크게 나타나고 있다.

국내에서 고추 탄저병균은 *Colletotrichum* 속의 4종의 병원균에 의해서 발생하는 것으로 보고되어 있고, 또 현재 포장에서의 우점종이 과거에 보고되었던 병원균과 다르다면, 포장에서 탄저병의 방제를 위하여 사용하는 살균제의 우점 병원균에 대한 효과를 조사할 필요가 있다. 본 실험에서는 기존에 고추 탄저병의 방제를 위하여 사용하였던, benzimidazole계 살균제와 보호용 살균제, 그리고 ergosterol 생합성을 저해하는 살균제를 선발하여 실험실에서 병원균의 군사생육에 대한 억제 효과를 조사하였다.

#### 가. Benzimidazole계 살균제에 대한 *Colletotrichum*속 탄저병균의 반응

실험에 사용한 4가지 종(*C. acutatum*, *C. coccodes*, *C. dematium*, *C. gloeosporioides*)의 탄저병균을 carbendazim에 대한 EC<sub>50</sub>(50% 균사생장억제 농도)과 MIC(100% 균사생장을 억제하는 최소 농도)값을 조사하였다(표 13). 고추에서 분리한 *C. dematium* 6균주 모두는 carbendazim에 대하여 EC<sub>50</sub>값이 0.04 ~ 0.97 µg/ml, MIC값은 4와 20 µg/ml로 나타났다. 고추, 사과, 딸기에서 분리한 *C. gloeosporioides*는 carbendazim에 대해서 감수성 균주와 저항성 균주로 분류가 가능하였다. 고추에서 분리한 2001-44와 2001-45, 사과의 B13과 B138, 딸기에의 CGF89, CGF94, CGF252는 모두 감수성 균주로서 EC<sub>50</sub>값이 0.001~0.55 µg/ml로 매우 낮았고 MIC값도 CGF252가 100 µg/ml, CGF89가 10 µg/ml이었으며 나머지 균주는 1 µg/ml로 나타났다. 사과에서 분리한 B90, B92, B147과 딸기의 CGF50, CGF54, CGF222는 EC<sub>50</sub>값과 MIC값이 모두 100 µg/ml가 넘어가는 높은 저항성을 보였다. 몇몇의 연구자들에 의해서 *C. acutatum*의 benzimidazole계 살균제에 대한 비감수성이 보고되어 있다. 특히 Ishii 등은 benzimidazole계 살균제와 *N*-phenylcarbamate계 살균제의 역상관 교차 저항성의 관계를 가지고서 *C. gloeosporioides*와 *C. acutatum*의 구별이 가능하다고 보고하였다. 그러나 최근 딸기 등에서 분리한 탄저병균의 균주가 benzimidazole계와 *N*-phenylcarbamate계 살균제에 대한 반응이 지금까지 보고된 것과는 다른 반응을 보였기 때문에 살균제 반응을 이용한 *Colletotrichum*속의 동정의 정확성에 문제를 제기하게 되었다(Ishii 등, 1998). 결국 *Colletotrichum*속의 탄저병균의 정확한 동정을 위해서는 분자생물학적인 방법을 통해야하며, 살균제의 반응은 분류, 동정에 필요한 기본적인 정보만을 제공한다고 할 수 있다. 하지만 본 실험에 사용한 균주에서는 표 10과 같이, Ishii 등(1998)이 보고한 것과 같은 예외적인 균주를 발견할 수 없었으며, 국내의 균주는 아직까지 benzimidazole계와 *N*-phenylcarbamate계 살균제에 대한 반응을 가지고서 두 종의 탄저병균을 분류할 수 있을 것으로 생각된다.

#### 나. 보호용 살균제에 대한 반응

Chlorothalonil과 propineb에 대하여 *C. acutatum*은 *C. gloeosporioides*의 다른 균주들보다 높은 EC<sub>50r</sub>값을 보여 종에 따른 살균제에 대한 반응이 차이를 보여주

고 있다(표 15). 그러나 *C. gloeosporioides*의 균주들 중에는 chlorothalonil과 propineb에 대한 저항성이 높은 예외적인 균주들도 있었다. Dithianon은 다른 균주들에 비해서 *Colletotrichum*의 종에 따라 감수성 정도에 큰 차이가 나타나지는 않았다. 보호용 살균제의 대부분은 균사 생장 억제 효과보다는 포자의 발아를 저해하는 효과가 크다고 알려져 있다. 특히 김 등(2003)은 *C. acutatum* JC24를 가지고서 수행한 실험에서 보호용 살균제인 mancozeb는 0.39  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서도 효과적으로 병원균의 발아를 억제하고 있다고 보고하였다. 본 실험에서는 포자 발아에 대한 억제 효과를 조사하지는 않았지만, 보호용 살균제가 보이는 균사 생장 억제 효과가 *C. gloeosporioides*와 *C. acutatum* 사이에는 차이가 있었기 때문에 *Colletotrichum*속의 탄저병균에 대한 보호용 살균제들의 효과를 비교하고자 하였다.

표 13. *Colletotrichum*속 탄저병균에 대한 carbendazim의 균사 성장 억제 효과

병원균	균주	기주식물	분리장소	EC <sub>50</sub> <sup>1</sup>	MIC <sup>2</sup>
<i>C. acutatum</i>	JC24	pepper	Jincheon	0.92	>100
	KS21	pepper	Geosan	3.04	>100
	MJ08	pepper	Mooju	2.94	>100
	02YY02	pepper	Yougndong	0.17	>100
	02OG07	pepper	Okcheon	0.001	>100
	02JB04	pepper	Jincheon	0.31	>100
<i>C. gloeosporioides</i>	2001-44	pepper	Jincheon	0.24	1
	2001-45	pepper	Jincheon	0.01	1
	B13	apple	Taegu	0.01	1
	B138	apple	Taegu	0.07	1
	B90	apple	Taegu	>100	>100
	B92	apple	Taegu	>100	>100
	B147	apple	Taegu	>100	>100
	CGF89	strawberry	Nonsan	0.02	10
	CGF94	strawberry	Iksan	0.001	1
	CGF252	strawberry	Nonsan	0.55	100
	CGF50	strawberry	Nonsan	>100	>100
CGF54	strawberry	Nonsan	>100	>100	
CGF222	strawberry	Nonsan	>100	>100	
<i>C. coccodes</i>	KACC40010	pepper	Taejeon	3.98	>100
	KACC40803	potato	Jeju	0.09	>100
<i>C. dematium</i>	02CS01	pepper	Chungju	0.04	20
	02UD01	pepper	Eumseong	0.11	4
	02UD02	pepper	Eumseong	0.26	4
	02UD03	pepper	Eumseong	0.97	4
	02UD04	pepper	Eumseong	0.41	4
	02UD05	pepper	Eumseong	0.43	4

<sup>1</sup> 병원균의 균사 성장을 50% 억제하는 농도.

<sup>2</sup> 실험한 농도 중에서 병원균의 성장을 100%억제하는 가장 최소 농도.

표 14. *Colletotrichum*속에 속하는 탄저병원균들의 carbendazim과 diethofencarb에 대한 역상관 교차 저항성

병원균	균주	기주	Carbendazim		Carb. + Dietho. <sup>1</sup>	
			EC <sub>50</sub> <sup>2</sup>	MIC <sup>3</sup>	EC <sub>50</sub>	MIC
<i>C. acutatum</i>	JC24	pepper	0.92	>100	1.12	>100
	KS21	pepper	3.04	>100	1.49	>100
	MJ08	pepper	2.94	>100	1.24	>100
	02YY02	pepper	0.17	>100	14.0	>100
	02OG07	pepper	0.001	>100	0.01	>100
	02JB04	pepper	0.31	>100	0.94	>100
<i>C. gloeosporioides</i>	2001-44	pepper	0.24	1	0.06	100
	2001-45	pepper	0.01	1	0.01	100
	B13	apple	0.01	1	0.01	1
	B138	apple	0.07	1	0.04	10
	B90	apple	>100	>100	0.12	100
	B92	apple	>100	>100	0.09	100
	B147	apple	>100	>100	0.11	100
	CGF89	strawberry	0.02	10	0.13	1
	CGF94	strawberry	0.001	1	0.09	100
	CGF252	strawberry	0.55	100	0.01	100
	CGF50	strawberry	>100	>100	0.58	10
	CGF54	strawberry	>100	>100	0.31	10
	CGF222	strawberry	>100	>100	0.49	10
<i>C. coccodes</i>	KACC40010	pepper	3.98	>100	127.6	>100
	KACC40803	potato	0.09	>100	0.29	>100
<i>C. dematium</i>	02CS01	pepper	0.04	20	0.72	20
	02UD01	pepper	0.11	4	0.53	4
	02UD02	pepper	0.26	4	0.75	4
	02UD03	pepper	0.97	4	2.47	20
	02UD04	pepper	0.41	4	0.64	4
	02UD05	pepper	0.43	4	0.93	4

<sup>1</sup> Carbendazim과 diethofencarb의 혼합제를 실험에 사용하였음.

<sup>2</sup> 병원균의 균사 생장을 50% 억제하는 농도.

<sup>3</sup> 실험한 농도 중에서 병원균의 생장을 100%억제하는 가장 최소 농도.

표 15. *Colletotrichum acutatum*과 *C. gloeosporioides*에 대한 몇 가지 보호용 살균제들의 균사 성장 억제 효과

병원균	균주	Iminoctadine	Dithianon	Chlorothalonil	Propineb
<i>C. acutatum</i>	JC24	506.6 <sup>1</sup>	185.2	412.1	4.7
	KS21	227.4	45.7	357.5	53.2
	MJ08	182.7	165.2	>500	44.1
	02YY02	185.3	40.6	18.9	168.5
	02OG07	462.0	137.8	1522.0	332.0
	02JB04	90.4	90.4	846.1	177.4
<i>C. gloeosporioides</i>	2001-44	0.01	33.8	61.93	-
	2001-45	0.15	61.7	952.1	7.2
	B13	<0.01	14.0	22.4	102.2
	B138	0.3	11.8	61.6	21.8
	B90	<0.01	22.5	97.4	41.2
	B92	<0.01	40.5	44.0	8.6
	B147	0.01	14.0	460.3	4.5
	CGF89	<0.01	50.2	2.3	1.2
	CGF94	<0.01	34.6	34.3	0.3
	CGF252	<0.01	42.1	8.9	6.1
	CGF50	0.01	66.3	65.6	3.1
	CGF54	3.1	47.4	30.7	7.5
	CGF222	0.01	68.4	27.5	2.4

<sup>1</sup> 병원균의 균사 성장을 50% 억제하는 농도.

#### 다. Ergosterol 생합성 저해 살균제에 대한 반응

탄저병균 4종(*C. acutatum*, *C. coccodes*, *C. dematium*, *C. gloeosporioides*)의 3가지 EBI 살균제(tebuconazole, hexaconazole, prochloraz)에 대한 EC<sub>50</sub>값을 조사하였다(표 16). *Colletotrichum*의 종간에는 EBI 살균제에 대한 EC<sub>50</sub>값에 있어서의 차이가 보이지 않았다. 다만 *C. gloeosporioides* 중 2001-45균주는 tebuconazole과 hexaconazole에 대한 EC<sub>50</sub>값이 34.0, 17.01  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 다른 균에 비해 높은 저항성 반응을 보였지만, prochloraz에 대한 EC<sub>50</sub>값은 0.07  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 다른 균주와 차이를 보이지 않았다. Ergosterol 생합성 저해 살균제는 병원균의 ergosterol 생합성 과정 중에서 C14-demethylase의 활성을 저해하는 것으로 알려져 있으며, 병원균의 포자 발아 억제 효과는 미미하나, 균사 생장은 아주 낮은 농도에서도 강하게 억제하는 것으로 보고되어 있다. 이러한 특징을 지닌 살균제에 대한 탄저병균들의 반응은 종이 달라진다고 해서 변화되는 것이 아님을 알 수 있었다.

살균제가 동일한 작용 기작을 가지고 있다고 하여도, 또는 동일한 살균제에 국한하여 보더라도 병원균의 종류에 따라서 살균제에 대한 반응은 매우 다양하게 나타난다. Kataria 등(1991)은 *Rhizoctonia solani*의 균사 융합균에 따라서 살균제에 대한 반응이 다르다고 보고하였고, Lyr(1995)는 난균문의 병원균의 방제를 위해서 사용되는 살균제에 대한 *Phytophthora*속에 속하는 여러 가지 종의 반응을 보고하였는데, 살균제에 따라서는 *Phytophthora*의 종에 대한 반응이 크게 차이가 나는 경우가 있었다. Cymoxanil을 배지에 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 첨가하였을 때, *P. cryptogaea*와 *P. citricola*는 균사 생육이 전혀 억제되지 않은 반면에, *P. infestans*와 같은 병원균의 균사 생육은 100% 억제되었다. 이처럼 살균제에 대한 병원균의 반응은 병원균의 분류상의 근연 관계와는 무관하게 상이한 반응을 나타내는 경우도 있다. 고추 탄저병균은 박과 김(1992)에 의해서 *C. gloeosporioides*가 국내의 우점종으로 보고되어 있었으나, 최근 여러 발표를 통하여 우점종이 *C. acutatum*으로 변화하였다고 보고하고 있다. 이러한 상황에서 병원균이 방제를 위하여 사용하는 살균제에 대한 반응이 다르다면, 포장에서 실질적으로 살균제를 사용하였을 때의 방제 효과도 변화할 것으로 예상된다. 본 실

험의 결과와 같이 benzimidazole계 살균제와 보호용 살균제에 속하는 살균제들을 포장에서 직접 사용할 때에는 우점종의 변화를 감안하여 방제 시스템을 확립해야 할 것이다. 그러나 살균제 중에는 ergosterol 생합성을 저해하는 살균제와 같이 *Colletotrichum*의 종에 관계없이 유사한 반응을 보이는 살균제들도 있었다.

표 16. *Colletotrichum* 속에 속하는 탄저병균들에 대한 ergosterol 생합성을 저해하는 살균제의 균사 성장 억제 효과

병원균	균주	Tebuconazole	Hexaconazole	Prochloraz
<i>C. acutatum</i>	JC24	0.20 <sup>1</sup>	0.22	0.24
	KS21	0.31	1.02	0.08
	MJ08	0.54	0.47	0.05
	02YY02	0.01	0.10	0.02
	02OG07	0.49	1.20	0.02
	02JB04	0.06	1.30	0.02
<i>C. gloeosporioides</i>	2001-44	0.6	0.34	0.26
	2001-45	34.0	17.07	0.07
	B13	1.93	1.58	0.01
	B138	1.81	2.26	0.02
	B90	2.02	1.37	0.03
	B92	2.16	1.31	0.02
	B147	1.74	1.68	0.08
	CGF89	1.81	0.73	0.09
	CGF94	1.91	1.42	0.02
	CGF252	0.20	0.39	0.01
	CGF50	0.51	0.60	>0.01
	CGF54	0.39	2.49	0.09
CGF222	0.60	0.73	>0.01	
<i>C. coccodes</i>	KACC40010	2.17	0.39	0.31
	KACC40803	0.83	0.40	0.26
<i>C. dematium</i>	02CS01	0.12	0.20	0.02
	02UD01	0.04	0.20	0.01
	02UD02	0.03	0.20	0.01
	02UD03	0.23	0.70	0.01
	02UD04	0.01	0.10	0.01
	02UD05	0.03	0.20	0.01

<sup>1</sup> 병원균의 균사 성장을 50% 억제하는 농도.

### 3. 고추 탄저병균의 포자 발아와 부착, 균사 생장에 미치는 화합물의 활성 검정법 확립 및 살균제의 효과

최근의 농약 연구에서는 신규 살균제를 개발하기 위해서 다양한 구조를 지닌 다수의 화합물의 확보에 많은 관심을 기울이고 있는데, 새로운 합성 기술이나 조합 화학을 통하여 화합물을 확보하거나, 다수의 화합물을 확보하고 있는 기관에 경비를 부담하고 화합물을 사오기도 한다. 또는 미생물이나 식물의 추출물과 같은 천연물질을 확보하고자 노력하기도 한다. 신규 살균제의 개발이 점점 어려워지면서 신규 화합물의 수는 십만 개에서 백만 개까지 필요하게 되었으며, 또 많은 수의 화합물의 활성을 단시간에 검정할 수 있는 새로운 검정 방법의 확립이 요구되고 있다(Cormrod와 Hawkes, 1995). 따라서 다수의 화합물의 활성을 검정할 수 있는 새로운 방법의 확립은 살균제 개발 전략과 밀접한 관계를 가지게 되었다.

신규 살균제를 개발하기 위한 화합물의 활성 검정 방법으로는 식물체를 직접 사용하는 온실 검정 방법과 실험실 내에서 병원균을 이용하는 *in vitro* 방법들 수 있다(조, 1990). 두 가지의 방법은 모두 장단점을 지니고 있지만, 다수의 화합물의 활성을 신속하게 검정하며 각 화합물이 갖는 작용 특성에 대한 정보를 얻기 위해서는 *in vitro*의 방법을 사용하는 것이 좋다. 식물병원 곰팡이에 대한 화합물의 활성을 검정하는 *in vitro* 방법으로는 여러 가지의 방법이 있지만, 포자 발아에 대한 억제 효과를 조사하는 방법이 다른 방법과 비교하여 빠른 시간 내에 곰팡이에 대한 화합물의 활성을 측정할 수 있는 방법이 될 수 있다(Slawecki 등, 2002). 하지만 현미경을 이용하여 포자의 발아를 확인하는 작업은 결코 용이한 작업은 아니다. 이와 같이 결과 관찰의 어려운 점을 개선하고자, 최근에는 96 well microtiter plate에서 배양한 병원균의 생장 정도를 흡광도로 측정하는 방법이 제안되었다(Wedge와 Smith, 2000; 최 등, 2000). Wedge와 Smith(2000)는 16종의 살균제가 *Colletotrichum acutatum*, *C. gloeosporioides*, *C. fragaria*의 균사 생육에 미치는 효과를 microtiter assay를 통해서 조사하였다. 하지만 부피가 작고 한정적인 96 well microtiter plate의 well에서는 병원균의 생장을 흡광도를 측정하여 비교한다는 것은 어려운 일이다. 따라서 병원균의 균사 생장을 정량적으

로 측정할 수 있는 방법이 제안되어야 한다. 손 등(1999)은 *Colletotrichum gloeosporioides*의 균사 생육에 미치는 영향을 조사하기 위해서 배양한 균사체를 tryphane blue로 염색한 후 흡광도를 측정하였고, Freimoser 등(1999)은 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)를 처리함으로써 병원균의 성장 정도를 보다 정확하게 조사할 수 있는 방법을 보고하였다. 배양한 균사체에 MTT를 처리하면 처리된 MTT는 균체의 호흡과정 중에서 환원되어 물에 녹지 않는 보라색의 formazan이라는 결정체를 세포 안에 만들게 되기 때문에, 균체에 propanol을 처리하여 formazan의 결정체를 추출한 후 595nm에서 흡광도를 측정함으로써 균사 성장 정도를 조사할 수 있었다. 이러한 연구 결과는 실험실 내에서 다수의 화합물이 식물 병원 곰팡이의 침입 초기에 나타나는 형태 분화에 미치는 효과를 효율적으로 검정하는데 사용될 수 있을 것으로 생각한다.

본 실험에서는 최 등(1999)과 Freimoser 등(1999)의 방법을 이용하여 탄저병 포자의 침입 초기 형태 분화에 미치는 화합물의 효과를 검정하기 위한 방법을 최적화하였고, 기존의 몇 가지 살균제가 탄저병균의 포자 발아와 부착, 그리고 균사 성장에 미치는 효과를 조사하였다.

#### 가. MTT와 propanol의 처리가 병원균의 흡광도에 미치는 영향

MTT와 propanol 처리와 접종한 포자의 농도는 병원균의 흡광도에 영향을 미쳤다(그림 11). JC24의 포자 농도가  $1 \times 10^4$  개/mL일 때, MTT를 12시간동안 처리하였을 때가 MTT 무처리구보다 높은 흡광도를 나타냈다. 또한 MTT 처리와 함께 1시간 동안 propanol을 처리하였을 때가 MTT 단독 처리구보다 흡광도가 더 높았다.  $1 \times 10^6$  개/mL의 농도로 JC 24를 접종하였을 때도 MTT 무처리구보다는 MTT 처리구에서 유의성 있게 높은 흡광도를 나타냈으나, MTT 단독 처리구와 MTT와 propanol 처리구의 흡광도 사이에는 유의성 있는 차이가 없었다.

Propanol의 처리가 mancozeb와 hexaconazole을 처리한 JC 24의 흡광도에 미치는 영향을 조사하였다(그림 12). 이 때 접종한 JC24의 분생포자 농도는  $1 \times 10^5$  개/mL로 조절하였다. Mancozeb는 1.0 µg/mL보다 낮은 농도에서 propanol

처리구의 흡광도가 propanol을 처리하지 않은 무처리구의 흡광도보다 1.4에서 1.8 배정도 높게 나타났으며, hexaconazole은 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 제외한 모든 처리 농도에서 약 1.8배정도 높게 흡광도가 나타났다. 이러한 결과는 처리한 살균제의 흡광도에 대한 억제율에 영향을 미쳤다. 예로서 Mancozeb의 흡광도 억제율은 propanol의 처리 여부에 따라서 변화하였는데, propanol을 처리하지 않은 0.1과 0.39  $\mu\text{g}/\text{mL}$  처리구에서 56.9와 72.6%의 억제율을 보였던 것이, propanol을 처리한 실험구에서는 61.9와 88.2%로 억제율이 상승하였다.

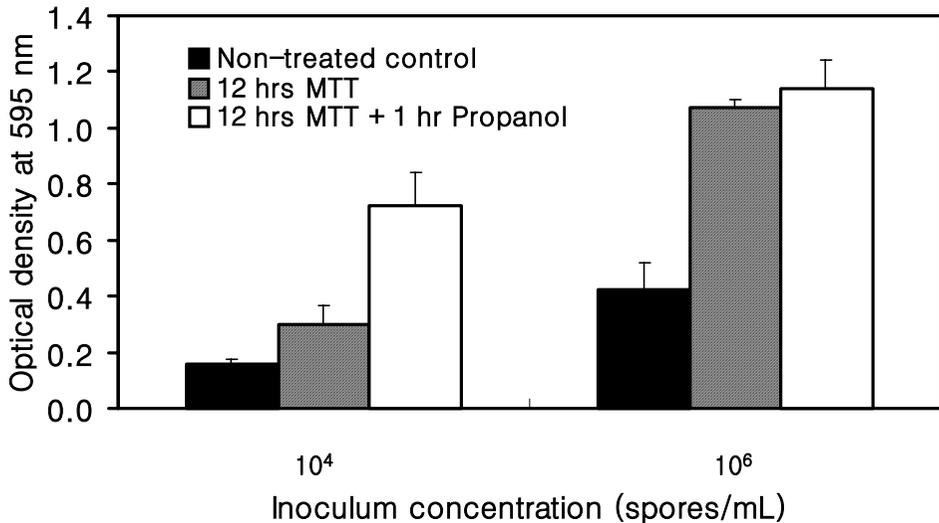


그림 11. *Colletotrichum* sp. JC24의 균사의 흡광도를 측정하는데 있어서 MTT와 propanol의 효과. JC24를 25°C에서 36시간 배양한 후, MTT와 propanol을 12시간과 1시간 간격으로 처리하고 595 nm에서 흡광도를 측정하였음.

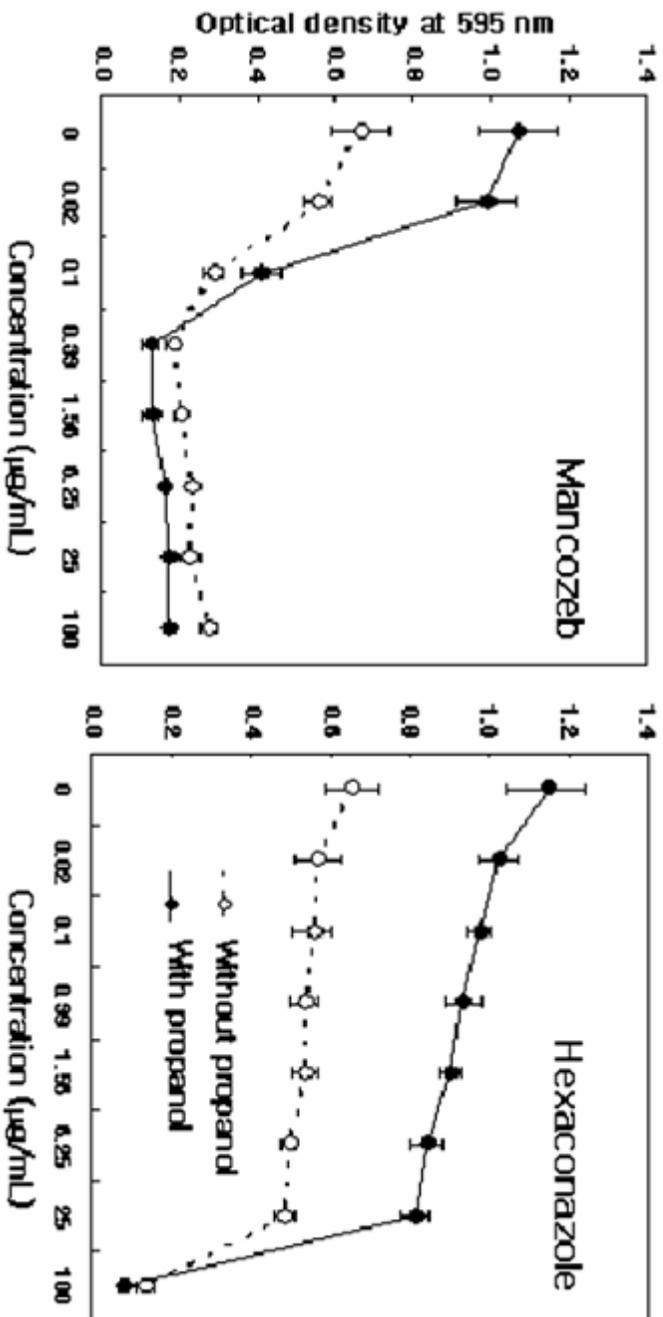


그림 12 Mancozeb와 hexaconazole을 처리한 *Colletotrichum* sp. JC24의 균사 생장을 흡광도로 측정할 때 propanol 처리가 미치는 영향. Propanol은 10 µl의 MTT를 처리하고 PDB로 세척한 후에 1시간 연속적으로 처리하였음.

