

QoI계 살균제에 대한 사과점무늬낙엽병균 *Alternaria alternata* f. sp. *mali*의 저항성 검정

정병학 · 신수근 · 양광열*

전남대학교 농업생명과학대학 응용생물학과

Occurrence and Monitoring of Resistance to Quinone Outside Inhibitor (QoI) Fungicides in *Alternaria alternata* f. sp. *mali* Causing Alternaria Leaf Spot of Apple

Byeong Hak Jeong, Soo-Geun Shin, and Kwang-Yeol Yang*

Department of Applied Biology, College of Agriculture and Life Sciences,
Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea

(Received June 8, 2026 / Revised June 17, 2026 / Accepted June 18, 2026)

Abstract *Alternaria alternata* f. sp. *mali* causes Alternaria leaf spot, a major disease requiring constant management in apple orchards in Korea. However, there are limited studies on fungicide resistance in *Alternaria alternata* f. sp. *mali*. To date, there is no study on the resistance to quinone outside inhibitor (QoI) fungicides that have been extensively used in apple orchards. We evaluated 96 *Alternaria alternata* f. sp. *mali* isolates, collected from apple orchards in Chungju, Jangsu, Jecheon, and Jinan in 2021, for their sensitivity to the QoI fungicide kresoxim-methyl on the basis of spore germination inhibition. Among the 96 isolates tested, 83 isolates (86.5%) exhibited a high level of resistance to kresoxim-methyl with EC_{50} values greater than 100 $\mu\text{g/mL}$. Similarly, all 83 isolates were also resistant to trifloxystrobin because their EC_{50} values were greater than 100 $\mu\text{g/mL}$. This suggests cross-resistance between QoI fungicides. Sequence analysis of the cytochrome b gene revealed that all the resistant isolates possessed the G143A mutation (GGT→GCT) at codon 143. On the basis of this mutation, we developed an allele-specific PCR assay using resistance-specific primers and a PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) assay using the restriction enzyme *Fnu4HI* to rapidly detect QoI-resistant isolates. Our results demonstrate that QoI resistance is widely distributed in the *Alternaria alternata* f. sp. *mali* populations of apple-growing regions in Korea. To establish effective management strategies for Alternaria leaf spot, our findings suggest that it is critical to continuously monitor fungicide resistance.

Key words: *Alternaria alternata* f. sp. *mali*, Alternaria leaf spot, Apples, Fungicide resistance, Quinone outside inhibitor (QoI) fungicides

서 론

사과는 국내 과수산업에서 생산액 비중이 가장 높은 주요 과수 작물 중 하나이다. 그러나 최근 농촌 고령화에 따른 노후 과원 폐원, 재배면적 감소 및 병해충의 피해 등의 영향으로 국내 사과 생산량은 2022년 566,041톤에서 2023년 394,428

톤으로 30.3% 감소하였으며, 2024년에는 460,088톤으로 일부 회복되었으나 여전히 2022년 수준에는 미치지 못하였다 (Ministry of Data and Statistics, 2024). 한국식물병목록에 의하면 국내 사과에는 60종의 병해가 발생하는 것으로 보고 되어 있지만 경제적으로 피해를 주기 때문에 안정적인 수확을 위해 살균제 등을 이용하여 방제하는 대표적인 곰팡이병에는 탄저병, 점무늬썩음병, 갈색무늬병, 부란병, 점무늬낙엽병 등이 있다(Back et al., 2025; KSPP, 2024). 이러한 주요한 곰팡이병 중에서 사과 점무늬낙엽병(*Alternaria leaf spot*)은

*Corresponding author
E-mail: kyyang@jnu.ac.kr

Alternaria alternata f. sp. *mali*에 의해 발병하며 병징은 주로 잎에 주로 발생하여 갈색 소형반점이 암갈색 또는 회갈색의 병반으로 확대되는 특징이 있으며 4월 하순부터 발병이 관찰되기 시작하여 사과 생육기간동안 점차 증가하였다가 9월에 가장 높은 발병율을 보이며 수확기인 10월까지 발병이 지속된다(Cheon and Jeon, 2015; Cheon et al., 2018). 사과 품종인 ‘홍월’, ‘홍옥’, ‘쓰가루’, ‘국광’, ‘조나골드’, ‘골든 델리셔스’ 등은 점무늬낙엽병에 저항성인 것으로 확인되었으나 농가 및 소비자의 선호도가 높은 품종인 ‘홍로’, ‘감홍’, ‘선홍’ 등은 감수성으로 나타났다(Kim and Hwang, 2004). 따라서 사과 재배농가에서는 점무늬낙엽병을 방제하기 위해서 저항성 품종 재배, 월동 후 1차 전염원이 되는 낙엽 제거와 같은 과원 관리와 함께 살균제 살포가 이루어지고 있다(Cabrefiga et al., 2023). 사과 점무늬낙엽병 방제를 위한 살균제로는 전세계적으로 보호살균제, quinone outside inhibitor (QoI), demethylation inhibitors(DMI), succinate dehydrogenase inhibitors(SDHI) 등이 주로 이용되어지고 있다(Cabrefiga et al., 2023; Verma and Khosla, 2018).

QoI계 살균제는 진균의 미토콘드리아 내막에 있는 cytochrome b의 Qo 부위에 결합하여 전자전달계를 저해함으로써 ATP 생성을 중단시켜 진균의 에너지 대사를 억제하는 작용기작을 가진 작물보호제로 식물병원성 곰팡이에 대한 우수한 방제 효과를 나타낸다(Bartlett et al., 2002; Gisi et al., 2002). 그러나 QoI계 살균제가 광범위하게 사용됨에 따라 다양한 식물병원성 곰팡이에서 저항성 발생이 보고되고 있다. 최초로 밀흰가루병균(*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*)에서 저항성이 보고된 이후, 포도노균병균(*Plasmopara viticola*), 사과검은별무늬병균(*Venturia inaequalis*), 감자검둥근무늬병균(*Alternaria solani*) 등 다양한 작물의 병원균에서 QoI계 살균제에 대한 저항성 균주가 확인되었다(Bartlett et al., 2002; Campbell et al., 2021; Lesniak et al., 2011; Nottensteiner et al., 2019; Sierotzki et al., 2000). QoI계 살균제에 대한 저항성은 cytochrome b의 유전자의 점돌연변이에 의해 발생하며, 대표적인 저항성 관련 돌연변이에는 F129L, G137R, G143A 등이 보고되어 있다(Gisi et al., 2000; Gisi et al., 2002; Grasso et al., 2006; Sierotzki et al., 2007). 이들 돌연변이 중 F129L 및 G137R 돌연변이는 일반적으로 중간 수준의 저항성을 보이며 권장

사용농도에서 일정 수준의 방제효과가 유지되는 반면, G143A 돌연변이는 높은 수준의 저항성을 나타내 QoI계 살균제에 대한 방제효과를 현저하게 감소시키는 것으로 보고되었다(Fernández-Ortuño et al., 2008).

