



사과원에 분포하는 *Botryosphaeria* spp.의 Benomyl 및 Tebuconazole 살균제에 대한 감수성 평가

Sensitivity Evaluation of *Botryosphaeria* spp. Distributed in Apple Orchards to Benomyl and Tebuconazole Fungicides in Korea

***Corresponding author**

Tel: +82-53-950-5761

Fax: +82-53-950-6758

E-mail: leesy1123@knu.ac.kr

ORCID

<https://orcid.org/0000-0003-1676-0330>임광재¹ · 최준우¹ · 임성근¹ · 남영주² · 이하경³ · 김흥태⁴ · 이승열^{1,5*} · 정희영^{1,5}¹경북대학교 식물학과, ²글로벌농업컨설팅(주), ³국립원예특작과학원 원예특작환경과,⁴충북대학교 식물학과, ⁵경북대학교 식물의학연구소**Gwang-Jae Lim¹, Jun-Woo Choi¹, Seong-Geun Lim¹, Young Ju Nam², Ha-Kyoung Lee³, Heung Tae Kim⁴, Seung-Yeol Lee^{1,5*}, and Hee-Young Jung^{1,5}**¹Department of Plant Medicine, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea²Global Agro-Consulting Corporation, Suwon 16614, Korea³Horticultural and Herbal Crop Environment Division, National Institute of Horticultural & Herbal Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea⁴Department of Plant Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea⁵Institute of Plant Medicine, Kyungpook National University, Daegu 45166, Korea

The sensitivity of *Botryosphaeria* spp. to benomyl WP (active ingredient [a.i.], 50%) and tebuconazole WP (a.i., 25%) fungicides was investigated by comparing 238 *Botryosphaeria* strains isolated from 2005 to 2023 using the agar dilution method. The EC₅₀ values of each isolate ranged from 0.07 to 3.04 µg/ml (average, 0.62±0.47) for benomyl and ranged from 0.05 to 1.94 µg/ml (average, 0.58±0.32) for tebuconazole. The mean and distribution of EC₅₀ values were compared to determine the differences in sensitivity between groups by year, region and species. The mean EC₅₀ values and distribution graphs were similar among all isolate groups, indicating no significant differences in sensitivity to both fungicides. As a result of analyzing the β-tubulin genes of 30 sensitive and less sensitive strains selected based on the EC₅₀ values to benomyl, no mutations were found at codons 167, 198, and 200. In addition, the diameter of lesions was measured 7 days after inoculation of 6 strains of *Botryosphaeria* into apple fruits treated with benomyl or tebuconazole at the recommended concentration, and there was no significant difference between the sensitive and less sensitive strains. Based on the results, the 238 *Botryosphaeria* isolates are sensitive to benomyl and tebuconazole fungicides. These results may provide the guidelines for monitoring the fungicide resistance in *Botryosphaeria* populations in Korea.

Keywords: Benzimidazole fungicide, *Botryosphaeria* spp., DMI fungicide, White rot disease

Received August 11, 2024

Revised September 24, 2024

Accepted September 24, 2024

서론

사과(*Malus × domestica* Borkch.)는 전 세계적으로 재배되는 주요 과수로서, 국내 사과 재배면적은 34,359 ha로 국내 재

Research in Plant Disease

eISSN 2233-9191

www.online-rpd.org

© The Korean Society of Plant Pathology

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

배 과수 중 재배면적이 가장 넓다(Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2021; Korean Statistical Information Service, 2024). 사과는 재배 기간 중, 다양한 식물병원성 곰팡이, 세균 및 바이러스에 의해 감염되며, 그중 사과에 보고된 주요 곰팡이 병으로는 *Alternaria alternata*에 의한 점무늬낙엽병, *Diplocarpon coronariae*에 의한 갈색무늬병, *Colletotrichum* spp.에 의한 탄저병, *Botryosphaeria* spp.에 의한 겹무늬썩음병 등 46종이 보고되어 있다(Choi 등, 2024). 특히 1970년 이후 후지 품종(cv. Fuji)의 재배면적이 증가함에 따라 *Botryosphaeria* spp.에 의한 사과 겹무늬썩음병이 심각하게 발생하였으며(Kim 등, 1995), 현재까지 전국의 사과 과원에서 지속적으로 발생하고 있다(Cheon과 Jeon, 2015; Lee 등, 2006, 2023). 현재 국내 발생하는 사과 겹무늬썩음병의 방제를 위하여 benzimidazole계, quinone outside inhibitor계, demethylation inhibitor (DMI)계 및 succinate dehydrogenase inhibitor (SDHI)계 등 100여 가지 이상의 살균제 품목이 등록되어 있으며, 이 중 thiophanate-methyl, benomyl, tebuconazole, prochloraz 등의 살균제가 주로 방제에 사용된다(Rural Development Administration, 2024). 그러나 다양한 곰팡이에서 β -tubulin 유전자 및 *cyp51* 유전자의 점돌연변이(point mutation)와 ABC transporter의 과발현에 의해서 benzimidazole계 살균제 및 DMI계 살균제에 대한 저항성이 보고되고 있다(Kim 등, 2007, 2023b; Kwak 등, 2017; Kwon 등, 2020). 따라서, 본 연구에서는 국내 다양한 지역의 사과원에서 분리된 사과겹무늬썩음병균(*Botryosphaeria* spp.)을 대상으로 종 동정을 수행하고, 겹무늬썩음병 방제를 위해 사용되는 benomyl과 tebuconazole에 대해 병원균의 종, 분리 지역 및 분리 연도에 따라 감수성 정도를 비교하였다. 또한, 약제 저항성과 관련된 유전자의 점돌연변이를 확인하고, 과실 접종 실험을 통해 약제 저항성이 방제에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

사과겹무늬썩음병균의 다유전자 계통 분석. 본 연구에서는 2005년에서 2022년까지 경상도, 충청도, 전라도, 경기도 및 강원도 소재 사과원에서 분리된 *Botryosphaeria* spp.를 확보하여 실험을 수행하였다(Supplementary Table 1). 사과 과실 및 줄기에서 분리된 238개의 *Botryosphaeria* spp. 균주 중, 41개 균주는 국립원예특작과학원에서 분양받았고, 98개 균주는 글로벌농업컨설팅에서 제공받았으며, 나머지 99개 균주는 경북대학교 식물균병학연구실에서 보유한 균주를 사용하여 실험을 수행하였다(Table 1). 이후 확보된 균주의 분

Table 1. List of isolates used in this study

| Year | Region | Number of isolates |
|------------------------|-----------|--------------------|
| 2005-2022 ^a | Gyeongbuk | 80 |
| | Gyeongnam | 11 |
| | Chungbuk | 35 |
| | Chungnam | 5 |
| | Jeonbuk | 48 |
| | Jeonnam | 4 |
| | Gwangwon | 35 |
| | Gyeonggi | 20 |
| | Total | 238 |

^aForty-one isolates were received from the National Institute of Horticultural and Herbal Science and 98 isolates were received from the Global Agriculture Company.

