

환경친화형 참다래 꽃썩음병 방제기술
개발에 관한 연구

Study on the Development of Eco-friendly Control
Techniques for Blossom Blight of Kiwifruits

연구기관

순천대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “환경친화형 참다래 꽃썩음병 방제기술 개발에 관한 연구” 과제
(제 1 세부과제 “참다래 꽃썩음병균 특성 분석 및 monitoring 시스템 개발”,
제 2 세부과제 “저농약, 고효율 참다래 꽃썩음병 방제 모델 확립”에 관한 연구)의
최종 보고서로 제출합니다.

2004년 8월 15일

주관연구기관명 : 순천대학교

총괄연구책임자 : 정 재 성

세부연구책임자 : 고 영 진

요 약 문

I. 제 목

환경친화형 참다래 꽃썩음병 방제기술 개발에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

참다래는 1980년대 초 우리나라에 보급된 뒤 월동이 가능한 남해안 지역을 중심으로 1,400여 ha에 달하는 면적에서 재배되고 있다. 참다래가 우리나라에 보급되기 시작할 때에는 병해가 없는 무병과수로 알려졌었지만 최근에는 궤양병, 꽃썩음병, 잣빛곰팡이병, 점무늬병, 역병, 과실무름병 등이 발생하여 피해를 주는 것으로 보고 되고 있다. 그 중에서 꽃썩음병은 궤양병과 더불어 참다래에 발생하는 대표적인 세균성 병해로 해마다 다소 차이는 있지만 평균 20-35% 정도의 발병율을 보이고 개화기에 강우가 잦은 해에는 50% 이상 감수를 초래할 만큼 큰 피해를 주고 있어 효율적인 방제대책이 시급한 실정이나 이와 관련된 연구가 거의 없는 실정이었다.

따라서 본 연구에서는 참다래 꽃썩음병을 일으키는 병원세균의 특성을 분석하고, 유전적 지표를 이용하여 간이진단법을 개발하고, 병원세균 집단의 유전적 특성을 분석하고자 하였다. 또한 병원세균의 월동부위별, 계절별 밀도변화 추이 조사 등을 통한 효율적인 상시 monitoring 시스템을 구축하고, 참다래 꽃썩음병을 일으키는 병원세균의 발생생태를 분석하여 예방 약제의 최적 살포 프로그램을 정립하고 한국형 경종적 방제체계를 확립하고자 하였다. 이를 통해 저농약, 고효율 꽃썩음병 방제체계를 확립함으로써 환경친화형 참다래 꽃썩음병 방제기술을 개발하고자 본 연구를 수행하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

연구개발의 내용과 범위는 다음과 같다.

1. 참다래 꽃썩음병균 특성 분석 및 monitoring 시스템 개발
 - 1) 참다래 꽃썩음병균의 특성 분석

- ① 병원균의 분류 및 동정
 - ② 병원균의 병원성 검정 및 기주범위 조사
 - ③ 병원균의 병원성 유전자 분석
 - 2) 참다래 꽃썩음병균 간이진단법 개발
 - ① 병원균의 진단 marker 개발
 - ② 병원균 간이진단법 개발
 - 3) 참다래 꽃썩음병균 집단 분석
 - ① 병원균의 약제저항성 발생 실태 파악
 - ② 병원균의 약제저항성 유전자 확인
 - ③ 병원균의 plasmid 분석
 - ④ 병원균의 지리적 변이 분석
 - 4) 참다래 꽃썩음병균 상시 monitoring 시스템 구축
 - ① 병원균의 식물체 부위별 분포 및 밀도 조사
 - ② 병원균의 계절별, 시기별 밀도 변화 추이 조사
 - ③ 효율적 상시 monitoring 시스템 구축
2. 저농약, 고효율 참다래 꽃썩음병 방제 모델 확립
- 1) 참다래 꽃썩음병균의 발생생태 조사
 - ① 전염원 월동 부위 조사
 - ② 발병조건 구명
 - 2) 꽃썩음병 예방약제 최적 살포 프로그램 정립
 - ① 예방약제 선발 및 약효 검정
 - ② 예방약제 살포적기 구명
 - ③ 예방약제 적정 살포횟수 구명
 - ④ 약제 최적살포 프로그램 정립 및 포장검증
 - 3) 참다래 꽃썩음병 경종적 방제 체계 확립
 - ① 한국형 환상박피 체계화
 - ② 실용적 비가림 재배 체계화
 - 4) 환경친화형 참다래 꽃썩음병 방제 모델 확립
 - ① 환경친화형 참다래 꽃썩음병 방제 모델 구축