QoI계 살균제는 1990년대 후반 상업화된 이후 국내 사과 재배지에서 점무늬낙엽병을 비롯한 주요 병해 방제에 널리 사용되어 왔다. 대표적인 QoI계 살균제로는 kresoxim-methyl, trifloxystrobin, pyraclostrobin 및 azoxystrobin 등이 있으며, 현재까지도 사과 병해 방제 프로그램의 핵심 약제로 이용되고 있다(Back et al., 2025). 그러나 동일한 작용기작을 가진 살균제의 반복적인 사용은 저항성 균주의 발생을 야기할 수 있으며, 이에 따라 QoI계 살균제에 대한 저항성 발생 가능성이 지속적으로 제기되어 왔다. 그러나 국내 사과점무늬낙엽병균의 살균제 저항성에 관한 연구는 Kim과 Lee(1987)에 의해 iprodione 저항성 균주가 최초로 보고된 이후 매우 미비한 실정이다. 특히 장기간 사용되어진 QoI계 살균제에 대한 점무늬낙엽병균의 저항성 발생 현황에 대한 연구는 전무한 실정으로, 국내 사과 재배지에서의 저항성 발달 여부를 모니터링할 필요가 있다. 따라서 본 연구에서는 국내 사과 재배지 4개 지역에서 *Alternaria alternata* f. sp. *mali*를 채집, QoI 살균제에 대해 한천희석법을 통한 포자발아 억제율을 이용하여 EC₅₀ 값 확인 및 저항성에 주요한 역할을 하는 타겟 유전자를 분석하여 저항성 발달 여부를 확인하였다. 추가적으로 allele-specific PCR과 PCR-restriction fragment length polymorphism 분자진단 기법을 확립함으로써 살균제 저항성 모니터링 및 방제 전략 수립에 도움을 주고자 하였다.

재료 및 방법

사과점무늬낙엽병균 채집 및 분리

2021년 5월에서 8월까지 사과 재배지인 충주, 장수, 제천, 진안 등 4개 지역 홍로 품종에서 사과 점무늬낙엽병에 걸린 잎들을 채집하여 병원균을 분리하였으며 분리균주수, 채집 지역, GPS 좌표 등의 정보는 Table 1에 제시하였다. 병원균 분리는 병징 부위와 건전 부위가 절반씩 포함된 1 cm² 크기의 사과 잎 절편을 70% 에탄올에서 30초, 1% 차아염소산 나트륨에서 30초간 표면 소독을 한 뒤, 멸균수에서 세척 후

Table 1. Collection information for *Alternaria alternata* f. sp. *mali* isolates obtained from four apple-growing regions in Korea in 2021

Collection site	Isolate codes	Number of isolates	Host	Latitude (N)	Longitude (E)
Chungju, Chungbuk	CJ1 to CJ21	21	Apple(Hongro)	37.07113	128.01801
Jangsu, Jeonbuk	JG1 to JG25	25	Apple(Hongro)	35.65263	127.52849
Jecheon, Chungbuk	JE1 to JE25	25	Apple(Hongro)	37.20294	128.24381
Jinan, Jeonbuk	JN1 to JN25	25	Apple(Hongro)	35.86073	127.41779

멸균 filter paper에서 건조하였다. 절편을 PDA 배지(potato dextrose agar, Becton, Difco™) 배지 중앙에 치상한 후, 25°C, 암조건, 상대 습도 90%로 설정된 배양기에서 5일간 배양한 후 형성된 균총 끝부분을 절단하여 새로운 PDA 배지에 치상하는 방법을 반복하여 순수분리 하였다.

분자생물학적 동정을 위해 internal transcribed spacer(ITS) 및 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(GAPDH) 유전자 영역을 증폭한 후 염기서열을 분석하였다. ITS 영역은 ITS1(5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')/ITS4(5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') primer를 사용하였으며, GAPDH 영역은 gpd1(5'-CAA CGG CTT CGG TCG CAT TG-3')/gpd2(5'-GCC AAG CAG TTG GTT GTG C-3') primer를 이용하여 증폭하였다(Berbee et al., 1999; White et al., 1990).

단포자 분리를 위하여 *Alternaria alternata* f. sp. *mali* 균주를 V8 juice agar 배지에 계대배양한 후, 25°C 명조조건에서 14일간 배양하여 포자를 형성시켰다. 형성된 포자는 멸균수와 Miracloth(Merck, NJ, USA)를 이용하여 회수하였다. 회수된 포자 현탁액은 1×10^4 spores/mL로 조정된 후, 1.5% water agar가 분주된 90 mm petri dish (SPL, Pocheon, Korea)에 20 μ L씩 도말하였다. 접종 6시간 후 현미경하에서 발아한 단포자를 분리하여 PDA 배지에 치상한 후 25°C에서 5일간 배양하였다. 이후 형성된 균총의 선단부에서 직경 5 mm의 균사 절편을 채취하여 20% glycerol 용액에 현탁한 후 -80°C에서 보존하였다.

포자발아 억제율을 이용한 병원균의 살균제 감수성 조사

2021년에 채집한 96개의 *Alternaria alternata* f. sp. *mali*와 한국농업미생물자원센터(KACC)에서 분양 받은 KACC 40030 균주를 실험에 이용하였다. *Alternaria alternata* f. sp. *mali*에 대한 kresoxim - methyl (a.i. 44.2%, SC), trifloxystrobin (a.i. 22%, SC)의 포자발아 억제 효과를 확인하기 위해 한천 희석법을 이용하였다(Pasche et al., 2005; Sautua and Carmona, 2021). 멸균한 1.5% WA에 각 살균제의 최종 농도가 0.01, 0.1, 1, 10, 100 μ g/mL이 되도록 첨가하였다. 추가적으로 병원균의 대체 호흡 경로를 통한 호흡을 억제하기 위해 100% 메탄올에 희석한 salicylhydroxamic acid (SHAM; Sigma-Aldrich, USA)를 최종 농도 100 μ g/mL이 되도록 첨가하였다(Ma et al., 2003; Vega et al., 2012). 포자 농도를 1×10^4 spore/mL로 희석한 후 살균제가 첨가된 1.5% WA에 plate 당 40 μ L씩 도말한 뒤, 25°C에서 12시간 동안 암조건에서 배양하였다. 이후 포자의 발아를 중지시키기 위해 50 μ L의 lactoglycerol를 처리하였다(Chitolina et al., 2021). 포자발아 억제율을 산출하기 위해 각 농도별 배지에서 50개 포자의 발아여부를 현미경을 이용하여 확인, 발아 억제율을 산출하였다. 발아 기준은 포자의 길이와 포자로부터 발아된 발아

관의 길이가 동일하거나 또는 포자로부터 발아된 발아관의 길이가 더 길 때 발아한 것으로 간주하였다. 살균제의 포자 발아 억제율(%)은 아래 식에 의해서 계산하였다.

$$\text{포자발아 억제율(\%)} = (1 - \text{살균제 처리구의 발아율} / \text{살균제 무처리구의 발아율}) \times 100$$