자생물학적 동정은 HiGene Genomic DNA prep kit (Biofact, Daejeon, Korea)를 이용하여 total genomic DNA를 추출 후, internal transcribed spacer (ITS) region, translation elongation factor 1- α (*tef1*), β -tubulin (*tub2*) gene을 각각 ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3')/ITS4 (5'-TCCTCGCTTATTGATATGC-3'), EF1-688F (5'-CGGTCACCTTGATCA-CAAGTGC-3')/EF1-1251R (5'-CCTCGAACTCACCAGTACCG-3'), Bt2a (5'-GGTAACCAATCGGTGCTGCTTTC-3')/Bt2b (5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3') 프라이머를 사용하여 증폭하였다(Alves 등, 2008; Gardes와 Bruns, 1993; Glass와 Donaldson, 1995; White 등, 1990). 증폭된 산물은 ExoSAP-ITTM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 정제하였으며, Bioneer (Daejeon, Korea)를 통해 염기서열을 분석하였다. 확보한 염기서열은 National Center for Biotechnology Information (NCBI) BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)를 통해 이전에 보고된 염기서열과 비교한 뒤, 분리한 균주들과 근연종들 간의 계통학적 유연관계 비교를 위해 MEGA X 프로그램에서 neighbor joining 방법을 사용하여 계통수를 작성하였다(Kumar 등, 2018).

한천희석법에 의한 살균제별 균사 성장 억제 효과 검증. 한천희석법을 이용하여 확보된 균주들의 benomyl WP (active ingredient [a.i.], 50%; FarmHannong, Seoul, Korea)와 tebuconazole WP (a.i., 25%; Bayer Crop Science, Seoul, Korea)에 대한 균사 성장 억제 효과를 조사하였다. 사용한 각 살균제의 유효성분 함량을 고려하여, potato dextrose agar (Difco, Detroit, MI,

USA)에 benomyl은 0.01, 0.1, 1, 10, 100 µg/ml, tebuconazole은 0.016, 0.08, 0.4, 2, 10 µg/ml가 최종 농도가 되도록 살균제 희석 배지를 제작하였다. 접종원인 *Botryosphaeria* spp.는 25°C의 암 조건에서 7일간 배양한 뒤, 균총 선단에서 직경 4 mm의 균사 조각을 cork borer로 떼어내어 접종원으로 사용하였다. 접종 후 6일간 배양하여 균총의 직경을 조사하고, PDA 배지에서 배양한 균의 직경과 비교하여 확인된 균사 성장 억제 효과는 다음 식을 통해 계산하였다: 균사 성장 억제 효과(%) = [1 - (살균제 첨가 배지의 균총 직경 / 살균제 무첨가 배지의 균총 직경)] × 100.

EC₅₀ (half maximal effective concentration) 값의 경우, GraphPad Prism® software (version 10.2.3; Dotmatics, La Jolla, CA, USA)의 로지스틱 회귀분석(logistic regression)을 통해 산출하여 각 균주의 감수성 정도를 확인하였다(Pugliese 등, 2018). 산출한 결과를 통해 EC₅₀ 값으로 순위를 정하고, 상대적으로 EC₅₀ 값이 높았던 15개 균주와 낮았던 15개 균주를 선발하여 각각 약제 감수성이 낮은 집단과 높은 집단으로 구분하였다. 또한, 실험에 사용한 병원균을 다양한 기준에 따라 집단을 나누어 감수성 정도를 비교하기 위해 병원균 종, 분리 지역, 분리 연도에 따라 EC₅₀ 값의 평균값, 중앙값, 분포를 비교하였다. EC₅₀ 값의 분포는 각 집단의 균주 개수에 차이가 있는 것을 감안하여 구간별 분포 비율(%)로 계산하여 비교하였다.

β-tubulin 유전자 증폭 및 염기서열 분석. Benomyl에 대하여 낮은 감수성을 나타낸 균주와 높은 감수성을 나타낸 균주를 대상으로 β-tubulin 유전자의 점돌연변이를 검정하였다. 167번, 198번, 200번째 codon의 변이 여부를 확인하기 위해, 이전 연구에 기술된 Tub-C' (5'-GAGGAATCCAGACCGNATGATG-3')/Tub-F (5'-GACGTTGTTGGGATCCA-3') 프라이머를 사용하여 β-tubulin 유전자를 증폭하였다(Albertini 등, 1999). Polymerase chain reaction 반응은 95°C에서 5분간 pre-denaturation 수행 후, 95°C에서 30초간 denaturation, 52°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분간 extension을 35회 반복하였고, 72°C에서 10분 동안 final-elongation을 수행하였다. 이후 증폭된 산물에 대해 상기와 동일한 방법으로 정제 및 분석을 실시하였다. 분석된 유전자의 염기서열은 이전에 보고된 carbendazim 저항성 균주인 *Botryosphaeria dothidea* BD10 (accession number: MZ197999)과 감수성 균주인 *B. dothidea* BD26 (accession number: MZ197998)의 β-tubulin 유전자 염기서열과 비교하여 점돌연변이 여부를 확인하였다(Wang 등, 2022).

살균제 처리에 따른 과실에서의 껍무늬썩음병 억제 효과 검정. Benomyl 및 tebuconazole에 대해 상대적으로 EC₅₀ 값이

높았던 3개 균주와 낮았던 3개 균주를 선발하여 사과 과실(cv. 피크닉)에 접종 후 살균제를 처리하여 병 억제 효과를 검정하였다. 먼저 과실 표면을 70% ethanol로 소독한 뒤 충분히 건조하여 습기를 제거하였고, 각 살균제를 권장 사용 농도(benomyl WP: 332.5 µg/ml; tebuconazole WP: 250 µg/ml)로 희석하여 준비하였다. Cork borer를 이용하여 과실 표면에 직경 4 mm의 상처를 내고, 25°C 배양기에서 7일간 배양한 사과껍무늬썩음병균의 균사디스크를 4 mm cork borer를 사용해 떼어내어 과실에 접종하였다. 이후 권장 사용 농도로 희석한 살균제에 30초간 침지한 후 30분간 건조하였다. 처리된 과실은 70% ethanol로 소독한 플라스틱 용기(250×200×100 mm, L×W×H)에 넣어 25°C 배양기의 암 조건에서 보관하였다. 무처리구의 경우 동일한 방법으로 표면 소독 후 균사를 접종한 뒤 살균제를 처리하지 않고 동일한 조건에서 보관하였다. 이 후 접종 7일차에 약제 처리구와 무처리구의 과실에 형성된 병반의 직경을 측정하였으며, 병 억제 효과는 다음 식을 이용하여 계산하였다: 병 억제 효과(%) = [1 - (살균제 처리 과실 병반 직경 / 살균제 무처리 과실의 병반 직경)] × 100.