#### 나. 접종한 포자 농도와 배양 시간이 흡광도에 미치는 영향

JC24를 24시간 배양하였을 때 접종한 포자의 농도간에는 흡광도의 차이가 뚜렷하지 않았다(그림 13). 그러나 배양 시간이 36시간으로 증가함에 따라  $1 \times 10^5$  과  $1 \times 10^6$  개/mL의 농도로 접종한 JC24의 흡광도는 1.093과 1.206까지 급속하게 증가하였으나, 두 처리간에는 통계적인 유의성이 없었다.  $1 \times 10^5$ 과  $1 \times 10^6$  개/mL의 농도로 분생포자를 접종한 JC24를 48시간 배양하였을 때, 36시간 배양하였을 때와는 다르게  $1 \times 10^6$  개/mL의 농도로 접종한 처리구의 흡광도가  $1 \times 10^5$  개/mL보다 미미한 차이로 높게 나타났다.  $1 \times 10^4$  개/mL의 농도로 접종한 JC24는 48 시간 후에 0.619까지 흡광도가 계속 증가하였다.

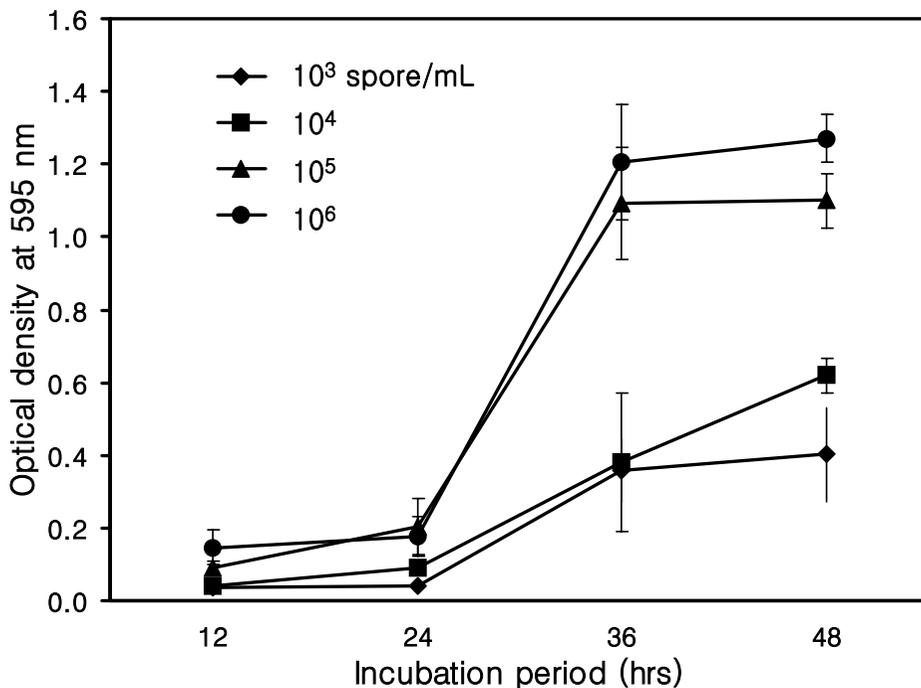


그림 13. *Colletotrichum* sp. JC24의 흡광도에 미치는 접종원 농도의 영향.

#### 다. 병원균의 기주 침입 단계의 특이적 형태에 대한 기존 살균제의 억제 효과

기주의 침입 단계에 필요한 병원균의 여러 가지 형태 변화 중에서 분생포자의 발아와 기주체 부착 및 균사 생육에 대한 기존 살균제의 억제 효과를 microtiter plate 상에서 조사하였다. 그림 14에서 보는 바와 같이 보호용 살균제들의 병원균 억제 양상은 두 가지의 그룹으로 구별할 수 있었다. Mancozeb, chlorothalonil, dithianon 등은 6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 낮은 처리구에서도 포자 발아, 균사 성장, 포자의 부착을 조사한 모든 처리에서 85% 이상의 억제 효과를 보였다. 그러나 propineb, iminoctadine, fluazinam 등의 보호용 살균제들은 전체적으로 낮은 억제율을 보였고, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 처리구에서 2시간 동안 살균제를 처리하고 세척한 후 조사한 포자 부착에 대한 억제율은, 포자 발아와 균사 성장에 대한 억제율 보다 감소하는 경향을 보였다. 병원균을 6시간 동안 배양한 후에 살균제를 처리하였을 때, propineb는 17.7%만 균사의 생육을 억제할 정도로 억제율이 저조하였지만, iminoctadine과 fluazinam은 분생포자를 접종함과 동시에 처리한 처리구와 비슷한 억제율을 보였다.

실험에 사용한 6종의 스테롤 생합성 저해 살균제들의 병원균의 흡광도에 대한 억제율은 보호용 살균제보다 떨어지는 경향을 보였다(그림 15). 6종의 살균제 모두 6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서의 억제율은 매우 저조하였다. 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 hexaconazole, tebuconazole, myclobutanil 등은 처리한 살균제를 세척할 경우 propineb, iminoctadine, fluazinam 등의 보호용 살균제의 억제 경향과 같이 효과가 감소하였다. Nuarimol의 경우는 특이하게 억제율은 미미하였지만 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 포자 부착의 억제율이 54.7%로 세 처리구 중에서 가장 우수하였다. 그러나 6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 처리한 nuarimol을 세척함으로써 포자 부착에 대한 억제 효과는 전혀 보이지 않았고, 포자 발아와 균사 성장 억제 효과보다 감소하는 경향을 보였다.

Kresoxim-methyl의 6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  처리구에서는 포자의 발아와 부착 및 균사 성장에 대한 억제 효과에는 통계적인 유의성이 없었다. 그러나 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 포자 부착에 대한 억제 효과가 다른 어떤 살균제보다 크게 나타났는데, 포자 발아에 대한 흡광도의 억제율이 6.2%에 지나지 않았던 반면에, 포자의 부착에 대한 억제율은 54.4%로 실험한 모든 살균제 중에서 가장 높았다(그림 16).

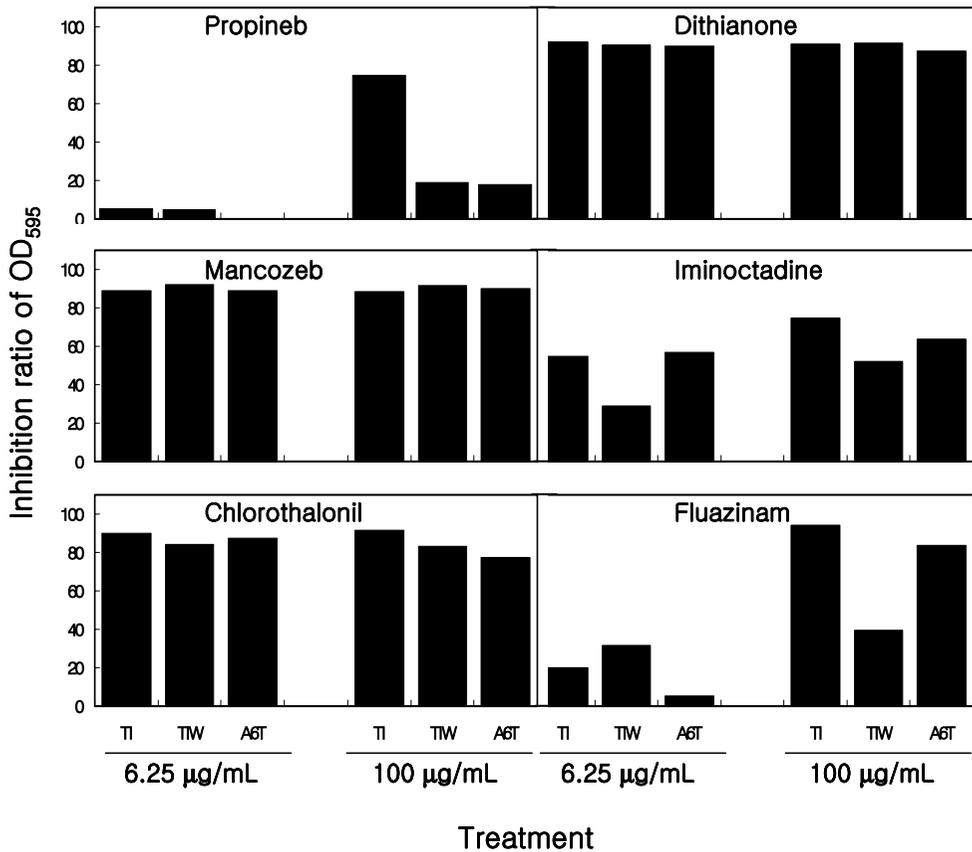


그림 14. The effect of 6 protective fungicides on spore germination, adhesion and mycelial growth of *Colletotrichum* sp. JC24 by microtiter plate assay. For the assessment of fungicidal activity against spore germination, mycelial growth and spore adhesion, fungicides dissolved with DMSO were treated at inoculation of JC24 immediately (TI), after incubation for 6 hrs (A6T), and following washing fungicides 2 hrs after incubation (TIW), respectively. The final concentration of DMSO was adjusted at about 1%.

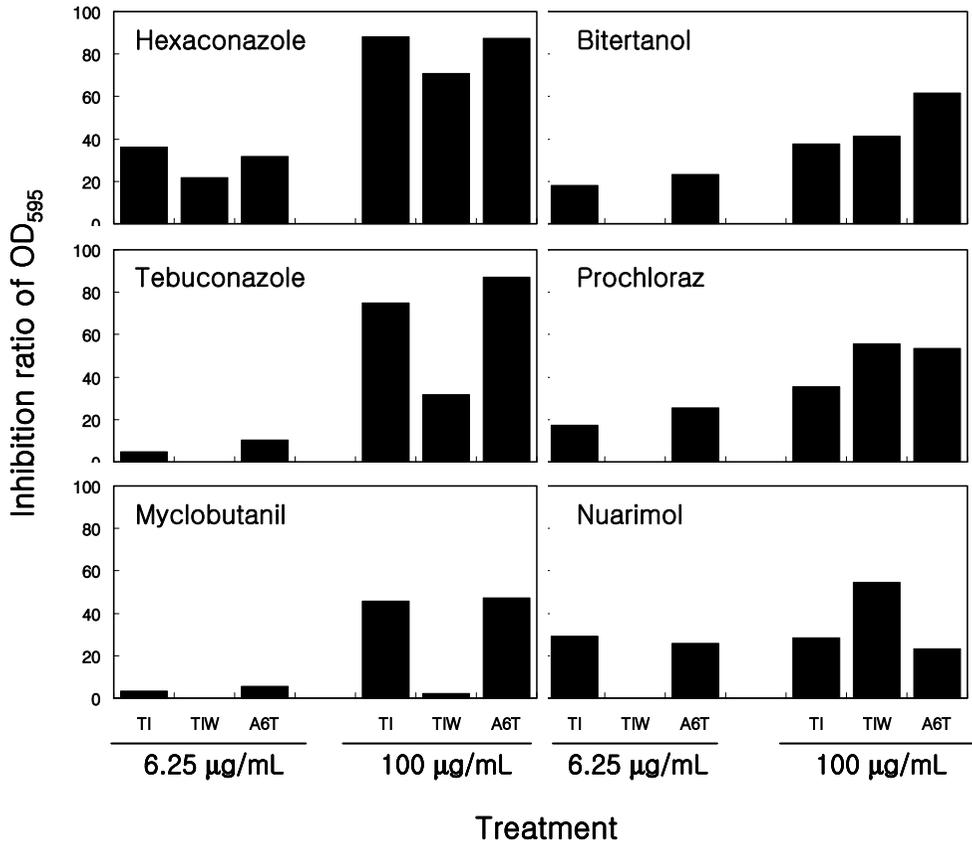


그림 15. The effect of 6 fungicides inhibiting sterol biosynthesis on spore germination, adhesion and mycelial growth of *Colletotrichum* sp. JC24 by microtiter plate assay. For the assessment of fungicidal activity, fungicides were treated at inoculation of JC24 immediately (TI), after incubation for 6 hrs (A6T), and following washing fungicides 2 hrs after incubation (TIW), respectively.

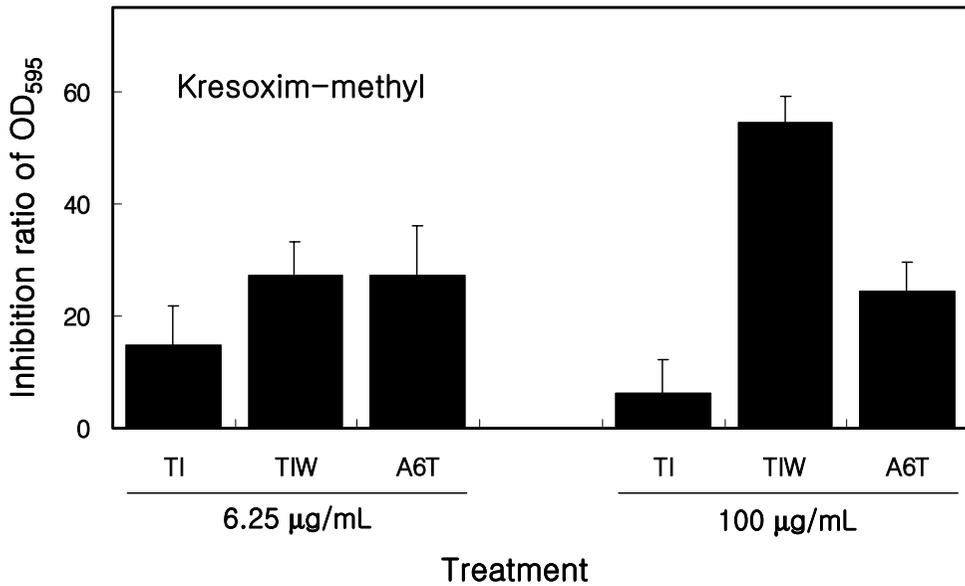


그림 16. The effect of kresoxim-methyl on spore germination, adhesion and mycelial growth of *Colletotrichum* sp. JC24 by microtiter plate assay. Fungicides dissolved with DMSO were treated at inoculation of JC24 immediately (TI), after incubation for 6 hrs (A6T), and following washing fungicides 2 hrs after incubation (TIW), respectively. The final concentration of DMSO was adjusted at about 1%.

본 실험에서 최 등(1999)의 microtiter plate assay 방법과 MTT와 propanol을 처리하여 병원균의 흡광도를 측정하는 Freimoser 등(1999)의 방법을 개선함으로써 고추 탄저병균에 대하여 다양한 화합물의 살균 활성을 측정할 수 있게 되었다고 생각한다.

Microtiter plate assay 방법을 사용하여 다수의 화합물의 살균활성을 측정할 때, 단순히 포자 발아와 균사 생장에 대한 억제 효과만을 측정한다면 특이적인 활성을 지니고 있는 화합물을 선별하지 못하는 경우가 생길 수도 있다. 이러한 단점을 극복하기 위하여 Slawewski 등(2002)은 96 well microtiter plate에서 *Botrytis*와 *Puccinia*의 포자 부착에 대한 몇 종류 살균제의 억제 효과를 조사하였다. 병원균의 포자를  $1 \times 10^5$  개/mL로 접종한 microtiter plate에 살균제를 처리하고 25°C에서 배양한 후, 바닥에 강하게 털어 부착하지 못한 포자를 제거하였다. 부착한 포자는 포유류의 cytotoxicity assay에 사용되는 sulforhodamine B를 이용하여 포자의 단백질 양을 조사함으로써 부착한 포자를 정량화 하였다 (Skehan 등, 1990). 그러나 그 과정이 MTT와 propanol을 사용하는 Freimoser 등(1999)의 방법에 비교하면 복잡하기 때문에 다수의 화합물을 검정하기에는 적합하지 않은 것으로 판단하여, 본 실험에서는 Freimoser 등의 방법을 개선하여 사용하였는데, 고추 탄저병균을 96 well microtiter plate에 접종할 때, 화합물의 처리 시기를 달리함으로써 병원균이 기주식물을 침입하는 초기에 보여주는 여러 가지의 형태 분화에 대한 화합물의 활성 여부를 검정할 수 있었다. 최 등(1999)은 *in vitro*에서의 여러 가지 방법으로 *Botrytis cinerea*에 대한 sulphamide계와 dicarboximide계 살균제의 포자 발아와 균사 생장 억제 효과를 조사하였는데, microtiter plate 방법에서 살균제를 처리하는 방법을 달리 함으로써 간단하게 각 살균제의 작용 특성을 알 수 있었다고 보고하였다. 그들은 병원균을 접종함과 동시에 살균제를 처리하고 3시간 배양한 후 새로운 배지로 세척하는 방법(I)과 병원균을 접종한 후 6시간 배양한 다음 살균제를 처리하는 방법(II)을 사용하였는데, 방법 I과 II에서 얻은 결과가 포자 발아와 균사 생장에 대한 억제 실험에서 얻은 결과와 유사한 경향을 보였다고 보고하였다. 본 실험에서는 두 가지의 연구 결과를 이용하여 JC24를 접종함과 동시에, 또는 접종하고 6시간 배양한 후에 살

균제를 처리하여, 분생 포자의 발아와 균사 성장 억제 효과를 검증할 수 있었다. 또한 병원균을 접종하면서 살균제를 처리하여 2시간 동안 배양한 다음, 새로운 배지로 2회 세척하여 살균제와 부착하지 않은 병원균의 포자를 제거하고 새로운 배지를 보충하여 배양함으로써, 병원균 포자의 부착을 저해하는 살균제의 효과를 구할 수 있었다. 이상의 방법으로 고추 탄저병 방제용 살균제를 실험한 결과, 본 실험 방법은 다양한 기작을 지니는 다수의 화합물의 살균 활성을 검증하는데 유용하게 이용될 수 있을 것으로 생각하였다.

Microtiter plate assay 방법에서 고추 탄저병균(JC24)의 성장 정도를 정량적으로 측정하기 위해서는 12시간의 MTT의 처리와 1시간의 propanol 처리가 필요하였다. 그러나 그림 11에서 보는 바와 같이  $1 \times 10^6$  개/mL로 접종하였을 때는 MTT의 단독 처리만으로도 무처리구보다 현저하게 흡광도가 증가하였고, MTT의 단독 처리와 MTT와 propanol 병행 처리의 흡광도 사이에는 유의성이 없었다. Microtiter plate의 한 well 당 JC24의 분생포자를  $1 \times 10^6$  개/mL로 접종하고 36시간 배양하면 그림 12에서 보는 것과 같이 JC24의 성장 곡선이 포화기에 해당하는데, 처리한 MTT가 산화되어 세포질 내부에서 formazan이 대량으로 생성되기 때문에 microtiter plate reader가 가지는 검출한계를 넘어서서, propanol의 처리에 의해서 세포로부터 추출되는 formazan의 흡광도를 정확하게 측정하지 못하는 것으로 생각된다. 따라서 microtiter plate assay 방법으로 고추 탄저병균(JC24)의 생육 정도를 측정하고자 할 때, MTT와 propanol을 동반 처리함으로써 병원균의 성장을 더욱 정량적으로 측정할 수 있으나, 접종하는 접종원의 포자 농도는 적정 농도로 조정해야할 필요가 있었다. 본 실험에서는 접종원의 농도를  $1 \times 10^5$  개/mL로 조절하는 것이 가장 효과적인 결과를 얻을 수 있었다.

Mancozeb, chlorothalonil, dithianon은 6.25  $\mu\text{g/mL}$ 에서 고추 탄저병균 분생포자의 발아와 부착, 그리고 균사 성장을 모두 억제하는 것을 보아 병원균의 초기 분화의 전단계에 강하게 작용하는 것을 알 수 있었다. 그림 14에서 보는 바와 같이 propineb, iminoctadine, fluazinam은 위의 세 가지 살균제보다 고추 탄저병균의 여러 가지 형태적 분화에 미치는 영향은 적은 것으로 나타났다. 특히 propineb는 병원균을 접종하고 바로 처리하였을 때를 제외하고는 100  $\mu\text{g/mL}$ 의

처리구에서도 병원균에 대한 억제 효과가 저조하였다. 이 결과는 propineb는 병  
 원균의 균사 생육이나 포자 부착보다는 포자 발아에 더 큰 영향을 미치고 있다  
 는 것을 보여준다. 6종의 보호용 살균제는 살균 활성의 강도와 특징에 따라서 두  
 그룹으로 나눌 수 있었는데, propineb, iminoctadine, fluazinam은 JC24의 분생포  
 자를 접종함과 동시에 2시간 동안 처리하고 새로운 배지로 세척할 경우, 다른 두  
 처리보다 그 효과가 감소하였다. Mancozeb, chlorothalonil, dithianon과 같은 다  
 른 3종의 살균제들도 6.25 µg/mL 이하의 농도로 처리하고 2시간 후에 세척하여  
 JC24의 포자 부착에 미치는 효과를 검사한 결과, 억제율이 감소하는 것을 보아  
 포자의 부착만을 특이적으로 억제하는 효과는 부족한 것으로 생각되었다(결과 미  
 발표). 스테롤 생합성 저해 살균제들은 보호용 살균제보다 활성이 미미하게 나타  
 났는데, 100 µg/mL의 처리구에서조차 hexaconazole과 tebuconazole을 제외한  
 다른 살균제들의 포자 발아와 균사 생장 억제 효과는 모두 60% 미만이었다(그림  
 15). 일반적으로 식물 병원곰팡이의 스테롤 생합성을 억제하는 살균제는 포자의  
 발아보다는 균사의 생장을 크게 억제하는 것으로 알려져 있다(Sherald 등, 1973;  
 Buchenauer, 1987). 그림 15에서 보는 바와 같이 bitertanol과 prochloraz는 100 µ  
 g/mL에서 균사 생장의 효과가 다른 효과보다 높게 나타난 반면에,  
 hexaconazole, tebuconazole, myclobutanil에서는 포자 발아와 균사 생장에 대한  
 억제 효과가 대등하였다. Hexacoanzole을 비롯한 세 가지의 살균제에서 포자 발  
 아와 균사 생장 억제 효과가 비슷하였던 것은 본 실험에서 포자 발아에 대한 억  
 제 효과를 알아보기 위해서 병원균을 접종하면서 살균제를 처리하고 계속 배양  
 하기 때문에 포자 발아에 대한 억제 효과와 균사 생장에 대한 억제 효과를 엄격  
 하게 구별할 수 없었던 한계에서 나온 결과라고 본다. 그러나 균사 생장 억제 효  
 과는 병원균을 6시간 배양하고 처리하였기 때문에 균사생장만을 억제하는 효과  
 를 구할 수 있었다고 생각한다. 따라서 포자를 접종하면서 hexaconazole,  
 tebuconazole, myclobutanil과 같은 살균제를 동시에 처리한 처리구에 대해서는  
 현미경에서 포자의 형태를 관찰하여, 포자 발아에 대한 억제 효과를 정확하게 판  
 단할 수 있을 것으로 생각한다. Nuarimol의 100 µg/mL 처리구에서 살균제를 세  
 척할 경우 포자의 부착에 대한 억제 효과가 상승하는 결과를 얻었지만, 6.25 µ

g/mL에서 100  $\mu\text{g/mL}$ 와 대등한 포자 발아와 균사 성장 억제 효과를 보이면서도 부착을 억제하는 효과는 전혀 보이지 않았던 것을 보아 부착만을 특이적으로 억제한다고 보기는 어려웠다. 그러나 100  $\mu\text{g/mL}$ 에서 보인 포자 부착 억제 효과에 대한 원인은 좀 더 규명해 보아야 할 것으로 생각한다.

Slawecki 등(2002)은 호흡 저해 살균제로 보고된 kresoxim-methyl이 *B. cinerea*와 *P. recondita*의 포자 부착을 억제한다고 보고하였다. 본 실험에서도 100  $\mu\text{g/mL}$ 의 kresoxim-methyl의 처리는 포자 발아나 균사 성장보다는 포자의 부착을 특이적으로 억제하는 것을 알 수 있었다. Kresoxim-methyl은 고추 탄저병균의 호흡과정 중에서 cytochrome bc1 complex의 활성을 억제하는데, 이 과정에서 병원균이 대체 호흡 경로(alternative respiration pathway)를 작동하기 때문에 *in vitro* 실험에서는 억제 효과가 포자에서의 결과와는 다르게 매우 저조한 것으로 보고되어 있다(Ypema와 Gold, 1999). 따라서 본 실험에서 포자 발아와 균사 성장 억제 효과가 미미한 것은 기존의 보고와 부합하는 결과로 생각한다. 그러면서도 포자가 microtiter plate의 표면에 부착하는 것을 억제하는 효과가 다른 효과보다 크게 나타난 것은 kresoxim-methyl이 포자 부착의 과정에 영향을 주고 있다는 증거이다. Doss 등(1993)에 의하면 중요한 식물병원균의 하나인 *B. cinerea*의 분생 포자 부착은 초기 부착과 후기 부착으로 나눌 수 있다. 초기의 부착에서는 건조한 분생 포자가 수화되면서 소수성인 표면에 약한 부착력으로 짧은 시간(약 2 분 이내) 안에 부착하지만, 기질 위에서 수 시간 배양된 후에 발생하는 후기의 부착에서는 포자가 발아관을 내며 부착하기 때문에 기질 표면의 소수성과는 관계없이 발아관 주변에 다당류의 물질을 분비하며 매우 강하게 부착하게 된다(Doss 등, 1993). Kresoxim-methyl이 *Colletotrichum* sp. JC24의 포자 부착을 억제하는 것은 JC24의 포자가 발아하기 전의 초기 단계 부착을 억제하는 것으로 생각된다.

고추 탄저병균(JC24)을 이용하여 수행한 본 연구를 통하여 다양한 작용 특성을 지닌 화합물에 대한 대량 검정 방법을 확립할 수 있었다. 또한 확립한 검정법을 이용하여 기존의 살균제의 살균 활성을 조사한 결과, 활성의 강도와 특징을 가지고서 보호용 살균제와 스테롤 생합성 저해 살균제를 두 그룹으로 분류할 수

있었으며, 포자의 부착을 특이적으로 억제하는 kresoxim-methyl의 특성을 확인할 수 있었다.