병원균의 cytochrome b 유전자 증폭 및 염기서열 분석

QoI 살균제에 대해서 저항성 발달 여부를 확인하기 위해 96개 *Alternaria alternata* f. sp. *mali* 분리 균주의 cytochrome b 유전자 염기서열 분석을 통해 점돌연변이를 확인하였다. 유전자 증폭을 위하여 Table 2에 제시된 AF(5'-ACA CTG CTT CAG CAT TTT TCT TCA TAG-3')/AR(5'-TTG TCC AAT TCA TGG TAT AGC ACT CA-3') primer를 제작하였다(Ma et al., 2003). DNA 추출을 위해 PDA에서 7일간 25°C, 암조건으로 배양한 후 균사를 모아 액체질소를 이용하여 마쇄한 후 i-genomic BYF DNA extraction mini kit (iNtRON, Korea)를 이용하여 genomic DNA를 추출, PCR 반응을 진행하였다. PCR premix인 2X Topsimple™ DyeMIX(aliquot)-nTaq (Enzynomics, Korea)에 genomic DNA 1 μ L, 10 pmole primer 각각 1 μ L, 멸균된 증류수 7 μ L, 총 20 μ L의 반응액을 조성하였다. 반응 조건은 95°C에서 3분간 pre-denaturation 진행 후, 94°C에서 40초간 denaturation, 58°C에서 40초간 annealing, 72°C에서 1분간 extension을 35회 반복하였고 72°C에서 10분간 반응 시킨 후 종료하였다. 최종산물을 1% agarose gel에 전기영동 하여 확인하고 증폭이 확인된 PCR 산물은 Dokdo-Prep™ PCR purification kit(ELPIS Biotech, Korea)를 이용하여 정제하였다. 정제산물은 macrogen에 의뢰하여 염기서열을 확인하였다. 분석된 염기서열은 Bioedit 프로그램을 이용하여 정리하고 분석하였다.

Allele-specific PCR을 이용한 G143A 돌연변이 확인

QoI계 살균제 저항성과 관련된 cytochrome b 유전자의 G143A 돌연변이를 확인하기 위하여 allele-specific PCR(AS-PCR)을 수행하였다. G143A 돌연변이 검정을 위한 primer는 Ma and Michailides(2004)를 참고하여 저항성 대립유전자 특이적 reverse primer를 포함하도록 제작하였다. 사용된 primer는 Table 2에 제시된 ARF(5'-ATGAGAGATGTAAATAA TGGGTGAT-3')와 ARR(5'-AAGGTTAGTAATAACTGTTGCAG-3')이었다. PCR 반응액은 cytochrome b 유전자 염기서열 분석에 사용한 조건과 동일하게 제조하였다. PCR 증폭은 95°C에서 3분간 pre-denaturation을 실시한 후, 94°C에서 40초간 denaturation, 61°C에서 40초간 annealing, 72°C에서 1분간 extension과정을 35회 반복하였다. 이후 72°C에서 10분간 반응 시킨 후 종료하였다. 증폭산물은 2% agarose gel에 전기영동한 후 UV-transilluminator를 이용하여 확인하였다.

Table 2. Primer sequences used for amplification of the cytochrome b gene and detection of the G143A mutation in *Alternaria alternata* f. sp. *mali*

Primers	Sequence(5'-3')	Reference
AF	ACACTGCTTCAGCATTTTCTTCATAG	Ma et al. (2003)
AR	TTGTCCAATTCATGGTATAGCACTCA	
ARF	ATGAGAGATGTAAATAATGGGTGAT	Ma et al. (2004)
ARR	AAGGTTAGTAATAACTGTTGCAG	

PCR-RFLP를 이용한 G143A 돌연변이 확인

Cytochrome b 유전자 염기서열 분석을 통해 저항성(CJ5번 균주) 및 감수성(CJ10번 균주) 유전자형으로 확인된 분리균주를 선발한 후, genomic DNA를 주형으로 AF와 AR primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. 증폭산물은 PCR 정제 키트를 이용하여 정제한 후 제한효소 처리에 사용하였다. 제한효소 절편 길이 다형성 분석을 위하여 *Fnu4HI*(New England Biolabs, USA)를 사용하였다. 제한효소 반응액은 제조사의 권장 방법에 따라 조성하였으며, 37°C에서 1시간 처리하여 DNA를 절단하였다. 제한효소 처리 산물은 100 bp DNA ladder를 포함하여 2% agarose gel에 전기영동한 후 UV-transilluminator에서 DNA 절단 양상을 확인하였다.

결과 및 고찰

사과점무늬낙엽병균 동정 및 QoI 살균제에 대한 포자발아 억제 효과

2021년 국내 사과 재배지 충주, 장수, 제천 및 진안 지역에서 사과 점무늬낙엽병 증상을 보이는 홍로 품종의 사과 잎으로부터 총 96개 병원균을 분리하여 실험에 사용하였다. 분리한 96개 균주의 분자생물학적 동정을 위해 ITS 및 GAPDH 유전자 영역을 증폭한 후 염기서열을 분석하였다. 분석된 염기서열의 길이는 ITS 420 bp와 GAPDH 534 bp였다. 이들 염기서열을 GenBank에 등록된 *A. mali* type strain CBS 106.24 및 *A. mali* isolate FC-3659(LC206592), EGS 38-029(AY762945, AY762955) 등과 유사도를 비교한 결과, 99.7–100%의 염기서열 상동성을 나타내었다. 따라서 본 연구에 사용된 균주들은 사과점무늬낙엽병균인 *Alternaria mali*로 동정되었다(Woudenberg et al., 2015). 전통적으로 사과점무늬낙엽병균은 *Alternaria mali* Roberts로 알려져 왔으나, 최근에 분류학적 연구에서는 *A. mali*가 *Alternaria alternata* species complex에 포함되어 사과에 특이적인 병원성을 나타내는 *A. alternata* f. sp. *mali*로 분류되고 있다(Cao et al., 2024). 따라서 본 연구에서도 *A. alternata* f. sp. *mali*로 명명하였다.

국내 사과 재배지에서 주요 병해 방제에 장기간 사용되어진 QoI계 살균제에 대한 점무늬낙엽병균의 저항성 발생 연구가

거의 이루어지지 않았기에 본 연구에서 분리한 96개 균주를 대상으로 살균제 저항성 여부를 확인하고자 하였다. QoI계 살균제는 병원균의 초기 생육 단계에서 미토콘드리아 호흡을 저해함으로써 병원균의 포자 발아 및 발아관 신장을 억제하므로 감염 초기 살포 시 우수한 방제효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(Bartlett et al., 2002). 이러한 작용 특성을 고려하여 *Alternaria solani* 및 *Pyrenophora tritici-repentis* 등 일부 병원균의 QoI계 살균제 감수성 평가는 포자발아 억제율을 기반으로 수행되었다(Pasche et al., 2005; Sautua and Carmona, 2021).