② 방제 모델의 재배포장 검증

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

1) 참다래 꽃썩음병균의 특성 분석

국내에서 발생하는 참다래 꽃썩음병을 일으키는 병원세균은 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*와 *P. fluorescense*로 확인되었다. 이들 두 종류의 병원세균에 의해 발현되는 병징에는 뚜렷한 차이가 있었다. *P. syringae* pv. *syringae*를 개화하기 시작한 꽃에 감염시켰을 때 감염 1주일 후부터 암술을 제외한 수술 부위가 흑갈색으로 변색되기 시작하여 2주일 후에는 꽃잎도 함께 변색되었다. 또한 4주일 후에 관찰한 결과, 크기가 작거나 기형적인 과일이 열리거나 낙과되었다. *P. fluorescense*을 감염 시킨 경우는 감염 1주일 후에 개화되지 않은 채 낙화되거나, 개화한 꽃도 수술과 암술 모두 흑갈색으로 변색되면서 2주에서 4주 사이에 모두 낙화되어 열매가 열리는 경우는 없었다.

P. syringae pv. *syringae*는 *syrB*유전자와 *syrD* 유전자를 동시에 가지고 있어서 식물독소로 syringomycin을 생산함을 알 수 있었다. 그러나 *P. fluorescense*는 *syrD* 유전자만을 가지고 있어 syringomycin이 아닌 syringopeptine을 생산하는 것으로 추정할 수 있었다. 두 균주에서 공통적으로 존재하는 *syrD* 유전자를 probe로 사용하여 독소 유전자의 위치를 확인한 결과 모두 chromosomal DNA에 존재함을 확인하였다.

2) 참다래 꽃썩음병균의 간이진단법 개발

국내에서 분리한 참다래 꽃썩음병원균인 *P. syringae* pv. *syringae*와 *P. fluorescense* 모두 *syrD* 유전자를 가지고 있으므로 이 유전자 부위를 증폭할 수 있는 primer를 설계하여 꽃썩음병을 진단할 수 있는 marker로 개발하였다. 또한 검출한계를 높이기 위해 nested-PCR primer도 함께 개발하였다. *P. syringae* pv. *syringae*에 대한 검출 한계를 측정된 결과, 1차 PCR을 수행한 경우에 3×10^4 cfu/ml였으며, 2차 PCR을 수행한 경우는 3×10^2 cfu/ml였다.

그러나 자연환경에서 채취한 시료에는 PCR 반응을 저해할 수 있는 여러 가지 불순물이 존재하므로 검출한계가 낮아질 것으로 사료되어 PCR에 앞서 시료를 20°C에서 12시간동안 증식시켜 개체수를 늘린 후 실험에 사용하는 간이진단법을 개발하였다. 이 방법을 이용하여 병든 꽃에 존재하는 병원세균의 병원성 유전자를 손쉽게 검출할 수 있었다.

3) 참다래 꽃썩음병균 발생생태 조사

참다래 꽃썩음병을 일으킬 수 있는 병원세균인 *P. syringae* pv. *syringae* 전염원은 참다래 과실을 수확하고 남은 죽은 과경지나 참다래 포장내에 방치해 있는 전정된 가지나 낙엽 등 식물체 잔존물에서 높은 밀도로 월동하는 것으로 밝혀졌다. 더불어 참다래 신초눈을 비롯하여 주간, 주지, 가지 등 식물체 상에서도 *P. syringae* pv. *syringae*는 골고루 월동하는 것으로 밝혀졌다. 따라서 참다래 꽃썩음병을 방제하기 위한 1차적인 방법은 참다래 포장에 존재하는 불필요한 식물체 잔존물들을 수거하여 소각함으로써 포장을 청결하게 유지하는 방법이다. 또한 포장위생 외에도 참다래 나무에 약제를 살포하여 식물체 상에 존재하는 전염원을 제거하는 것이 추가적인 예방법으로 판단된다.