#### 4. 고추 탄저병균, *Colletotrichum acutatum* JC24의 침입 구조 형성에 미치는 영향

식물병원균이 기주식물을 침입하기 위해서는 병원균의 포자가 기주식물의 표면에 부착하고, 침입하기 위한 다양한 구조를 만들어야 한다. 식물병원균에 있어서는 기주 식물의 표면의 성질에 따라서 침입 구조를 성공리에 만들 수도 있고, 만들지 못하는 경우도 생긴다. 벼 도열병균은 벼 잎에서 발아하고 부착기를 만들어 벼 잎의 표면을 침입할 때, 벼 잎의 소수성이나 강도를 인식하여 부착기를 만든다고 알려져 있다. *Colletotrichum*속의 탄저병균들 중에서도 *C. orbiculare*, *C. lindemuthiarum*, *C. gloeosporioides* 등에서 기주 표면과 부착기 등 침입 구조의 형성과의 관계에 대해서 보고되어 있다. 본 실험에서는 고추 탄저병균으로 새롭게 동정된 *C. acutatum*에서 포자 발아, 부착기 형성, 부착기의 멜라닌화 등이 일어나는데, 분생포자가 부착하는 기질의 종류, 포자의 농도, 배양 온도, 포자를 수확하는 *C. acutatum*의 배양 일수, 그리고 영양분이 미치는 영향을 조사하였다.

##### 가. 분생포자가 부착하는 기질

그림 17에서 보는 바와 같이 *C. acutatum* JC24는 실험에 사용한 세 종류의 기질 중에서 cellophane막 상에서 가장 높은 포자 발아율, 부착기 형성율, 그리고 부착기의 멜라닌화율을 보였다. 포자 발아는 cellophane 막에 분생포자를 접종하고 12 시간 후에 가장 높은 발아율을 보였으며, 24 시간에는 발아율이 감소하는 현상을 보여 주었다. 부착기 형성과 부착기의 멜라닌화도 12 시간 후가 가장 왕성하게 일어났다. 그러나 부착기의 가장 높은 형성율이 12 시간 후에 약 40% 정도에 그쳐서, 다른 식물병원균에서의 부착기 형성율과는 다른 점을 보여 주었다. 부착기의 멜라닌화는 약 10% 수준에 머물러, *C. acutatum*이 고추 열매를 침입하는데 부착기가 필수 불가결한 구조인가에 대해서 의문을 갖게 해준다.

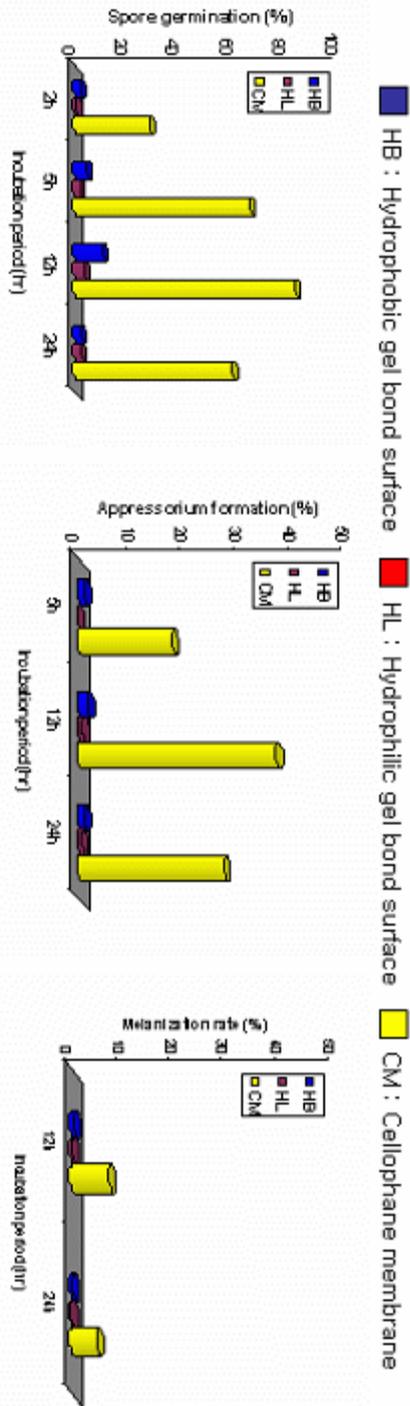


그림 17 온생포자가 부착하는 표면의 기질이 고추 탄저병균, *Colletotrichum acutatum* JIC24의 침입 기구 형성에 미치는 영향

특히 gel bond 상태에서는 도열평균과는 전혀 다르게 포자의 발아조차 되지 않았는데, 소수성인 표면에서 약 15% 정도의 포자발아율을 보였을 뿐, 매우 저조한 발아율이었다. 부착기 형성을 역시 매우 낮아 *C. acutatum* JC24가 고추를 침입하는데 있어서 부착기의 역할은 다시 한 번 고려해야할 사항으로 남았다.

#### 나. 분생포자의 농도가 미치는 영향

Cellophane막에 접종하는 분생포자의 농도가 너무 높거나 낮아도 막상에서의 포자 발아율이 저조하였다(그림 18). 포자의 농도가  $1 \times 10^6$  개/ml일 때 JC24는 발아율이 가장 높았으며, 부착기의 형성과 부착기의 멜라닌화 역시 가장 많이 일어난 것을 알 수 있었다. 접종하는 포자 농도에 따라서 특정한 기질 상에서 병원균의 침입 기구의 형성이 영향을 받고 있기 때문에, cellophane막과는 많은 성질이 다르지만, 고추 열매에 병원균을 접종하고자 할 때에는 병원균의 농도를 균일하게 조정해야 한다. 또한 cellophane막을 이용하여 실험실에서 특정한 살균제의 작용 특성을 조사하고자 할 때에도 접종원의 포자 농도는 큰 영향을 미칠 수 있을 것으로 판단한다.

#### 다. 배양 온도가 미치는 영향

병원균 포자의 배양 온도는 포자가 침입에 필요한 자신의 구조를 만드는데, 커다란 영향을 미치지 않았다. 그림 19에서 보는 것과 같이 19°C의 낮은 온도에서는 접종하고 5시간 후에 JC24의 포자발아율이 다른 온도보다 낮은 경향을 보였지만, 배양시간이 더 지속됨에 따라서 다른 온도에서와 동일한 발아율을 보였다. 부착기 형성을 역시 19°C에서 가장 낮았지만, 27시간 배양한 이후로는 배양 온도에 차이가 보이지 않았다. 22, 25, 28°C의 경우에는 포자발아와 부착기 형성, 부착기의 멜라닌화 등에 전혀 차이가 없었다.

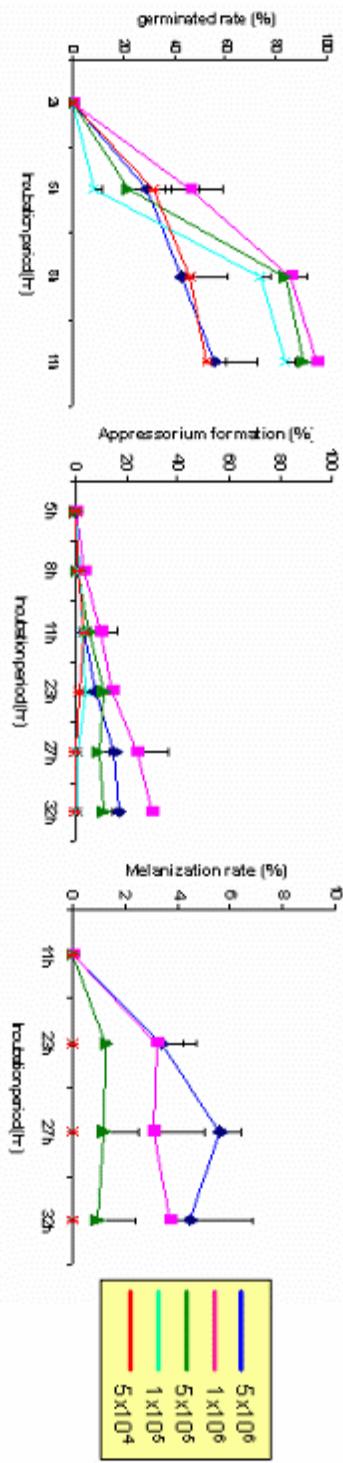


그림 18 접종원의 농도에 따라 *Colletotrichum acutatum* JC24가 침입 구조를 만드는 데 미치는 영향

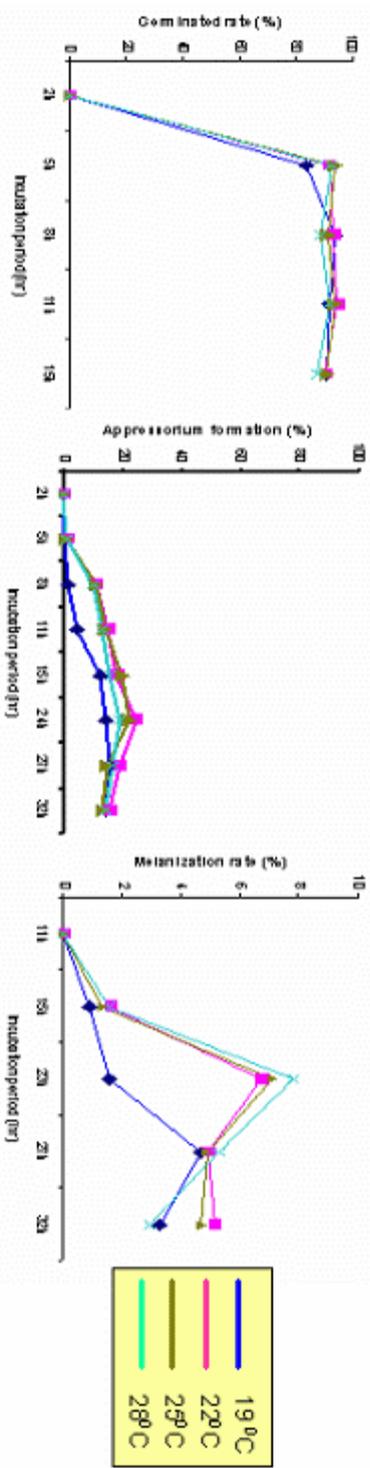


그림 18 배양 온도가 *Colletotrichum acutatum* JC24의 침입 기구 형성에 미치는 영향

#### 라. 포자를 수확하는 *C. acutatum*의 배양 일수

PDA에서 21일간 배양한 *C. acutatum* JC24에서 수확한 포자는 7일과 14일간 배양한 균총에서 수확한 포자보다도 집중하고 12시간까지는 포자의 발아율이 낮았다(그림 20). 25℃의 PDA에서 7일과 14일간 배양한 균체에서 수확한 포자의 발아율에는 차이가 없었다. 그러나 부착기의 형성율은 7일된 포자가 14일과 21일된 포자보다 높았다. 본 실험의 결과를 보면, 고추의 탄저병 실험을 위해서 포자를 수확하고자 할 때는, 25℃의 PDA에서 7 - 14일간 배양하고 포자를 수확하는 것이 바람직하다고 생각한다.

#### 마. 영양분이 미치는 영향

고추 잎과 향나무의 잎의 즙액을 분생포자의 현탁액에 첨가하여 Cellophane막에 접종하고 시간별로 관찰하면, 배양 17시간 이후 분생포자의 발아율이 급속하게 저하하는 현상을 관찰할 수 있었다(그림 21). 이러한 포자 발아율이 감소하는 원인은 *C. acutatum* JC24가 새로운 포자들을 대량으로 만들기 때문이라고 생각하고 현미경관찰을 시작하였다. 그림 23에서 보는 것과 같이 17시간 배양한 후, 각 처리구마다 단위면적당 관찰되는 포자의 수가 현저하게 차이를 알 수 있었다(그림 23). 고추 잎과 향나무의 잎의 즙액, 그리고 PD broth를 포자 현탁액에 첨가한 처리구에서는 증류수만을 사용한 무처리구에 비하여 단위 면적당 존재하는 포자의 수가 증가하고 있었다(그림 22). 그러나 즙액을 처리한 농도와는 큰 관련이 없었다. 영양분이 *C. acutatum* JC24의 분생포자 생성을 촉진하는가를 알아보기 위하여 PD broth를  $3^{-2}$ ,  $3^{-3}$ ,  $3^{-4}$ 으로 희석하여 포자 현탁액에 첨가하였다. 그 결과 PD broth를  $3^{-2}$ 의 높은 농도로 희석하여 처리한 처리구에서 면적당 생성된 포자의 수가 가장 많았다. *C. acutatum* JC24는 영양분의 존재하에서 부생적인 생활을 하며 대량의 분생포자를 만들기 때문에 포장에서 병이 많이 발생하는데도 많은 영향을 받을 것으로 생각한다. 고추 탄저병은 여름 장마기의 비바람에 의해서 갑작스럽게 발생이 증가하고, 방제가 어려워지는 식물병으로 알려져 있다. 고추 탄저병이 비바람에 의해서 전파되는 것은 고추 탄저병균의 분생포자가 gum물질에 묻혀있기 때문에 바람에 의한 전파가 되지 못하고, 반드시 비바람이

동반될 때 전반이 급격하고 용이하게 이루어질 수 있다. 또한 그림 20에서 보는 것과 같이 인공적으로 고추의 열매에 상처를 내고 병원균을 접종하였을 때와 상처 없이 접종하였을 때의 접종 부위에서의 병원균의 행동은 매우 다르다. 상처를 유발하고 접종을 하였을 때에는 표피 세포가 파열되며 밖으로 누출된 세포질의 영양분 때문에 접종한 *C. acutatum* JC24가 부생적인 생장을 하면서 상처 부위에 균사가 많이 형성되고, 동시에 대량의 분생포자를 형성하고 있는 것을 알 수 있었다. 그러나 상처없이 병원균을 접종한 부위에서는 JC24가 균사를 만들지 못하고 분생포자가 발아하고 부착기를 만든 상태가 지속되는 것을 볼 수 있다. 결국 포장에서의 비바람은 고추 탄저병균의 전반에 큰 영향을 미칠 뿐만 아니라 고추 열매에 상처를 유발하여 세포의 파열을 가져오고 영양물질을 세포 밖으로 누출하게 되기 때문에 세포질의 영양분에 의해서 병원균의 부생적 생장이 자극되어 대량의 분생포자를 만들게 될 것으로 생각한다. 또는 비바람에 있는 미량의 영양물질이 병원균의 부생적인 성질을 자극하여 대량의 분생포자를 만들 수도 있다. 이처럼 포장에서의 비바람은 병원균의 전반뿐만 아니라 병원균의 부생적 생장을 자극하여 포장에서의 병원균의 밀도를 상승시킬 것으로 생각한다.

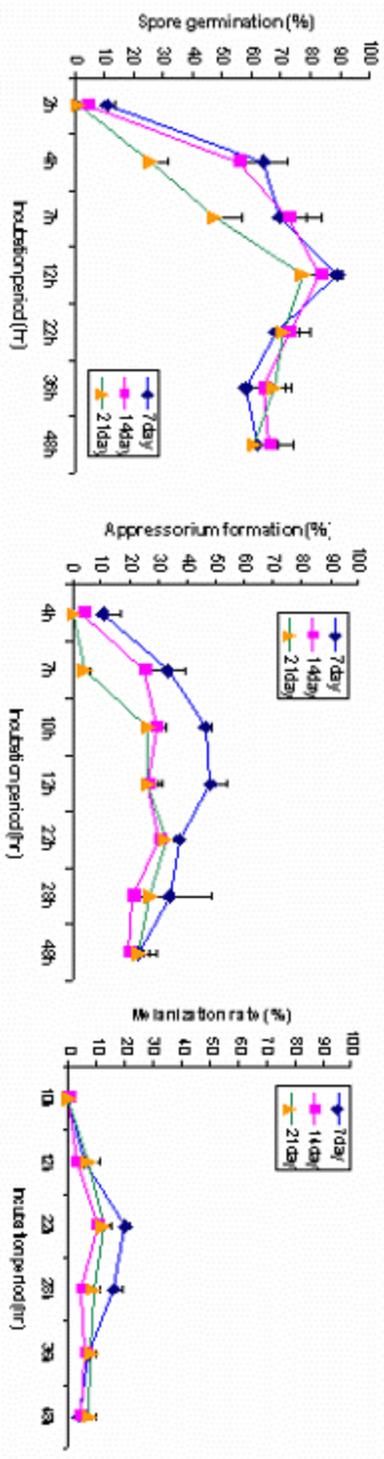


그림 20 수확한 포자의 배양 일수가 Cellophane막 상에서 *Colletotrichum acutatum* JC24의 침입 구조 형성에 미치는 영향

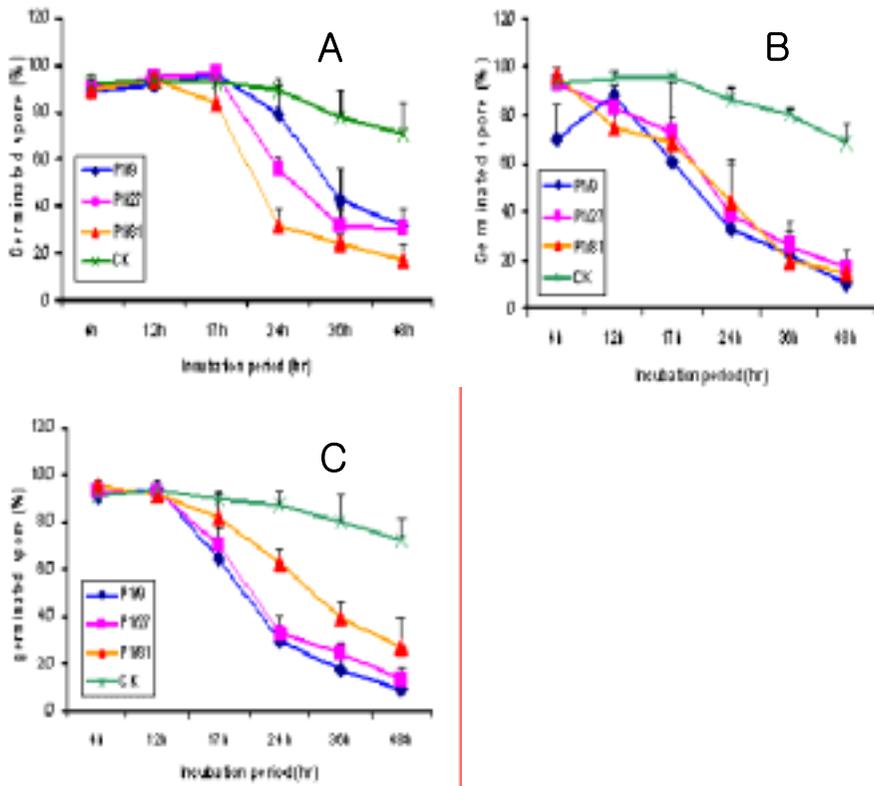


그림 21. 고추와 향나무의 잎의 즙액, 그리고 PD broth가 *Colletotrichum acutatum* JC24가 cellophane막 상에서 포자 발아에 미치는 영향.

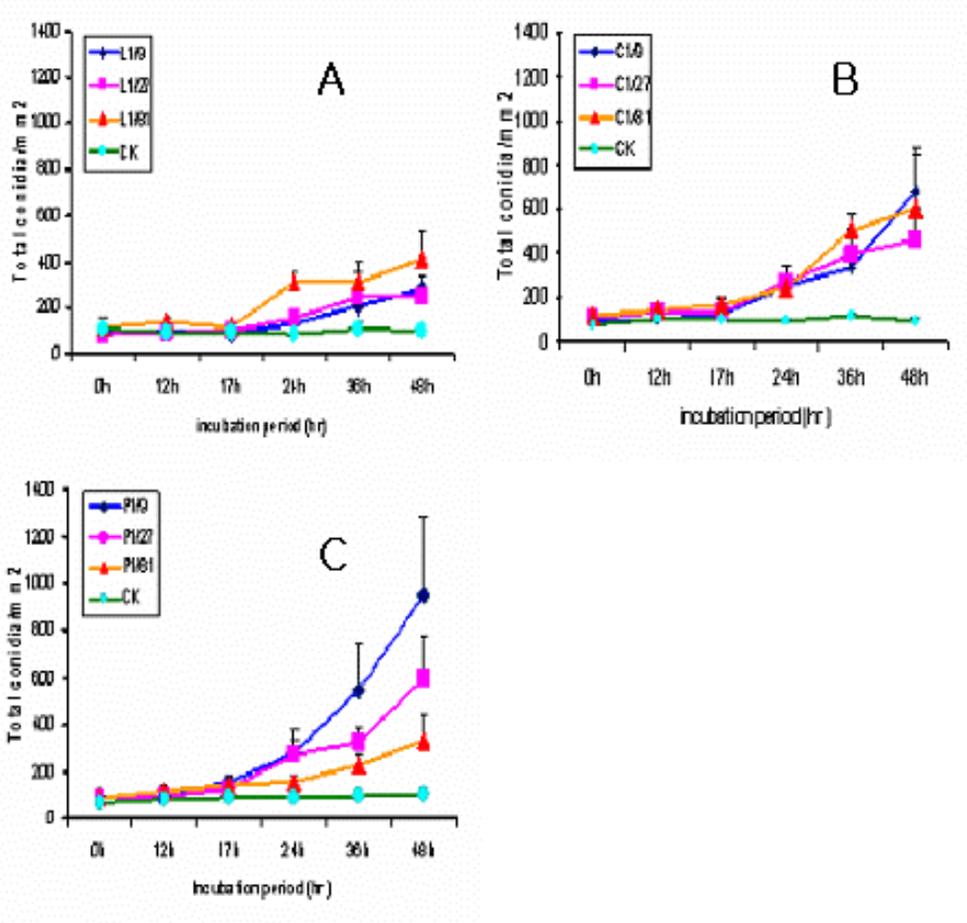


그림 22. 고추 잎과 향나무 잎의 즙액, 그리고 PD broth의 처리가 cellophane막 상에서 *Colletotrichum acutatum* JC24의 분생포자 생성에 미치는 영향.

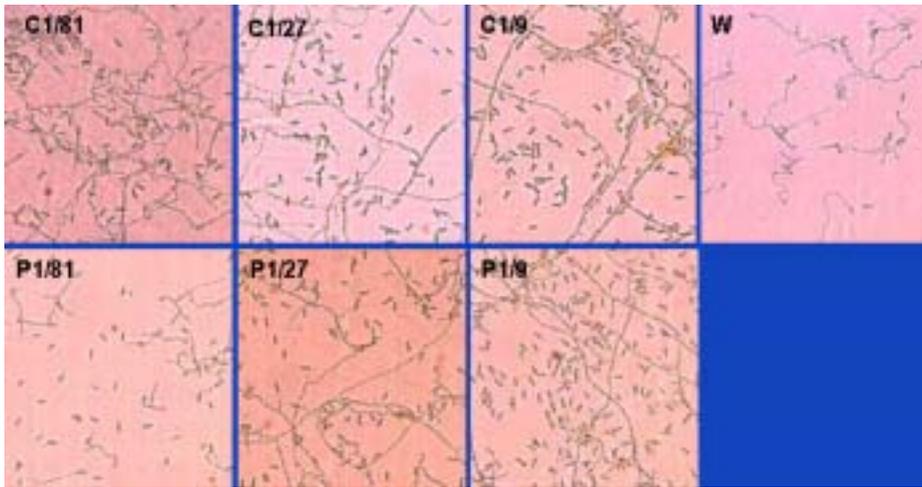


그림 23. 영양분이 *C. acutatum*의 포자 생성에 미치는 영향

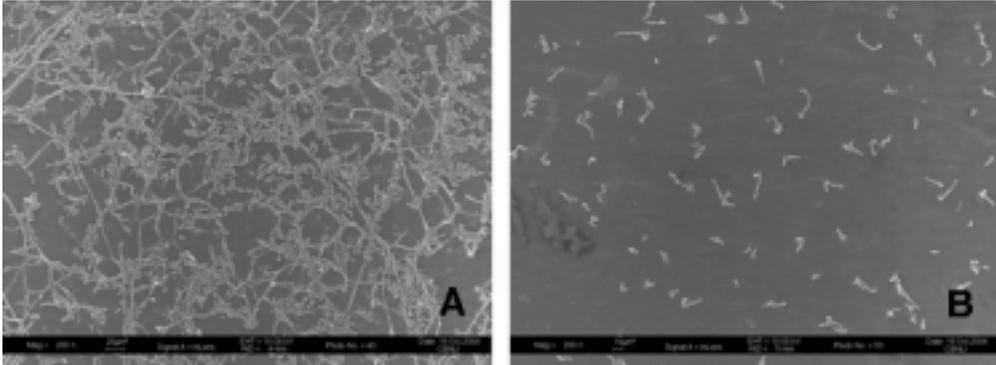


그림 24. *Colletotrichum acutatum* JC24의 침입 부위에서의 행동 모습. A; 고추 열매 표면에 상처를 내고 병원균의 포자 현탁액을  $5 \mu\text{l}$ 씩 점적하여 접종함. B; 고추 열매 표면에 상처를 내지 않고 포자 현탁액을  $5 \mu\text{l}$ 씩 점적하여 접종함. 접종한 고추는 포화 습도가 유지되는 플라스틱 상자에서 4일간 보관한 후, 전자현미경으로 관찰하였음.

## 5. 고추 탄저병의 방제에 사용되는 다양한 살균제의 작용 특성

고추 탄저병의 방제 살균제로 사용되고 있는 benomyl(a.i. 25% WP), chlorothalonil(a.i. 75% WP), tebuconazole(a.i. 25% WP), trifloxystrobin(a.i. 22% SC), bion-M(a.i. 49% WP), tricyclazole(a.i. 75% WP) 등을 선발하고 cellophane 막을 이용하여 *in vitro*에서의 작용 특성을 조사하였다. 또한 고추 열매와 온실에서 재배한 성체 식물에서 선발한 살균제의 효과를 조사하였다.