결과 및 고찰

***Botryosphaeria* 균주의 분자생물학적 동정.** 전체 238개의 균주 중 204개 균주는 *Botryosphaeria sinensis*, 34개 균주는 *B. kuwatsukai*와 동일한 cluster를 형성하였다(Supplementary Fig. 1). 따라서, 국내 사과원에 우점하여 분포하고 있는 껍무늬썩음병균은 기존에 알려진 *B. dothidea*와 매우 근연한 *B. sinensis*로 확인되었으며(Lee 등, 2021), 최근 연구에서 보고된 *B. kuwatsukai* (Lim 등, 2023)도 약 14% 정도 분포하는 것으로 확인되었다.

국내 사과원에서 분리된 *Botryosphaeria* 균주의 살균제 감수성. Benomyl에 대한 238개 *Botryosphaeria* 균주의 약제 감수성을 조사한 결과 대부분 유사한 억제 경향성이 확인되었다(Fig. 1A, C). 평균 EC₅₀ 값은 0.62 µg/ml로 나타났으며, 가장 낮은 약제 감수성을 나타낸 균주의 EC₅₀ 값은 3.04 µg/ml였다(Table 2). 전체 균주의 약 84%인 201개 균주의 EC₅₀ 값이 1.05 µg/ml 이하에 분포하였다(Fig. 2A). Tebuconazole에 대한 약제 감수성을 조사한 결과 역시 모든 균주에서 유사한 억제 경향성을 확인하였다(Fig. 1B, D). 평균 EC₅₀ 값은 0.58 µg/ml로 나타났으며, 가장 낮은 약제 감수성을 나타낸 균주의 EC₅₀ 값은 1.94 µg/ml였다(Table 2). 전체 균주의 약 90%인 215개 균주의 EC₅₀ 값이 0.90 µg/ml 이하에 분포하였다(Fig. 2B). *Botryosphaeria* 종별로 분석하였을 때, 우점종인 *B. sinensis* 집단은 두 가지 약제에 대

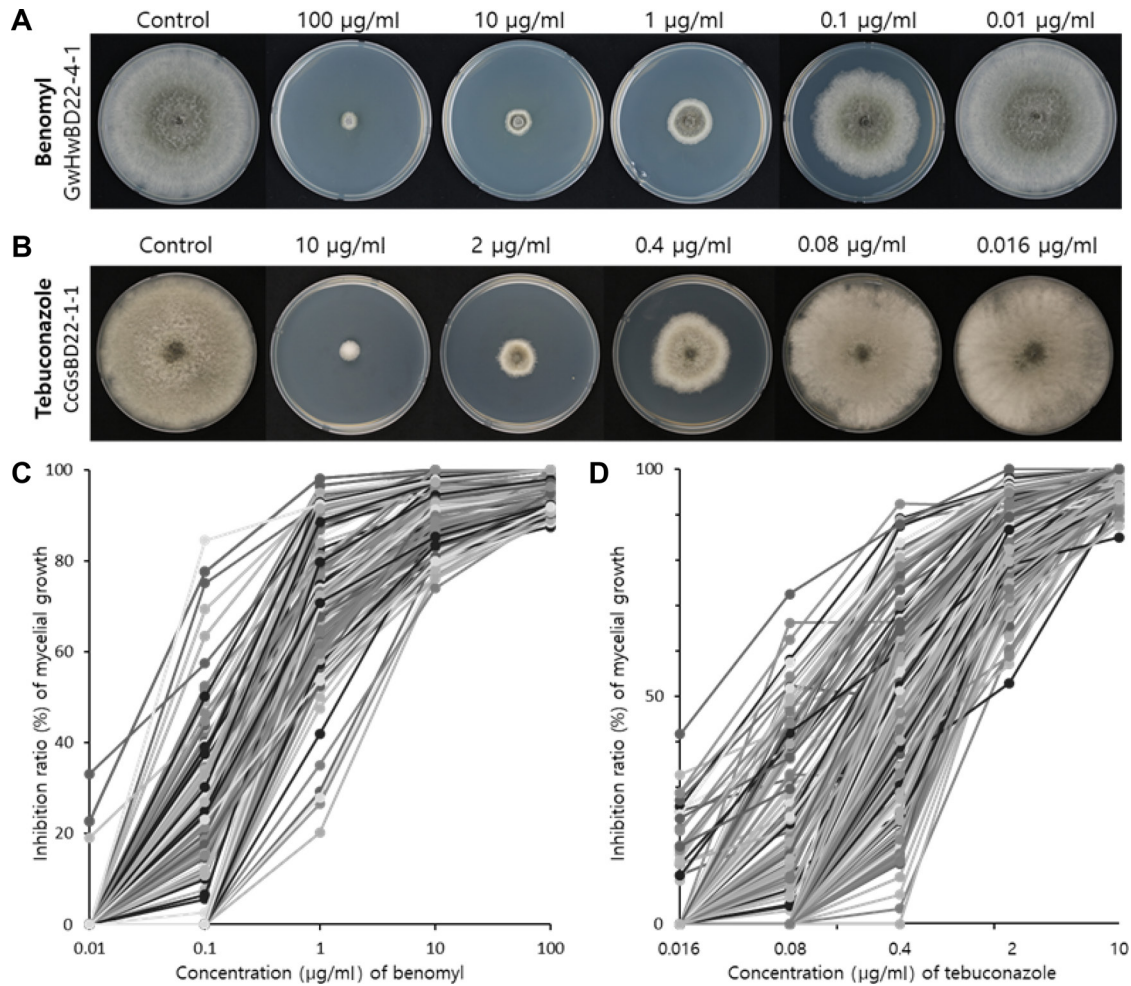


Fig. 1. Mycelial growth at each concentration of benomyl-amended (A) and tebuconazole-amended (B) potato dextrose agar media and the inhibition ratio (%) of 238 *Botryosphaeria* spp. in response to benomyl WP (A, C) and tebuconazole WP (B, D).