참다래 꽃썩음병을 일으킬 수 있는 병원세균 *P. syringae* pv. *syringae*의 발병 최소농도는 1×10^4 cfu/ml였고, *P. syringae* pv. *syringae*의 최적 성장 온도범위는 20-25°C 사이로 확인되었다. 따라서 *P. syringae* pv. *syringae*는 참다래 나무 위나 참다래 과수원 포장에 존재하는 식물체 잔존물 등에서 월동을 한 후 참다래 꽃봉오리가 형성되는 4월 중순 무렵부터 개화가 이루어지는 5월 하순 사이에 병원세균의 최적 성장 온도 조건이 갖추어지면 각종 월동 부위에서 참다래 꽃썩음병을 일으킬 수 있는 병원세균의 발병 최소농도 이상으로 급속한 증식과 전파가 이루어지고 꽃썩음병을 일으키는 병환을 되풀이 하는 것으로 추정할 수 있다.

4) 참다래 꽃썩음병 예방약제 최적 살포 프로그램 정립

참다래 꽃썩음병 방제약제로 등록되어 있는 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제와 농용신·쿠퍼 수화제 외에 농용신 수화제, 옥쏘리닉에시드 수화제 및 디치돈 수화제는 실내약제선발 실험 뿐만 아니라 포장 약효검정 실험에서도 방제효과가 우수하므로 장차 참다래 꽃썩음병 방제 약제로 개발할 수 있을 것으로 기대된다. 참다래 꽃썩음병에 대한 등록 약제에 의해서만 약제방제가 지속적으로 이루어질 때 필연적으로 약제저항성균의 발생이 예상되므로 약제저항성균의 발생을 억제시킬 수 있는 방안으로 새로운 방제약제 선별 및 개발을 통한 방제약제의 다양화는 필수불가피한 일이라고 판단된다.

참다래 꽃썩음병 방제약제로 등록되어 있는 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제와 농용신·쿠퍼 수화제의 살포적기는 개화기로 확인되었고, 저농약 고효율 참다래 꽃썩음병 방제를 위한 예방약제의 적정 살포횟수는 참다래 꽃 만개기 20일전인 5월 초순부터 10일 간격 3회 살포로 판명되었다. 따라서 참다래 꽃 만개기 20일전인 5월 초순부터 개화기까지 예

방 약제를 10일 간격 3회 살포하는 것은 병원세균 전염원이 월동부위로부터 건전한 꽃봉오리나 꽃으로의 전파와 감염을 사전에 예방할 수 있는 합리적인 참다래 꽃썩음병 예방약제 최적 살포 프로그램이라고 판단된다.

5) 참다래 꽃썩음병균 집단 분석

꽃썩음병원균의 약제저항성 발생 실태는 국내에서 참다래 꽃썩음병 약제로 등록되어 있는 아그리마이신 수화제와 농용신 코퍼 수화제의 주성분인 streptomycin과 copper sulfate에 대한 저항성으로 파악하였다.

streptomycin 저항성의 경우, 41개의 *P. syringae* pv. *syringae* 중 2개 (KHP7, BJB3)의 균주에서 저항성이 확인되어 5%정도의 발생빈도를 나타내었고, 최소저해농도가 100 μ g/ml로 비교적 낮은 수준이었다. Streptomycin에 대해 저항성을 보인 *P. syringae* pv. *syringae* KHP7과 BJB3에 존재하는 streptomycin 저항성 유전자는 *strA-strB* 구조로 이루어져 있었으며 전형적인 Tn5393과 염기서열이 동일하였다. 또한 streptomycin에 저항성을 나타내는 병원세균은 모두 3개의 plasmid를 가지고 있었으며 100 kb 크기의 plasmid에 *strA-strB* 유전자가 존재하였다.

