

Rezasulin 기반 포자 생존 검정법을 이용한 당근검은잎마름병균 *Alternaria dauci*의 포자 성장 시기에 따른 몇 가지 살균제의 효과

Effects of Several Fungicides on the Spore Growth Period of *Alternaria dauci*, a Carrot Black Leaf Blight Fungus, Using a Rezasulin-based Spore Survival Assay

*Corresponding author

Tel: +82-43-261-2556

Fax: +82-43-271-4414

E-mail: htkim@cbnu.ac.kr

ORCID

<https://orcid.org/0000-0001-7132-0587>도지원 · 김흥태* 

충북대학교 농업생명환경대학 식물의학과

Jiwon Do and Heung Tae Kim* 

Department of Plant Medicine, College of Agriculture, Life & Environment Sciences, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea

The effects of five fungicides on the spore growth phase of *Alternaria dauci*, which causes carrot leaf blight, were tested using the spore viability assay (SVA) and agar dilution method (ADM). The average EC_{50} values for chlorothalonil against seven isolates of *A. dauci* examined by SVA and ADM were 14.21 $\mu\text{g/ml}$ and more than 100 $\mu\text{g/ml}$. Dithianon and folpet also had lower EC_{50} values in SVA than in ADM, while iminoctadine tris-albesilate had lower EC_{50} value in ADM. For fluazinam, the EC_{50} values of SVA and ADM were 1.63 and 2.40 $\mu\text{g/ml}$, respectively. As EC_{50} values of five fungicides according to the spore growth phase of *A. dauci* KACC 42997, the efficacy of each fungicide as chlorothalonil, dithianon, and folpet decreased when treated after spore germination rather than when treated with spores before germination. However, iminoctadine tris-albesilate was more effective when treated after spores germinated than when treated before treatment. The excellent effect of fluazinam on the pathogen was maintained until *A. dauci* KACC 42997 was cultured in potato dextrose broth for 6 hr and the germ tube grew beyond the size of the spore. However, when treated with iminoctadine tris-albesilate and fluazinam after culturing for 12 hr, as the EC_{50} values of the two fungicides increased to 8.87 and 20.65 $\mu\text{g/ml}$, their efficacies decreased. The results of this study show that the treatment time of the fungicide should be determined by considering the effect of the fungicide on the spore growth phase of pathogens.

Keywords: *Alternaria dauci*, Fungicide efficacy on the spore growth phase, Spore viability assay

Received March 11, 2024

Revised March 29, 2024

Accepted April 1, 2024

서론

살균제는 식물체 내부로의 침투성 여부를 가지고 침투 살균제(systemic fungicide)와 접촉 살균제(contact fungicide)의 두 종류로 나눌 수 있다. 침투 살균제는 식물체에 처리한 살균제가 식물체 내부로 침투되고, 식물체 내부에서 이행할 수 있는 살균

제이다. 이런 침투 살균제는 병원균이 식물체를 침입한 이후에 처리하여도 병원균의 생장을 억제하여 식물병을 방제할 수 있기 때문에 치료 살균제라고도 불린다(Ivic, 2010). 하지만 접촉 살균제는 식물체 내부로 침투하는 특성이 없기 때문에 식물체 표면의 처리된 부위에서만 효과를 나타내는데, 병원균이 식물체를 침입하기 전에 처리하여 식물체 표면에서 병원균의 포자 발아나 생장을 억제하여야만 병을 방제할 수 있다. 병원균이 식물체 내부로 침입하여 병이 발생한 후에 접촉 살균제를 처리하게 되면, 식물체 내부로 침투가 어렵기 때문에, 병 방제 효과가 감소하는 단점을 가지고 있다. 따라서 이런 접촉 살균제는 보호 살균제 또는 예방 살균제라고도 부른다. 이런 보호 살균제는 병원균에 대한 포자 발아 억제 효과는 우수한 반면에, 균사 생장 억제 효과는 저조한 경향을 보인다(Damicone, 2017; Kapsa, 2003).

살균제는 검정하는 방법에 따라서 병원균에 대한 억제 효과가 달라지기 때문에, 적합한 검정법을 사용하여 방제 효과를 검정해야 한다. 식물병원균에 대한 살균제의 효과를 검정하는 방법으로 병원균의 균사 생장 억제 효과를 검정하는 한천희석법이나, 현미경으로 포자의 발아 여부를 조사하는 포자 발아 검정법 등이 있다. 만약 균사 생장 억제 효과가 저조한 보호 살균제의 효과를 한천희석법으로 조사한다면, 포자 발아 검정법을 사용하여 조사한 효과보다 저조한 효과를 얻을 수 있다(Park 등, 2014). 그런데 포자 발아 여부를 현미경 하에서 조사하려면 포자 개개의 발아 여부를 조사해야 하기 때문에, 많은 작업량과 시간을 필요로 한다. 이런 어려움을 해결하기 위하여 포자 개개의 발아 여부를 검정하지 않고, resazulin 기반의 PrestoBlue™ 시약을 사용하는 포자 생존 검정법이 사용되고 있다(Park과 Kim, 2022).

최근 들어 특정한 작용점을 갖는 치료 살균제에 대해서 여러 종류의 식물병원균에서 저항성균이 출현하면서 병 방제 효과가 감소하고 있다. 하지만 보호 살균제에 대한 저항성균의 발생 보고는 거의 없는 상태이다 보니 보호 살균제에 대한 관심이 높아지고 있다(Kim 등, 2015, 2019; Kwak 등, 2017; Yeon 등, 2019). 그런데 병원균의 생장 단계에 미치는 보호 살균제의 효과를 알 수 있다면 보호 살균제를 보다 정확하고 효율적으로 사용할 수 있을 것으로 생각한다.