Table 2. EC₅₀ values of *Botryosphaeria* isolates against benomyl and tebuconazole fungicides

| Fungicides | Group | Number of isolates | EC ₅₀ value ^a (µg/ml) | | |
|--------------|----------------|--------------------|---|---------|---------|
| | | | Minimum | Average | Maximum |
| Benomyl | Total | 238 | 0.07 | 0.62 | 3.04 |
| | Less sensitive | 15 | 0.88 | 1.59 | 3.04 |
| | Sensitive | 15 | 0.22 | 0.16 | 0.33 |
| Tebuconazole | Total | 238 | 0.05 | 0.58 | 1.94 |
| | Less sensitive | 15 | 1.05 | 1.42 | 1.94 |
| | Sensitive | 15 | 0.05 | 0.12 | 0.16 |

^aEC₅₀ value is the concentration inhibiting mycelial growth on potato dextrose agar by 50%.

하여 모두 전체 집단과 유사한 경향을 나타냈다(Fig. 3A, B). 한편, *B. kuwatsukai* 집단에서는 benomyl과 tebuconazole에 대한 평균 EC₅₀ 값이 각각 0.32와 0.49 µg/ml로 나타나 전체 집단에 비해 두 약제에 대한 감수성이 더 높았다(Fig. 3A, B). 지역별(경

북 80개, 전북 48개, 강원 35개, 충북 35개, 경기 20개, 경남 11개, 충남 5개, 전남 4개) 분리 균주의 benomyl과 tebuconazole에 대한 감수성을 상사수염그래프(box and whisker plot)로 비교한 결과, 평균 EC₅₀ 값, 중앙값, EC₅₀ 값의 분포 범위에서 통계적으

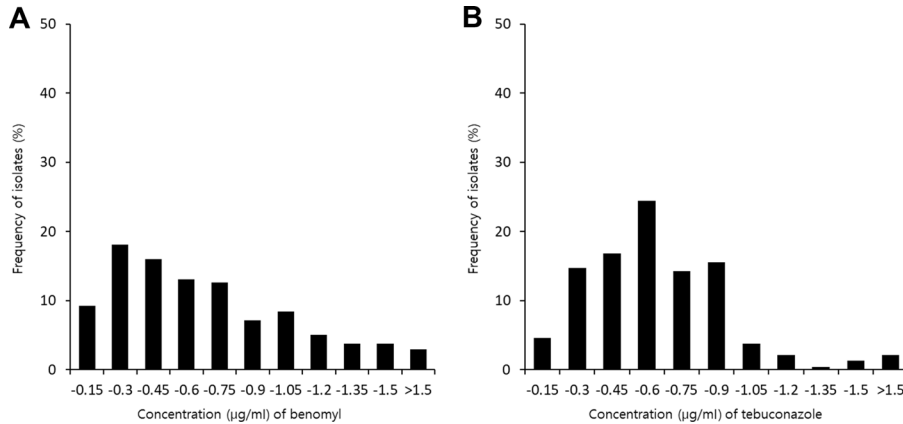


Fig. 2. Distribution of the EC₅₀ values for benomyl (A) and tebuconazole (B).

로 유의미한 수준의 차이는 확인할 수 없었다(Fig. 3C, D). 경시적인 약제 감수성 변화를 확인하기 위해, 2005-2020년에 분리한 75개 균주 집단과 비교적 최근인 2021-2022년에 분리한 163개 균주 집단으로 나누어 비교하였다. Benomyl에 대한 2005-2020년 집단의 평균 EC₅₀ 값은 0.70 µg/ml로 나타난 반면 2021-2022년 집단의 EC₅₀ 값은 0.59 µg/ml로 약제에 대한 감수성이 다소 증가한 것으로 나타났다(Fig. 3E). Tebuconazole의 경우 두 집단의 EC₅₀ 값은 각각 0.55 µg/ml과 0.59 µg/ml로 나타났으며 분포 그래프에서도 유의미한 차이를 나타내지 않았다(Fig. 3F). 결과적으로 국내 사과원에 분포하고 있는 *Botryosphaeria* 균주는 대부분 benomyl 및 tebuconazole 살균제에 감수성으로 확인되었으며, 본 실험에서 검정한 238개 균주 중 고도저항성을 획득한 균주는 확인되지 않았다.

다양한 병원균에서 각 집단별 균주 수에 관계없이 지역별, 종별 그리고 연도에 따른 감수성 차이를 보고하고 있다. 이전 연구에 따르면, benzimidazole계 살균제에 대한 감수성을 병원균 종에 따라 비교한 결과 *Colletotrichum gloeosporioides* s. lat.는 β-tubulin gene에서 점돌연변이(E198A)를 나타내며 질적 저항성을 보였다. 반면, *C. acutatum* s. lat.의 경우 이러한 변이 없이 모두 양적 저항성을 보여 감수성에 차이가 나타났다(Isa와 Kim, 2022). *Macrophomina phaseolina*를 제주도과 제주도 이외의 지역으로 구분하여 prochloraz 등 5종의 살균제에 대해 감수성을 비교한 연구에서는 제주도 이외의 지역에서 분리한 균주가 2.2배 이상의 EC₅₀ 값을 보여 감수성의 차이가 확인되었다(An 등, 2022). 분리한 연도에 따라 경시적인 변화를 관찰한 연구에서는 딸기, 토마토 등에서 분리한 *Botrytis cinerea*가 SDHI계 살균제에 대해 100 µg/ml 이상의 EC₅₀ 값을 보이는 저항성 균이 2011년, 2015년 그리고 2016년으로 갈수록 증가하였다(Baek과 Kim, 2021). 하지만 본 연구에서 benomyl과 tebuconazole에 대해 238개 사과점무늬썩음병균을 대상으로 산출한

EC₅₀ 값을 집단별로 비교한 결과, 평균 EC₅₀ 값과 구간별 균주 분포에서 이전 연구와 달리 확연한 차이를 나타내지 않았다.