Copper 저항성의 경우, 4개 (HSS3, KJA3, NYH3, NNH4)의 균주에서 저항성이 확인되어 10% 정도의 발생빈도를 나타내었고, 최소저해농도는 3 mM이었다. Copper에 저항성을 나타내는 *P. syringae* pathovar들의 저항성 관련 유전자 중 비교적 잘 보존되어 있는 *copR*에서 PCR primer를 설계하여 PCR을 수행한 뒤 염기서열을 분석한 결과, 국내에서 분리된 참다래 궤양병 원균 *P. syringae* pv. *actinidiae* JYG3에 존재하는 copper 저항성 유전자와 염기서열에서 98%의 상동성을 나타내어 *P. syringae* pathovar들이 가지고 있는 copper 저항성 유전자들 중에서 유전적으로 가장 유사한 것으로 나타났다. 또한 증폭된 *copR* 부위를 probe로 사용하여 유전자의 위치를 파악한 결과 copper 저항성 유전자는 약 60 kb의 plasmid DNA에 존재하였다.

자연 생태계에서 plasmid에 있는 유전자는 접합이나 형질전환 등의 방법으로 종간 또는 속을 뛰어 넘어 전달되는 것으로 알려져 있다. 국내에서 분리한 참다래 꽃썩음병균의 streptomycin과 copper에 대한 저항성 정도는 심각하지 않은 상태이다. 그 이유 중 하나는 지금까지 농가들이 꽃썩음병의 방제를 위한 약제 살포에 대해 비교적 관심이 적었기 때문이다. 그러나 이들이 가지고 있는 약제 저항성 유전자가 모두 plasmid DNA 내에 존재하고 있는 사실에 비추어 약제 살포가 증가하면 자연선택에 의해 농업생태환경에서 streptomycin과 copper 저항성 균주의 출현 빈도가 높아질 가능성이 있다.

국내에서 분리된 참다래 꽃썩음병균은 plasmid pattern에 따라 6가지 group으로 구분할 수 있었다. 분리된 43개의 참다래 꽃썩음병균 중 34개가 2개의 plasmid를 갖는 group III에 속해 가장 큰 비중을 차지하였으며, *P. fluorescense*의 경우는 plasmid가 존재하지 않았다. 3개의 plasmid를 가지고 있는 GroupIV의 경우는 모두 streptomycin 저항성을 가지고 있어 유전적 기원이 동일한 plasmid일 것으로 추정되었다.

병원세균들의 지리적 변이 분석을 위해 분리된 병원세균들의 genomic DNA로 RAPD를 수행하였다. 먼저 같은 지역 내에서의 유전적 변이를 확인하기 위해 전남 해남지역에서 분리한 4개의 균주로 PCR을 수행한 결과, plasmid pattern이 다름에도 불구하고 10개의 primer에 대해 모두 동일한 band pattern을 보여 genomic DNA상에서의 유전적 변이는 없는 것으로 짐작할 수 있었다.

국내의 서로 다른 지역에서 채집된 8개의 *P. syringae* pv. *syringae*들과, 일본의 참다래 꽃썩음병균인 PSJA1, *P. fluorescense* KDK8, 그리고 참다래 궤양병균인 *P. syringae* pv. *actinidiae* JYG를 대상으로 56개의 random primer를 사용하여 RAPD를 수행한 결과, 국내에서 채집된 8개의 *P. syringae* pv. *syringae* 균주들은 모든 primer에 대해 매우 유사한 band pattern을 나타내어 이들의 유전적 유사도가 매우 높은 것으로 생각되었다.

일본의 꽃썩음병균인 PSJA1도 국내의 균주와 비교적 비슷한 band pattern을 나타내었으나, 다른 꽃썩음병균인 *P. fluorescense* KDK8과 궤양병균인 *P. syringae* pv. *actinidiae* JYG3와는 모든 primer에서 매우 다른 양상의 band pattern을 보여 유전적 유연관계가 상당히 먼 것을 확인할 수 있었다.