분리된 사과점무늬낙엽병균 96개와 한국농업미생물자원센터에서 분양 받은 KACC 40030을 포함한 총 97개 균주를 대상으로 QoI계 살균제인 kresoxim-methyl의 포자발아 억제 효과를 조사하였으며 이를 바탕으로 균주별 EC₅₀ 값을 산출하였다. Kresoxim-methyl에 대한 EC₅₀ 값은 충주 지역 21개 균주 중 14개 균주, 장수 지역 25개 균주 전부, 제천 지역 25개 균주 중 23개 균주, 그리고 진안 지역 25개 균주 중 21개 균주에서 100 µg/mL 이상으로 나타났다. 따라서 총 96개의 분리 균주 중 83개 균주(86.5%)가 100 µg/mL 이상의 EC₅₀ 값을 나타냈다(Fig. 1). 본 연구에서는 EC₅₀ 값이 100 µg/mL 이상의 균주들의 EC₅₀ 값은 100 µg/mL로 처리하였다. 반면 EC₅₀ 값이 100 µg/mL 미만으로 나타난 KACC 40030을 포함한 14개 균주는 0.00µg/mL – 0.09 µg/mL 범위로 나타났다. 이와 같이 저항성 균주와 감수성 균주 사이의 EC₅₀ 값은 뚜렷한 차이를 보여 두 집단이 명확하게 구분되었다(Fig. 1). 이러한 결과는 본 연구에서 조사한 4개 지역 사과 재배지의 점무늬낙엽병균에서 QoI계 살균제인 kresoxim-methyl에 대한 저항성이 높은 빈도로 분포하고 있음을 보여준다.

Kresoxim-methyl과 trifloxystrobin은 모두 QoI계 살균제로서 cytochrome b의 Qo 부위에 작용하는 동일한 작용기작을 가진다. 기존 연구에서 QoI계 살균제 간 교차저항성이 보고되었으며 kresoxim-methyl에 저항성을 보이는 균주가 trifloxystrobin을 비롯한 다른 QoI계 살균제에도 낮은 감수성을 나타내는 것으로 알려져 있다(Park and Kim, 2022). 이에 본 연구에서는 *Alternaria alternata* f. sp. *mali* 집단에서 QoI계 살균제 간 교차저항성 여부를 확인하기 위하여 trifloxystrobin에 대한 감수성을 추가로 평가하였다. Kresoxim-methyl에

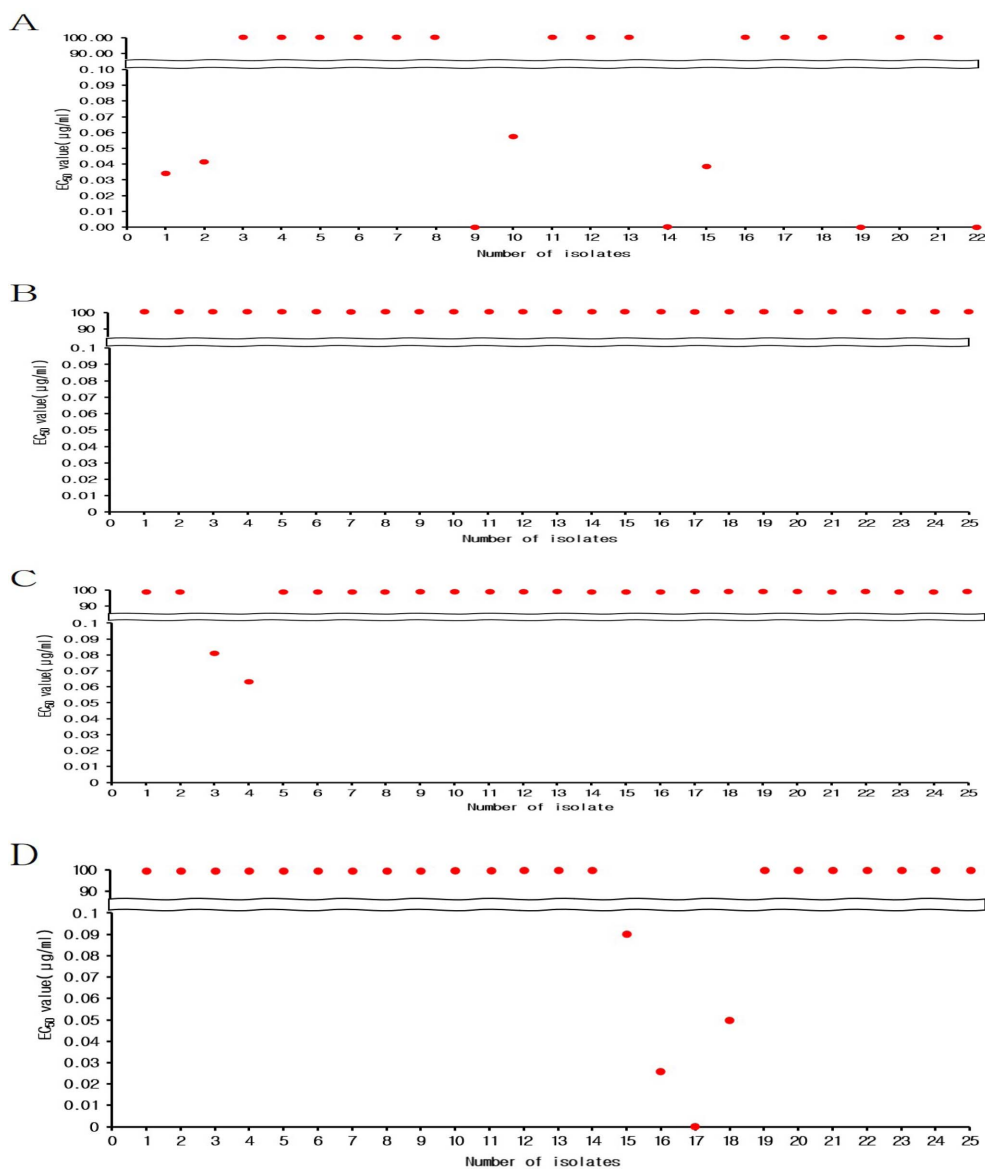


Fig. 1. Distribution of EC_{50} value of *Alternaria alternata* f. sp. *mali* isolates from Chungju (A), Jangsu (B), Jecheon (C), and Jinan (D) to kresoxim-methyl. KACC 40030 was included as the 22nd isolate in Group A (Chungju) in addition to the 21 field isolates. EC_{50} value indicate the concentrations required to inhibit spore germination by 50%.

대해 100 µg/mL 이상의 EC_{50} 값을 나타낸 83개 균주 (86.5%)가 trifloxystrobin에 대해서도 100 µg/mL 이상의 EC_{50} 값이 나타났다(Fig. 2). 이러한 결과는 국내 사과점무늬 낙엽병균 집단에서 kresoxim-methyl과 trifloxystrobin에 대한 동시 저항성이 존재함을 확인한 것으로 QoI계 살균제 간 교차저항성의 가능성을 시사한다. 이와 동일한 결과는 2017년과 2018년에 브라질 상파울루 지역의 tangerines 과원에서 분리한 *A. alternata* 균주에서도 확인되었다. Azoxystrobin과 pyraclostrobin에 대한 감수성을 조사한 결과, 하나의 QoI계 살균제에 저항성을 나타낸 균주가 다른 QoI계 살균제에도 저항성을 나타내어 두 약제 간 교차저항성이 존재함을 확인하였다(Chitolina et al., 2021). 이러한 현상은 *A. alternata*

뿐만 아니라 다른 식물병원균에서도 확인되었다. 오랜기간 QoI계 살균제가 사용된 사과 과수원에서 분리한 *Venturia inaequalis*를 조사한 결과, kresoxim-methyl에 대한 저항성을 나타내는 균주가 trifloxystrobin에 대해서도 감수성이 감소하는 경향을 보여 QoI계 살균제 간 교차저항성이 존재함을 보고하였다(Köller et al., 2004).