본 연구에서는 5종의 살균제를 선발하여 당근검은무늬병균인 *Alternaria dauci*에 대한 효과를 PrestoBlue™ 시약을 사용하는 포자 생존 검정법과 한천희석법으로 검정하여 그 효과를 비교하였다. 또한 병원균 포자의 생장 시기에 따라 살균제를 처리하여 병원균 포자의 생장 시기에 미치는 살균제의 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

실험에 사용한 균주와 균주의 보관. 실험에 사용한 당근검은무늬병균 *A. dauci* KACC 42997은 농촌진흥청 국립농업과학원 씨앗은행에서 분양받아 사용하였다. 분양받은 *A. dauci* KACC 42997은 potato dextrose agar (PDA; Difco™; Becton Dickinson & Co., Sparks, MD, USA) 배지에 접종하여 25°C의 암 조건에서 10일간 배양하였다. 병원균 균총의 선단부에서 균사 조각을 떼어내어 PDA 사면 배지에 접종하고 25°C에서 7일간 배양한 다음, 4°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

실험에 사용한 살균제와 처리 농도. 실험에는 작용점이 특이적이지 않는 카균에 속하는 살균제 중에서 chlorothalonil (a.i. 75, WP), dithianon (a.i. 75%, WG), folpet (a.i. 50%, WP), iminoctadine tris-albesilate (a.i. 40%, WP) 그리고 미토콘드리아의 산화적 인산화 반응에서 인산화 반응을 억제하는 다5군인 fluazinam (a.i. 50%, WG)을 사용하였다. 사용한 모든 살균제의 최종 처리 농도는 0.1, 1.0, 10.0, 100.0 µg/ml로 조절하였다.

병원균의 포자 형성 및 포자 현탁액 준비. 병원균의 포자는 Yoon 등(2023)의 방법을 사용하여 준비하였다. 당근검은무늬병균 *A. dauci* KACC 42997을 PDA 배지에 접종하여, 25°C의 암 상태에서 7일간 배양하였다. 멸균한 슬라이드그라스를 이용하여 병원균의 공중 균사를 제거하고, 20°C에서 통기 처리와 12시간 주기의 UV 처리를 동시에 실시하며 5일간 배양하였다. 멸균 증류수를 사용하여 수확한 포자 현탁액은 멸균한 4겹의 거즈에 여과하여 불순물을 제거한 후 포자 밀도를 조절하여 사용하였다. 포자 생존 검정법과 한천희석법에서의 살균제 효과를 비교하기 위해서는 구미, 제주, 평창에서 분리한 *A. dauci* 균주를 각각 2균주(CDSGM2-5와 CDSGM7-11), 2균주(CDSJ12-4와 CDSJ13-6), 3균주(CDSPC2-2, CDSPC2-3과 CDSPC6-4)씩을 선발하여 사용하였다.

PrestoBlue™ 시약을 사용한 병원균 포자 생존 검정. Park과 Kim(2023)이 *Colletotrichum acutatum s. lat.*에 대한 살균제 효과 검정을 위하여 사용하였던 방법을 개선하여 사용하였다. 96-well microtiter plate (SPL Life Sciences, Pocheon, Korea)의 각 well당 액체 배지 80 µl와 포자 현탁액과 살균제 용액을 각각 10 µl씩 총 100 µl씩 분주하였다. 실험 조건을 표준화하기 위하여 배지와 병원균의 포자 밀도가 생장에 미치는 효과를 조사하였다. 병원균의 배지로는 10%와 20%의 potato dextrose broth (PDB; Difco™; Becton Dickinson & Co.) 배지와 10%,

20%, 50%의 Czapek-dox broth (CDB; Difco™; Becton Dickinson & Co.) 배지를 각각 사용하였으며, 포자의 밀도는 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 spores/ml가 되도록 조절하였다.

살균제의 처리 시기에 따른 효과 검정은 20%의 PDB에서 포자 밀도를 5×10^4 spores/ml로 조절하여 실시하였다. 살균제는 병원균을 접종함과 동시에 처리(0시간)하거나, 병원균을 25°C에서 1.5시간, 3시간, 6시간, 12시간 동안 배양한 후에 각각 처리하였다. 포자의 생존 여부를 조사하기 위하여 살균제를 처리하고 24시간 배양한 후에, PrestoBlue™ 시약을 처리하고 다시 1시간 배양하고, 각 well의 형광을 Synergy HTX microplate reader (BioTek, Winooski, VT, USA)에서 조사하였다. Microplate reader의 여기(excitation) 파장과 방출(emission) 파장을 530 nm와 590 nm로 조정하여 상대적 형광값(relative fluorescence unit, RFU)을 측정하였으며, 병원균의 균사 성장 정도를 광학현미경(KR-300; Korea Lab Tech, Seongnam, Korea)으로 관찰하였다. 각 살균제의 포자 생존 억제 효과는 다음과 같은 식으로 계산하였다: 살균제의 포자 생존 억제 효과(%) = $[1 - (SPT_{t-24} - SP_t) / (P_{t-24} - P_t)] \times 100$; SPT_{t-24} , 배지에 포자를 접종하여 t시간 배양 후 살균제를 처리하고, 다시 24시간을 배양한 후 측정된 형광값; SP_t , 포자만 접종하여 t시간 배양한 후 조사한 형광값, P_{t-24} , 포자 무접종 배지에 t시간 후에 살균제를 처리하고, 24시간 후에 조사한 형광값, P_t , 살균제를 처리하지 않은 무접종 배지의 t시간 후의 형광값.