6) 참다래 꽃썩음병 경종적 방제 체계 확립

참다래 재배 시 환상박피에 의한 꽃썩음병 방제효과를 극대화시킬 수 있는 환상박피 최적 시기는 만개기 약 한달 반 전인 4월 10일 전후인 것으로 확인되었으며, 4월 10일을 전후한 약 1개월 동안이 환상박피를 시행할 수 있는 유효기간이라 추정되었다. 참다래 주간부에 환상박피 폭을 20 mm로 시행하는 것이 꽃썩음병 방제에 가장 적합한 것으로 판명되었으나 환상박피 위치는 주간부에서 어느 부위에 시행하든지 상관이 없는 것으로 확인되었다. 따라서 참다래 꽃만개기 약 한달 반 전인 4월 10일을 전후한 약 1개월 동안에 참다래 주간부위에 20 mm의 폭으로 환상박피를 시행하는 것이 우리나라 실정에 적합한 가장 이상적인 한국형 환상박피 방법이라고 결론지을 수 있다.

완전비닐피복 시설, 비닐터널 시설, 부분비닐피복 시설은 모두 높은 꽃썩음병 방제효과를 나

타내었지만 과풍망 시설은 꽃썩음병 방제효과가 거의 없었다. 완전비닐피복 시설, 비닐터널 시설, 부분비닐피복 시설 등 세 가지 비가림 시설 중에서 완전비닐피복 시설 및 비닐터널 시설에 비하여 소요 설치비용이 저렴하고 설치방법이 간편한 부분비닐피복 시설로도 충분히 꽃썩음병을 방제할 수 있었다. 따라서 참다래 꽃 만개기 두 달 반 정도 이전에 부분 비닐피복식 비가림 시설을 하면 참다래에 발생하는 꽃썩음병을 거의 완벽하게 예방할 수 있을 것으로 추정된다.

7) 참다래 꽃썩음병균 상시 monitoring 시스템 구축

꽃썩음병원균은 주로 열매 수확 후 제거되지 않은 참다래 나무의 과경지에 63.5%가 존재하는 것으로 나타났으며, 진정가지, 낙엽, 토양 등 포장 내에 존재하는 토양 잔존물에서도 22% 정도 검출되어 과경지의 제거와 포장의 청결이 꽃썩음병의 발병을 억제하는데 큰 도움을 줄 수 있을 것으로 생각되었다.

계절별로 꽃썩음병균의 밀도를 조사한 결과, 겨울에는 과경지에 33.8%, 진정가지에 18.6%, 낙엽에 31.3%가 존재하였으며 기온이 상승하면서 균의 밀도가 높아지는 것으로 나타났다. 특히 개화기인 5월과 6월에는 균의 밀도가 가장 높았으며 이는 꽃썩음병균의 주요 균인 *P. syringae* pv. *syringae*의 성장 적온이 20~25 °C인 것과 관련이 있을 것으로 생각된다.

국내에서 분리된 참다래 꽃썩음병균을 효율적으로 상시 monitoring 하기 위한 방법으로 시료를 생리식염수로 희석하여 SPS agar에 도말한 후 세균의 밀도를 측정하는 상시 monitoring 시스템을 개발하였다.

8) 환경친화형 참다래 꽃썩음병 방제 모델 확립

약제방제를 대체할 수 있는 환경친화형 참다래 꽃썩음병 방제 모델로서 환상박피와 부분비닐피복 비가림 시설을 제시할 수 있다. 환상박피인 경우 처리비용이 소요되지 않는 장점이 있는 반면에 참다래 나무마다 매년 다시 처리해야 하는 번거로운 단점이 있고, 부분비닐피복 비가림 시설인 경우 매년 설치하는 번거로움을 피할 수 있는 장점이 있는 반면에 시설설치 비용이 소요되는 단점이 있다. 따라서 환상박피와 부분비닐피복 비가림 시설 중에서 참다래를 재배하는 농가의 실정에 적합한 방제모델을 선택하여 약제방제를 대체할 수 있는 환경친화형 참다래 꽃썩음병 방제 모델로서 참다래 재배 현장에 적용하는 것이 바람직할 것으로 판단된다.