### 가. Cellophane막에서의 작용특성 조사

고추 탄저병균인 *C. acutatum* JC24의 포자 발아, 부착기 형성, 부착기의 멜라닌화에 미치는 선발한 6가지의 살균제의 효과를 cellophane막 상에서 조사하였다. JC24를 cellophane막에 접종하고 25°C에서 12, 24, 38시간 배양하고 발아한 포자의 수를 조사하였다(표 17). 무처리구에서의 발아율은 12시간에 88.4%이었지만 시간이 경과함에 따라서 감소하여 38시간 후에는 69.6%의 발아율을 보였다. 이에 비하여 trifloxystrobin은 12시간에서의 발아율이 59.3%이었고, 24시간부터 증가한 발아율은 24시간과 38시간 후에는 80.2와 74.2%로 통계적인 유의성없이 증가한 상태가 유지되고 있었다. 무처리구에서 JC24의 포자 발아율이 12시간을 기점으로 감소하는 것은 cellophane막 상에서 병원균이 부생적인 생장이 자극되어 부생적으로 성장하기 때문에 발아관이 만든 균사체에서 대량의 분생포자가 만들어진 것으로 생각한다. 따라서 24시간과 38시간에 조사한 결과에서는 새로운 포자들이 발아하지 못하였기 때문에 발아율이 전반적으로 감소하고 있음을 보여준다. 이러한 현상은 그림 21의 결과가 잘 설명하고 있다. 그러나 trifloxystrobin을 처리하게 되면 12시간에 이미 32.9%의 포자의 발아가 억제되고 있었고, 억제되던 발아율은 다시 상승하여 무처리구와 비교할 때 유의성을 인정할 수 없었다. 결국 trifloxystrobin은 *in vitro* 상태에서 병원균의 분생포자에 대해서 미약한 발아 억제 효과를 보였지만, 새로운 포자의 형성을 억제하지는 못하고 있음을 보여주었다. Tebuconazole은 배양한 지 12시간만에 조사한 결과 포자의 발아율이 82.0%로 무처리구와 비교하여 유의성이 인정되지 못하였다. 하지만 24시간과 38시간의 조사에서도 무처리구와는 다르게 포자의 발아율이 감소하지 않고, 83.3과 85.3%

의 발아율을 보여주었다. 결국 tebuconazole은 병원균의 포자에 대해서 발아를 억제할 수는 없었지만, 분생포자가 부생적인 성장을 하며 계속적으로 생성되는 것은 억제하고 있음을 알 수 있었다. JC24의 분생포자에 benomyl을 처리하였을 때, 분생포자의 발아율은 무처리구에서의 발아율의 변화 양상과 동일하였으며, 포자 발아 억제 효과도 확인할 수 없었다. 이러한 결과는 몇 가지의 주요 병원균의 멜라닌 대사를 저해하는 것으로 알려진 tricyclazole도 JC24의 포자 발아에는 아무런 영향도 미치지 않았다. 하지만 보호용 살균제로 알려져 있는 chlorothalonil과 보호용 살균제인 mancozeb가 식물에서 병에 대한 저항성을 유도하는 것으로 알려져 있는 BTH의 혼합제인 Bion-M은 JC24의 포자 발아를 완전하게 억제하였다. 이러한 결과는 96-well microtiter plate 방법으로 조사한 결과에서도 동일하게 JC24의 포자 발아를 완전히 억제하는 것으로 밝혀졌다(그림 14). Trifloxystrobin과 tricyclazole은 12시간째 조사한 결과를 보면, 무처리구와 비교하였을 때 발아한 포자에서의 부착기의 형성을 완전히 억제하였으며, 24시간과 38시간의 조사에서도 두 가지의 살균제는 98.2와 79.3%, 그리고 78.0과 67.2%의 발아 억제율을 보이고 있었다. 실험한 살균제 중에서 특히 benomyl의 처리구에서는 부착기에서의 멜라닌화가 전혀 관찰되지 않았다.

그림 25에서 보는 것과 같이 bion-M과 chlorothalonil의 처리구에서는 포자가 전혀 발아하지 못하였고, trifloxystrobin, tebuconazole, benomyl의 처리구에서는 발아를 억제하지는 못하였지만, 발아한 포자의 발아관 길이가 무처리구에 비하여 현저하게 억제되어 있는 것을 보여주고 있으며, 발아관의 형태도 비정상적으로 변화되어 있는 것을 볼 수 있었다. 그러나 tricyclazole의 처리에서는 JC24의 포자가 발아하고 성장하는데 전혀 영향을 받지 않고 있었다.

표 17. Cellophane막 상에서 *Colletotrichum acutatum* JC24 분생포자의 포자 발아, 부착기 형성, 그리고 부착기의 멜라닌화에 대한 몇 가지 살균제의 억제 효과

Fungicides	% of total spore		
	12 hr	24 hr	38 hr
<b>Spore germination</b>			
Untreated control	88.4±9.1	75.8±6.7	69.6±6.0
Trifloxystrobin	59.3±11.6	80.2±11.4	74.2±10
Tebuconazole	82.0±11.7	83.3±5.3	85.3±1.2
Benomyl	81.1±16.3	72.0±2.0	67.1±11.5
Tricyclazole	83.6±3.8	81.1±9.3	67.6±12.5
Bion-M	0	0	0
Chlorothalonil	0	0	0
<b>Appressorium formation</b>			
Untreated control	12.4±2.7	10.9±1.7	11.6±3.4
Trifloxystrobin	0	0.2±0.4	2.4±1.4
Tebuconazole	5.8±3.8	8.9±3.4	7.1±0.4
Benomyl	2.4±1.7	5.6±1.4	4.9±1.0
Tricyclazole	0	2.4±1.0	3.8±1.4
Bion-M	0	0	0
Chlorothalonil	0	0	0
<b>Appressorium melanization</b>			
Untreated control	0	3.8±1.4	6.2±1.5
Trifloxystrobin	0	0	2.4±1.4
Tebuconazole	0	3.8±1.4	3.6±0.8
Benomyl	0	0	0
Tricyclazole	0	0	0

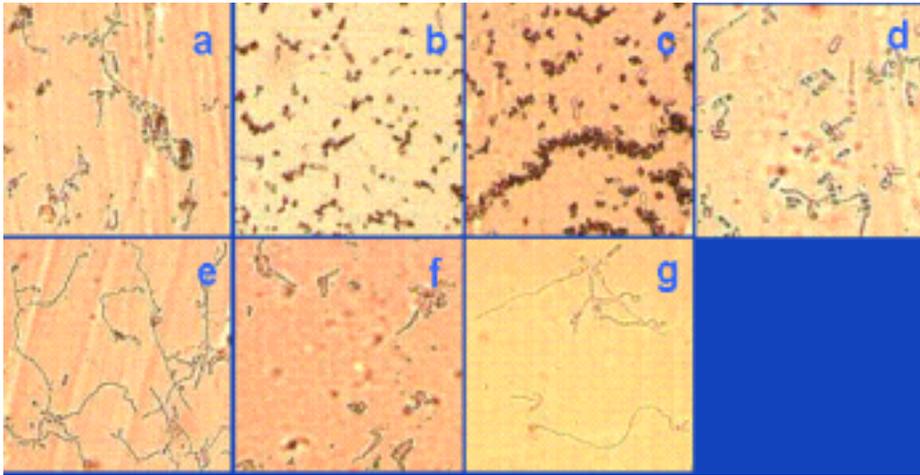


그림 25. 살균제를 처리하고 cellophane막에서 36 시간 배양한 *Colletotrichum acutatum* JC24의 포자의 모습. a; benomyl, b; bion-M, c; chlorothalonil, d; tebuconazole, e; tricyclazole, f; trifloxystrobin, g; untreated control.

#### 나. 고추 열매를 이용한 실험실에서의 살균제의 병 방제 효과

고추 열매를 이용한 실험에서는 접종하는 병원균의 농도에 따라서 병의 발생이 심하여질 때, 살균제의 방제 효과에 영향을 받을 것을 고려하여 접종원의 포자 농도를  $5 \times 10^5$ 과  $5 \times 10^6$  개/ml로 조정하여 실험하였다. 실험한 5 가지의 살균제는 모든 처리에서 효과가 낮았으며, 각 처리의 반복 간에도 차이가 심하여 실험의 유의성을 인정하기가 어려웠다(표 18). 결국 고추 열매를 이용한 실험에서의 검정을 실시하기 위해서는 살균제를 처리하는 방법과 병원균의 접종법 등이 더 연구되어야 할 것으로 판단한다.

#### 다. 온실에서 살균제 방제 효과 실험

온실에서 재배하여 고추 열매를 최소 10개씩 가지고 있는 성체식물에 선발한 chlorothalonil, benomyl, tebuconazole, trifloxystrobin, BTH와 mancozeb의 혼합제를 충분히 처리하고, 2일 후에 병원균인 *C. acutatum* JC24의 포자 현탁액을 상처 접종하여 살균제의 방제 효과를 조사하였다. 병 조사는 접종하고 2주 후에 접종 부위에 형성된 병반의 크기를 측정하였다. 보호용 살균제이며 JC24의 포자 발아를 100% 억제하였던 chlorothalonil은 전혀 효과가 없었다(그림 26). Trifloxystrobin과 BTH 혼합제는 64.8과 70.3%의 효과를 보였다.

### 6. 고추 탄저병에 대한 포장 방제력 작성

고추 탄저병의 방제를 위해서 경종적인 방법으로 반비가림과 골피복을 시험하였으며, 살균제를 사용하는 효율적인 방제력을 작성하기 위한 실험을 수행하였다.

표 18. 고추 열매에서의 살균제의 방제 효과 조사

Fungicide	Dilution concentration			
	N	N/2	N/4	N/8
$5 \times 10^5$ conidia/ml				
Chlorothalonil	8.8 ± 8.9	14.0 ± 12.5	0	4.4 ± 3.9
Benomyl	51.6 ± 13.4	32.5 ± 18.9	16.8 ± 12.8	5.9 ± 9.2
Tebuconazole	35.6 ± 9.3	37.1 ± 14.4	37.6 ± 4.0	15.8 ± 11.4
Trifloxystrobin	39.6 ± 53.1	24.8 ± 7.3	7.0 ± 7.7	9.9 ± 7.5
Bion-M	44.6 ± 40.1	29.3 ± 24.4	35.7 ± 4.5	34.0 ± 45.0
$5 \times 10^6$ conidia/ml				
Chlorothalonil	22.8 ± 10.0	14.0 ± 11.8	20.6 ± 3.4	14.2 ± 0.6
Benomyl	35.2 ± 13.4	35.9 ± 9.2	20.1 ± 10.1	11.8 ± 14.6
Tebuconazole	34.2 ± 9.5	31.4 ± 12.9	14.8 ± 12.9	3.9 ± 5.1
Trifloxystrobin	16.3 ± 8.3	28.5 ± 14.4	6.9 ± 12.0	14.4 ± 15.4
Bion-M	68.9 ± 26.9	32.9 ± 33.4	51.7 ± 27.1	10.5 ± 9.2

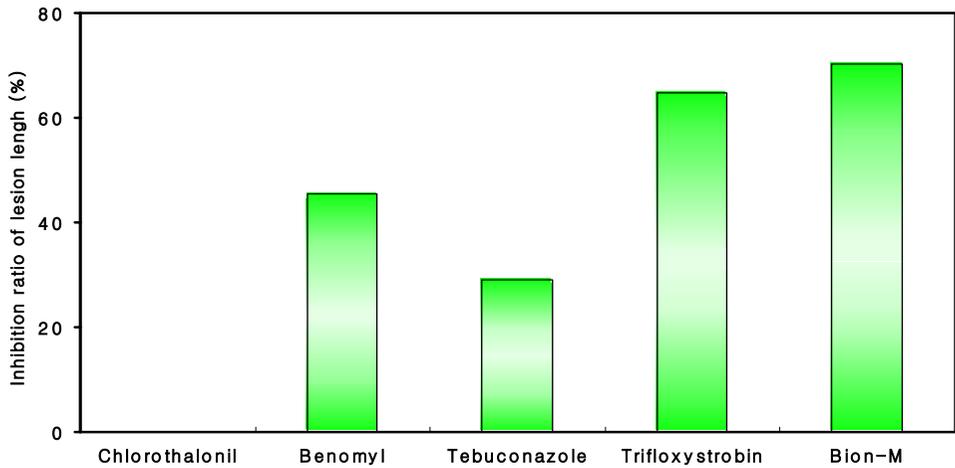


그림 26. 고추 탄저병에 대한 몇 가지 살균제의 포장에서 방제 효과.

#### 가. 골 피복과 반비가림의 고추 탄저병 방제 효과

탄저병의 발병과율은 7월 27일과 8월 26일에 실시하였다. 1차 조사인 7월 26일에 조사한 결과, 무처리구에서의 발병과율은 4.0%이었다(표 19). 한 달 뒤인 2차 조사시기에는 무처리구에서 86.6%의 발병과율을 보였다. 골피복의 경우는 1차와 2차 조사에서 4.2%와 83.8%의 발병과율을 보여 탄저병의 방제 방법으로 적당치 못함을 보여 주었다. 골피복 처리구에서의 발병 양상은 주변 포장과의 경계 부위에서부터 발병이 시작되었고, 골피복의 중앙부에서는 발병이 가장자리보다 낮았다. 이는 외부로부터의 침입과 골피복이 완전하게 되지 않은 가장자리 토양에서 비바람에 튀어 오른 포자가 병을 일으키기 시작한 것으로 판단된다. 하지만 반비가림의 경우는 1, 2차의 조사 모두에서 87.3%와 85.5%로 우수한 효과를 보였고, 특히 2차 조사에서는 살균제의 처리구도 효과가 급격히 감소하는데 비하여, 85.5%의 효과가 유지되는 것을 보아 매우 효과적인 방제법임을 나타내고 있다. 그러나 포장에서 고추 밭을 반비가림하여 재배하는 것이 용이하지 못한 단점을 가지고 있다. 따라서 고추 밭에 간이적이면서도 효율적인 반비가림 시설을 설치하는 전략이 필요하다.

표 19. 골 피복과 반비가림 재배가 고추 탄저병의 발병에 미치는 영향

재배 방법	1차 조사 (7월 27일)		2차 조사 (8월 26일)	
	발병과율(%)	방제가(%)	발병과율(%)	방제가(%)
무처리	4.0		86.6	
골피복	4.2	0	83.8	3.2
반비가림	0.5	87.3	12.5	85.5

#### 나. 살균제 처리 간격에 따른 병 방제 효과

실험에는 보호용 살균제, benzimidazole계 살균제, ergosterol 생합성 저해 살균제, strobilurin계 살균제에서 고추 탄저병의 방제에 사용되는 살균제를 하나씩 선발하여 실험하였다. 2003년의 1차 실험에서는 보호용 살균제와 benzimidazole계 살균제로 chlorothalonil과 benomyl을 사용하였지만, 2005년에는 propineb와 carbendazim을 사용하였다. 살균제의 처리 간격도 1차 실험에서는 7, 10, 14일로 처리하였지만, 2차 실험에서는 10일과 20일 간격으로 처리하였다.

1차의 실험에서는 4회 조사한 결과를 기초로 하여 각 살균제의 병진전곡선면적율을 구하여 효과를 비교하였다(표 20). trifloxystrobin은 살균제 처리 간격과 관계없이 67.4, 71.8, 71.9%의 방제 효과를 보였다(그림 27과 표 20). 온실실험 결과와 동일하게 chlorothalonil은 전혀 방제 효과가 없었다. benomyl의 경우도 저조한 효과를 보였다. 그러나 tebuconazole은 14일 간격으로 처리하였을 때 64.3%의 효과를 보여 7일과 10일 간격의 처리보다 효과적임을 알 수 있었다.

2차 시험에서는 보호용 살균제에서 propineb를, benzimidazole계 살균제에서는 carbendazim을 사용하였으며, 처리 간격은 10일과 20일로 정하여 실험하였다. 8월 16일에 10일과 20일 간격의 마지막 처리가 완료된 시기에 10일 간격 처리는 총 7회, 20일 간격 처리는 총 4회를 처리하였다. 발병과율 조사는 7월 18일과 8월 24일에 총 2회 실시하였다. 1차 조사 때까지 10일 간격 처리는 4회, 20일 간격 처리는 2회를 처리한 상태이었다. 대부분의 살균제 처리는 1차 조사에서 2차 조사 시기보다 우수한 효과를 나타냈다. 그런데 tebuconazole은 20일 간격으로 2

회 처리한 처리구에서의 효과가 92.7%의 효과를 보여, 89.3%의 병 방제 효과를 보인 10일간격으로 4회 처리한 처리구보다도 우수하였다(그림 28). 보호용 살균제인 propineb는 10일 간격으로 처리하였을 때, 1차와 2차 조사 모두에서 96.4%와 80.6%의 효과를 보여 우수한 효과가 있음을 보여 주었다. 또한 발병 초기에는 20일 간격으로 처리하여도 74.7%의 효과를 보였지만, 발병 후기인 8월까지 20일 간격으로 처리할 경우에는 20.5%의 저조한 효과만을 보였을 뿐이었다. Trifloxystrobin은 20일 간격 처리의 효과가 1차 조사에서도 급격히 감소하는 것을 보아 10일 간격으로 살균제를 살포하는 것이 적합할 것으로 생각한다. 또한 2차 조사에서는 10일 간격 처리에서도 효과가 36.7%로 감소하는 것을 보아, 8월 하순의 발병 후기에는 효과가 없는 것으로 생각된다. Carbendazim의 경우에는 모든 조사에서 가장 낮은 효과를 보였으며, 표 9에서 보는 것과 같이 주된 탄저병균인 *C. acutatum*이 benzimidazole계 살균제에 대해서 비감수성이기 때문에 포장에서의 효과도 미미한 것으로 생각한다.

표 20. 살균제 처리 간격이 고추 탄저병의 방제에 미치는 효과

처리 간격	처 리	병진전곡선면적	방제가(%)
7일	무처리	223.8	
	Chlorothalonil	212.8	4.9
	Tebuconazole	168.5	24.7
	Trifloxystrobin	72.9	67.4
	Benomyl	162.1	27.6
10일	무처리	223.8	
	Chlorothalonil	241.3	0.0
	Tebuconazole	169.8	24.1
	Trifloxystrobin	63.1	71.8
	Benomyl	112.3	49.8
14일	무처리	223.8	
	Chlorothalonil	239.1	0.0
	Tebuconazole	79.9	64.3
	Trifloxystrobin	62.8	71.9
	Benomyl	167.9	25.0

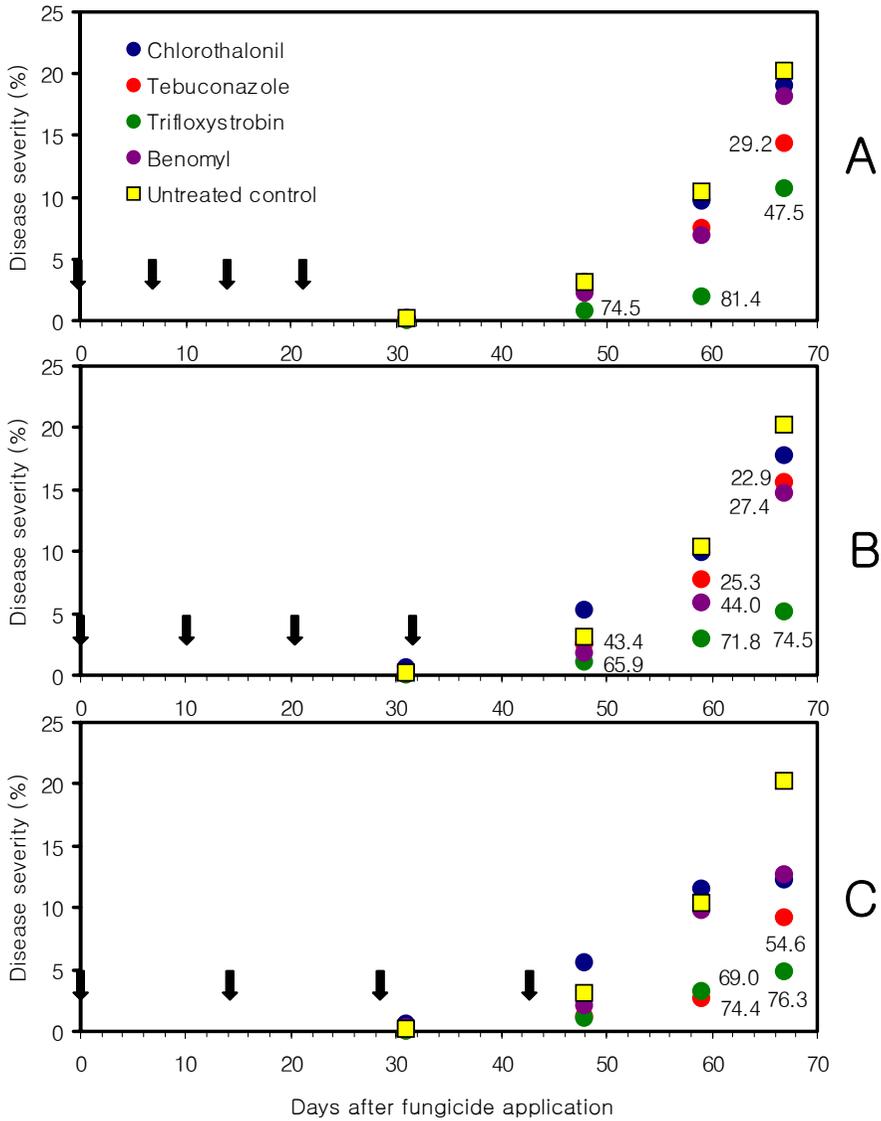


그림 27. 살균제의 처리 기간에 따르는 고추 탄저병의 발병과율 변화(2003). 화살표는 4종의 살균제를 7, 10, 14일 간격으로 처리한 날짜를 나타냄. 살균제는 모든 처리구에서 총 4회만 처리하였으며, 모든 처리는 약제의 처리가 끝나거나, 중도 이거나에 관계없이 동일한 날짜에 4회 실시하였음.

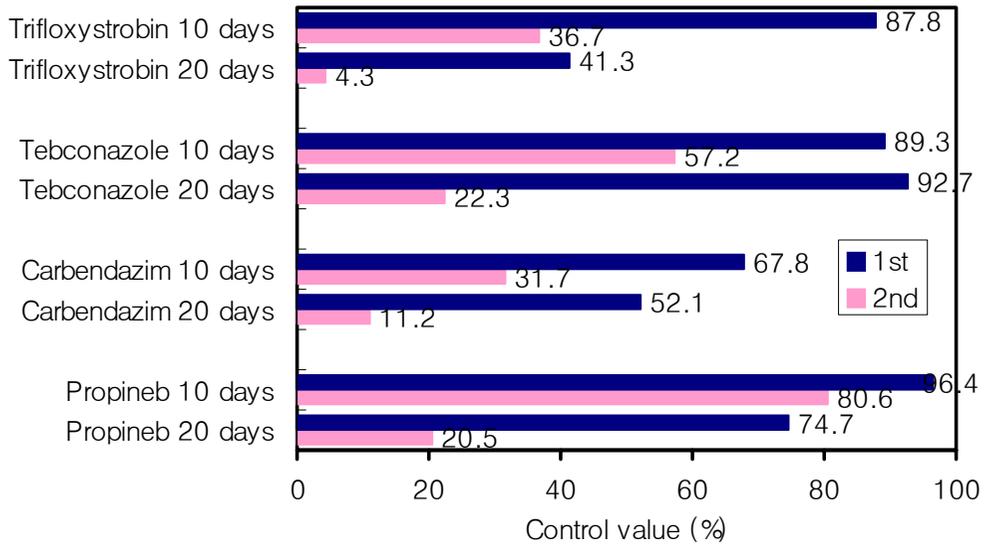


그림 28. 살균제의 처리 기간이 각종 살균제의 고추 탄저병에 대한 방제 효과에 미치는 영향(2005).

#### 다. 살균제 처리 조합에 따른 병 방제 효과

고추 탄저병의 방제를 고추 전생육기에 걸쳐서 총 4회 살균제를 처리하여 방제하고자 하였다. 살균제 처리 시기로는 정식 후, 개화기, 발병 직전후, 발병 시기로 나누어 처리하였으며, BTH 혼합제, 보호용 살균제인 propineb, strobilurin 계인 trifloxystrobin, 그리고 ergosterol 생합성 저해제인 tebuconazole을 선발하여 각각의 시기에 사용하였다. 네 가지 살균제를 조합한 살포 계획에서 하나씩의 살균제 처리를 제거하면서 탄저병의 방제에 필수불가결한 처리를 결정하고자 하였다.

모든 처리 중에서 효과가 우수한 세 가지의 살균제 처리 조합은 초기의 정식기와 개화기의 처리가 필요하며, 더불어 발병 직전후의 처리가 중요한 것으로 나타났다(그림 29). 위의 세 처리와 다음의 세 처리를 비교하면 발병 직전후의 trifloxystrobin의 처리 유무에 따라서 효과가 크게 바뀌는 것을 볼 수 있었다. 발병 직전후에 trifloxystrobin을 처리한다고 하더라도 정식 후와 개화기에 모두, 또는 최소한 한 번은 살균제를 처리하여야 효과를 볼 수 있었다. 두 시기 모두 처리하지 않으면 발병 직전후와 발병 시기에 살균제를 처리한다고 하더라도 미미한 효과밖에 얻지 못하였다.

#### 라. 고추 탄저병에 대한 충북대학교 방제력의 효과 검증

고추 재배시의 정식기, 개화기, 발병 직전후, 발병 시기에 각각 BTH 혼합제, propineb, trifloxystrobin, tebuconazole을 순차로 처리하는 방제력이 여러 고추 포장에서 어느 정도의 탄저병 방제 효과를 가져오는지 실험하였다.

충북 청주, 괴산, 음성과 경북의 영양에서 실험한 결과를 보면, 괴산과 음성이 59.6과 60.6%의 효과를 보였고, 청주와 경북의 영양에서는 76.7과 83.6%의 효과를 보였다(그림 30). 대조 살균제로는 영양과 괴산에서는 tebuconazole을 음성과 청주 포장에서는 propineb와 trifloxystrobin을 사용하였고 총 4회 처리하였다. 괴산과 청주의 대조 살균제는 효과가 12.1과 19.0%의 아주 저조한 효과를 보였는데, 약제의 처리시기가 적당하지 못하였는지, 저항성균이 출현한 결과인지는 더 실험을 수행하여야 알 수 있을 것 같다.