살균제의 병원균에 대한 균사 성장 억제 효과 조사. 병원균

에 대한 살균제의 균사 성장 억제 효과는 Do 등(2020)의 한천희석법에 따라서 실시하였다. 병원균을 25°C의 V-8 juice 배지(V-8 juice, 200 ml; CaCO₃, 3 g; Agar, 15 g; 증류수, 1 l)에서 10일간 배양한 후, 균총의 선단부에서 직경 3 mm의 균사 조각을 떼어 살균제가 첨가된 PDA 배지에 접종하였다. PDA 배지에는 실험에 사용하는 살균제를 최종 농도가 0.1, 1.0, 10.0, 100.0 µg/ml가 되도록 첨가하였으며, 배지의 오염을 방지하기 위하여 300 µg/ml의 streptomycin을 첨가하였다. 병원균을 접종한 PDA 배지는 25°C에서 10일간 배양 후, 병원균의 균총 직경을 조사하였다. 살균제의 균사 성장 억제 효과는 살균제 배지에서 병원균의 균총 직경을 살균제를 첨가하지 않은 PDA 배지에서 균총의 직경과 비교하여, 다음의 식으로 계산하였다: 균사 성장 억제율(%) = $(1 - \text{살균제 첨가 배지의 균총의 직경} / \text{살균제 무첨가 배지의 균총의 직경}) \times 100$.

A. dauci KACC 42997에 대한 각 살균제의 포자 생존 억제 효과와 균사 성장 억제 효과는 각 살균제의 EC₅₀값을 엑셀 프로그램에서 계산하여 비교하였다.

결과 및 고찰

배양 시간에 따른 병원균의 포자 발아. *A. dauci* KACC 42997을 20% PDB에 접종하여 배양하면서 시간별로 발아하는 모습을 관찰하였다(Fig. 1). *A. dauci* KACC 42997은 20% PDA에 접종하여 1.5시간을 배양한 후부터 발아관이 나타나기 시작하여, 3시간 후에는 분생포자의 단경 이상으로 발아관이 신장하였다. 발아관의 길이는 6시간을 배양한 후부터 분생포자의 장

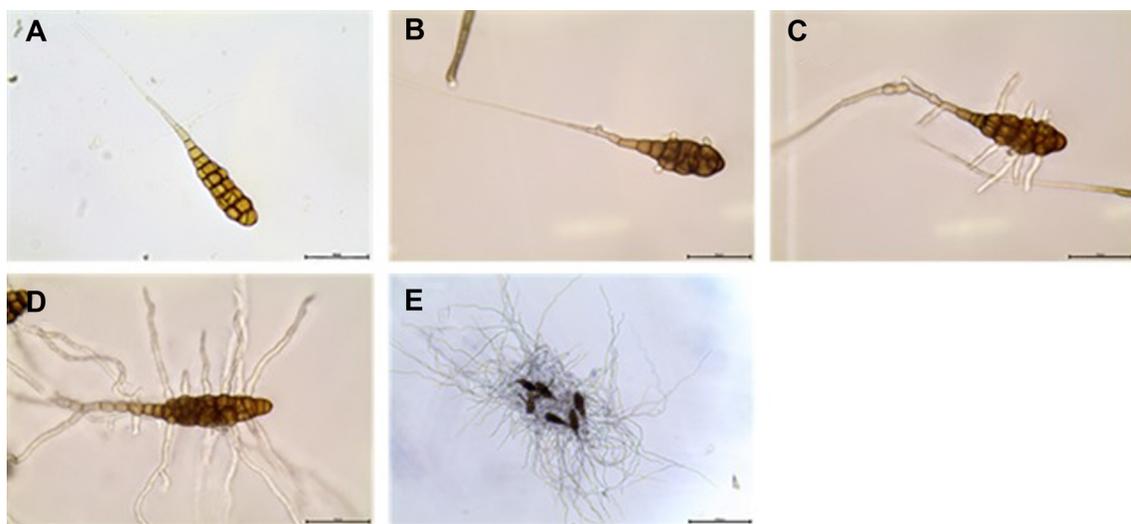


Fig. 1. Morphological changes in spores of *Alternaria dauci* KACC 42997 according to the culture period. Spores of *A. dauci* KACC 42997 were cultured in 20% potato dextrose broth medium at 25°C and observed microscopically at incubation periods of 0, 1.5, 3, 6, and 12 hr (A-E).

경 이상으로 신장하였으며, 배양 시간이 12시간을 넘어가면서 부터 균사로 자라기 시작하였다.

병원균의 포자 밀도와 배지가 병원균 호흡에 미치는 영향. PrestoBlue™ 시약의 resazurin이 resorufin으로 변화되면서 나오는 형광을 측정하여 *A. dauci*의 포자 생존 정도를 간접적으로