SUMMARY

Kiwifruit has been grown in southern parts of Korea since the early 1980s and is currently cultivated on 1,400 ha in Korea. Bacterial blossom blight or blossom rot was first reported in 1993. The disease occurs during flowering in late May and disease outbreaks associated with rainfall during the flowering season have resulted in a severe reduction in kiwifruit production. In this work, strains of the pathogens causing bacterial blight of kiwifruit in Korea were examined using phenotypic and genotypic methods. A PCR method that combines biological and enzymatic amplification of targets was developed for the detection of pathogens. In order to develop an efficient control strategy for blossom blight of kiwifruit, the genetic differentiation of plasmid and genomic DNA within population was investigated. Control practices including chemical sprays, girdling of tree trunks, and rain-proof installation were also evaluated for the eco-friendly control program of bacterial blossom blight of kiwifruit. The results are as the followings:

- 1) Bacterial blight of kiwifruit is caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and *Pseudomonas fluorescense* in Korea. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* affects flower buds of kiwifruit by rotting the anthers, which become a chocolate brown color. The disease may be restricted to the anther and is then apparent when the bud opens into a flower. However, *Pseudomonas fluorescense* cause the rot to other tissue in the bud, resulting in general browning. The bud then dropped, leaving a pedicel attached to the vine.
- 2) A nested PCR was performed with primers designed from the coding sequence of the *syrD* gene, which is involved in the secretion of phytotoxin lipodepsinopeptide. With two successive amplifications, as few as 30 cfu/ml of *P. syringae* pv. *syringae* could be detected on ethidium bromide-stained agarose gel.
- 3) Two strains of *P. syringae* pv. *syringae* resistant to streptomycin were collected from diseased tissue of kiwifruits in Korea. PCR amplification with primers specific to *strA-strB* revealed that they harbored these genes for a streptomycin-resistance determinant. Tr5393, containing *strA-strB*, was also identified with PCR primers

designed to amplify parts of *tnpA*, *res*, and *tnpR*. No IS elements were detected within *tnpR*, nor were they found in the intergenic region between *tnpR* and *strA*.

- 4) Four of 41 *P. syringae* pv. *syringae* isolates were able to grow on PS plates containing 1.25 mM of copper sulfate. Using primers designed from DNA sequence of *copR* which code for regulatory protein of copper resistance gene cluster, we amplified 1kb fragment of DNA. Sequencing of this DNA fragment showed 98% similarities with the gene of *P. syringae* pv. *actinidiae*, causative agent of bacterial canker of kiwifruit. DNA homologous to this fragment was found on a plasmids in four copper resistant strains.
- 5) Forty one isolates of *P. syringae* pv. *syringae* were examined for plasmid DNAs. They were classified into 6 groups according to the number and size of plasmids. Of the 41 *P. syringae* pv. *syringae* strains, 34 contained predominantly two plasmids. However, two *P. fluorescense* strains did not harbor detectable plasmids. Genetic diversity among 8 strains of *P. syringae* pv. *syringae* collected from different area were assessed by RAPD. No difference among all strains collected same site was observed. RAPD results suggested that *P. syringae* pv. *syringae* strains isolated in Korea were closely related in phylogenetic relationship.
- 6) Dead fruit stalks, dead pruned twigs, fallen leaves and soils mainly provide *P. syringae* pv. *syringae* with overwintering place in the kiwifruit orchards, and the inocula also overwintered on buds, trunks, branches, and twigs on the kiwifruit trees.
- 7) The population density of *P. syringae* pv. *syringae* were speculated to be over 1×10^4 cfu/ml for the bacterial infection, and the optimum temperature for bacterial growth ranged 20 to 25°C.
- 8) Application of preventative fungicides was highly effective in controlling bacterial blossom blight of kiwifruit with the spray schedule of 3 times application at 10-day intervals during the flowering stage from the early May.
- 9) Girdling of tree trunks and partial rain-proof installation over kiwifruit trees can substitute the routine chemical application as an environmentally friendly control method.
- 10) The bacterial disease was most effectively prevented by the girdling of tree trunks with 20 mm width around April 10 before about 45 days of full flowering stage of

kiwifruit in Korea.