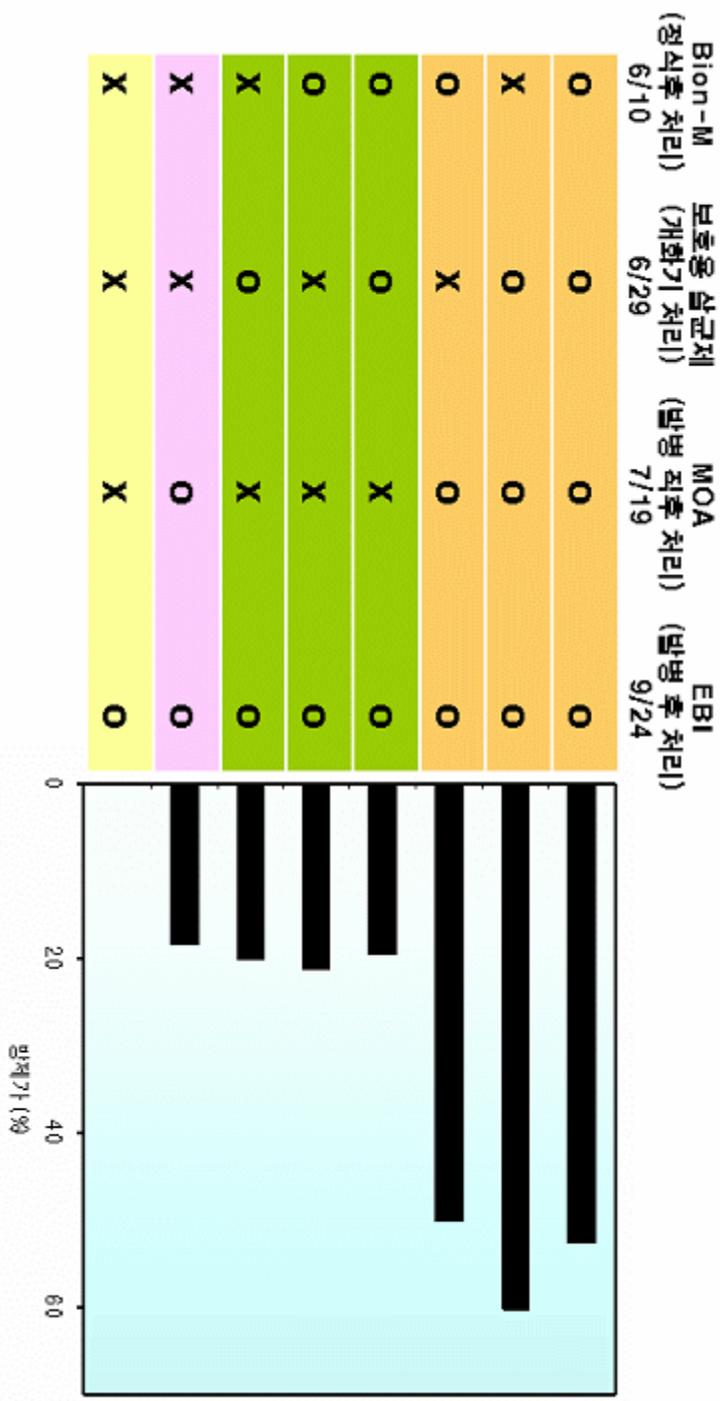


그림 29 삼균제 처리 조합에 따른 고추 탄저병 방제 효과

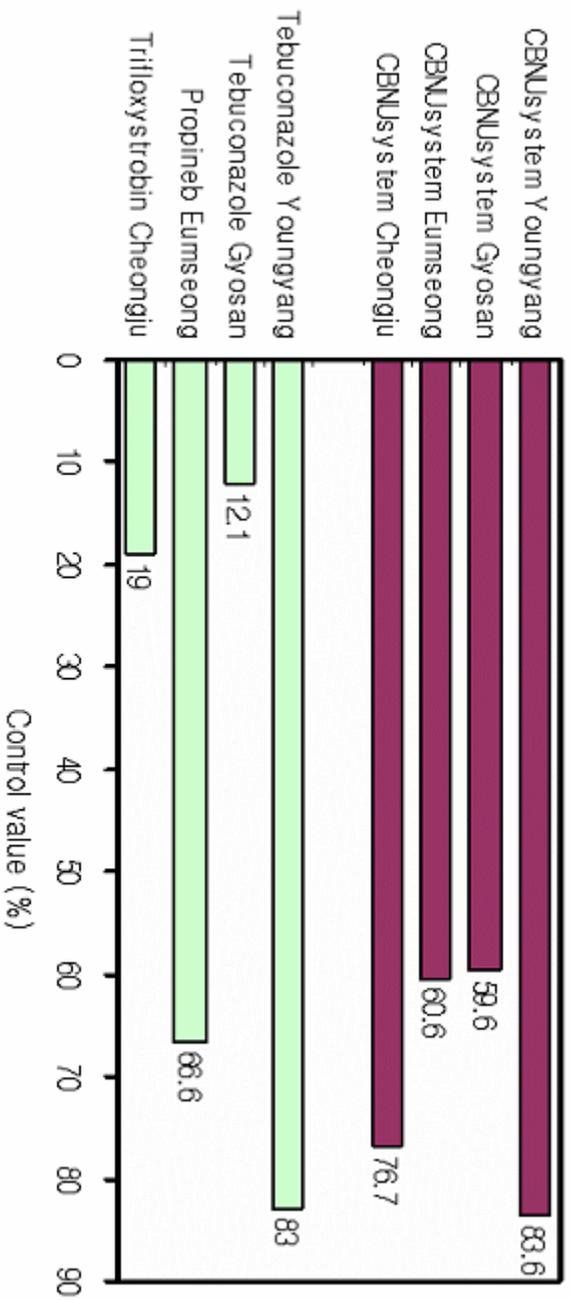


그림 30 고추 탄저병에 대한 충북대학교의 방제력 검정

## 7. Ergosterol 생합성 저해 살균제에 대한 고추 탄저병균의 반응과 저항성균의 포장 적응력

국내에서 재배되는 고추의 면적은 75,574 ha로 전체 채소 재배면적의 20% 이상을 차지하는 가장 대표적인 양념 채소이다. 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,  $\beta$ -methoxyacrylate계 살균제 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 작용기작을 보이는 특징을 가지고 있다. 이러한 EBI는 1981년 보리 흰가루병균(Fletcher와 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 떨어진다는 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.

### 가. 병원균 분리와 균사 생장 억제실험을 통한 균주 선발

실험에 사용한 20개의 고추 탄저병균과 14개의 사과 탄저병균의 균주 중에서 고추 탄저병균인 *Colletotrichum* sp. 2001-45만이 myclobutanil, tebuconazole, hexaconazole, nuarimol에 대해서 교차 저항성을 보였다(그림 31). 그러나 prochloraz에 대해서는 0.07  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 낮은  $\text{EC}_{50}$  값(50%의 균사생장 억제 효과를 보이는 값)을 보였다. 표 17에서 보는 바와 같이 myclobutanil, tebuconazole, hexaconazole, nuarimol에 대한 2001-45의  $\text{EC}_{50}$  값은 153.5, 42.7, 34.0, 17.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었으며, 2001-44와 비교한 저항성 요인도 18.3, 56.7, 57.0, 17.1로서 감수성인 균주에 비하여 17배에서 57배정도 높은 저항성을 나타냈다. 그러나 prochloraz의  $\text{EC}_{50}$  값은 0.07  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 4개의 EBI에 대해서 감수성으로 나타난 2001-44와 JC24보다도 낮았다. 사용한 EBI에 대한 JC24의  $\text{EC}_{50}$  값은 5.8, 0.2, 0.2, 1.6, 0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로, 2001-44와 함께 감수성 균주로 확인되었다.

### 나. 온도별 균사생장 실험

선발된 2001-44, JC24, 2001-45을 20°C, 25°C, 30°C에서 각각 7일간 배양한 후 균총의 직경을 측정하였다. 저항성인 2001-45는 감수성인 2001-44와 모든 실험 온도에서 비슷한 균사 생장을 보였다(그림 32). 또한 두 균주 모두 고온인 30°C에서 균사 생장이 활발하였다. 또 다른 감수성인 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.

### 다. 포자 형성 실험

2001-45는 PDA에서 5일, 10일, 15일간 배양하였을 때, 5.0, 3.8, 3.7 x 10<sup>4</sup> 개/plate로 매우 낮게 나타났다(그림 33). 2001-44는 15일 간 배양하였을 때 4.4 x 10<sup>6</sup> 개/plate로 10일 이후 생성량이 급증하였다. 2001-44와 같이 EBI에 대하여 감수성인 JC24는 배양 초기부터 다른 두 균주보다 많은 양의 포자를 형성하였다. 5, 10, 15일 간 배양하였을 때 plate당 형성된 포자의 수가 103.7, 691.7, 591.7 x

10<sup>4</sup> 개로, 10일간 배양하였을 때 가장 많은 포자를 형성하고 15일째부터는 형성되는 수가 감소하였다.

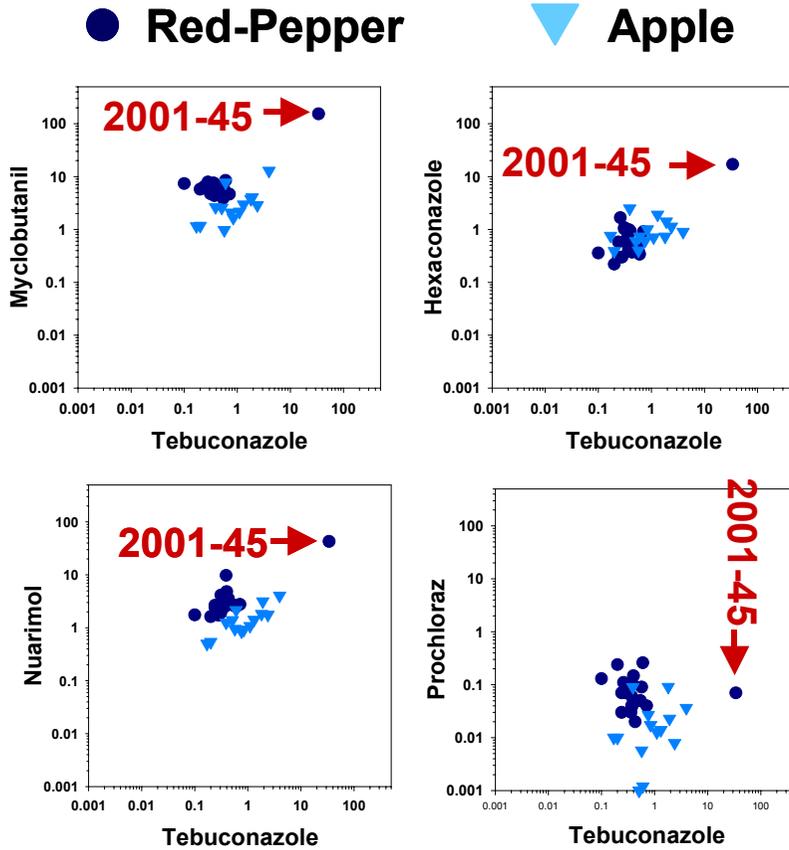


그림 31. 고추와 사과에서 분리한 *Colletotrichum* spp.인 탄저병균들의 ergosterol 생합성 저해 살규제에 대한 EC<sub>50</sub>값.

Table 21 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
<b>EC<sub>50</sub><sup>c</sup></b>			
Myclobutanil	153.5 <sup>a</sup> (18.3 <sup>b</sup> )	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
<b>MIC<sup>d</sup></b>			
Myclobutanil	>50	>50	>50
Tebuconazole	>50	>50	50
Hexaconazole	>50	>50	50
Nuarimol	>50	>50	50
Prochloraz	5	50	5

<sup>a</sup>; Numbers indicate the inhibitory percentage of mycelial growth on PDA amended with each fungicides compared with that on PDA without fungicide.

<sup>b</sup>; Numbers mean resistance factor, which is calculated by following formular;

$$\text{Resistance factor} = \frac{\text{EC}_{50} \text{ of resistant isolate (2001-45)}}{\text{EC}_{50} \text{ of sensitive isolate (2001-44)}}$$

<sup>c</sup>; Fifty percentage of effective concentration

<sup>d</sup>; Minimal inhibitory concentration

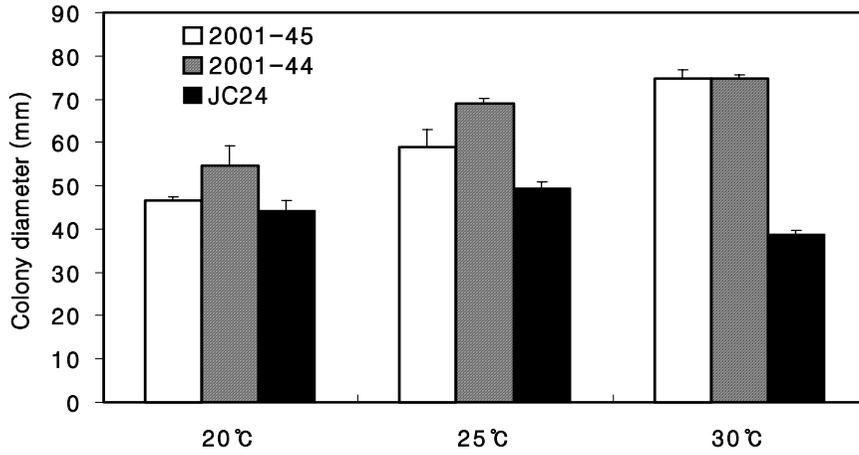


그림 32. 고추에서 분리한 탄저병 균주의 각 온도에서의 균사 성장 조사.

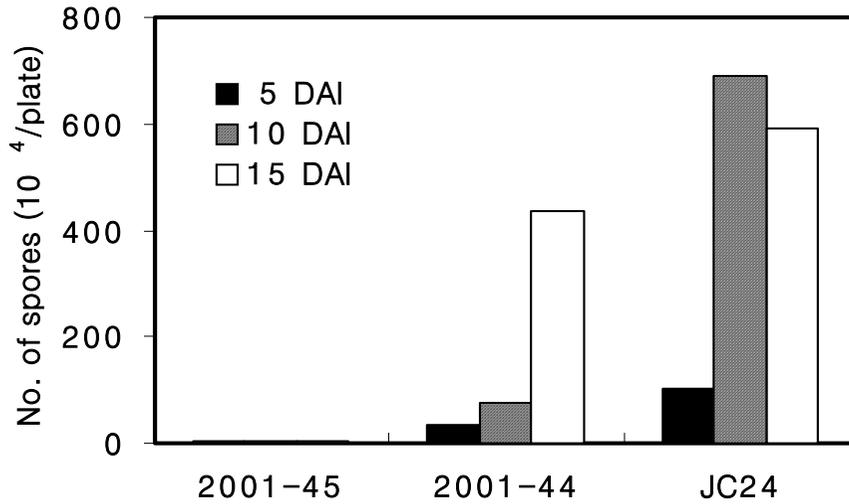


그림 33. PDA배지에서 고추에서 분리한 세 가지의 균주의 포자 생성 능력

#### 라. 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 감수성인 JC24에서 탄저병의 병징을 확인할 수 있었다(그림 34). JC24를 상처 접종하고 3일 후부터 접종 부위가 움푹 파이기 시작하다가 5일 후부터는 뚜렷한 병징을 관찰할 수 있었다. 그러나 다른 감수성인 2001-44와 저항성인 2001-45는 상처 부위가 갈변하기만 하였을 뿐, 뚜렷한 병반이 형성되지 않았다.

#### 마. 다른 살균제에 대한 감수성

스테롤 생합성 저해 살균제에 대하여 저항성인 2001-45의 보호용 살균제에 대한 감수성 정도는 스테롤 생합성 저해 살균제에 대하여 감수성인 2001-44와 JC24와 비슷하거나 감수성이 높은 것으로 나타났다(표 21). 특히 iminoctadine에 대한  $EC_{50}$  값은  $0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로  $506.6 \mu\text{g}/\text{ml}$ 인 JC24에 비하여 매우 낮았다. 그러나 chlorothalonil에 대한  $EC_{50}$  값은  $952.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 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.



**2001-45   2001-44   JC24   CK**

그림 34. 고추에서 분리한 세 가지 고추 탄저병균의 고추에 대한 병원성 검정

Table 22 Inhibitory effect of protective fungicides on mycelial growth of *Colletotrichum* spp. causing pepper anthracnose

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

<sup>a</sup>; Numbers indicate the inhibitory percentage of mycelial growth on PDA amended with each fungicides compared with that on PDA without fungicide.

<sup>b</sup>; Symbol indicates that the test was not conducted.

<sup>c</sup>; Fifty percentage of effective concentration

<sup>d</sup>; Minimal inhibitory concentration.

2001년 충북의 고추 재배 지역에서 분리한 2001-45 균주는 myclobutanil, tebuconazole, hexaconazole과 같은 triazole계에 속하는 스테롤 생합성 저해 살균제와 pyrimidine계에 속하는 nuarimol에 대해서는 서로 교차 저항성을 보이고 있었지만, imidazole계에 속하는 prochloraz에 대해서는 저항성을 보이지 않았다. Prochloraz는 본 실험에서 사용한 myclobutanil, 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 가능성이 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 선별하여 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℃와 25℃에서는 느렸지만, 생장 적온인 30℃에서는 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.

## 8. 고추 탄저병균의 살균제 모니터링

### 가. Chlorothalonil에 대한 고추 탄저병균의 감수성 변화

고추에서의 탄저병은 4종류의 *Colletotrichum*에 의해서 발생하는데, 가장 높은 빈도로 검출되는 병원균은 *Colletotrichum gloeosporioides*라고 보고되었다(Park 과 Kim, 1992). 그러나 최근에는 가장 높은 빈도로 분리되는 고추 탄저병균이 *C. acutatum*으로 변화되었다는 보고가 있다(Kim 등, 2003). 고추에 탄저병을 일으키는 병원균인 4종의 *Colletotrichum*의 포장 밀도 변화는 화학적 방제에 의지하는 고추 탄저병의 방제에 있어서 매우 중요하다. 고추 탄저병을 일으키는 4종류의 *Colletotrichum*은 종에 따라 포장에서 사용하는 몇 종류의 살균제에 대한 반응이 크게 다르기 때문에, 포장에서의 주된 탄저병균의 밀도 변화는 방제에 사용할 살균제를 선택하는데 있어서 매우 중요한 요인이 된다(金 등, 2003). 지금까지 4종류의 탄저병균 중에서 포장에서 가장 높은 밀도로 존재하던 *C. gloeosporioides*는 benzimidazole계 살균제인 carbendazim, benomyl, thiophanate-methyl 등에 대한 감수성이 큰 것으로 알려져 있다(金 등, 2003). 하지만, 최근 포장에서 가장 높은 밀도를 차지하는 것으로 보고된 *C. acutatum*은 *C. gloeosporioides*와 다르게 benzimidazole계 살균제에 대해서 저항성을 보이는데, 살균제 배지를 이용한 실내 실험에서 고농도의 살균제 처리에 의해서도 균사의 생육이 완전히 억제되지 않고 생장이 가능하다(Liyanage 등, 1992; Bernstein 등, 1995; Ishii 등, 1998; Peres 등 2002). 이처럼 고추에서 탄저병을 일으키는 *Colletotrichum*은 분류상의 종에 따라서 살균제에 대한 반응이 다르기 때문에 병원균의 종과 살균제와의 반

응, 그리고 포장에서 종의 밀도 변화에 대한 조사가 지속적으로 이루어져야 효과적인 방제 방법을 확립할 수 있을 것으로 생각한다.

포장에서 고추 탄저병의 방제를 위해서 사용되는 살균제에는 chlorothalonil, propineb, mancozeb와 같은 예방용 살균제와 benomyl, carbendazim과 같은 benzimidazole계, tebuconazole, hexaconazole 등과 같은 ergosterol 저해 살균제 등이 있으며, 최근에 azoxystrobin, kresoxim-methyl과 같은  $\beta$ -methoxyacrylate 계의 살균제가 개발되어 사용되고 있다. 이 중에서 보호용 살균제들은 오래 전부터 탄저병의 방제에 사용되고 있는데, 특히 chlorothalonil은 1964년부터 사용하고 있는 살균제로서, 매우 많은 작물에서 식물병을 방제하는데 사용하고 있다. 최근 까지도 chlorothalonil은 바나나의 검은Sigatoka병(Washington 등, 1998), 토마토의 *Alternaria* 반점병(Davis 등, 1997)과 탄저병(Sanogo 등, 2003), 땅콩의 *Cercospora* 반점병(Culbreath 등, 2002), 수박 덩굴쪼김병(Keinath, 2000), 감자 역병(Mayton 등, 2001) 등을 방제하기 위한 살균제 처리 시스템을 확립하는데 사용되고 있다. 하지만 chlorothalonil과 같이 다년간 사용하고 있는 살균제에 대해서 포장에서 병원균의 감수성 변화를 모니터링한 결과는 없었다.

국내에서는 1980년대에 들어오면서부터 살균제에 대한 저항성 병원균의 출현에 대한 보고가 나오기 시작하였다. 벼 도열병 방제에 이용되는 항생물질계통 약제인 kasugamycin과 blasticidin-S에 대한 저항성균의 발현이 보고되었고, 1984년부터 1990년 중반까지는 benzimidazole계 살균제인 thiophanate-methyl, benomyl, carbendazim 등에 대해서 저항성을 보이는 *Botrytis*, *Alternaria* 등에 대한 보고가 있었다(Park, 1981; Lee와 Kim, 1986). 1990년대에 들어오면서 dicarboximide, phenylamide, *N*-phenylcarbamate계 살균제에 대한 저항성 보고가 잇달았다(Kim 등, 1993). 저항성이 보고된 대부분의 살균제는 특이적인 작용점을 가지고 있기 때문에 포장에서 저항성균의 발생이 수월한 것으로 알려져 있다. 작용 기작이 특이하지 못한 보호용 살균제에 대한 저항성 발현 조사는 Kato 등(1997)이 감자 역병균의 유전적인 구성이 변화하여 포장에서의 우점균이 변화하는데 그 원인이 mancozeb나 chlorothalonil과 같은 보호용 살균제의 사용에 의해 저항성균이 출현한 것이 아닌지를 조사하기 위한 보고가 있다. 본 실험에서는

병원균의 채집 연도와 지역 간에 보호용 살균제인 chlorothalonil에 대한 고추 탄저병균의 감수성이 변화하는 지를 조사하여 chlorothalonil의 사용이 포장에서의 우점 병원균의 집단 변화에 영향을 주는 지를 알아보고자 한다.

### 1) 균주별 chlorothalonil에 대한 감수성 정도

1999년과 2002년에 분리한 고추 탄저병균(*Colletotrichum acutatum*) 중에서 각각 4균주씩을 선발하여 chlorothalonil에 대한 균사 생장 억제 효과를 조사하였다. 그림 35에서 보는 바와 같이 SNU145와 02KSN8은 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 100%의 균사 생장억제 효과를 보이는 감수성 균주로, SNU18과 02CND8은 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서도 20% 이하의 억제효과를 보이는 저항성 균주로 판명되었다. 이러한 결과는 동일한 시기에 채집한 균주간에도 chlorothalonil에 대한 감수성 정도가 차이를 보여 주고 있다.

### 2) 연도별 chlorothalonil에 대한 감수성의 변화

연도별 감수성의 변화를 조사하기 위해서 1999년에 단포자 분리한 128개 균주와 2002년의 257개 균주를 실험에 사용하였다. 전국 각 지역에서 분리한 탄저병균주의 chlorothalonil에 대한 반응은 그림 36에서 보는 바와 같이 매우 다양하였다. 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 chlorothalonil을 첨가한 PDA 배지 상에서 균사생장이 100% 완전히 억제되는 균주는 1999년에 30개로 전체의 23.4%이었으나, 2002년에는 89개로 34.6%를 차지하여 감수성인 균주의 비율이 2002년이 1999년보다 높았다. 또한 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 chlorothalonil을 첨가한 PDA 배지 상에서 균사생장의 억제율이 60% 이하로 나타나는 균주의 비율도 1999년에 29.7%이었으나 2002년에는 14.8%로 감소하여, 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 chlorothalonil에 의해서 100% 생육이 억제되는 균주의 비율 변화와 동일한 결과를 얻었다. 또한 실험에 사용한 전체 균주에 대하여 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 chlorothalonil의 평균 균사생장 억제율은 1999년에 74.2%에서 2002년에는 80.6%로 평균적으로는 약간 상승하여 전체 균주의 감수성 정도가 증가하는 양상을 보였지만, 통계적으로는 유의차가 없었다. 이처럼 채집 시기에 따른 고추 탄저병균의 chlorothalonil에 대한 감수성 정도는 1999년보다 2002년에 약간 증가

하는, 즉 저항성 균주의 선발 빈도가 감소함을 나타내고 있다. 살균제에 대한 감수성의 변화를 모니터링하기 위해서는, 병원균을 채집하는데 있어서 넓은 범위를 대표할 수 있도록 채집하기 전에 확실한 계획을 세우는 것이 중요하다. 본 실험에서는 병원균을 채집할 때 동일한 지역에서 다수의 균주가 채집되는 것을 방지하였으며, 각 도 마다 동일한 수의 채집지를 선정하였다. 채집지를 선정할 때에도 채집지가 한 곳으로 집중되는 것을 배제하였기 때문에, 1999년에 채집하여 단포자 분리한 128개 균주와, 2002년의 257개 균주는 전국을 대표할 수 있다고 본다.