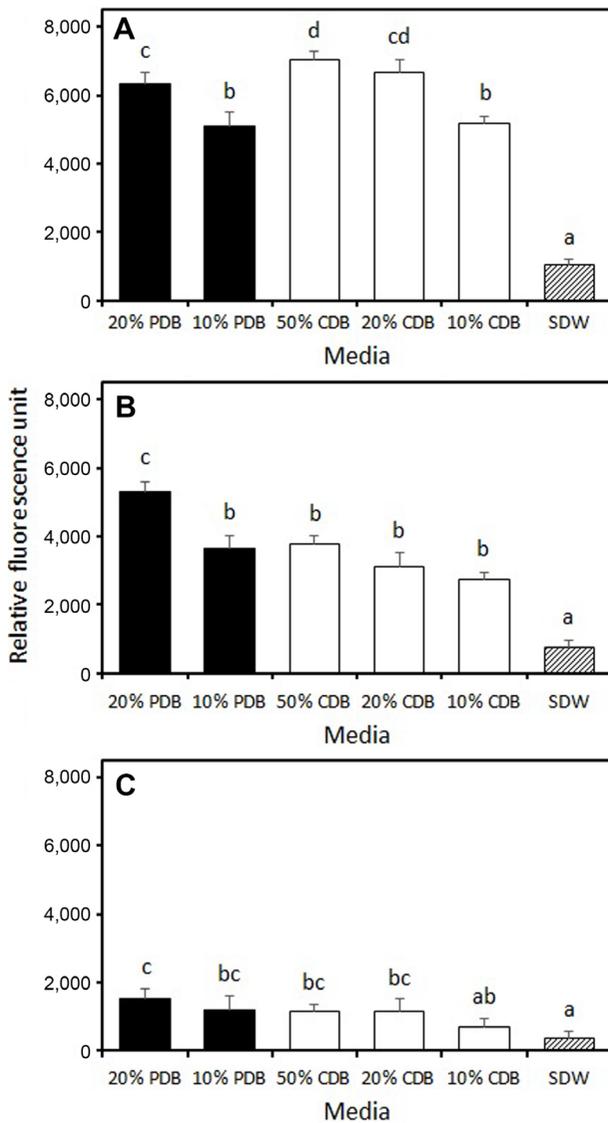


Fig. 2. Effect of medium-type and inoculated spore density on spore viability of *Alternaria dauci* KACC 42997. The culture media used in this study were 10% and 20% potato dextrose broth (PDB), 10%, 20%, and 50% Czapekdox broth (CDB), and sterile distilled water (SDW). The final density of spores inoculated in each medium was adjusted to 1 × 10⁵ spores/ml (A), 5 × 10⁴ spores/ml (B), and 1 × 10⁴ spores/ml (C). Fluorescence was measured 24 hr after treatment of Presto Blue™ reagent at 530/590 nm excitation/emission wavelength. All treatment means were separated using Duncan's Multiple Range Test (DMRT) according to the media used in the experiment. Treatments with the same letters are not statistically different at P=0.05.

로 조사하였다. 병원균은 현미경 관찰을 통하여 충분히 성장 되었다고 판단되는 24시간을 배양한 후에 형광량을 조사하였다. Fig. 2에서 보는 것과 같이 배지의 종류와 접종한 *A. dauci*의 포자 밀도는 RFU에 영향을 미쳤다. *A. dauci*의 포자 밀도를 1 × 10⁵개/ml로 조절하여 접종하였을 때, 50% CDB에서 가장 높은 RFU를 얻을 수 있었다. 하지만 사용한 액체 배지인 PDB와 CDB를 20%까지 희석하였을 때에는 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 병원균의 포자를 배지에 접종하지 않고 멸균 증류수에 접종하여 배양할 경우의 RFU는 1,026으로, 배지에 접종하여 배양하였을 때의 RFU와 비교하면 매우 낮았다. *A. dauci*를 영양원이 없는 증류수에 접종하여 배양할 경우, 병원균 포자의 발아와 생장이 늦어지기 때문에 RFU 값이 낮았던 것을 알 수 있었다. 접종하는 *A. dauci*의 포자 밀도가 5 × 10⁴과 1 × 10⁴개/ml 일 경우에는 20% PDB의 RFU가 가장 높았다. 고추탄저병원균인 *Colletotrichum acutatum s. lat.*의 경우도 CDB보다는 PDB에 포자를 접종하여 배양하였을 때 resazurin이 resorufin으로 환원되면서 발생하는 형광량이 높았다(Park과 Kim, 2023). 또한 *C. acutatum s. lat.*는 접종하는 포자 밀도와 관계없이 CDB에 접종하였을 때 RFU가 PDB에 비하여 전체적으로 낮았지만, *A. dauci*는 1 × 10⁵개/ml의 높은 밀도로 접종하였을 때에는 PDB와 CDB의 RFU가 차이가 없었다. 하지만 접종하는 병원균의 포자 밀도가 낮아질 경우 20% PDB에서 가장 높은 RFU를 얻을 수 있었다. 그런데 *A. dauci*의 분생포자를 인공 배지 상에서 형성시키 고자 할 때에는 배양 온도의 변화, 균사체에 대한 상처 유발, 통기 및 UV 처리 등 다양한 처리를 순차적으로 해야 할 뿐만 아니라, 사용하는 균주에 따라서는 형성하는 포자의 양이 적은 균주들도 있었다(Yoon 등, 2023). 따라서 본 연구에서는 접종하는 분생포자의 밀도를 1 × 10⁵개/ml보다는 5 × 10⁴개/ml로 조절하여 사용하기로 하였으며, 실험을 위한 배지는 20% PDB를 사용하기로 하였다.

포자 생존법과 한천희석법에 의한 EC₅₀값의 비교. 포장에서 분리한 *A. dauci*의 7균주를 선발하여 앞에서 사용한 5종의 살균제 효과를 포자 생존법과 한천희석법으로 검정하였다. Table 1에서 보는 것과 포자 생존법에서 chlorothalonil, dithianon, folpet의 EC₅₀값이 한천희석법의 EC₅₀값보다 낮은 것을 보면, 포자 생존에 미치는 효과가 균사 생장을 억제하는 효과보다 우수하였다. Chlorothalonil, dithianon, folpet 등과 같이 보호 살균제이면서 유기농 자재로 인증되어 있는 보르도액도 균사 성장보다는 포자 발아에 대한 억제 효과가 우수하다(Park 등, 2014). 보르도액을 고추탄저병원균에 187 µg/ml로 처리하였을 경우, 포자 발아는 100% 억제하지만, 배지에서 균사 생장은

Table 1. EC₅₀ values of several fungicides^a against *Alternaria dauci* causing carrot leaf blight