본 연구의 결과 국내 주요 사과 재배지의 점무늬낙엽병균 집단에서 QoI계 살균제 간 교차저항성의 가능성이 확인된 만큼 QoI계 살균제의 저항성이 광범위하게 확산되어 있으므로 향후 방제 전략 수립 시 저항성 관리가 매우 중요함을 시사한다 하겠다.

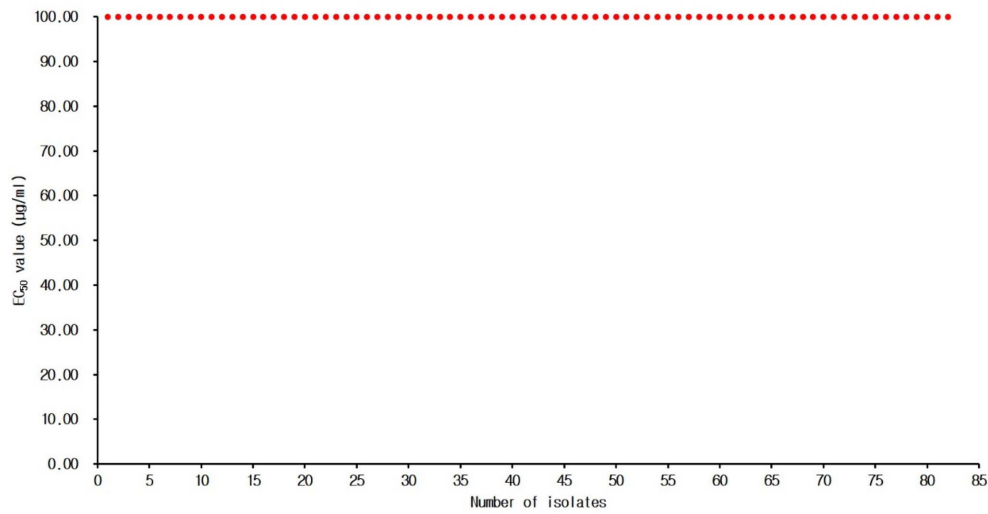


Fig. 2. Distribution of EC_{50} values for trifloxystrobin among 83 *Alternaria alternata* f. sp. *mali* isolates exhibiting high resistance to kresoxim-methyl ($EC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$).

Table 3. Kresoxim-methyl resistance found in *Alternaria alternata* f. sp. *mali* in Korea

Region	Isolate	EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	DR ^a	SNPs ^b
Chungju	CJ1	0.03	S	-
	CJ2	0.04	S	-
	CJ3	>100	R	G143A
	CJ4	>100	R	G143A
	CJ5	>100	R	G143A
	CJ6	>100	R	G143A
	CJ7	>100	R	G143A
	CJ8	>100	R	G143A
	CJ9	0.00	S	-
	CJ10	0.06	S	-
	CJ11	>100	R	G143A
	CJ12	>100	R	G143A
	CJ13	>100	R	G143A
	CJ14	0.00	S	-
	CJ15	0.04	S	-
	CJ16	>100	R	G143A
	CJ17	>100	R	G143A
	CJ18	>100	R	G143A
	CJ19	0.00	S	-
	CJ20	>100	R	G143A
	CJ21	>100	R	G143A
Jangsu	JG1	>100	R	G143A
	JG2	>100	R	G143A
	JG3	>100	R	G143A
	JG4	>100	R	G143A
	JG5	>100	R	G143A

Table 3. Continued

Region	Isolate	EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	DR ^a	SNPs ^b
Jangsu	JG6	>100	R	G143A
	JG7	>100	R	G143A
	JG8	>100	R	G143A
	JG9	>100	R	G143A
	JG10	>100	R	G143A
	JG11	>100	R	G143A
	JG12	>100	R	G143A
	JG13	>100	R	G143A
	JG14	>100	R	G143A
	JG15	>100	R	G143A
	JG16	>100	R	G143A
	JG17	>100	R	G143A
	JG18	>100	R	G143A
	JG19	>100	R	G143A
	JG20	>100	R	G143A
	JG21	>100	R	G143A
	JG22	>100	R	G143A
	JG23	>100	R	G143A
	JG24	>100	R	G143A
	JG25	>100	R	G143A
Jecheon	JE1	>100	R	G143A
	JE2	>100	R	G143A
	JE3	0.08	S	-
	JE4	0.06	S	-
	JE5	>100	R	G143A
	JE6	>100	R	G143A
	JE7	>100	R	G143A

Table 3. Continued

Region	Isolate	EC ₅₀ (μg/ml)	DR ^a	SNPs ^b
Jecheon	JE8	>100	R	G143A
	JE9	>100	R	G143A
	JE10	>100	R	G143A
	JE11	>100	R	G143A
	JE12	>100	R	G143A
	JE13	>100	R	G143A
	JE14	>100	R	G143A
	JE15	>100	R	G143A
	JE16	>100	R	G143A
	JE17	>100	R	G143A
	JE18	>100	R	G143A
	JE19	>100	R	G143A
	JE20	>100	R	G143A
	JE21	>100	R	G143A
	JE22	>100	R	G143A
	JE23	>100	R	G143A
	JE24	>100	R	G143A
	JE25	>100	R	G143A
Jinan	JN1	>100	R	G143A
	JN2	>100	R	G143A
	JN3	>100	R	G143A
	JN4	>100	R	G143A
	JN5	>100	R	G143A
	JN6	>100	R	G143A
	JN7	>100	R	G143A
	JN8	>100	R	G143A
	JN9	>100	R	G143A
	JN10	>100	R	G143A
	JN11	>100	R	G143A
	JN12	>100	R	G143A
	JN13	>100	R	G143A
	JN14	>100	R	G143A
	JN15	0.09	S	-
	JN16	0.03	S	-
	JN17	0.00	S	-
	JN18	0.05	S	-
	JN19	>100	R	G143A
	JN20	>100	R	G143A
	JN21	>100	R	G143A
	JN22	>100	R	G143A
	JN23	>100	R	G143A
	JN24	>100	R	G143A
	JN25	>100	R	G143A

^aDR; degrees of resistance to kresoxim-methyl (R; resistant, S; sensitive)

^bSNPs; single-nucleotide polymorphisms that resulted in kresoxim-methyl resistance.

사과점무늬낙엽병균의 cytochrome b 유전자 분석 및 돌연변이 여부 확인

QoI계 살균제 저항성과 관련된 돌연변이를 확인하기 위해 작용 부위인 미토콘드리아 cytochrome b 유전자의 일부 영역을 AF와 AR primer를 이용하여 증폭하였으며 227 bp 크기의 PCR 산물을 확보하였다. 증폭한 유전자 단편의 염기서열을 분석한 결과, EC₅₀ 값이 100 μg/mL 미만인 KACC 40030을 포함한 14개 균주에서는 143번째 코돈이 GGT(glycine)로 확인되었다. 반면 EC₅₀ 값이 100 μg/mL 이상인 83개 모든 분리균주에서는 143번째 코돈인 GGT(glycine)에서 GCT(alanine)로 치환된 것으로 나타났다(Table 3). 따라서 저항성 균주에서 cytochrome b 유전자의 G143A 돌연변이가 예외 없이 검출되었으며, 해당 돌연변이와 kresoxim-methyl 저항성 간의 강한 연관성이 확인되었다.