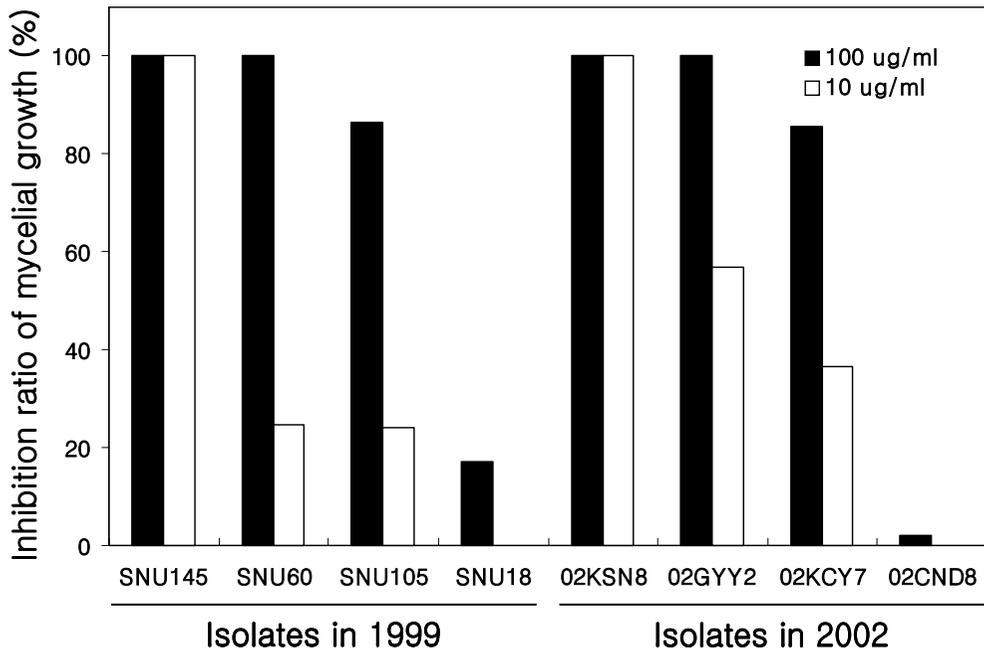


그림 35. 1999년과 2002년에 고추 탄저병에 감염된 고추에서 분리한 *Colletotrichum acutatum*의 균주들의 chlorothalonil에 대한 감수성 변화.

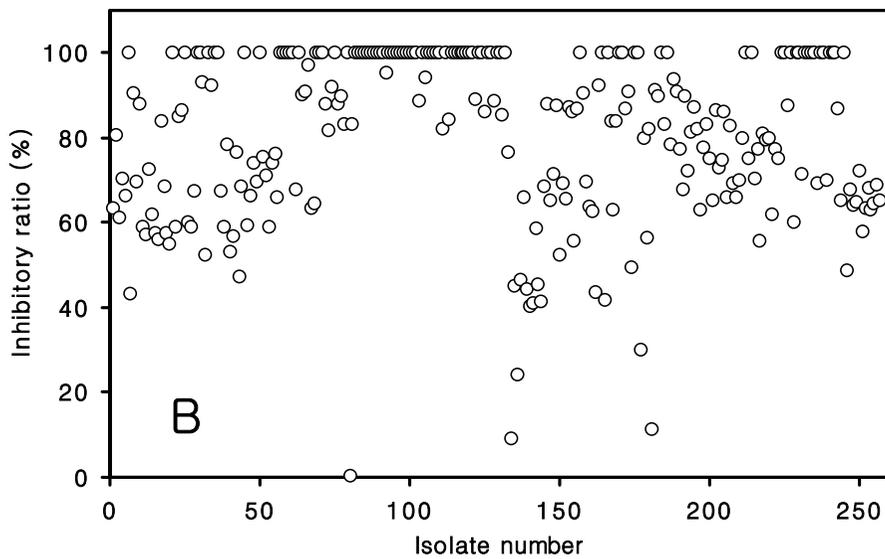
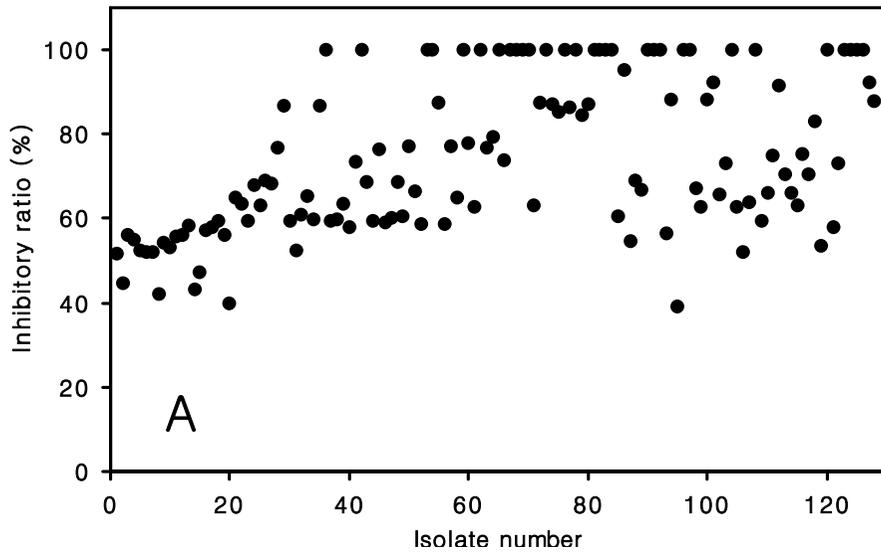


그림 36. 1999년과 2002년에 분리한 *Colletotrichum acutatum* 균주들의 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 chlorothalonil에 대한 감수성 변화. A; 1999년에 분리한 균주, B; 2002년에 분리한 균주.

### 3) 각 지역별 균주의 감수성의 변화

탄저병균을 채집한 1999년과 2002년의 3년 사이에 탄저병균의 chlorothalonil에 대한 감수성이 전국 각 지역별로 차이가 있는 것을 알 수 있었다(그림 37). 경기/강원 지역과 경상남북도의 경우는 병원균의 감수성이 증가하였지만, 충청남북도와 전라남북도의 경우는 감수성이 떨어지는 균주의 집단이 증가하였다. 경상남북도 지역에서 1999년에 채집한 탄저병균의 MIC값이 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상, 50 - 500, 5 - 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인 균주의 비율은 90.2, 4.9, 4.9%이었으나, 2002년에는 27.7, 22.9, 13.3%로 크게 변화하였으며, 0.5 - 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인 균주의 비율도 36.1%로 상승한 것을 알 수 있었다. 그와는 반대로 충청남북도에서 채집한 균주의 MIC값을 조사하면, 1999년에는 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상인 균주의 비율이 53.7%이고, 50 - 500, 5 - 50, 0.5 - 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인 균주의 비율은 19.5, 12.2, 14.6%로 조사되었다. 그러나 2002년에는 86.8, 8.9, 3.7, 0.5%로, 높은 MIC값을 갖는 균주의 비율이 상승하는 것으로 보아 저항성을 보이는 균주의 비율이 증가한 것을 알 수 있었다. 이러한 결과를 근거로 보면 지역간 chlorothalonil 사용량과 빈도를 예측할 수는 있는데, 경기/강원과 경상도 지역보다는 충청과 전라도 지역에서 chlorothalonil 또는 유사한 작용기작을 갖는 보호용 살균제의 사용이 많았을 것으로 추정한다. 포장에서의 chlorothalonil의 사용량을 조사할 수 있다면 저항성 병원균의 모니터링 결과와 연계하여 많은 정보를 제공할 수 있고 모니터링의 결과를 정확하게 해석할 수 있겠지만, 유감스럽게도 본 실험에서는 조사가 진행되지 못하였기 때문에 포장에서의 실질적인 농약의 사용량을 조사하기 어렵다. 그렇지만 본 실험의 결과, 충청과 전라도 지역에서 분리한 탄저병균의 chlorothalonil에 대한 저항성이 증가하는 경향을 보아 이 지역에서의 chlorothalonil과 비슷한 작용기작을 지닌 보호용 살균제의 사용에 주의를 기울여야 할 것으로 생각한다.

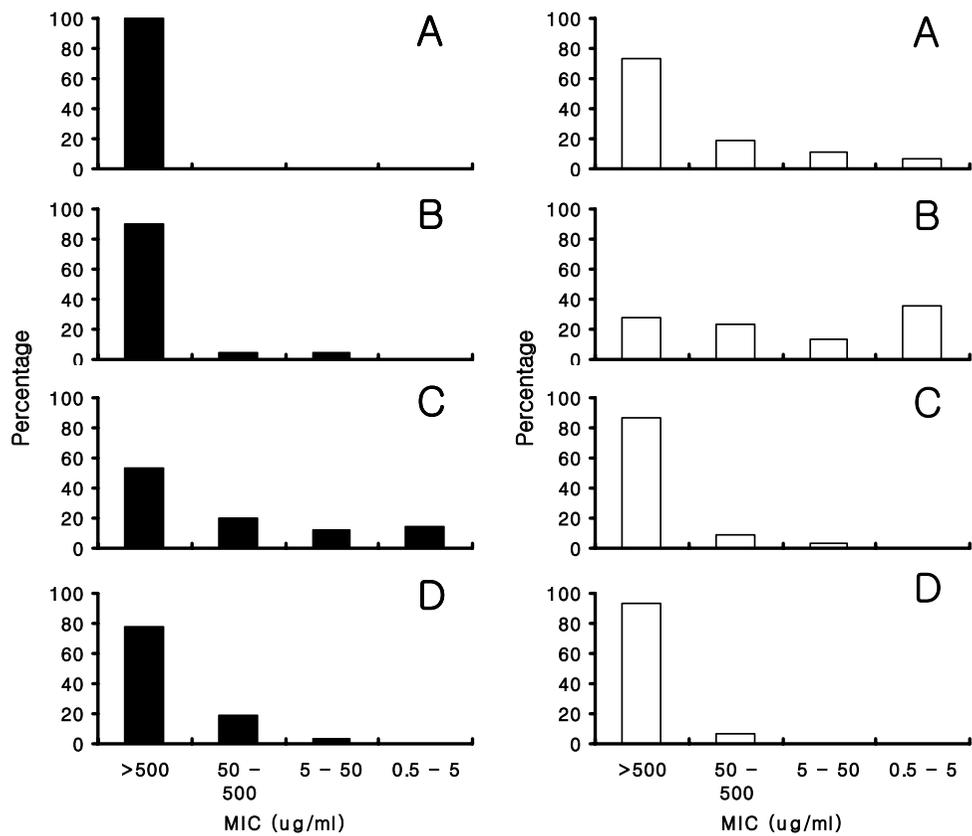


그림 37. Chlorothalonil에 대한 시기별(왼쪽; 1999년 균주, 오른쪽; 2002년 균주)로 분리한 *Colletotrichum acutatum* 균주의 지역별 최소생장억제농도(MIC)의 분포. A; 경기, 강원도, B; 경상남도/경상북도, C; 충청남도/충청북도, D; 전라북도/전라남도.

#### 나. 보호용 살균제와 ergosterol 생합성 저해 살균제에 대한 고추 탄저병균의 저항성 모니터링

현대 농업에 있어서 농업의 생산성이 증가하게 된 데에는 농약과 비료의 역할을 이야기하지 않을 수 없다. 일본의 식물방역협회의 자료(1997)에 의하면 농약은 사용하지 않고서 작물을 재배할 경우, 작물에 따라서 다르지만, 사과와 복숭아 같은 과실류에서는 병해충 잡초에 의한 손실량이 97%와 100%에 달한다고 한다. 수도나 소맥, 대두와 같은 작물의 생산량 감소는 27.5, 35.7, 30.4%에 이른다. 이처럼 중요한 농약이 농업 현장에서 오용되거나 남용될 경우에 환경이나 인간의 생활 현장에 큰 영향을 미치게 된다. 환경에서의 농약의 잔류, 인축에 대한 독성뿐만이 아니라, 농약에 대해서 저항성을 보이는 유해생물의 출현이 문제시될 수도 있다.

식물병을 방제하는데 사용하는 살균제에 대해서도 많은 저항성 병원균이 발견되어 보고되고 있다. Ogawa 등(1983)이 보고할 당시 살균제에 대한 저항성 발현이 알려진 식물병원균은 대략 100여종을 상회한다고 하였다. 국내에서는 1980년대에 들어오면서부터 살균제에 대한 저항성 병원균의 출현에 대한 보고가 나오기 시작하였다. 벼 도열병 방제에 이용되는 항생물질계통 약제인 kasugamycin과 blasticidin-S에 대한 저항성균의 발현이 보고되었고, 1984년부터 1990년 중반까지는 benzimidazole계 살균제인 thiophanate-methyl, benomyl, carbendazim 등에 대해서 저항성을 보이는 *Botrytis*, *Alternaria* 등에 대한 보고가 있었다(Park, 1981; Lee와 Kim, 1986). 1990년대에 들어오면서 dicarboximide, phenylamide, *N*-phenylcarbamate계 살균제에 대한 저항성 보고가 잇달았다(김 등, 1993). 저항성이 보고된 대부분의 살균제는 특이적인 작용점을 가지고 있기 때문에 포장에서 저항성균의 발생이 수월한 것으로 알려져 있다. 작용 기작이 특이하지 못한 보호용 살균제에 대한 저항성 발현 조사는 Kato 등(1997)이 감자 역병균의 유전적인 구성이 변화하여 포장에서의 우점균이 변화하는데 그 원인이 mancozeb나 chlorothalonil과 같은 보호용 살균제의 사용에 의해 저항성균이 출현한 것이 아닌지를 조사하기 위한 보고가 있다.

Dekker(1995)는 이러한 살균제 저항성 문제를 해결하는 방안으로 저항성 병원

균에 대한 검정과 모니터링, 살균제를 이용하는 방제 체계에서 선택압을 줄이는 방안 모색, 작용기작이 다른 살균제의 혼합 또는 교호 처리 등의 방안을 이야기하고 있다.

국내의 고추 재배에서는 생육 후기로 갈수록 장마와 태풍의 영향으로 탄저병의 발생이 심해지고, 이를 방제하기 위해서 살균제를 처리하는 횟수도 증가하게 된다. 따라서 동일한 살균제의 연용과 과용이 예상되며, 그에 따르는 살균제 저항성 문제의 발생 소지가 높아진다. 고추 탄저병의 방제 방법으로는 현재까지 살균제를 사용하는 화학적 방법이 가장 효과적인 방법으로 알려져 있다. 사용하는 살균제들은 최근에 개발된 strobilurin 살균제들의 사용이 증가하고 있지만, 보호용 살균제와 ergosterol 생합성 저해 살균제들이 주로 사용되고 있다. 탄저병 방제에 많이 사용하고 있는 ergosterol 생합성 저해 살균제는 1980년대 초반부터 여러 가지의 식물병의 방제를 위해서 사용되어 왔으며, 세계적으로 흰가루병균 (*Erysiphe*, *Sphaerotheca*, *Uncinula* 등), *Venturia*, *Puccinia*, *Septoria* 등 많은 식물병원균에서 저항성 균이 발생하였다는 보고가 있다(Fletcher and Wolfe, 1981; Schepers, 1983; Stanis and Jones, 1985). 따라서 국내에서 고추 탄저병 방제에 사용되고 있는 보호용 살균제와 ergosterol 생합성 저해 살균제가 우수한 효과를 보이며 지속적으로 사용되고, 저항성 병원균의 발생을 피하기 위해서는 포장에서의 병원균에 대한 모니터링이 필요하다. 본 연구에서는 1999년과 2002년에 고추 재배 포장에서 채집한 탄저병균에 대해서 보호용 살균제와 ergosterol 생합성 살균제에 대한 모니터링을 실시하여, 연도 별, 지역 간의 살균제에 대한 병원균의 감수성이 변화되는 지, 저항성균이 출현하였는지를 조사하고자 하였다.

### 1) 전국에서 채집한 고추 탄저병균에 대한 살균제 모니터링

전국 고추재배지의 1999년과 2002년에 분리한 130개와 258개 균주를 사용하여 탄저병의 방제 약제로 이용되는 살균제에 대하여 저항성 발현 정도를 조사하였다. 그림 38에서 보는 것과 같이 4가지의 보호용 살균제 중에서 dithianon, chlorothalonil, propineb에 대해서는 2002년에 분리한 병원균이 1999년에 분리한 병원균보다 낮은 EC<sub>50</sub>값을 보이고 있었다. 실험에 사용한 전체 균주의 EC<sub>50</sub>값의

평균을 비교하여 보아도, 1999년에 분리한 균주의 dithianon, chlorothalonil, propineb에 대한 평균 EC<sub>50</sub>값은 57.7, 241.0, 368.7  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인데 비하여, 2002년의 균주들은 37.1, 106.2, 105.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 보였다. 그러나 iminoctadine의 경우는 1999년의 균주가 121.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 2002년의 평균 EC<sub>50</sub>값인 164.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 보다 낮게 나타나, 다른 세 가지의 보호용 살균제와는 다르게 iminoctadine에 대한 탄저병균의 저항성이 증가하는 경향을 보여 주고 있다. 2002년의 균주들을 지역 별로 분석하여 보면, 충북 지역에서 분리한 병원균들이 chlorothalonil과 iminoctadine에 대한 감수성이 다른 지역보다 떨어지는 것으로 나타났다(그림 39). 반면에 경기 지역에서 분리한 탄저병균들은 두 종류의 보호용 살균제 모두에 대해서 다른 지역보다 저항성이 떨어지는, 즉 감수성인 균주의 밀도가 아직도 높다는 것을 알 수 있었다. Iminoctadine에 대한 병원균의 반응은 충북, 충남, 경북, 경남 지역의 균주들에서 감수성이 저하하는, 즉 저항성이 증가하는 경향을 보이고 있기 때문에 탄저병의 초기 방제에 사용하는 보호용 살균제가 지역에 따라서 달라져야 할 것으로 생각한다.

Tebuconazole, hexaconazole, prochloraz와 같이 병원균의 ergosterol 생합성을 저해하는(EBI) 살균제에 대한 탄저병균의 감수성 정도를 조사하였다(그림 40). Fig. 38에서 보여준 보호용 살균제와는 다르게 ergosterol 생합성 저해 살균제에 대한 각 균주들의 EC<sub>50</sub>값은 1999년에 비해 2002년에 전반적으로 상승하였다. 1999년과 2002년에 분리한 모든 균주의 평균 EC<sub>50</sub>값은 tebuconazole에 대해서는 0.089  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 0.15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 1.7배가, hexaconazole은 0.488  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 0.560  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 1.2배가, 그리고 prochloraz는 0.038  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 0.06  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 1.6배씩 상승하였다. 2002년에 채집한 고추 탄저병균의 prochloraz에 대한 감수성 정도를 지역 별로 비교하여 보면, 보호용 살균제에 대한 감수성이 저하되었던 충북 지역의 균주의 감수성 정도가 가장 낮았으며, 충남, 경남, 경북 등지에서 분리한 탄저병균의 감수성 정도가 높게 나타났다. 2002년의 탄저병 균주는 경기와 강원 지역보다는 충북, 경북, 경남, 전북 등 고추를 많이 재배하는 지역에서 감수성이 저하되는 균주의 빈도 수가 높게 나타나고 있었다(그림 41). 예외적으로 충남의 경우에는 타 지역과 비교하여 감수성이 가장 높은 것으로 나타난 것을 보면, 이 지역에서

prochloraz와 같은 ergosterol 생합성 저해 살균제의 사용이 타 지역에 비하여 빈번하지 않았을 것으로 추측한다.

그림 39과 41에서 보는 바와 같이 지역에 따라 살균제에 대한 감수성 정도가 다르게 나타나는 것을 가지고 각 지역에서 사용하는 살균제의 종류가 다르다는 것은 예상할 수 있다. 또한 강원과 경기 지역에서 분리한 탄저병균들은 타 지역에서 분리한 병원균에 비해서 보호용 살균제나 ergosterol 생합성 저해 살균제에 대한 감수성이 높게 나타나고, 충북, 충남, 경북, 경남 지역의 감수성이 떨어지는 것은, 고추를 대단위로 재배하는 지역의 살균제 사용량이 다른 지역보다 많았을 것으로 예상할 수 있다. 따라서 대단위의 면적에서 고추를 재배하는 지역에서는 효과적인 저농약 사용 방제 체계가 반드시 확립되어야 할 필요가 있다.

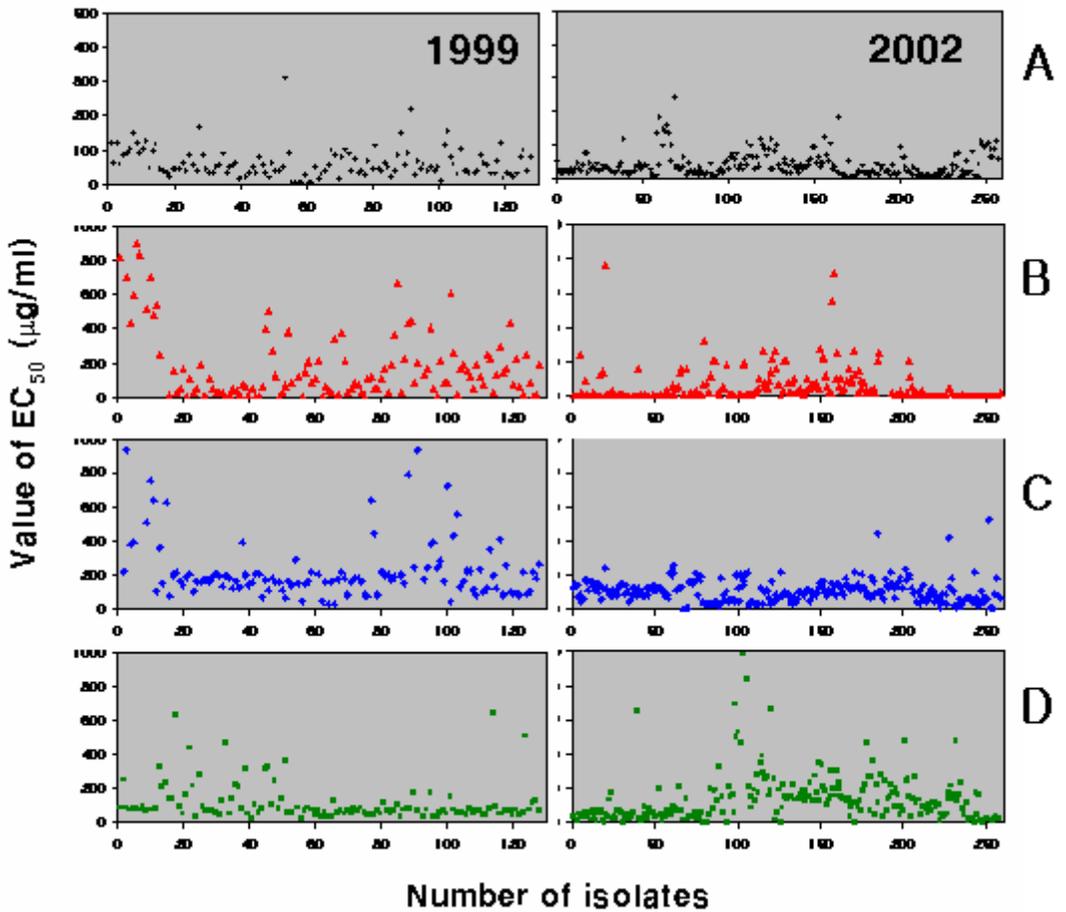


그림 38. 네 종류의 보호용 살균제에 대하여 1999년과 2002년에 분리한 *Colletotrichum acutatum* 균주의 감수성 분포. A; Dithianon, B; Chlorothalonil, C; Propineb, D; Iminoctadine.

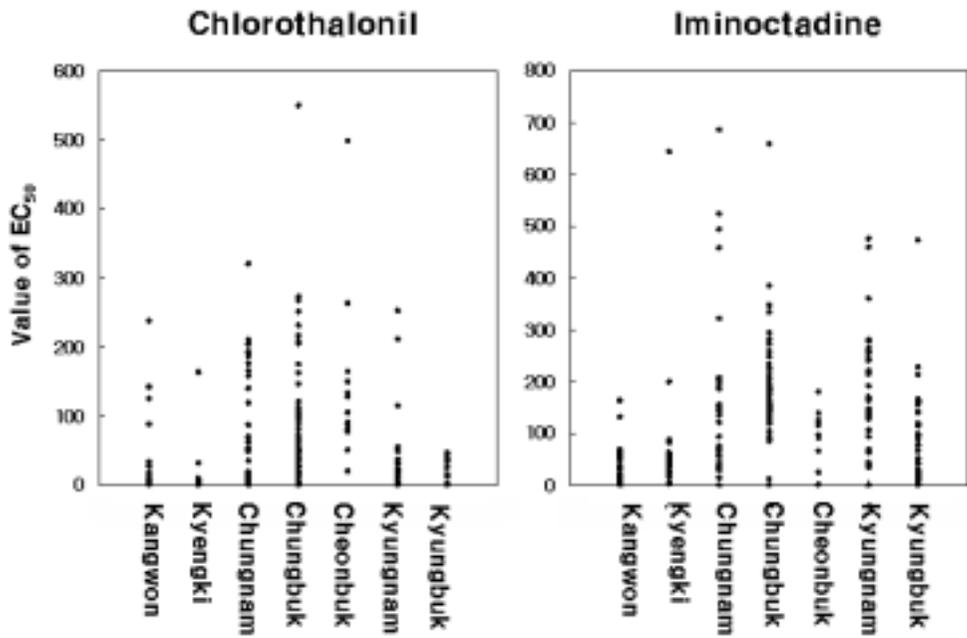


그림 39. Chlorothalonil과 iminoctadine에 대한 *Colletotrichum acutatum* 균주의 EC<sub>50</sub>값의 지역 분포.