Isolates ^b	Chlorothalonil		Dithianon		Folpet		Iminoctadine tris-albesilate		Fluazinam	
	SVA ^c	ADM ^d	SVA	ADM	SVA	ADM	SVA	ADM	SVA	ADM
CDSGM2-5	8.00 ^e	20.77	0.72	>100.00	5.41	23.50	1.73	0.57	<0.01	0.79
CDSGM7-11	6.38	12.44	0.23	>100.00	1.64	18.89	1.63	0.19	0.02	0.35
CDSJI2-4	41.49	>100.00	5.05	>100.00	10.89	53.13	15.09	2.22	11.31	4.51
CDSJI3-6	20.98	>100.00	0.01	>100.00	6.25	67.70	4.94	2.13	0.03	1.46
CDSPC2-2	6.07	>100.00	<0.01	>100.00	1.85	66.48	1.58	3.10	<0.01	6.30
CDSPC2-3	4.94	>100.00	1.61	>100.00	3.34	48.14	3.84	0.86	<0.01	1.36
CDSPC6-4	11.63	>100.00	2.10	>100.00	8.85	60.63	8.85	1.89	<0.01	2.06
Average	14.21	>100.00	1.39	>100.00	5.46	48.35	5.38	1.57	1.63	2.40

SVA, spore viability assay; ADM, agar dilution method.

^aThere were 5 fungicides used in this study such as chlorothalonil (a.i. 75, WP), dithianon (a.i. 75%, WG), folpet (a.i. 50%, WP), iminoctadine tris-albesilate (a.i. 40%, WP), and fluazinam (a.i. 50%, WG).

^bSeven isolates of *A. dauci* were used in the experiment, including two isolates obtained from Gumi, two isolates from Jeju, and three isolates from Pyeongchang.

^cThe effect of the fungicide on *A. dauci* was investigated using the SVA to test the viability of spores and the agar dilution method to test the effect of inhibiting mycelial growth. SVA was performed using Presto Blue™ reagent.

^dThe effect of fungicides on inhibiting mycelial growth against isolates of *A. dauci* was investigated using the ADM.

^eThe numbers express the EC₅₀ value of fungicide against each isolate of *A. dauci*. The EC₅₀ value represents the concentration that inhibits the viability or mycelial growth of *A. dauci* by 50%.

전혀 억제하지 못하기 때문에, 보호 살균제의 활성 검정을 위해서는 균사 생장 억제 효과를 검정하는 한천희석법이 아닌 다른 검정 방법을 선택하여 사용하는 것이 중요하다. 그런데 보호 살균제의 특징을 지니며 작용기작 그룹이 카군에 속하는 iminoctadine tri-albesilate는 CDSPC2-2 균주를 제외한 6종의 균주에서 포자 생장 억제 효과보다는 균사 생장 억제 효과가 우수하였으며, 작용기작이 다5군에 속하는 fluazinam은 포자 생장 억제 효과와 균사 생장 억제 효과가 모두 우수하였다. 이처럼 살균제의 효과 검정이 하나의 방법으로만 수행되어진다면, 일부 살균제의 경우에는 병원균에 대한 효과가 과소 평가될 수 있기 때문에, 주의가 필요하다.

살균제의 포자 생장 억제 효과. Chlorothalonil, dithianon, folpet, fluazinam을 100 µg/ml로 조절하여 *A. dauci* KACC 42997의 포자에 처리하면 포자가 전혀 발아하지 못하였다(Fig. 3). 하지만 동일한 농도로 iminoctadine tris-albesilate를 처리한 경우, 다른 보호 살균제와는 다르게 포자의 각 세포가 발아하면서 기형인 발아관이 형성되었다. Chlorothalonil은 10 µg/ml로 처리하였을 때까지 병원균의 포자가 전혀 발아하지 못하였지만, dithianon, folpet, fluazinam 처리에서는 포자의 단경 크기의

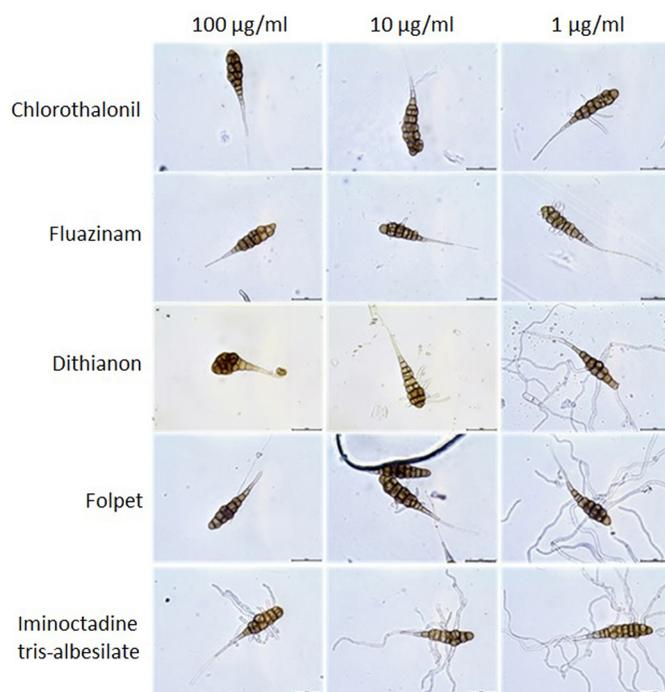


Fig. 3. Spore growth inhibition effect of fungicides on *Alternaria dauci* KACC 42997. Each fungicide was treated at the same time as spores were inoculated into 20% potato dextrose broth. Spores of *A. dauci* were observed under a microscope 1 day after treatment of each fungicide.