β-tubulin 유전자 염기서열 및 변이 분석. Benomyl에 대한 EC₅₀ 값이 가장 높고 낮았던 30개 균주에 대해 β-tubulin gene을 분석한 결과, 두 집단 모두 감수성 균주인 *Botryosphaeria dothidea* BD26의 198번 codon과 동일한 GAG (glutamate)로 확인되었으며, 167번과 200번 codon 또한 TTC (phenylalanine)로 확인되어 점돌연변이를 확인할 수 없었다(Fig. 4). Benzimidazole계 살균제는 β-tubulin 유전자에서 점돌연변이를 보이며 저항성이 나타나는 기작이 대표적으로 알려져 있는데, 이중 198번 codon이 GAG (glutamate)에서 GCG (alanine)로 치환되는 돌연변이(E198A)가 주요하게 보고되어 있다(Fungicide Resistance Action Committee, 2024). *B. dothidea*를 포함해 *Monilinia fructicola*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botrytis cinerea* 등의 다양한 병원균에서 E198A 돌연변이에 의한 살균제 저항성이 보고되었다(Fan 등, 2022a; Weger 등, 2011; Yuan 등, 2022). 또한, *Gibberella zeae*에서는 F167Y, F200Y 점돌연변이에 의한 benzimidazole계 살균제 저항성이 보고된 바 있다(Qiu 등, 2011). 하지만 본 연구에서 검정한 30개 균주는 이러한 점돌연변이가 확인되지 않아 benomyl에 대해 질적 저항성을 보이지 않는 감수성 균주로 나타났다. 하지만 *Phytophthora sojae*에서 Q8L, C165Y, I258V 등 다양한 위치의 점돌연변이에 의한 저항성이 확인된 만큼(Peng 등, 2019), *Botryosphaeria* spp.에 대한 지속적인 모니터링과 함께 β-tubulin의 전체 시퀀스를 파악하여 저항성 균의 조사가 필수적이다. 추가적으로, 현재까지 *Botryosphaeria* spp.에 대해 DMI계 살균제에 저항성을 부여하는 유전자의 변이 위치가 정확히 특정되지 않아 본 연구에서 점돌연변이 검정을 실시하지 않았으나, 차후 이에 대한 검정 역시 실시해야 할 것으로 판단된다.

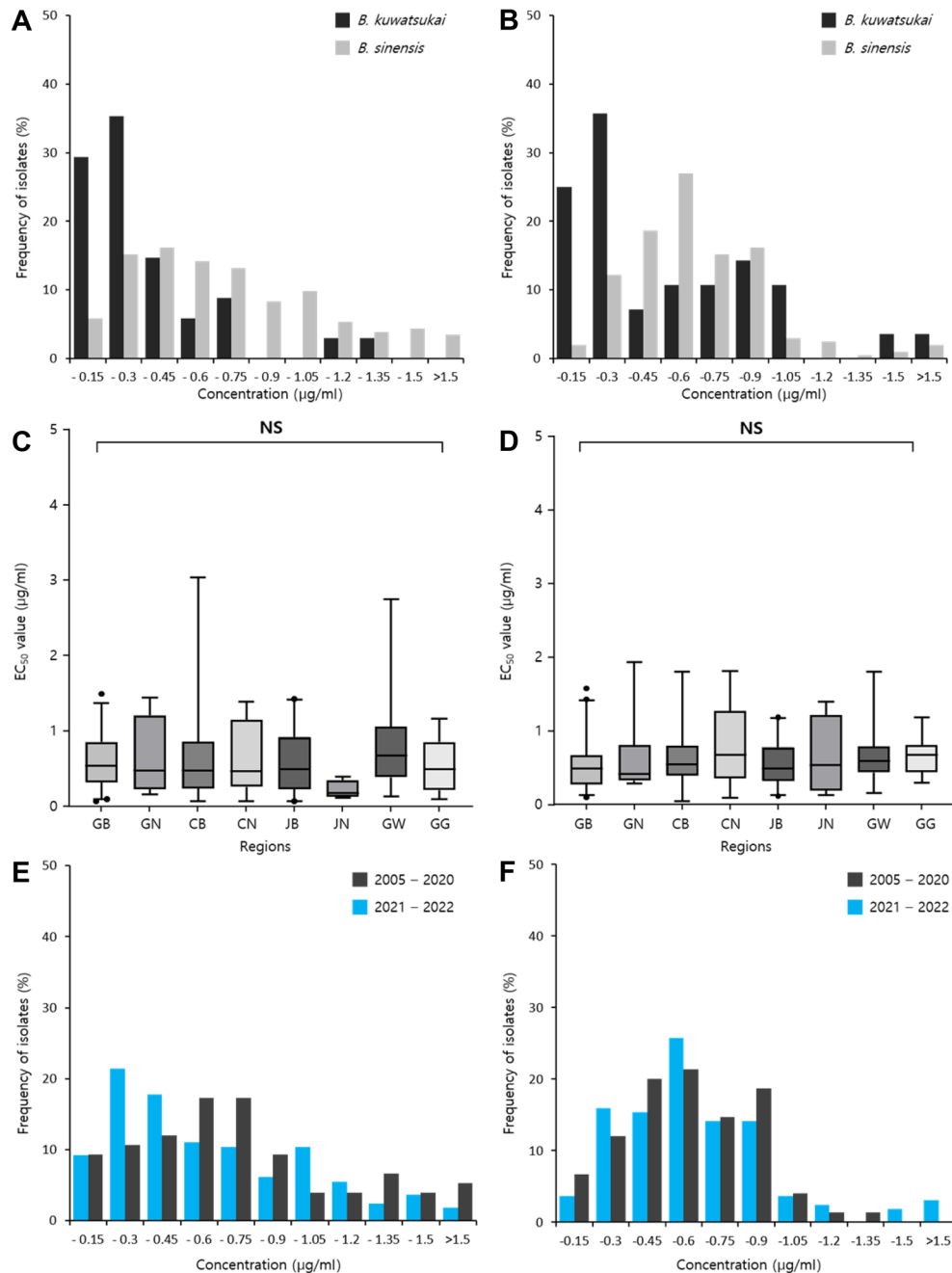


Fig. 3. Distribution of EC_{50} values of *Botryosphaeria* spp. populations by species (A, B), isolated regions (C, D), and isolated years (E, F). Middle line means median EC_{50} values of all isolates of *Botryosphaeria* spp. which were assigned to Gyeongbuk (GB), Gyeongnam (GN), Chungbuk (CB), Chungnam (CN), Jeonbuk (JB), Jeonnam (JN), Gwangwon (GW), and Gyeonggi (GG). Black dots indicate strains with EC_{50} values that were not assigned within the 2.5–97.5 percentile range for each region, and NS means not significant among regions (C, D). Benomyl (A, C, E). Tebuconazole (B, D, E).

Benomyl과 tebuconazole 처리에 따른 병 발생 억제 효과. Benomyl에서 상대적으로 높은 EC_{50} 값을 보인 균주의 처리구 병반면적은 5.3–8.7 mm로 나타났으며, 낮은 EC_{50} 값을 보인 균주 또한 6.2–8.1 mm의 병반면적을 보였다. 6개 균주의 무처리구의 병반면적은 18.1–29.3 mm로 확인되어 선정한 균주는 모두 살균제가 효과적으로 병 발생을 억제한 것으로 확인되었다(Fig. 5A, B).