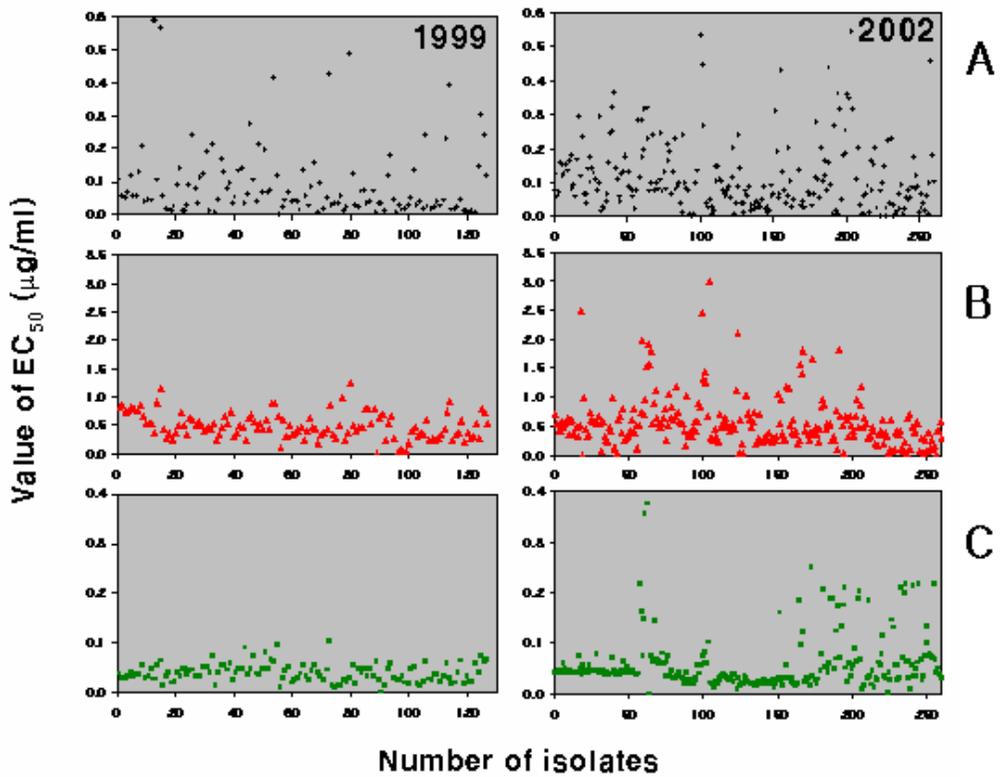


그림 40. 세 종류의 ergosterol 생합성 저해 살균제에 대하여 1999년과 2002년에 분리한 *Colletotrichum acutatum* 균주의 감수성 분포. A; Tebuconazole, B; Hexaconazole, C; Prochloraz.

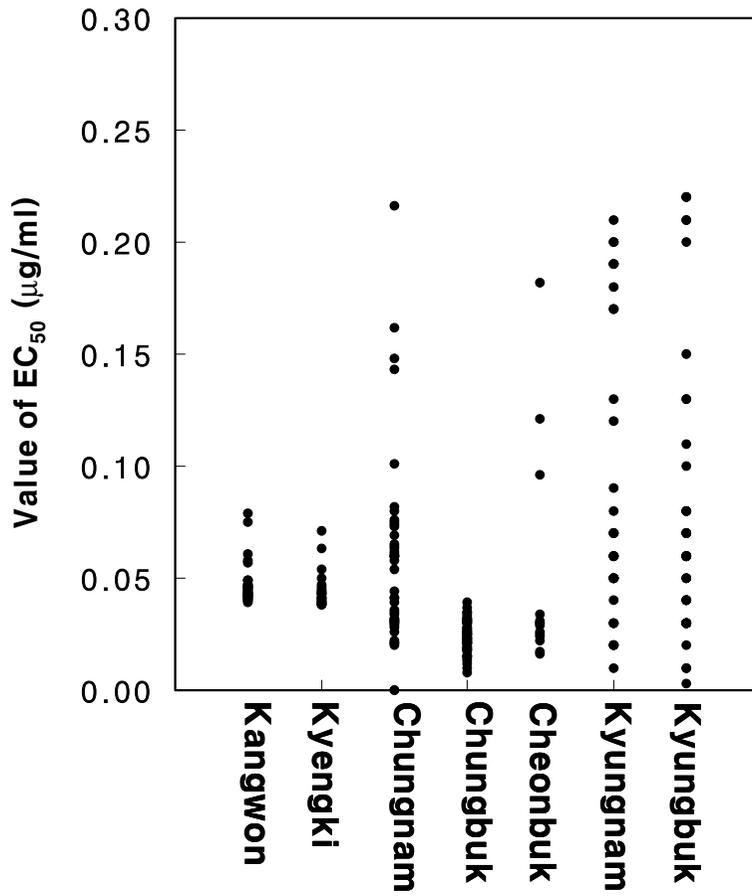


그림 41. Prochloraz에 대한 *Colletotrichum acutatum* 균주의 EC<sub>50</sub>값의 지역 분포.

## 2) 충북에서 분리한 고추 탄저병균의 살균제에 대한 모니터링

충북의 고추 재배지에서 2002년 7, 8, 9월에 단포자 분리를 통하여 탄저병균을 39균주, 61균주, 139균주를 분리하여, 동일한 연도의 단기간의 고추 재배기간 중에 탄저병균들의 살균제에 대한 감수성이 변화하는 지를 조사하였다.

고추 생육 후기인 9월달에 분리한 고추 탄저병균의 네가지 보호용 살균제 모두에 대한 EC<sub>50</sub>값이 현저하게 감소하는 것을 보아, 고추 생육 초기에 분리하였던 균주보다도 후기에 분리한 균주의 보호용 살균제에 대한 저항성 정도가 감소하는 것을 알 수 있었다(그림 42). Propineb에 대한 7, 8, 9월에 분리한 모든 탄저병균의 평균 EC<sub>50</sub>값은 436.5, 204.2, 85.4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 3개월이라는 사이에 살균제에 대한 병원균의 EC<sub>50</sub>값이 5배나 감소하였다. 그러나 tebuconazole, hexaconazole, prochloraz와 같은 EBI 살균제들은 3개월이라는 단기간 동안에 위에서 기술한 4개의 보호용 살균제에 대한 병원균의 감수성 정도의 변화만큼 큰 폭의 차이를 찾을 수 없었다(그림 44). 시기별로 분리한 각각의 균주들이 보호용 살균제와 ergosterol 생합성 저해 살균제에 대한 각각의 농도에서의 균사 성장 억제 효과를 비교하여 보았다(그림 43과 45). 7월중에 분리한 02JB07과 02JJ01은 8월과 9월에 분리한 02ZB17과 02JJ13, 02CS23과 02UU22보다도 실험에 사용한 4가지의 보호용 살균제 모두에 대해서 낮은 균사 성장 억제율을 보였다. 균주의 평균 EC<sub>50</sub>값이 채집한 시기에 따라서 급하게 저하된 propineb는 1000, 100, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 propineb-PDA 배지 모두에서 7월에 분리한 02JB07과 02JJ01의 균사성장 억제율이 8월과 9월에 분리한 균주보다 낮았다. 그러나 8월과 9월에 채집한 균주의 평균 EC<sub>50</sub>값에 큰 차이를 보이지 않았던 dithianone, chlorothalonil, iminoctadine 등은 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 살균제 배지에서만 02JB07과 02JJ01이 낮은 억제율을 보였을 뿐, 100과 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 살균제 배지에서의 균주간의 차이는 크게 나타나지 않았다. Tebuconazole과 hexaconazole을 10, 2.5, 0.6, 0.15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로, 그리고 prochloraz를 1.0, 0.1, 0.01  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 PDA 배지에 첨가하고, 7월과 8월, 9월에 분리한 균주 가운데에서 임의로 선발한 02OA03과 02JB04, 02ZB16과 02CO17, 02DM23과 02CB27를 접종하여 각 살균제의 균사 성장 억제 효과가 각각의 균주에 어떤 영향을 주는 지를 조사하였

다. 다른 시기별로 분리한 균주는 보호용 살균제에 대한 반응과는 다르게, 분리 시기에 따라서 살균제에 대한 감수성 정도에 변화가 없었다. 2002년 7월부터 9월까지의 단기간에 시기별로 분리한 균주들의 살균제에 대한 반응은 보호용 살균제에 있어서는 시기별로 차이를 보였지만, ergosterol 생합성 저해 살균제의 경우에는 단기간 내에 저항성이 발현되지 않는 것으로 생각된다.

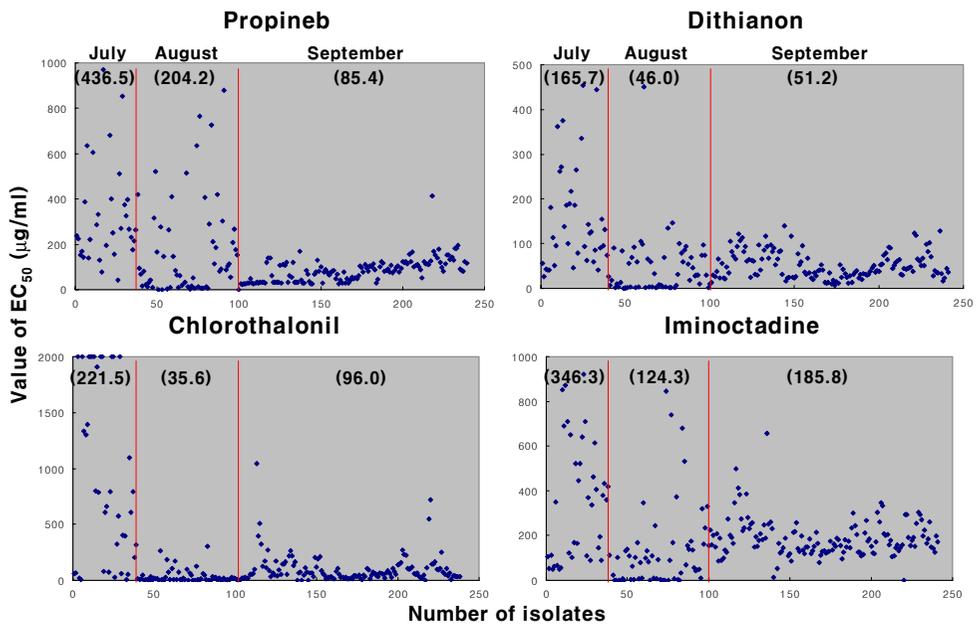


그림 42. 2002년에 충북지역에서 분리한 *Colletotrichum* spp.의 네 종류의 보호용 살균제에 대한 감수성의 시기별 변화.

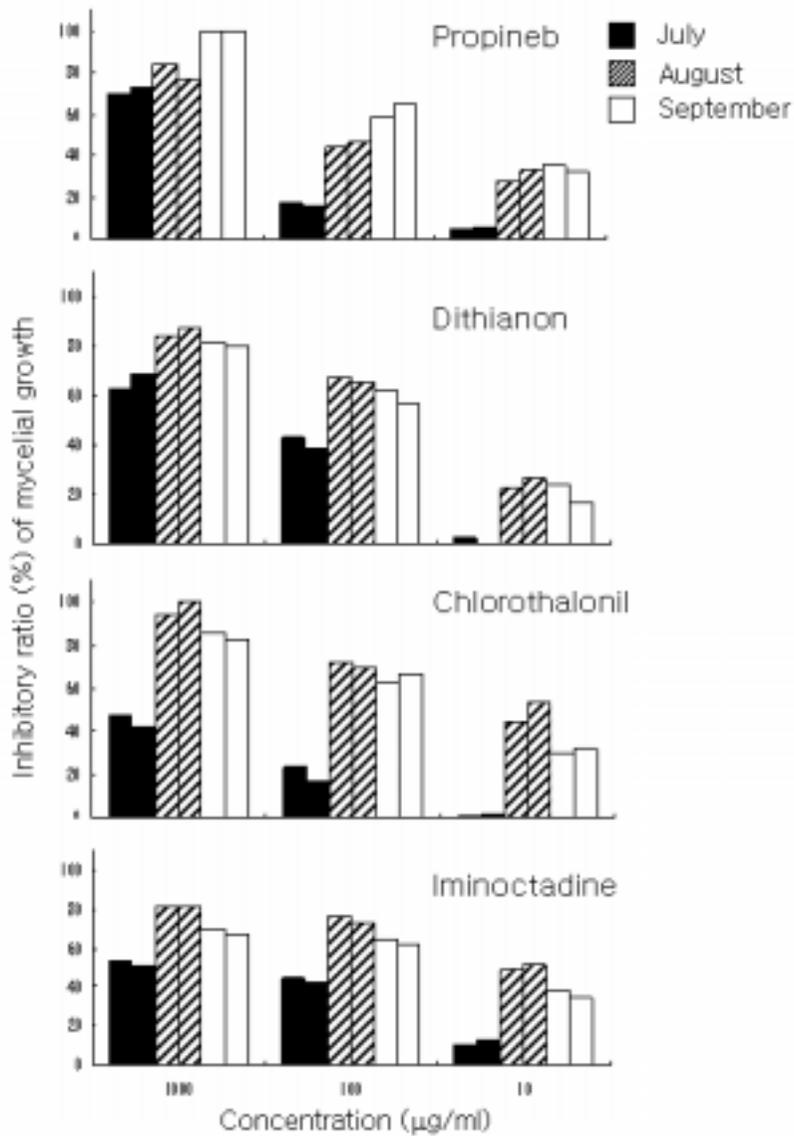


그림 43. 네 종류의 보호용 살균제의 고추 탄저병균에 대한 균사 성장 억제 효과.

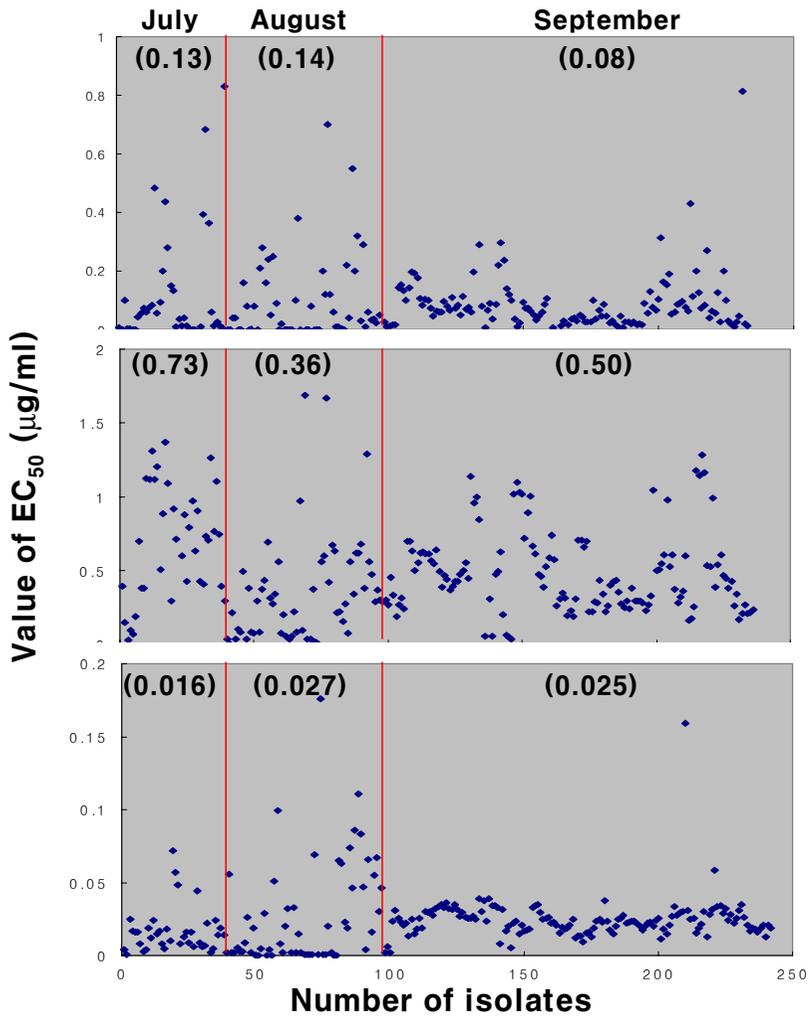


그림 44. 2002년에 충북지역에서 분리한 *Colletotrichum* spp.의 세 종류의 ergosterol 생합성 저해 살균제에 대한 감수성의 시기별 변화.

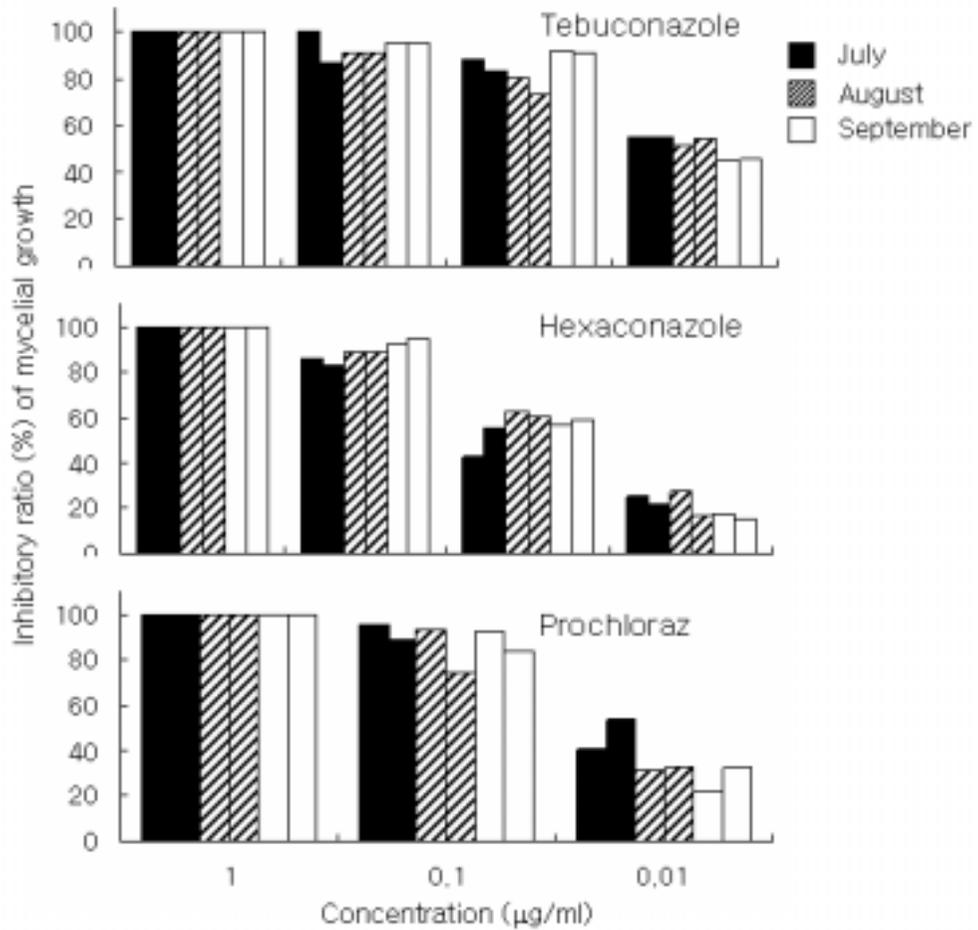


그림 45. 세 종류의 ergosterol 생합성 저해 살균제의 고추 탄저병균에 대한 균사 성장 억제 효과.

## 9. Benzothiadiazole의 고추 탄저병 방제 효과

Benzothiadiazole(BTH)은 식물체에서 다양한 식물병원균에 대하여 저항성을 유도하는 살균제로 알려져 있다. 본 연구에서도 위탁기관으로 되어 있는 충북농업기술원에서는 BTH를 고추 유묘에 침지 처리하여 고추 탄저병에 대한 방제 효과를 조사하였다. 또한 정식 직전에 유묘에 침지 처리하면서 유묘를 재배할 때 상토에 혼합처리, 정식 후에 토양에 관주 처리, 또는 정식 후에 경엽처리하는 등 유묘에 대한 침지처리와 함께 다른 처리 방법들을 병행하면서 고추 탄저병에 대한 방제 효과를 조사하였다.

BTH의 1차년도(2003) 실험에서 대조 살균제로 7월 11일부터 4회 경엽살포한 propineb는 8월 6일과 8월 25일의 2차와 3차 조사에서 73.9%와 66.8%의 방제 효과를 보였다(그림 46). 이 때 무처리구에서는 전체 열매의 50.2%와 72.3%가 탄저병균에 감염되어 병반이 나타난 것으로 조사되었다. BTH 혼합제에 고추의 유묘를 30분간 침지 처리하였을 때, 2차 조사에서 44.8%, 그리고 3차 조사에서는 10.7%의 효과를 보였다. 그러나 5월 12일 유묘에 침지 처리하고 6월 8일에 경엽처리한 곳에서는 76.7과 23.4%의 병 방제 효과가 있었다. Probenazole의 처리구에서도 BTH 혼합제와 비슷한 경향의 방제 효과를 보여 주고 있었다. 정확한 이유를 알 수는 없지만, tricyclazole은 유묘 침지 처리만을 실시한 처리구가 유묘 침지와 경엽 처리를 조합하여 실시한 처리구보다 양호한 효과를 보였다. Tricyclazole의 경우도 3주에는 다른 살균제의 처리구들과 효과가 급격히 감소하였다. 결국 BTH 혼합제와 probenazole은 tricyclazole은 1차년도의 포장 실험 결과, 고추 탄저병의 발생을 2주간 지연시키는 효과가 있는 것으로 생각된다.

BTH의 2차년(2004)도 실험에서는 대조살균제로 처리한 propineb의 처리구에서도 탄저병에 대한 방제 효과를 찾아 볼 수 없었다(그림 47). BTH 혼합제의 경엽처리와 토양관주처리에서만 모든 조사시기에 방제 효과를 보였지만, 그 효과가 매우 미미하였다. 2차 조사의 BTH 혼합제의 유묘 침지 처리에서 가장 높은 45.9%의 방제 효과를 보였다. 2차년도의 실험에서는 무처리구의 발병율이 낮았으며, 대조살균제의 처리 시기가 늦어 뚜렷한 방제 효과를 볼 수가 없었다.

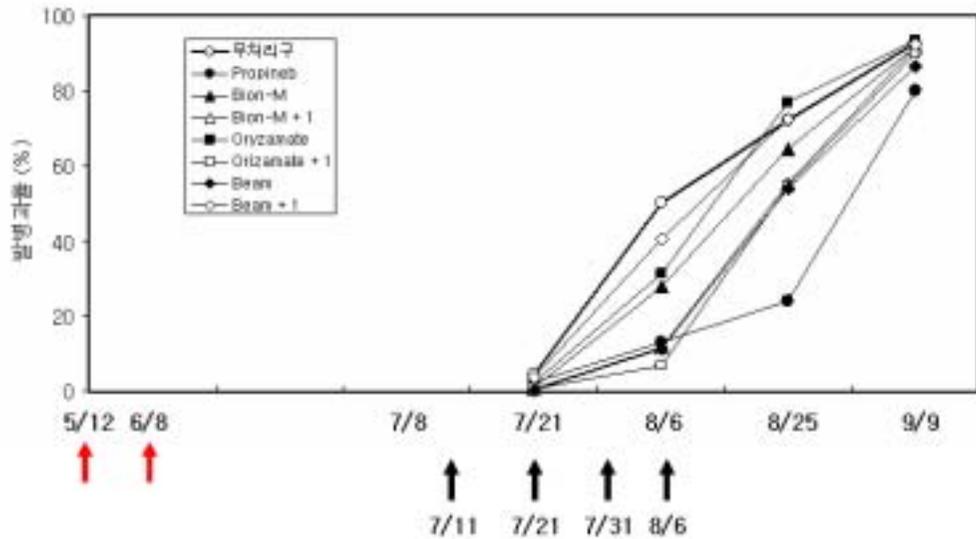


그림 46. BTH 혼합제와, probenazole, tricyclazole의 유묘 침지 처리와 유묘침지 및 경엽처리의 조합의 고추 탄저병에 대한 방제 효과. 대조 살균제로는 propineb를 사용하였으며, 7월 11일부터 10일 간격으로 4회 처리하였음. 실험에 사용한 살균제는 5월 12일 유묘를 정식 전에 포장 사용 희석농도로 조제한 용액에 유묘를 30분씩 침지하여 처리하였음. 일부 경엽처리를 포함한 처리구에서는 6월 8일에 포장 사용 희석농도로 경엽처리하였음.

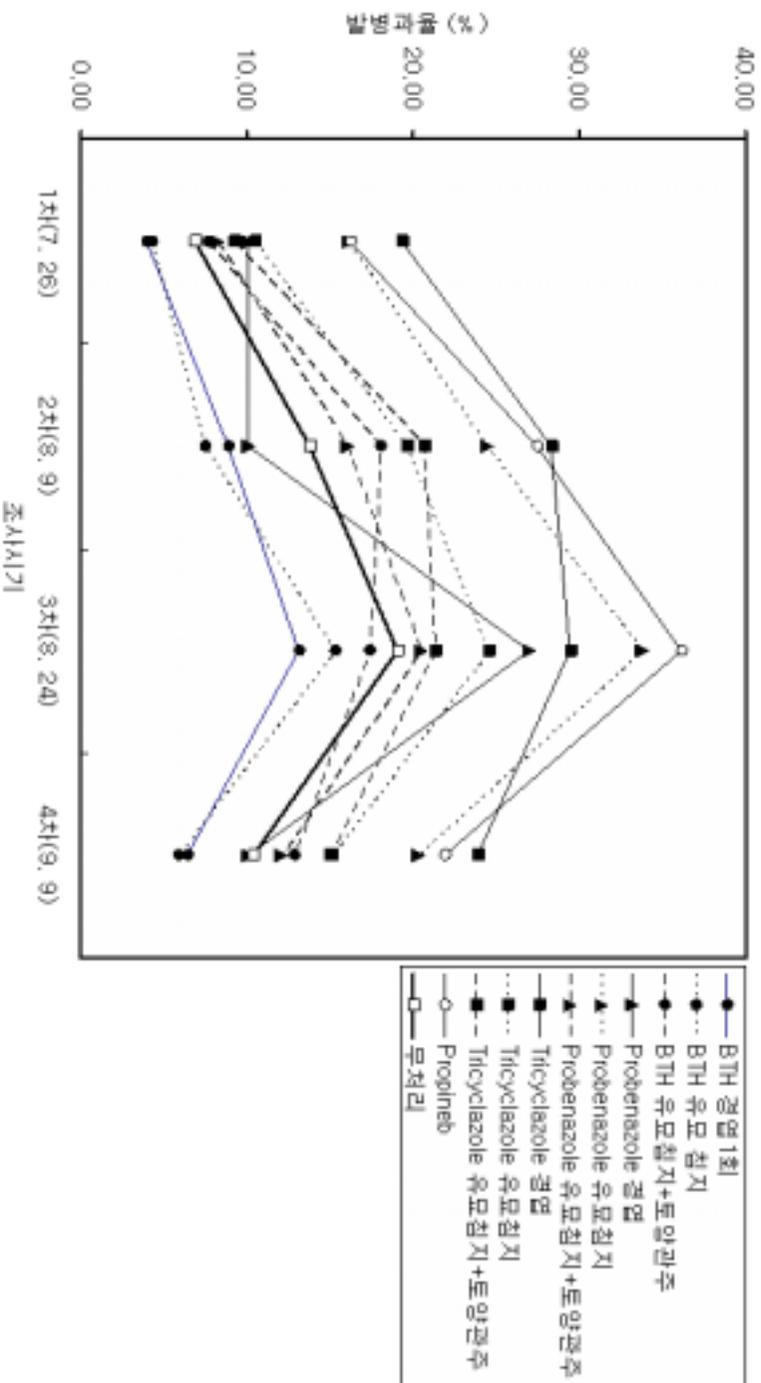


그림 44. BTH 경염제와, probenazole, tricyclazole의 유모침지 처리와 유모침지 및 경염처리 조합의 고추 단진액에 대한 방제 효과. (신조 살균제로는 prophene를 사용하였으며, 7월 12일부터 10일 간격으로 4회 처리하였고, 5월 11일(에 무모를 표정에 정식하였음.