짧은 발아관이 형성되었다. 하지만 iminoctadine tris-albesilate 처리구에서는 Fig. 3에서 보는 것과 같이 발아관이 길게 성장한 포자를 관찰할 수 있었다. Iminoctadine tris-albesilate의 1 µg/ml 처리구에서는 균사의 생장이 더 왕성한 것을 관찰할 수 있었으나, Fig. 1E에서 보는 것과 같은 무처리구의 포자와 비교하면 균사 생장이 정상적으로 이루어지지 않고 있음을 알 수 있었다.

Chlorothalonil, dithianon, folpet 등 3종의 보호 살균제는 병원균을 배지에서 일정 기간 배양한 후에 처리할 경우, 그 효과가 감소하였다(Fig. 4). Dithianon은 배지에 포자를 접종함과 동시에 처리하였을 때와 1.5시간 배양한 후에 처리하였을 때의

포자 성장 억제 효과는 비슷하였지만, 병원균을 3시간과 6시간 배양하여 발아관의 길이가 단경 또는 장경보다 길게 성장한 후에 처리한 경우 그 효과는 감소하였다(Fig. 4B). Dithianon을 100 µg/ml 농도로 포자 접종과 동시에 처리하였을 때 억제율은 92.4%였으나, 3시간과 6시간 배양한 후에 처리할 경우에는 60.3%와 56.1%로 감소하였으며, 12시간 배양한 후에는 28.3%까지 감소하였다. 이런 결과는 chlorothalonil과 folpet의 처리구에서도 유사하게 나타났다(Fig. 4A, C). 그런데 다점 작용점을 갖는 보호 살균제로 알려진 iminoctadine tris-albesilate를 병원균의 배양 시간에 따라 처리하였을 때, 포자에 대한 억제

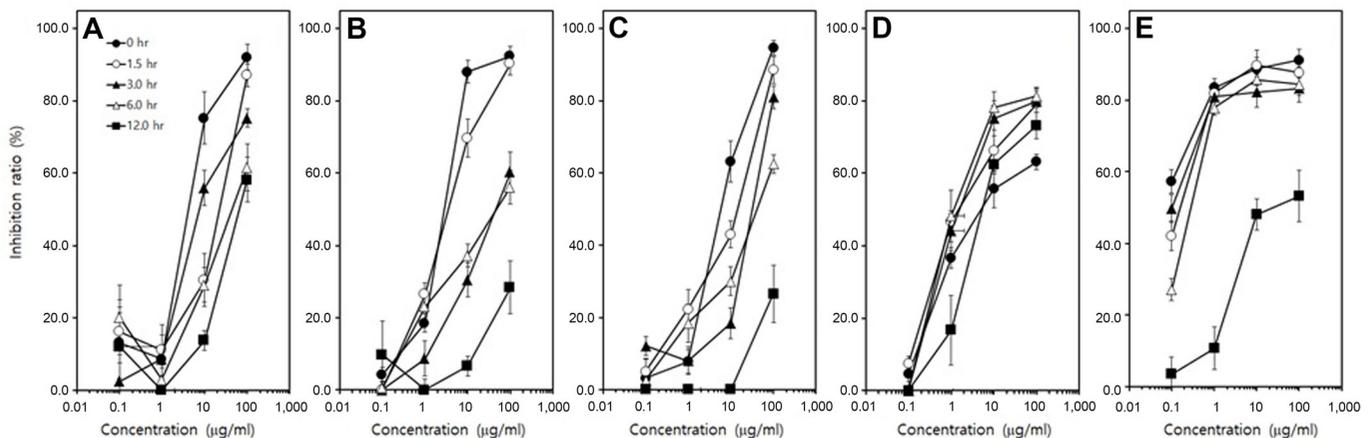


Fig. 4. Viability inhibition effect of each fungicide on *Alternaria dauci* KACC 42997 according to treatment at each spore growth stage. Fungicides used in the study were chlorothalonil (A), dithianon (B), folpet (C), iminoctadine tris-albesilate (D), and fluazinam (E). Each Fungicide was treated after incubating spores of *A. dauci* KACC 42997 in 20% potato dextrose broth medium for 0, 1.5, 3.0, 6.0, and 12.0 hr, respectively.

Table 2. Changes of EC₅₀ value in each fungicide against *Alternaria dauci* KACC42997 depending on the treatment time

Fungicides ^a	Treatment time				
	0 hr ^b	1.5 hr	3 hr	6 hr	12 hr
Chlorothalonil	6.21 ^c	15.40	11.03	43.73	78.31
Dithianon	2.05	4.05	55.07	44.31	>100.00
Folpet	7.60	7.57	24.52	42.63	>100.00
Iminoctadine tris-albesilate	10.28	3.21	3.21	2.68	8.87
Fluazim	0.05	0.13	0.10	0.34	20.65

^aThere were 5 fungicides used in this study such as chlorothalonil (a.i. 75, WP), dithianon (a.i. 75%, WG), folpet (a.i. 50%, WP), iminoctadine tris-albesilate (a.i. 40%, WP) and fluazinam (a.i. 50%, WG).

^bIn order to treat each fungicide according to the spore growth phase of *A. dauci* KACC42997, each fungicide was treated according to the incubation period in 20% PDB medium. Each number represents the incubation time of *A. dauci* KACC42997. The case in which spores of *A. dauci* KACC42997 were inoculated into 20% PDB and simultaneously treated with fungicide was indicated as 0 hr. When treated with fungicide after 1.5 hr of incubation, the pathogen began to germinate. When the pathogen was cultured for 3 hr and 6 hr, the length of the germ tube grew to about the length of the short or long diameter of the spore. The last treatment with the fungicide was when the pathogen was cultured for 12 hr and the germ tubes were almost in a mycelial state.

^cThe numbers express the EC₅₀ value of fungicide against *A. dauci* KACC42997. The EC₅₀ value represents the concentration that inhibits the viability by 50%.