Tebuconazole에 대해 높은 EC_{50} 값을 보인 균주는 4.0–8.2 mm, 낮은 EC_{50} 값을 보인 균주는 2.4–5.1 mm의 병반면적을 보였으며, 전체 무처리구의 병반면적은 15.0–34.4 mm로 나타나 감수성의 차이와 관계없이 모두 무처리구에 비해 병반이 억제되는 모습을 보였다(Fig. 5C, D). 따라서, benomyl과 tebuconazole에 대해 EC_{50} 값에 차이를 보인 균주들은 모두 식물체 상에서 병 발생이

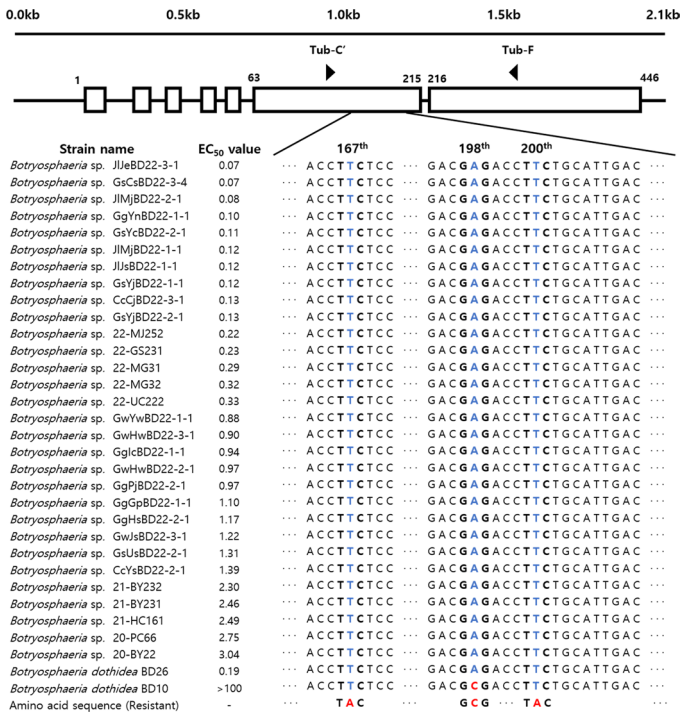


Fig. 4. β -tubulin gene sequences of selected sensitive and less sensitive *Botryosphaeria* spp. in response to benomyl. Portions of the β -tubulin gene sequence in carbendazim sensitive and resistant *Botryosphaeria* spp. isolates are shown, with the pertinent point mutation being highlighted in red and wild type sequences were highlighted in blue.

효과적으로 억제되었으며, 두 그룹 간의 차이 역시 확인되지 않았다.

Benzimidazole계와 DMI계 살균제 모두 다양한 곰팡이에 서 이미 저항성 혹은 내성이 다수 보고되었다. *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum* spp., *Venturia nashicola* 등의 곰팡이에서 carbendazim, tebuconazole, difenoconazole 살균제에 대한 저항성이 국내외에서 확인되었으며(Isa 등, 2021; Kim 등, 2023a; Kwon 등, 2010; Park 등, 2002), *Botryosphaeria dothidea* 역시 국외에서 thiophanate-methyl, carbendazim, tebuconazole 에 대한 저항성이 보고되었다(Fan 등, 2016, 2022b; Wang 등, 2022). 국내의 경우 benomyl에 대해 배지상에서 균사 성장량 을 통해 *B. dothidea*의 저항성이 보고된 바 있으나(Lee와 Park, 1994), 이후 살균제에 대한 명확한 감수성 평가는 미흡한 상태 이다. 본 연구를 통해 국내 사과원에서 확보된 *Botryosphaeria* spp.의 살균제에 대한 감수성 평가를 진행한 결과 모든 균주 가 benomyl과 tebuconazole에 대해 유사한 EC₅₀ 값과 분포 그래프를 나타내었으며, 점돌연변이 확인, 과실 점종 결과 역 시 높은 EC₅₀ 값을 보인 균주 집단과 낮은 EC₅₀ 값을 보인 균 주 집단 간에 유의미한 차이를 확인할 수 없었다. 추가적으로, benzimidazole계에 속하는 thiophanate-methyl WP (70% a.i.; Kyung Nong, Gyeongju, Korea)와 DMI계에 속하는 met-conazole SC (20% a.i.; Dongbang Agro, Seoul, Korea)를 이용 하여 benomyl과 tebuconazole에 대해 EC₅₀ 값에서 차이를 보

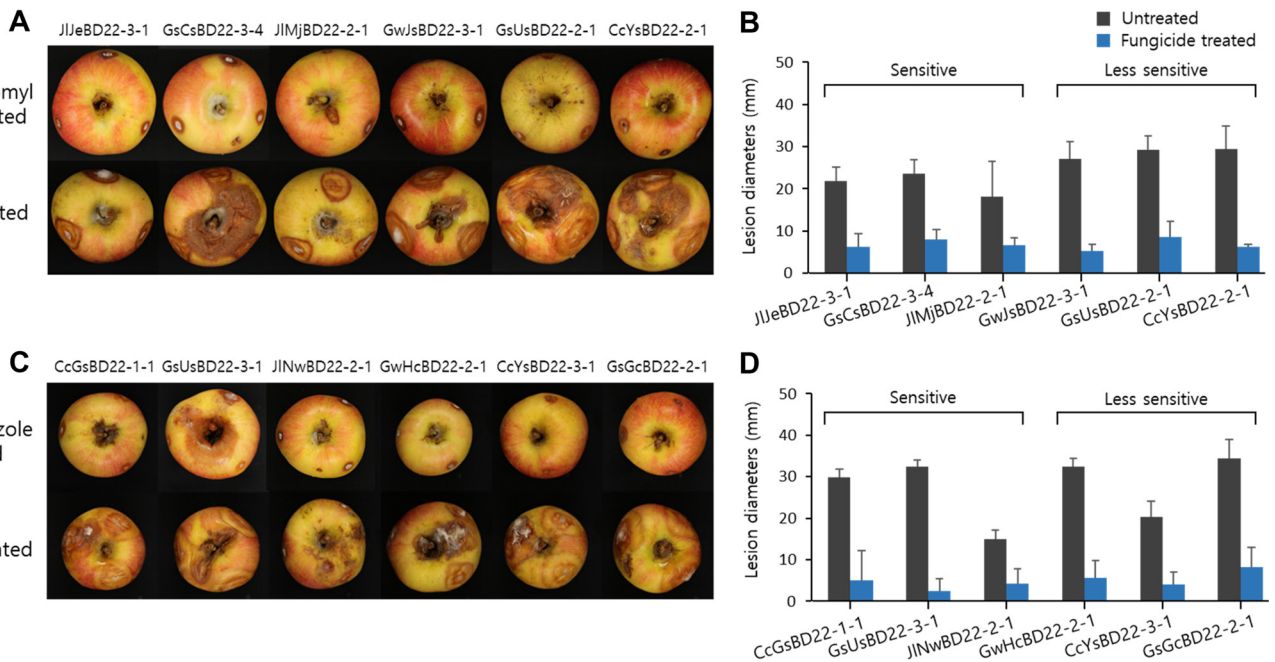


Fig. 5. Control efficacy of benomyl and tebuconazole against sensitive and less sensitive *Botryosphaeria* spp. on apple fruit (cv. picnic). Pictures of *Botryosphaeria* inoculated apple fruits in response to benomyl (A), and tebuconazole (C). Lesion diameters after benomyl treatment (B) and tebuconazole treatment (D).