QoI계 살균제에 대한 저항성은 다양한 식물병원성 곰팡이에서 보고되어 왔다. 현재까지 보고된 cytochrome b 유전자의 저항성 관련 돌연변이로는 G143A, F129L 및 G137R이 있으며, 이 중 G143A 돌연변이가 가장 널리 분포하는 것으로 알려져 있다(Dorigan et al., 2023). 특히 F129L 돌연변이는 상대적으로 낮은 수준의 저항성을 부여하여 살균제 권장 농도에서 방제가 가능한 반면, G143A 돌연변이는 높은 수준의 저항성을 유발하여 QoI계 살균제의 방제 효과를 현저히 감소시키는 것으로 보고되었다(Fernández-Ortuño et al., 2008). 또한 G143A 돌연변이를 보유한 *Alternaria* spp.는 감수성 균주에 비해 QoI계 살균제에 대한 EC₅₀ 값이 현저히 증가하는 것으로 알려져 있다(Chitolina et al., 2021; Ma et al., 2003).

본 연구에서도 EC₅₀ 값이 100 μg/mL 이상인 83개 모든 분리균주에서 G143A 돌연변이가 검출된 반면, 감수성 균주에서는 해당 돌연변이가 확인되지 않았다. 이러한 결과는 G143A 돌연변이가 국내 사과점무늬낙엽병균의 QoI계 살균제 저항성과 밀접하게 연관되어 있음을 시사한다. 또한 조사된 4개 지역에서 높은 빈도의 저항성 균주가 확인된 점을 고려할 때, 국내 사과 재배지에서는 QoI계 살균제의 방제 효율이 저하되어 있을 가능성이 있다. 따라서 향후 보다 광범위한 국내 사과 재배지를 대상으로 점무늬낙엽병균의 QoI계 살균제 저항성 발생 현황과 G143A 돌연변이 분포를 지속적으로 모니터링할 필요가 있을 것으로 판단된다.

Allele-specific PCR 및 PCR-RFLP를 이용한 살균제 저항성 돌연변이 검정

식물병원균의 살균제 저항성 검정을 신속하고 정확하게 수행할 수 있는 분자생물학적 방법에는 allele-specific PCR 및 PCR-RFLP가 널리 사용되고 있다(Furuya et al., 2009; Ma et al., 2003). 본 연구에서 먼저 사과점무늬낙엽병균의 cytochrome b 유전자 염기서열의 점돌연변이를 kresoxim-methyl에 대한 저항성 균주와 감수성 균주를 간편하게 구별하기 위해 allele-

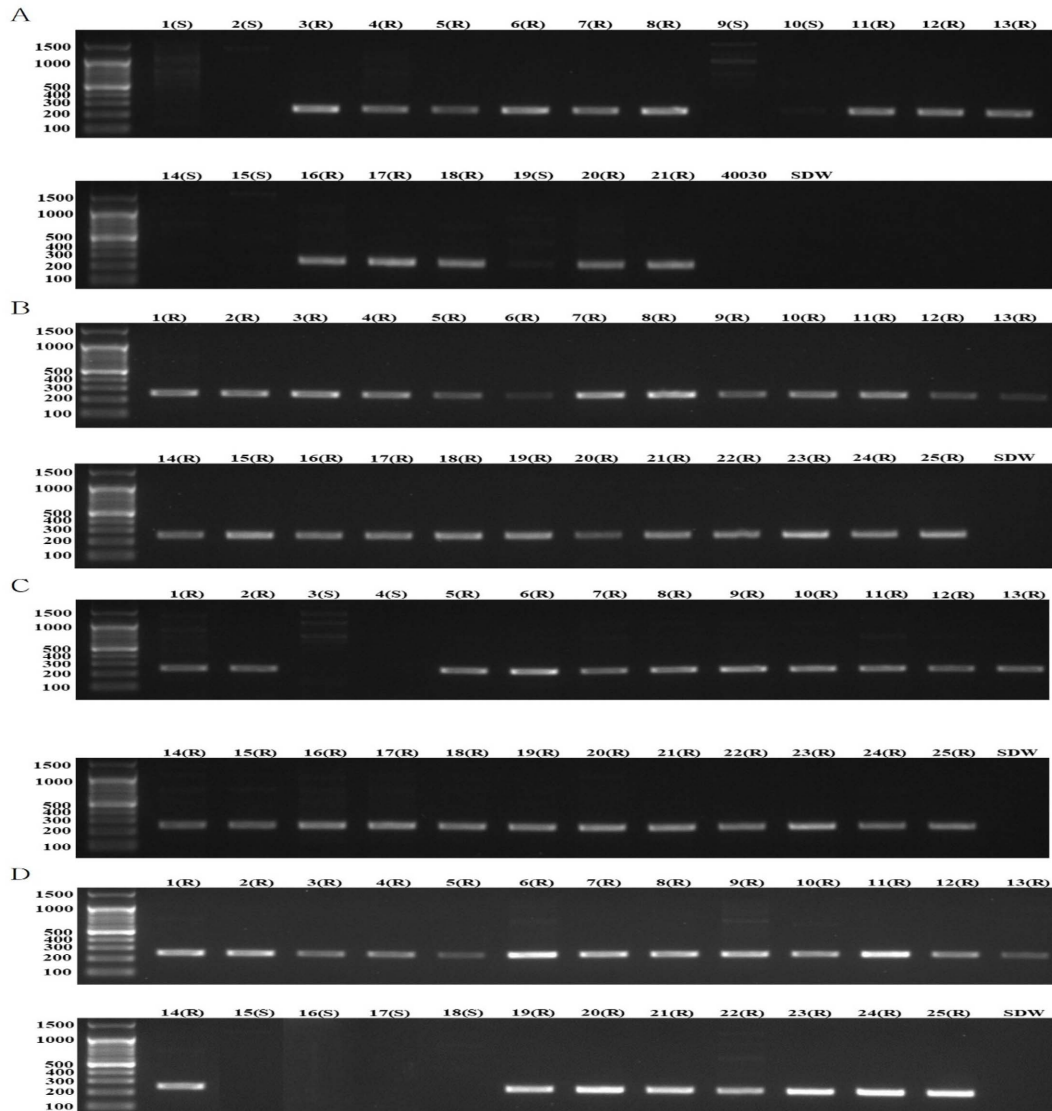


Fig. 3. Allele-specific PCR detection of the G143A mutation associated with kresoxim-methyl resistance in *Alternaria alternata* f. sp. *mali* isolates collected from Chungju (A), Jangsu (B), Jecheon (C), and Jinan (D). The 40030 lane in Group A corresponds to the allele-specific PCR result obtained from KACC 40030. Sterile distilled water (SDW) was used as the negative control in place of template DNA.

specific primer인 ARF와 ARR를 제작하고 PCR를 수행한 결과, 83개 저항성 균주에서만 227bp의 PCR 산물이 증폭되었다(Fig. 3). 그리고 G143A 돌연변이를 재검증하는 차원에서 PCR-RFLP 방법을 활용하고자 GGT에서 GCT로 치환됨으로써 GCTGC 염기서열을 인식하는 제한효소인 *Fnu4HI*를 처리하였다. 그 결과 kresoxim-methyl 감수성 균주에서는 227 bp의 PCR 산물을 확인할 수 있는 반면, kresoxim-methyl 저항성 균주에서는 227 bp의 PCR 산물이 178 bp와 49 bp로 절단된 2개의 산물을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 이러한 PCR-RFLP 방법은 *Alternaria* 속 이외에 *Botrytis cinerea*, *Cercospora beticola*, *Plasmopara viticola* 등의 병원균에서 QoI, benzimidazole계 살균제에 대한 저항성 발달을 검정하는데 적용되기도 하였다(Furuya et al., 2009; Malandrakis et al.,

2022; Rosenzweig et al., 2015).