올이 보호 살균제의 억제 경향과는 달랐다(Fig. 4D). Iminoctadine tris-albesilate는 병원균의 포자를 접종함과 동시에 처리하였을 때보다 3-6시간 배양한 후에 처리하였을 때의 억제율이 소폭 상승하였다. 이런 결과는 Table 2에서 보는 것과 같이 chlorothalonil, dithianon, folpet은 처리하는 시기가 늦어질수록 EC₅₀값이 증가하였지만, iminoctadine tris-albesilate는 포자에 처리하였을 때 가장 높은 EC₅₀값을 보이다가, 발아한 상태의 포자에 처리하였을 때 EC₅₀값이 감소하였다. 병원균의 세포 호흡을 억제하는 fluazinam은 포자를 12시간 배양한 후에 처리한 경우를 제외하고는 모두 유사한 억제율을 보였다(Fig. 4E, Table 2). Fluazinam은 Park과 Kim(2022)이 보고한 것과 같이 세포 호흡을 억제하는 다5군의 살균제이면서 작용 특성은 보호 살균제와 매우 유사하였다. 하지만 다른 보호 살균제와는 다르게, 포자가 발아관을 완전히 형성한 뒤에 처리하여도 포자에 처리하였을 때와 대등한 효과를 보였다.

국내에서 iminoctadine tris-albesilate는 단제 품목 122개와 합제 품목 64개, 총 186개 품목이 가지, 감, 고추, 당근, 사과 등에 등록되어 갈색무늬병, 검은별무늬병, 잣빛곰팡이병, 탄저병, 꺾무기병, 흰가루병 등의 방제에 사용되고 있으며, 감굴 저장병 방제를 위해서 1품목이 등록되어 있다(Rural Development Administration, 2024). 중국에서도 감굴의 저장병인 *Geotrichum citri-aurantii*에 의한 흰곰팡이병의 방제를 위해서 iminoctadine tris-albesilate가 사용되고 있다(Zhang 등, 2024). Iminoctadine tris-albesilate는 *G. citri-aurantii*의 포자 발아에 영향을 미쳤는데, 0.05 µg/ml와 같은 낮은 농도에서는 포자 발아를 지연시키지만, 0.2와 1.0 µg/ml의 농도에서는 120시간까지 배양하여도 17.0% 이하로 발아율을 억제하였다. Iminoctadine tris-albesilate를 PDA 배지에 최종 농도가 0.06 µg/ml가 첨가한 후 배양한 *G. citri-aurantii*의 균총의 선단을 관찰한 결과, 균사 선단에서 분지하는 균사의 수가 감소하였으며, 0.12 µg/ml의 처리구에서는 균사 선단에서 굴곡이 심한 비정상적인 균사가 관찰되었다. 이런 균사 형태의 변화를 통해서 iminoctadine tris-albesilate가 정상적인 균사의 형성과 세포막 기능에 영향을 미치는 것으로 판단하였다. Iminoctadine tris-albesilate의 처리에 의해서 포자 현탁액의 전기 전도도와 세포막에서의 malondialdehyde의 양이 상승하는 것을 보면, iminoctadine tris-albesilate는 병원균의 세포막 integrity에 영향을 주어 병원균 성장을 억제하는 살균제임을 알 수 있다(Zhang 등, 2024; Zhu 등, 2019). 본 실험에서 포자를 접종함과 동시에 처리하는 것보다 포자가 발아한 후에 처리한 경우 효과가 더 우수한 것을 보면, iminoctadine tris-albesilate는 카균에 속하는 다른 보호 살균제와는 다르게, 포자 발아보다는 균사

생장에 대한 억제 효과가 우수함을 보여준다. 또한 오이 잎에서 실험한 갈색무늬병균 *Corynespora crassiiicola*에 대해서 예방 효과보다도 치료 효과가 우수하였다. 이런 특징은 iminoctadine tris-albesilate가 다른 보호 살균제와는 다르게 병이 발생하는 것을 확인한 후에 처리하여도 방제 효과를 얻을 수 있는 독특한 특성을 지닌 카균의 살균제임을 알 수 있다. 또한 살균제 저항성 문제로 인하여 많은 치료 살균제의 사용이 제한되는 시점에서 iminoctadine tris-albesilate가 앞에서 소개한 다5군의 fluazinam과 더불어 저항성 문제 해결을 위한 대체 살균제로서의 가능성을 보여주고 있다고 본다.

본 연구 결과는 보호 살균제의 특성을 갖는 5종의 살균제가 포자 생장 시기에 미치는 효과가 다름을 보여주고 있으며, 이런 특성은 포장에서 식물병 방제를 위해서 살균제를 처리할 때에 충분히 고려해야 할 사항으로 생각되어진다. 또한 최근 많은 식물병원균에서 살균제에 대한 저항성 발현이 보고되어 있다(Kim 등, 2015, 2019; Kwak 등, 2017; Yeon 등, 2019). 특히, strobilurin계 살균제에 대한 고추, 복숭아, 사과 탄저병균의 저항성 발현은 매우 심각한 상태이다. 반면에 보호 살균제에 대한 저항성 발현은 거의 보고되어 있지 않기 때문에, 저항성이 발생한 살균제의 대체 살균제로서 보호 살균제가 관심을 받고 있다. 일반적으로 보호 살균제는 병이 발생하기 전인, 병원균이 식물체에 부착하여 발아하기 전 단계에서 예방적으로 처리할 때 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 그런데 보호 살균제처럼 카균에 속하는 iminoctadine tris-albesilate와 다5군에 속하지만 보호 살균제와 유사한 작용 특성을 지니는 fluazinam은 보호 살균제와 유사한 특성을 보이면서도 차이점이 있기 때문에, 이런 정보를 잘 사용함으로써, 포장에서 저항성 문제의 관리와 효율적인 병 방제의 가능성을 높여줄 것으로 생각한다.