인 20개 균주에 대해 동일한 시험을 수행하였다. 그 결과, 두 집단 간의 균사 생장 억제율이 대부분 유사한 것으로 나타났다 (Supplementary Fig. 2). 따라서 benzimidazole계와 DMI계 살균제는 2005년부터 2022년까지 채집한 모든 *B. sinensis*와 *B. kuwatsukai* 균주들에 대해 높은 억제율을 보이는 것으로 판단된다. 하지만 기후 변화 등으로 인해 저항성 병원균이 발생할 가능성이 높아지고 있기 때문에(Lurwanu 등, 2021), 지속적인 저항성 모니터링과 함께 2020년 이전에 분리한 균주에 대한 추가적인 검정이 필수적일 것으로 판단된다. 또한 *Botryosphaeria* spp.는 기후 변화 등으로 인해 수체가 스트레스를 받을 때 발생 가능성이 높아진다고 알려져 있으므로(Sturrock 등, 2011), 살균제 제형이나 적절한 처리 방법 등을 고려하여 방제 방법을 수립해야 할 것이다. 위 결과는 차후 *Botryosphaeria* spp.에 의한 병해 방제를 위한 살균제 선발, 혹은 앞으로 나타날 수 있는 저항성 문제를 관리할 때 유용한 기초 자료가 될 것으로 기대된다.

요 약

2005년부터 2023년까지 분리된 238개의 *Botryosphaeria* spp.를 대상으로 한천희석법을 통해 benomyl WP (a.i. 50%)와 tebuconazole WP (a.i. 25%)에 대한 감수성을 조사하였다. Benomyl에 대한 각 균주의 EC₅₀ 값은 0.07-3.04 µg/ml (average, 0.62±0.47)이며, tebuconazole은 0.05-1.94 µg/ml (average, 0.58±0.32)로 나타났다. 연도별, 지역별 그리고 병원균 종으로 집단을 나누어 감수성 차이를 확인하기 위해 EC₅₀ 값의 평균과 분포를 비교하였다. 그 결과, 평균 EC₅₀ 값과 분포 그래프가 모든 집단 간에 유사하여 두 살균제에 대해 감수성의 유의적인 차이를 확인할 수 없었다. Benomyl에 대한 EC₅₀ 값을 기준으로 선발된 감수성 및 저감성 균주 30종의 β-tubulin 유전자를 분석한 결과, 167번, 198번, 200번 코돈에서 점돌연변이가 발견되지 않았다. 또한, benomyl 또는 tebuconazole을 권장 농도로 처리한 사과 열매에 *Botryosphaeria* 6개 균주를 접종한 후 7일째에 병반 직경을 측정하고 결과 감수성 균주와 저감성 균주 간에 유의한 차이는 없었다. 이러한 결과로 미루어 볼 때, *Botryosphaeria* spp. 균주는 모두 benomyl과 tebuconazole에 감수성인 것으로 판단된다. 이러한 결과는 차후 국내 사과에서 발생하는 *Botryosphaeria* spp. 개체군의 살균제 저항성 모니터링에 활용될 것으로 생각된다.

Conflicts of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

Acknowledgments

This work was carried out with the support of the Cooperative Research Program for Agriculture Science & Technology Development (Project No. PJ016906), Rural Development Administration, Republic of Korea.

Electronic Supplementary Material

Supplementary materials are available at Research in Plant Disease website (<http://www.online-rpd.org/>).

References

- Albertini, C., Gredt, M. and Leroux, P. 1999. Mutations of the β-tubulin gene associated with different phenotypes of benzimidazole resistance in the cereal eyespot fungi *Tapesia yallundae* and *Tapesia acuformis*. *Pestic. Biochem. Phys.* 64: 17-31.
- Alves, A., Crous, P. W., Correia, A. and Phillips, A. J. L. 2008. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Divers.* 28: 1-13.
- An, S. H., Choi, J. Y. and Kim, H. T. 2022. Changes in the sensitivity of *Macrophomina phaseolina* causing soybean charcoal rot to several fungicides. *Korean J. Pestic. Sci.* 26: 169-179. (In Korean)
- Baek, D. and Kim, H. T. 2021. Resistance to SDHI fungicides of *Botrytis cinerea* causing gray mold in various crops. *Korean J. Pestic. Sci.* 25: 237-245. (In Korean)
- Cheon, W. and Jeon, Y. 2015. Survey of major diseases occurred on apple in northern Gyeongbuk from 2013 to 2014. *Res. Plant Dis.* 21: 261-267. (In Korean)
- Choi, J., Kim, S.-H., Choi, Y.-J., Kim, G. H., Yoon, J.-Y., Park, B.-Y. et al. 2024. Yearly update of the list of plant diseases in Korea (6.2 edition, 2024). *Res. Plant Dis.* 30: 103-113. (In Korean)
- Fan, F., Li, X. B., Yang, Y. Y., Zhang, J. Y., Zhu, Y. X., Yin, W. X. et al. 2022a. Benzimidazole-resistant isolates with E198A/V/K mutations in the β-tubulin gene possess different fitness and competitive ability in *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 112: 2321-2328.
- Fan, K., Fu, L., Liu, H., Qu, J., Zhang, G., Zhang, S. et al. 2022b. Reduced sensitivity to tebuconazole in *Botryosphaeria dothidea* isolates collected from major apple production areas of China. *Plant Dis.* 106: 2817-2822.
- Fan, K., Wang, J., Fu, L., Li, X., Zhang, Y., Zhang, X. et al. 2016. Sensitivity of *Botryosphaeria dothidea* from apple to tebuconazole in China. *Crop Prot.* 87: 1-5.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2021. Data of crops and livestock products. URL <https://www.fao.org/home/en/> [25 March 2024].
- Fungicide Resistance Action Committee. 2024. Fungal control agents sorted by cross-resistance pattern and mode of action.