BTH의 3차년도(2005) 실험에서는 BTH 혼합제의 유묘침지와 토양관주 처리의 효과만을 대조살균제인 propineb와 비교하였다(그림 48). 7월 29일에 2차 조사한 결과에서 유묘 침지 처리의 경우는 58.7%의 방제 효과를, 토양관주 처리구에서는 71.5%의 효과를 보였다. 총 3년에 걸친 포장실험의 결과 BTH 혼합제는 고추 정식 시에 유묘침지 처리 또는 정식 후의 토양 관주처리에 의해서 7월말에서 8월초까지는 고추 탄저병의 발병을 억제할 수 있는 효과를 보여주었다. 그러나 8월초를 지나면서는 그 효과가 급격히 감소하였다.

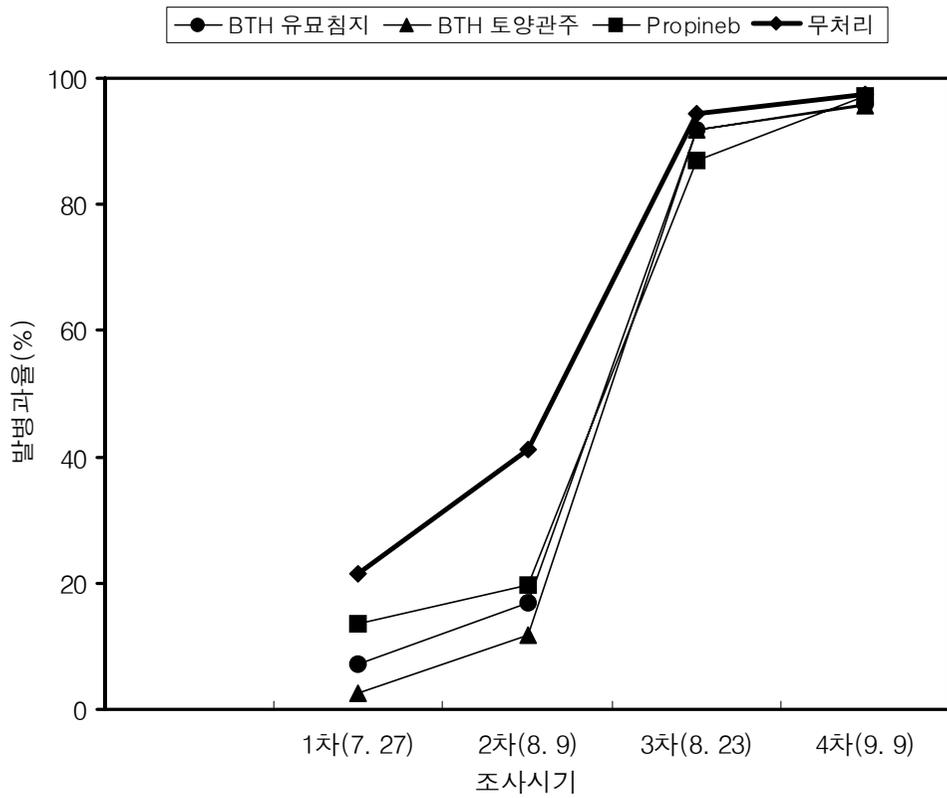


그림 48. BTH 혼합제의 유묘 침지 처리와 토양 관주 처리의 고추 탄저병에 대한 방제 효과.

## 제4장 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도

### 1. 고추 탄저병균의 동정 및 탄저병균 종간의 살균제에 대한 반응

현재까지 고추 탄저병의 주된 병원균은 *C. gloeosporioides*로 보고되어 있었으나, 본 연구를 통하여 주된 병원균은 *C. acutatum*임이 동정되었다. 병원균의 종을 정확하게 동정함으로써 효과적인 방제법을 확립할 수 있게 되었으며, 농약의 사용량을 줄일 수 있게 되었다.

### 2. 고추 탄저병균의 포자 발아와 부착, 군사 생장에 미치는 화합물의 활성 검정법 확립 및 살균제의 효과

96-well microtiter plate법에 의해서 대량의 화합물에 대한 검정이 가능하여졌고, 기존의 살균제가 가지는 새로운 작용 특성 연구가 가능해졌다. 특히 식물병 방제 전략에서 병원균의 부착을 억제하는 물질의 탐색이나 기존 약제의 효과 검정이 가능해졌다.

### 3. 고추 탄저병균, *Colletotrichum acutatum* JC24의 침입 구조 형성에 미치는 영향

병원균이 기주체를 침입하는데 나타나는 다양한 구조의 형성에 영향을 미치는 요인에 대해서 조사하였다. 이 결과로써 부착기가 고추 탄저병균의 침입에 어느 정도의 역할을 할런지 의문점이 되었고, 영양분에 의한 부생적인 생장이 병원성과도 관련이 있을 것으로 판단하였다. 고추 탄저병균의 병원성 기작은 더 많은 연구를 통해서 증명해야할 사항으로 생각한다.

### 4. 고추 탄저병의 방제에 사용되는 다양한 살균제의 작용 특성

Trifloxystrobin은 cellophane막 상에서 포자발아를 억제하는 것으로, tebuconazole은 새로운 분생포자의 생성을 억제하는 것으로 나타났다. 보호용 살균제들은 모두 탄저병균의 포자발아를 억제하였다. 이러한 결과는 포장에서의

방제력 작성에 이용하였다.

#### 5. 고추 탄저병에 대한 포장 방제력 작성

저농약 사용 방제력인 CBNU system을 확립하였다. CBNU system은 충북 청주, 괴산, 음성, 경북 영양 등 4곳의 고추 포장에서 그 효과를 검정하였으며, 우수한 효과를 보였다. 이러한 저농약 방제력은 청정 농산물 생산에 기여할 것으로 생각한다.

#### 6. 고추 탄저병균의 살균제 모니터링

전국적인 저항성 지도를 작성하였다. 이러한 저항성 지도는 지역에 따라서 사용 가능한 살균제에 대한 정보를 제공하기 때문에 농약의 사용량 감소에 기여할 것이다.

## 제5장 연구개발결과의 활용계획

본 연구과제의 핵심기술은 2가지이다. 첫째는 살균제에 대한 저항성 모니터링 기술들과 분석기술의 확립이며, 둘째는 고추에 대한 저농약 방제 체제의 확립이다. 살균제에 대한 저항성 모니터링 기술들과 분석기술의 확립은 현재 인삼에서의 저항성 지도를 작성하는데 사용하고 있다. 이러한 저항성 지도의 작성은 대상 작물에서의 농약 사용량을 감소시킬 수 있을 것으로 생각한다.

고추에 대한 저농약 방제 체제는 농촌 지도사와 농민을 대상으로 교육할 계획이다. 2005년 12월 9일 충북농업기술원에서 강의를 시작으로 충북지역에서의 고추 연구회 등을 통하여 현장에서 적용할 수 있도록 지도하고자 한다.

## 제6장 참고문헌

- Adaskaveg, J. E. and Forster, H. 2000. Occurrence and management of anthracnose epidemics caused by *Colletotrichum* species on tree fruits crops in California. p317-336. ed. by Prusky, D., Freeman, S. and Dickman, M. B. *In Colletotrichum* host specificity, pathology, and host-pathgen interaction. pp393.
- Adaskaveg, J. E. and Hartin, R. J. 1997. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. *Phytopathology* 87:979-987.
- Bernstein, B., Zehr, E. I. and Dean, R. A. 1995. Characteristics of *Colletotrichum* from peach, apple, pecan, and other hosts. *Plant Dis.* 79:478-482.
- Beynon, S. M., Coddigton, A., Lewis, B. G. and Varzea, V. 1995. Genetic variation in the coffee berry disease pathogen, *Colletotrichum kahawae*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 46:457-470.
- Brown, A. E., Sreenivasaprasad, S. and Timmer, L. W. 1996. Molecular Characterization of Slow-Growing Orange and Key Lime. Anthracnose Strains Of *Colletotrichum* from Citrus as *C. acutatum*. *Phytopathology* 86:523-527.
- Buchenauer, H. (1987) Mechanism of action of triazolyl fungicides and related compounds. pp.205-231, *In* Modern selective fungicides : properties, applications, mechanisms of action (ed. H. Lyr), Longman Scientific and Technical, Harlow, United Kingdom.
- Burland, T. G. and Gull, K. 1984. Molecular and cellular aspects of the interaction of benzimidazole fungicides with tubulin and microtubules. p299-320. ed. by Trinci, A. P. J and Ryley, J. F. *In* Mode of action of

- antifungal agents. pp405.
- Cormrod, J. C. and T. R. Hawkes (1995) Screening practices in the agricultural industry. pp.97-107, *In* Brighton crop protection conference -Weeds- 1995, England.
- Culbreath, A. K., K. I. Stevenson and T. B. Brenneman. 2002. Management of late leaf spot of peanut with benomyl and chlorothalonil: a study in preserving fungicide utility. *Plant Dis.* 86:349-355.
- Davis, R. M., E. M. Miyao, R. J. Mullen, J. Valencia, D. M. May and B. J. Gwynne. 1997. Benefits of applications of chlorothalonil for the control of black mold of tomato. *Plant Dis.* 81:601-603.
- Dekker, J. 1995. Development of resistance to modern fungicides and strategies for its avoidance. p23-38. ed. by Lyr, H. *In* Modern selective fungicides. pp595.
- Denoyes, B. and Baudry, A. 1995. Species identification and pathogenicity study of French *Colletotrichum* strains isolated from strawberry using morphological and cultural characteristics. *Phytopathology* 85:53-57.
- De Waard, M. A. 1994. Resistance to fungicides which inhibit sterol 14 $\alpha$ -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.
- Doss, R. P., S. W. Potter, G. A. Chastagner and J. K. Christian (1993) Adhesion of nongerminated *Botrytis cinerea* conidia to several substrata. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1786-1791.
- Elad, Y. 1992. Reduced sensitivity of *Botrytis cinerea* to two sterol biosynthesis-inhibiting fungicides: fenetrazole and fenethanil. *Plant Pathology* 41: 47-54.
- Fletcher, J. S. and Wolfe, M. S. 1981. Insensitivity of *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* to triadimefon, triadimenol and other fungicides. Brighton Crop

- Protection Conference: Pests and Diseases 2:633-640.
- Forster, H. and Adaskaveg, J. E. 1999. Identification of subpopulations of *Colletotrichum acutatum* and epidemiology of almond anthracnose in California. *Phytopathology* 89:1056-1065.
- Freeman, S. and Katan, T. 1997. Identification of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose and root necrosis of strawberry in Israel. *Phytopathology* 87:516-521.
- Freeman, S., Katan, T. and Shabi, E. 1996. Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* Isolates from Avocado and Almond Fruits with Molecular and Pathogenicity Tests. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1014-1020.
- Freeman, S., Nizani, Y., Dotan, S., Even, S. and Sando, T. 1997. Control of *Colletotrichum acutatum* in strawberry under laboratory, greenhouse, and field conditions. *Plant Dis.* 81:749-752.
- Freeman, S., Katan, T. and Shabi, E. 1998. Characterization of *Colletotrichum* species Responsible for Anthracnose Diseases of Various Fruits. *Plant Dis.* 82:596-605.
- Freeman, S., Shabi, E. and Katan, T. 2000. Characterization of *Colletotrichum acutatum* Causing Anthracnose of Anemone (*Anemone coronaria* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* pp:5267-5272.
- Freimoser, F. M., C. A. Jakob, M. Aebi and U. Tuor (1999) The MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3727-3729.
- Fujimura, M., Kamakura, T. and Yamaguchi, I. 1992. Action mechanism of diethofencarb to a benzimidazole-resistant mutant in *Neurospora crassa*. *J. Pesticide Sci.* 17:237-242.
- Guerber, J. C. and Correll, J. C. 2001. Characterization of *Glomerella acutata*,

- the telemorph of *Colletotrichum acutatum*. *Mycologia* **93**:216-229.
- Hadden, J. F. and Black, L. L. 1989 Anthracnose of Pepper Caused by *Colletotrichum* Spp. *Proceeding of the International Symposium on Integrated Management Practices* pp.184-188.
- Ishii, H., Iwamoto, S. and Nishimura, K. 1998. Comparative studies on fungicide sensitivity and other characteristics in *Colletotrichum* isolated from various plant species. *The 1998 Brighton Conference-Pests and Diseases* pp. 529-534.
- 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.
- Kataria, H. R., Verma, P. R. and Gisi, U. 1991. Variability in the sensitivity of *Rhizoctonia solani* anastomosis groups to fungicides. *J. Phytopathol.* 133:121-133.
- Kato, M., E. S. Mizubuti, S. B. Goodwin and W. E. Fry. 1997. Sensitivity to protectant fungicides and pathogenic fitness of clonal lineage of *Phytophthora infestans* in the United States. *Phytopathology* 87:973-978.
- Keinath, A. P. 2000. Effect of protectant fungicide application schedules on gummy stem blight epidemics and marketable yield of watermelon. *Plant Dis.* 84:254-260.
- Kim, B. S., T. H. Lim, E. W. Park and K. Y. Cho. 1995. Occurrence of multiple resistant isolates of *Botrytis cinerea* to benzimidazole and *N*-phenylcarbamate fungicides. *Korean J. Plant Pathol.* 11:146-150.
- Kim, B. S., Park, H. K. and Lee, W. S. 1989. Resistance to Anthracnose (*Colletotrichum* spp.) in Pepper. *Proceeding of the International Symposium on Integrated Management Practices* pp:184-188.
- Kim, J. T., S. K. Park, W. Choi, Y. H. Lee and H. T. Kim (2003) Identification of *Colletotrichum* spp. associated with pepper anthracnose in

- Korea. Plant Path. J. 19:331.
- Köller, W. 1992. Antifungal agents with target sites in sterol functions and biosynthesis. In : *Target sites of fungicide action*, ed. by W. Köller, pp. 119-206. CRC Press, Florida, USA.
- Lee, C. U. and H. H. Kim. 1986. Cross-tolerance of *Alternaria mali* to various fungicides. Korean J. Mycol. 14:71-78.
- Lee, C. U. and Kim, H. H. 1986. Cross-tolerance of *Alternaria mali* to various fungicides. Korean J. Mycol. 14:71-78.
- Liyanage, H. D., R. T. McMillan and H. C. Kistler. 1992. Two genetically distinct population of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. Phytopathology 82:1371-1376.
- Liyanage, H. D., Mcmillan, R. T., Jr. and Kistler, C. 1992. Two genetically distinct populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. *Phytopathology* 82:1371-1376.
- Lyr, H. 1995. Selectivity in modern fungicides and its basis. pp13-22. ed. by Lyr, H. In Modern selective fungicides -Properties, Applications, Mechanisms of action- pp595.
- Mayton, H., G. A. Forbes, E. S. G. Mizubuti and W. E. Fry. 2001. The roles of three fungicides in the epidemiology of potato late blight. Plant Dis. 85:1006-1012.
- Ogawa, J. M., Manji, B. T., Heaton, C. R., Petrie, J. and Sonoda, R. M. 1983. Methods for detection and monitoring the resistance of plant pathogens to chemicals. ed. by Georgiou, G. P. and Saito, T. In Pest resistance to pesticides. Plenum Press, New York-London. pp 117-162.
- Park, C. S. 1981. Studies on fungicide resistance against rice blast disease. Cooperation Research Rept. No. 8-1 ORD, 20pp.
- Park, K. S. and Kim, C. H. 1992. Identification, distribution and etiological characteristics of anthracnose fungi of red pepper in Korea. Kor. J. Plant

- Pathol. 8:61-69.
- Peres, N. A. R., N. L. Souza, S. E. Zitko and L. W. Timmer. 2002. Activity of benomyl for control of postbloom fruit drop of citrus caused by *Colletotrichum acutatum*. *Plant Dis.* 86:620-624.
- Sanogo, S., R. E. Stevenson and S. P. Pennypacker. 2003. Appressorium formation and tomato fruit infection by *Colletotrichum coccodes*. *Plant Dis.* 87:336-340.
- Schepers, H. T. A. M. 1983. Decreased sensitivity of *Sphaerotheca fuliginia* to fungicides which inhibit ergosterol biosynthesis. *Neth. J. Plant Pathol.* 89: 185-187.
- Sherald, J. L., N. N. Ragsdale and H. D. Sisler (1973) Similarities between the systemic fungicides triforine and triarimol. *Pestic. Sci.* 4:719-728.
- Shi, Y., Correll, J. C., Guerber, J. C. and Rom, C. R. 1996. Frequency of *Colletotrichum* species causing bitter rot of apple in the southeastern United States. *Plant Dis.* 80:692-696.
- Skehan, P., R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J. T. Warren, H. Bokesch, S. Kenney and M. R. Boyd (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* 82:1107-1112.
- Slawecki, R. A., E. P. Ryan and D. H. Young (2002) Novel fungitoxicity assays for inhibition of germination-associated adhesion of *Botrytis cinerea* and *Puccinia recondita* spores. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:597-601.
- Soeldner, J. K. Christian and L. E. Fukunaga (1993) Adhesion of germlings of *Botrytis cinerea*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:260-265.
- Sreenivasaprasad, S., Mills, P. R., Meehan, B. M. and Brown, A. E. 1996. Phylogeny and systematics of 18 *Colletotrichum* species based on ribosomal DNA spacer sequences. *Genome* 39:499-512,
- 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.
- Talhinhas, P., Sreenivasaprasad, S., Neves-Martins, J. and Oliveria, H. 2002. Genetic and morphological characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of lupins. *Phytopathology* 92:986-996.
- Vinnere, O., Fatehi, J., Wright, S. A. I. and Gerhardson, B. 2002. The causal agent of anthracnose of *Rhododendron* in Sweden and Latvia. *Mycol. Res.* 106(1):60-69.
- Washington, J. R., J. Cruz, F. Lopez and M. Fajardo. 1998. Infection studies of *Mycosphaerella fijiensis* on Banana and the control of black sigatoka with chlorothalonil. *Plant Dis.* 82:1185-1190.
- Wedge, D. E. and B. J. Smith (2000) A microtiter assay shows effectiveness of a natural fungicide for control of *Colletotrichum* spp. *Phytopathology* 90:S83.
- Ypema, H. L. and R. E. Gold (1999) Kresoxim-methyl, modification of a naturally occurring compound to produce a new fungicide. *Plant Dis.* 83:4-19.
- 권천섭, 이순구. 2002. 고추 탄저병의 발병 생태 특성. *식물병연구* 8:120-123.
- 김병섭, 임태현, 박은우, 조광연. 1995. Benzimidazole계 및 *N*-phenylcarbamate계 살균제에 다중 저항성인 잭빛곰팡이병균의 발생. *한국식물병리학회지* 11:146-150.
- 김병섭, 박은우, 임태현, 조광연. 1996. Dichlofluanid 저항성 잭빛곰팡이병균 (*Botrytis cinerea*)의 저항성 불안정 및 감수성균의 경합 능력 비교. *한국식물병리학회지* 12:415-421.
- 김병섭, 조광연, 이윤수. 1998. *Colletotrichum gloeosporioides*에 의한 소리쟁이 탄저병. *한국식물병리학회지* 14:358-360.

- 김완규, 조원대, 이영희. 1992. *Colletotrichum gloeosporioides* Penz.에 의한 딸기 탄저병. 한국식물병리학회지 8:213-215.
- 김완규, 조의규, 이은중. 1986. 고추탄저병 *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. 2계통. 한국식물병리학회지 2:107-113.
- 김재정, 김준태, 박성우, 박은숙, 김홍태. 2003. 고추 탄저병균의 포자 발아와 부착, 균사 생장에 미치는 화합물의 활성 검정법 확립 및 살균제의 효과. 농약과학 회지 7:159-168.
- 김주희, 이용훈, 이왕휴. 1998. *Colletotrichum gloeosporioides*에 의한 땅콩 탄저병. 한국식물병리학회지 14:614-617.
- 김주희, 최정식, 최인영, 정성희, 이왕휴. 1997. *Colletotrichum gloeosporioides* Penz.에 의한 시클라멘 탄저병. 한국식물병리학회지 13:195-199.
- 김진원, 심규열, 이두형. 1993. *Colletotrichum gamiicola*와 *C. caudatum*에 의한 잔디 탄저병의 발생. 한국식물병리학회지 9:226-231.
- 김충희, 박경석. 1988. 고추 탄저병 발병진전의 한 예찰모델. 한국식물병리학회지 4:325-331.
- 김홍태, 김윤식. 2004. 우리나라 주요 고추 탄저병균의 변화. p181-206. 한국 고추의 분자 유전과 육종. 김병동 등. pp522.
- 남명현. 2003. 우리나라 딸기탄저병의 병원, 생태학적 특성 및 방제. 충남대학교 박사학위논문.
- 박경석, 김충희. 1992. 국내 고추 탄저병균류의 동정, 분포 및 병원학적 특성. 한국식물병리학회지 8:61-69.
- 박성우, 김준태, 김재정, 김홍태. 2002. 고추에서 분리한 탄저병균의 스테롤생합성 저해 살균제에 대한 감수성 반응과 포장 적응력. 식물병 연구 8:239-244.
- 박숙영, 정희정, 김가영, 고영진. 1996. *Colletotrichum gloeosporioides*에 의한 난 탄저병의 발생 특성. 한국식물병리학회지 12:455-458.
- 박원묵, 김성환, 고영희. 1989. 성숙에 따른 고추의 탄저병균 *Colletotrichum gloeosporioides* Penz.에 대한 감수성화에 관한 연구. 한국식물병리학회지 5:262-270.

- 박원목, 박상호, 이용세, 고영희, 조의규. 1987. 전기영동법을 이용한 고추탄저병균의 분류. 한국식물병리학회지 **3**:85-92.
- 박원목, 이용세, 김성희, 김성환, 고영희. 1987. 푸른 고추의 탄저병균 *Colletotrichum gloeosporioides* Penz.에 대한 병저항성의 생화학적고찰. 한국식물병리학회지 **4**:290-296.
- 박인철, 예완혜, 김충희. 1992. Procymidine, Vinclozolin, Benomyl에 저항성인 딸기 잿빛곰팡이병균의 발생. 한국식물병리학회지 **8**:41-46.
- 박의훈, 조용섭. 1996. 한국에서 분리한 고추 더듬이병균의 구리저항성 Plasmid. 한국식물병리학회지 **12**:156-161.
- 손미정, 김홍태, 김진철, 최경자, 조광연 (1999) 고추 탄저병균의 실험실 내의 스크리닝법 확립. p. 43, 학술발표회 요약집 1999, 한국농약과학회.
- 오인석. 1995. 고추 탄저병균(*Colletotrichum* spp.)의 분류 및 병원성에 관한연구. 충남대학교 박사학위논문.
- 오진성, 김충희. 1992. 고추 재배지역에서 분리한 *Phytophthora capsici* 균주들의 살균제 Metalaxyl에 대한 감수성 정도. 한국식물병리학회지 **8**:29-33.
- 윤재복, 박효근. 2001. 고추의 과실탄저병 저항성 검정 방법 : 병원균의 포자형성, 접종방법과 접종원의 농도 및 접종 후 환경조건. 한국원예학회지 **42**:389-393.
- 이두형. 1997. *Colletotrichum lilicearum*에 의한 맥문동 탄저병. 한국식물병리학회지 **13**:295-298.
- 이승돈, 조용섭. 1996. 한국에서의 고추 더듬이병균의 구리 저항성과 레이스분포. 한국식물병리학회지 **12**:150-155.
- 이창은. 1985. 사과 푸른곰팡이병균의 각종 살균제에 대한 내성. 한국식물병리학회지 **11**:128-135.
- 이창은, 박석희. 1994. Benomyl에 저항성인 사과 겹무늬썩음병균의 교차 및 이중 저항성. 한국식물병리학회지 **10**:270-276.
- 임태현. 2002. Fungicide Resistance of *Monilinia fructicola* Isolates Causing Brown Rot on Stone Fruits. 충북대학교 박사학위논문.
- 정희정, 고영진. 1992. *Colletotrichum gloeosporioides* Penz.에 의한 유사탄저병.

- 한국식물병리학회지 8:70-74.
- 조광연 (1990) 신규 농약 개발을 위한 스크리닝 체제 확대 발전. 한국화학연구원 보고서.
- 최경자, 김홍태, 김진철, 조광연 (1999) 여러 종류의 *in vitro* 생물 검정에서 *Botrytis cinerea*에 대한 sulphamide계와 dicarboximide계 살균제의 활성 특성. 한국농약과학회지 3:37-44.
- 최경자, 김진철, 김홍태, 조광연 (2000) *Saccharomyces cerevisiae*를 이용한 효율적인 호홉 저해제 검정법. 한국농약과학회지 4:52-59.
- 한경숙, 이두형. 1995. 콩, 팥 및 녹두에서 분리한 탄저병균류의 동정과 병원학적 특징. 한국식물병리학회지 11:30-38.
- 한국식물병리학회. 1998. 한국식물병명목록. pp. 436. 김병섭, 정영륜, 조광연. 1993. Metalaxyl 저항성 및 감수성 감자 역병균(*Phytophthora infestans*)의 적응력 (Fitness) 비교 및 Dimethomorph와 Chlorothalonil에 의한 방제. 한국식물병리학회지 9:31-35.
- 한국식물병리학회지. 1998. 한국 식물병·해충·잡초 명감. 제3판. pp;104-107.
- 日本植物防疫協會. 1997. 植物防疫講座(第3版) P141-147.
- 金興泰, 金俊泰, 朴成祐, 金在貞, 朴殷淑 (2003) 炭疽病防除に使う殺菌劑に對するトウガラシ炭疽病菌の感受性差異. 日本農藥學會. 第28回 대회 講演要約集. p68.