요 약

당근검은잎마름병을 일으키는 *A. dauci*의 포자 생장 시기에 따른 chlorothalonil, dithianon, folpet, iminoctadine tris-albesilate, fluazinam의 효과를 포자 생존 검정법과 한천희석법으로 검정하였다. 포자 생존 검정법과 한천희석법으로 조사한 *A. dauci* CDSGM2-5를 비롯한 7개 균주의 chlorothalonil에 대한 평균 EC₅₀값은 14.21 µg/ml와 100 µg/ml 이상이었다. Dithianon과 folpet 역시 포자 생존 검정법의 EC₅₀값이 한천희석법보다 낮았지만, iminoctadine tris-albesilate는 한천희석법으로 조사한 EC₅₀값이 더 낮았다. Fluazinam은 포자 생존 검정법과 한천희석법의 EC₅₀값이 각각 1.63 µg/ml와 2.40 µg/ml로, 두 방법의 EC₅₀값이 비슷하였다. *A. dauci* KACC 42997의 포자

생장 단계에 따라 각 살균제를 처리한 결과, chlorothalonil, dithianon, folpet은 포자가 발아한 이후에 처리하면 발아하기 전에 처리하였을 때보다 효과가 감소하였으나, iminoctadine tris-albesilate는 포자 접종과 동시에 처리하였을 때 10.28 µg/ml였던 EC₅₀값이 포자가 발아한 후에 처리하면 2.68 µg/ml에서 3.21 µg/ml까지 감소하여, 포자 발아 후에 처리하였을 때 효과가 우수하였다. Fluazinam은 접종하는 포자에서 발아관이 장경보다 길게 발아한 포자까지 처리하여도 포자의 생장을 크게 억제하였다. 하지만 iminoctadine tris-albesilate와 fluazinam을 12시간을 배양한 후에 처리하면 EC₅₀값이 8.87 µg/ml와 20.65 µg/ml로 상승하면서 억제 효과가 감소하였다. 본 연구 결과는 살균제의 적합한 처리 시기는 병원균의 포자 성장 시기에 따라서 달라짐을 보여주고 있다. 따라서 살균제 처리 시기의 결정은 병원균의 성장 시기에 대한 살균제의 효과까지도 고려해야 할 것으로 생각되어진다.

Conflicts of Interest

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

Acknowledgments

This work was supported by the project (research number: 116090-03-2-SB010) of Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture and Forestry, Korea.

References

- Damicone, J. 2017. Fungicide resistance management. Oklahoma Cooperative Extension Service Bulletin EPP-7663. URL <https://extension.okstate.edu/fact-sheets/> [11 March 2024].
- Do, J., Min, J., Kim, Y., Park, Y. and Kim, H. T. 2020. Detection of fungicidal activities against *Alternaria dauci* causing Alternaria leaf spot in carrot and monitoring for the fungicide resistance. *Res. Plant Dis.* 26: 61-71. (In Korean)
- Ivic, D. 2010. Curative and eradicated effects of fungicides. In: Fungicides, ed. by O. Carisse, pp. 3-22. InTech, Rijeka, Croatia.
- Kapsa, J. 2003. Usefulness of fungicides with various modes of actions in the protection of potato crops. *J. Plant Prot. Res.* 43: 191-198.
- Kim, A. H., Kim, S. B., Han, K. D. and Kim, H. T. 2015. Monitoring for the resistance of *Botrytis cinerea* causing gray mold against mepanipyrim. *Korean J. Pestic. Sci.* 19: 329-334. (In Korean)
- Kim, S., Min, J. and Kim, H. T. 2019. Occurrence and mechanism of fungicide resistance in *Colletotrichum acutatum* causing pepper anthracnose against pyraclostrobin. *Korean J. Pestic. Sci.* 23: 202-211. (In Korean)
- 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)
- Park, S. and Kim, H. T. 2023. Evaluation of activity of QoI fungicide against *Colletotrichum acutatum* s. lat. causing pepper anthracnose using resazurin-based respiration assay. *Res. Plant Dis.* 29: 11-22. (In Korean)
- Park, S.-B. and Kim, H. T. 2022. Cross-resistance of *Colletotrichum acutatum* s. lat. to strobilurin fungicides and inhibitory effect of fungicides with other mechanisms on *C. acutatum* s. lat. resistant to pyraclostrobin. *Res. Plant Dis.* 28: 122-131. (In Korean)
- Park, S.-J., Lee, S.-M., Gwon, H.-W., Lee, H. and Kim, H. T. 2014. Control efficacy of Bordeaux mixture against pepper anthracnose. *Korean J. Pestic. Sci.* 18: 168-174. (In Korean)
- 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> [11 March 2024].
- Yeon, E., Song, J., Kim, M.-S. and Kim, H. T. 2019. Development of resistance of *Colletotrichum horii* to demethylase inhibiting fungicides. *Korean J. Pestic. Sci.* 23: 312-322. (In Korean)
- Yoon, S., Min, J. and Kim, H. T. 2023. Factors affecting spore formation of carrot leaf blight caused by *Alternaria dauci* in vitro. *Res. Plant Dis.* 29: 251-257. (In Korean)
- Zhang, K., Fu, Y., Long, C. and Zhu, F. 2024. Baseline sensitivity and fungicidal action of iminoctadine tris (albesilate) against *Geotrichum citri-aurantii*. *Eur. J. Plant Pathol.* 168: 635-647.
- Zhu, J., Zhang, L., Ma, D., Gao, Y., Mu, W. and Liu, F. 2019. A bioactivity and biochemical analysis of iminoctadine tris (albesilate) as a fungicide against *Corynespora cassiicola*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 158: 121-127.