본 연구에서는 allele-specific PCR과 PCR-RFLP의 두 가지 분자생물학적 방법을 이용하여 사과점무늬낙엽병균의 kresoxim-methyl 저항성을 신속하고 정확하게 진단할 수 있는 분자진단 기법을 확립하였다. Allele-specific PCR은 저항성 관련 돌연변이를 신속하게 검출할 수 있어 대규모 집단의 저항성 모니터링에 적합한 반면, PCR-RFLP는 제한효소 처리에 따른 절편 양상을 통해 저항성과 연관된 염기서열 치환을 정확하고 재현성 있게 확인할 수 있는 장점을 가진다. 따라서 본 연구에서 확립한 분자진단 기법은 사과점무늬낙엽병균 집단의 QoI 계 살균제 저항성을 효과적으로 진단하고 모니터링하는 데 유용하게 활용될 수 있을 것으로 판단된다. 또한 이를 통해 국내 사과 재배지에서 점무늬낙

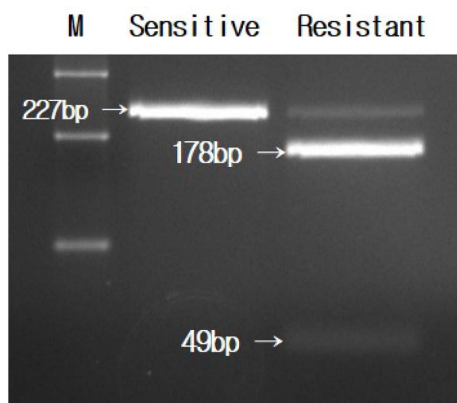


Fig. 4. Restriction fragment patterns of PCR-amplified cytochrome b gene fragments from kresoxim-methyl-sensitive and -resistant *Alternaria alternata* f. sp. *mali* isolates following digestion with Fnu4HI. Digested products were separated on a 2% agarose gel containing ethidium bromide. M, DNA size marker; S, sensitive isolate; R, resistant isolate.

엽병의 효율적인 방제 전략 수립과 저항성 관리 체계 구축에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

이 논문은 전남대학교 연구년교수 연구비(과제번호: 2023-0087-01) 지원에 의하여 연구되었습니다.

Author Information and Contributions

Byeong Hak Jeong, Department of Applied Biology, College of Agriculture and Life science, Chonnam National University, Graduate student, ORCID <http://orcid.org/0009-0006-4207-9038>

Soo-Geun Shin, Department of Applied Biology, College of Agriculture and Life science, Chonnam National University, Graduate Student, ORCID <https://orcid.org/0009-0007-1374-57>

Kwang-Yeol Yang, Department of Applied Biology, College of Agriculture and Life science, Chonnam National University, Professor, ORCID <http://orcid.org/0000-0002-8040-5467>

Research design; Yang KY, Investigation; Jeong BH, Shin SG, Data analysis; Yang KY, Jeong BH, Shin SG, Writing and Editing; Yang KY, Jeong BH

이해상충관계

저자는 이해상충관계가 없음을 선언합니다.

Literature Cited

- Back C-G, Lee S-Y, Keum J, Hung H-Y, 2025. Development of fungicide spray programs for the efficient control for major apple diseases. *Kor. J. Pestic. Sci.* 29(2):114-126.
- Bartlett DW, Clough JM, Godwin JR, Hall AA, Hamer M, et al., 2002. The strobilurin fungicides. *Pest Manag. Sci.* 58(7): 649-662.
- Berbee M, Pirseyedi M, Hubbard S, 1999. *Cochliobolus* phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Mycologia* 91:964-977.
- Cabrefiga J, Salomon MV, Vilardell P, 2023. Improvement of Alternaria leaf blotch and fruit spot of apple control through the management of primary inoculum. *Microorganisms*, 11(1). DOI 10.3390/microorganisms11010101
- Campbell SE, Brannen PM, Scherm H, Eason N, MacAllister C, 2021. Efficacy of fungicide treatments for *Plasmopara viticola* control and occurrence of strobilurin field resistance in vineyards in Georgia, USA. *Crop Prot.* 139:105371. DOI 10.1016/j.cropro.2020.105371
- Cao C, Gong S, Li Y, Tang J, Li T, Zhang Q, 2024. Pathogenic factors and mechanisms of the Alternaria leaf spot pathogen in apple. *Horticulturae* 10(3):212. DOI 10.3390/horticulturae10030212
- Cheon WS, Jeon YH, 2015. Survey of major diseases occurred on apple in northern Gyeongbuk from 2013 to 2014. *Res. Plant Dis.* 21(4):261-267.
- Cheon WS, Do YS, Lee SY, Choi KH, Nam JC, et al., 2018. Survey of major leaf disease occurred on apple tree in Korea from 1992-2010. *Res. Plant Dis.* 24(4):249-256.
- Chitolina GM, Silva-Junior GJ, Feichtenberger E, Pereira RG, Amorim L, 2021. Distribution of *Alternaria alternata* isolates with resistance to quinone outside inhibitor (QoI) fungicides in Brazilian orchards of tangerines and their hybrids. *Crop Prot.* 141:105493. DOI 10.1016/j.cropro.2020.105493
- Dorigan AF, Moreira SI, da Silva Costa Guimarães S, Cruz-Magalhães V, Alves E, 2023. Target and non-target site mechanisms of fungicide resistance and their implications for the management of crop pathogens. *Pest Manag. Sci.* DOI 10.1002/ps.7726
- Fernández-Ortuño D, Torés JA, De Vicente A, Pérez-García A, 2008. Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi. *Int. Microbiol.* 11(1):1-9.
- Furuya S, Suzuki S, Kobayashi H, Saito S, Takayanagi T, 2009. Rapid method for detecting resistance to a QoI fungicide in *Plasmopara viticola* populations. *Pest Manag. Sci.* 65(8):840-843.
- Gisi U, Chin K, Knapova G, Farber R, Mohr U, et al., 2000. Recent developments in elucidating modes of resistance to phenylamide, DMI and strobilurin fungicides. *Crop Prot.* 19:863-867.
- Gisi U, Sierotzki H, Cook A, McCaffery A, 2002. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor

- fungicides. Pest Manag. Sci. 58(9):859-867.
- Grasso V, Palermo S, Sierotzki H, Garibaldi A, Gisi U, 2006. Cytochrome b gene structure and consequences for resistance to Qo inhibitor fungicides in plant pathogens. Pest Manag. Sci. 62(6):465-472.
- Kim D, Hwang JH, 2004. Inheritance and RAPD marker selection linked to resistance trait of *Alternaria blotch* (*A. mali*) in Apples. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 22(3):315-320.
- Kim KH, Lee CU, 1987. Resistance of *Alternaria mali* Roberts to iprodione. Korean J. Plant Pathol. 3(4):270-276.
- Korean Society of Plant Pathology, 2022. List of Plant Diseases in Korea. 6th ed. The Korean Society of Plant Pathology, Gangnam-gu, Seoul, South Korea. pp 237-242. (in Korean)
- Köller W, Parker DM, Turechek WW, Avila-Adame C, Cronshaw K, 2004. A Two-phase resistance response of *Venturia inaequalis* populations to the QoI fungicides kresoxim-methyl and trifloxystrobin. Plant Dis. 88(5):537-544.
- Ma Z, Felts D, Michailides TJ, 2003. Resistance to azoxystrobin in *Alternaria* isolates from pistachio in California. Pestic. Biochem. Physiol. 77(2):66-74.
- Ma Z, Michailides TJ, 2004. An allele-specific PCR assay for detecting azoxystrobin-resistant *Alternaria* isolates from pistachio in California. J. Phytopathol. 152(2):118-121.
- Lesniak KE, Proffer TJ, Beckerman JL, Sundin GW, 2011. Occurrence of QoI resistance and detection of the G143A mutation in Michigan populations of *Venturia*. Plant Dis. 95:927-934.
- Malandrakis AA, Krasagakis N, Kavroulakis N, Ilias A, Tsagarakou A, et al., 2022. Fungicide resistance frequencies of *Botrytis cinerea* greenhouse isolates and molecular detection of a novel SDHI resistance mutation. Pest. Biochem. Physiol. 183:105058. DOI 10.1016/j.pestbp.2022.105058
- Ministry of Data and Statistics, 2024. 2024 Survey results on the production of autumn cabbage/radish, soybean, apple, and pear. https://mods.go.kr/board.es?mid=a10301080700&bid=228&act=view&list_no=434453(Accessed Jan. 10. 2025).
- Nottensteiner M, Absmeier C, Zellner M, 2019. QoI fungicide resistance mutations in *Alternaria solani* and *Alternaria alternata* are fully established in potato growing areas in bavaria and dual resistance against SDHI fungicides is upcoming. Gesunde Pflanzen, 71(3):155-164.
- Park subin and Kim HT, 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(30):122-131
- Pasche JS, Piche LM, Gudmestad NC, 2005. Effect of the F129L Mutation in *Alternaria solani* on fungicides affecting mitochondrial respiration. Plant Dis. 89(3):269-278.
- Rosenzweig N, Hanson L, Clark G, Franc G, Stump W, et al., 2015. Use of PCR-RFLP analysis to monitor fungicide resistance in *Cercospora beticola* populations from sugarbeet (*Beta vulgaris*) in Michigan, United States. Plant Dis. 99(3):355-362.
- Sautua FJ and Carmona MA, 2021. Detection and characterization of QoI resistance in *Pyrenophora tritici-repentis* populations causing tan spot of wheat in Argentina. Plant Pathol. 70:2125-2136.
- Sierotzki H, Wulschleger J, Gisi U, 2000. Point mutation in cytochrome b gene conferring resistance to strobilurin fungicides in *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* field isolates. Pest. Biochem. Physiol. 68(2):107-112.
- Sierotzki H, Frey R, Wulschleger Jr, Palermo S, Karlin S, et al., 2007. Cytochrome b gene sequence and structure of *Pyrenophora teres* and *P. tritici-repentis* and implications for QoI resistance. Pest Manag. Sci., 63(3):225-233.
- Vega B, Liberti D, Harmon PF, Dewdney MM, 2012. A rapid resazurin-based microtiter assay to evaluate QoI sensitivity for *Alternaria alternata* isolates and their molecular characterization. Plant Dis. 96(9):1262-1270.
- Verma S, Khosla K. 2018. Chemical management of Marssonina leaf blotch and *Alternaria* leaf spot diseases of apple in Himachal Pradesh. Int. J. Chem. Stud. 6(4):3316-3319.
- White T, Bruns T, Lee S, Taylor J, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocols, a guide to methods and applications. Academic Press, Inc., Sandiego, USA. pp. 315-322.
- Woudenberg JHC, Seidl MF, Groenewald JZ, Vries M, Stielow JB, Thomma BPHJ, Crous, PW. 2015. *Alternaria* section *Alternaria*: Species, *formae speciales* or pathotypes? Stud. Mycol. 82:1-21.

QoI계 살균제에 대한 사과점무늬낙엽병균 *Alternaria alternata* f. sp. *mali*의 저항성 검정

정병학 · 신수근 · 양광열*

전남대학교 농업생명과학대학 응용생물학과

요 약 사과 점무늬낙엽병은 *Alternaria alternata* f. sp. *mali*에 의해 발생하는 주요 병해로, 국내 사과 재배지에서 지속적인 방제가 요구된다. 그러나 국내 사과점무늬낙엽병균의 살균제 저항성에 대한 연구는 매우 제한적이며 특히 장기간 사용된 QoI계 살균제에 대한 저항성 발생 현황을 보고한 연구는 없다. 본 연구에서는 2021년 충주, 장수, 제천, 진안 지역의 사과 재배지에서 채집한 *Alternaria alternata* f. sp. *mali* 96개 분리 균주를 대상으로 QoI계 살균제인 kresoxim-methyl에 대한 감수성을 포자발아 억제율 기반으로 평가하였다. 그 결과, 전체 분리균주의 86.5%에 해당하는 83개 균주가 100 µg/mL 이상의 EC₅₀ 값을 나타내어 높은 수준의 저항성을 보였다. 또한 이들 83개 균주는 trifloxystrobin에 대해서도 100 µg/mL 이상의 EC₅₀ 값을 나타내어 QoI계 살균제 간 교차저항성이 확인되었다. Cytochrome b 유전자 분석 결과, 저항성 균주 83개 모두에서 143번째 코돈의 G143A(GGT→GCT) 돌연변이가 확인되었다. 이에 따라 저항성 유전자 특이적인 primer를 이용한 allele-specific PCR과 제한효소 *Fnu4HI*를 이용한 PCR-RFLP 기법을 확립하였다. 본 연구는 국내 주요 사과 재배지의 사과점무늬낙엽병균 집단에서 QoI계 살균제 저항성이 광범위하게 분포하고 있음을 확인하였으며, 향후 저항성 모니터링 및 효과적인 사과 점무늬낙엽병 방제 전략 수립에 도움이 될 수 있을 것으로 생각된다.

색인어: *Alternaria alternata* f. sp. *mali*, 사과 점무늬낙엽병, QoI계 살균제, 살균제 저항성