- URL <https://www.frac.info/> [25 March 2024].
- Gardes, M. and Bruns, T. D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* 2: 113-118.
- Glass, N. L. and Donaldson, G. C. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1323-1330.
- Isa, D. A. and Kim, H. T. 2022. Detection of *Colletotrichum* spp. resistant to benomyl by using molecular techniques. *Plant Pathol. J.* 38: 629-636.
- Isa, D. A., Min, J. Y. and Kim, H. T. 2021. Responses to carbendazim and analysis of field populations of *Colletotrichum* spp. isolated from several host plants. *Korean J. Pestic. Sci.* 25: 73-81. (In Korean)
- Kim, G., Son, D., Choi, S., Liu, H., Nam, Y. and Sang, H. 2023a. Monitoring of benzimidazole resistance in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry in Korea and development of detection method for benzimidazole resistance. *Plant Pathol. J.* 39: 614-624.
- Kim, J., Kim, H. T. and Jeon, Y. 2023b. Research to fungicide sensitivity of *Colletotrichum* spp. isolated from apple fruits in cheongsong, Korea. *Res. Plant Dis.* 29: 145-157. (In Korean)
- Kim, K. W., Park, E. W., Kim, S. B. and Yun, J. I. 1995. Temporal dynamics of *Botryosphaeria dothidea* spore dispersal in apple orchards and related climatological factors. *Korean J. Plant Pathol.* 11: 230-237.
- Kim, Y.-S., Min, J. Y., Kang, B. K., Bach, N. V., Choi, W. B., Park, E. W. et al. 2007. Analyses of the less benzimidazole-sensitivity of the isolates of *Colletotrichum* spp. causing the anthracnose in pepper and strawberry. *Plant Pathol. J.* 23: 187-192.
- Korean Statistical Information Service. 2024. Agricultural area survey, Fruit tree cultivation area. URL <https://kosis.kr/index/index.do> [25 March 2024].
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. and Tamura, K. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35: 1547-1549.
- Kwak, Y., Min, J., Song, J., Kim, M., Lee, H. and Kim, H. T. 2017. Relationship of resistance to benzimidazole fungicides with mutation of β -tubulin gene in *Venturia nashicola*. *Res. Plant Dis.* 23: 150-158. (In Korean)
- Kwon, S. K., Jeon, C. W., Nam, M. H. and Kwak, Y. S. 2020. Evaluation of fungicides sensitivities of Strawberry wilt disease pathogen, *Fusarium oxysporum* f sp. *fragariae*. *Korean J. Pestic. Sci.* 24: 34-42.
- Kwon, S.-M., Yeo, M.-I., Choi, S.-H., Kim, G.-W., Jun, K.-J. and Uhm, J.-Y. 2010. Reduced sensitivities of the pear scab fungus (*Venturia nashicola*) collected in Ulsan and Naju to five ergosterol-biosynthesis-inhibiting fungicides. *Res. Plant Dis.* 16: 48-58. (In Korean)
- Lee, C. U. and Park, S. H. 1994. Cross- and double-resistance of benomyl-resistant *Botryosphaeria dothidea*. *Korean J. Plant Pathol.* 10: 270-276. (In Korean)
- Lee, D.-H., Lee, S.-W., Choi, K.-H., Kim, D.-A. and Uhm, J.-Y. 2006. Survey on the occurrence of apple diseases in Korea from 1992 to 2000. *Plant Pathol. J.* 22: 375-380.
- Lee, S.-Y., Peter, K. A., Das, K., Diane, A.-R. and Jung, H.-Y. 2023. The rapid apple decline phenomenon: current status and expected associated factors in Korea. *Plant Pathol. J.* 39: 538-547.
- Lee, S.-Y., Ten, L. N., Back, C.-G. and Jung, H.-Y. 2021. First report of apple decline caused by *Botryosphaeria sinensis* in Korea. *Kor. J. Mycol.* 49: 417-423.
- Lim, G.-J., Das, K., Noh, H.-J., Lim, S.-K., Cho, Y.-J., Lee, S.-Y. et al. 2023. First report of an apple ring rot fungus *Botryosphaeria kuwatsukai* in Korea. *Kor. J. Mycol.* 51: 111-120.
- Lurwanu, Y., Wang, Y. P., Wu, E. J., He, D. C., Waheed, A., Nkurikiyimfura, O. et al. 2021. Increasing temperature elevates the variation and spatial differentiation of pesticide tolerance in a plant pathogen. *Evol. Appl.* 14: 1274-1285.
- Park, S.-W., Kim, J.-T., Kim, J.-J. and Kim, H.-T. 2002. Sensitivity of *Colletotrichum* spp. isolated from red-pepper to sterol biosynthesis inhibiting-fungicides and their field fitness. *Res. Plant Dis.* 8: 239-244. (In Korean)
- Peng, Q., Wang, Z., Fang, Y., Wang, W., Cheng, X. and Liu, X. 2019. Point mutations in the β -Tubulin of *Phytophthora sojae* confer resistance to ethaboxam. *Phytopathology* 109: 2096-2106.
- Pugliese, M., Matic, S., Prethi, S., Gisi, U. and Gullino, M. L. 2018. Correction: molecular characterization and sensitivity to demethylation inhibitor fungicides of *Aspergillus fumigatus* from orange-based compost. *PLoS One* 13: e0202835.
- Qiu, J. B. Xu, J. Q., Yu, J. J., Bi, C. W., Chen, C. J. and Zhou, M. G. 2011. Localisation of the benzimidazole fungicide binding site of *Gibberella zeae* β 2-tubulin studied by site-directed mutagenesis. *Pest Manag. Sci.* 67: 191-198.
- Rural Development Administration. 2024. Pesticide safety information system. Version: 1st February 2024. URL <https://psis.rda.go.kr/psis/agc/res/agchmRegistStusLst.ps?menuId=PS00263> [25 March 2024].
- Sturrock, R. N., Frankel, S. J., Brown, A. V., Hennon, P. E., Kliejunas, J. T., Lewis, K. J. et al. 2011. Climate change and forest diseases. *Plant Pathol.* 60: 133-149.
- Wang, L., Tu, H., Hou, H., Zhou, Z., Yuan, H., Luo, C. et al. 2022. Occurrence and detection of carbendazim resistance in *Botryosphaeria dothidea* from apple orchards in China. *Plant Dis.* 106: 207-214.
- Weger, J., Schanze, M., Hilber-Bodmer, M., Smits, T. H. M. and Patocchi, A. 2011. First report of the β -tubulin E198A mutation conferring resistance to methyl benzimidazole carbamates in European isolates of *Monilinia fructicola*. *Plant Dis.* 95: 497.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, eds. by M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White, pp. 315-322. Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Yuan, H., Hou, H., Zhou, Z., Tu, H. and Wang, L. 2022. Rapid detection of the E198A mutation of carbendazim-resistant isolates in *Colletotrichum gloeosporioides* by loop-mediated isothermal amplification. *Hortic. Plant J.* 8: 289-296.