- 11) Installation of partial rain-proof vinyl cover over kiwifruit trees before about 75 days of full flowering stage of kiwifruit prevented most of the disease occurrence of bacterial blossom blight on kiwifruit.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	15
Section 1. Research purpose	15
Section 2. Research necessity and range	15
Chapter 2. Research background and current status	20
Chapter 3. Results and discussion	23
Section 1. Characterization of the bacteria causing blossom blight of kiwifruit	23
Section 2. Development of diagnostic method for bacterial blight of kiwifruit	53
Section 3. Ecology of the bacteria causing blight of kiwifruit	55
Section 4. Establishment of optimal chemical spray program for the control of blossom blight of kiwifruit	61
Section 5. Analysis of bacterial population of kiwifruit blossom blight	71
Section 6. Cultural control of blossom blight of kiwifruit	91
Section 7. Monitoring system of blossom blight of kiwifruit	102
Section 8. Eco-friendly control model of blossom blight of kiwifruit	105
Chapter 4. Achievement and devotion	111
Chapter 5. Application plan of research results	116
Chapter 6. Reference	117

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	15
제 1 절 연구개발의 목적	15
제 2 절 연구개발의 필요성 및 범위	15
제 2 장 국내외 기술개발 현황	20
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	23
제 1 절 참다래 꽃썩음병균의 특성 분석	23
제 2 절 참다래 꽃썩음병균 간이진단법 개발	52
제 3 절 참다래 꽃썩음병균의 발생생태 조사	55
제 4 절 꽃썩음병 예방약제 최적 살포 프로그램 정립	61
제 5 절 참다래 꽃썩음병균 집단 분석	71
제 6 절 참다래 꽃썩음병 경종적 방제 체계 확립	91
제 7 절 참다래 꽃썩음병균 상시 monitoring 시스템 구축	102
제 8 절 환경친화형 참다래 꽃썩음병 방제 모델 확립	105
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	111
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	116
제 6 장 참고문헌	117

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

덩굴성 아열대 식물인 참다래는 야생에 서식하던 중국 남부로부터 1900년대 초 뉴질랜드로 도입된 후 1930년경에 이르러 경제적 과수로 개량되었다. 우리나라에는 1980년대 초부터 월동이 가능한 제주도와 남해안 지역을 중심으로 1,400여ha에 달하는 면적에서 재배되고 있다. 참다래가 우리나라에 보급되기 시작할 때에는 병해가 없는 무병과수로 알려졌었지만 최근에는 궤양병, 꽃썩음병, 잣빛곰팡이병, 점무늬병, 역병, 과실무름병 등이 발생하여 피해를 주는 것으로 보고 되고 있다. 그 중에서 꽃썩음병은 궤양병과 더불어 참다래에 발생하는 대표적인 세균성 병해로 해마다 다소 차이는 있지만 평균 20-35% 정도의 발병율을 보이고 개화기에 강우가 잦은 해에는 50% 이상 감수를 초래할 만큼 큰 피해를 주고 있어 효율적인 방제대책이 시급한 실정이나 이와 관련된 연구가 거의 없는 실정이었다.

따라서 본 연구에서는 참다래 꽃썩음병을 일으키는 병원세균의 특성을 분석하고, 유전적 지표를 이용하여 간이진단법을 개발하고, 병원세균 집단의 유전적 특성을 분석하고자 하였다. 또한 병원세균의 월동부위별, 계절별 밀도변화 추이 조사 등을 통한 효율적인 상시 monitoring 시스템을 구축하고, 참다래 꽃썩음병을 일으키는 병원세균의 발생생태를 분석하여 예방 약제의 최적 살포 프로그램을 정립하고 한국형 경종적 방제체계를 확립하고자 하였다. 이를 통해 저농약, 고효율 꽃썩음병 방제체계를 확립함으로써 환경친화형 참다래 꽃썩음병 방제기술을 개발하고자 본 연구를 수행하였다.

제 2 절 연구개발의 필요성 및 범위

1. 기술적 측면

식물에서 발생하는 대부분의 진균성 병해와는 달리 세균성 병해에는 방제 약제가 항생제와 동제로 제한되어 있어 약제 방제가 어려울 뿐만 아니라 방제 약제도 예방 위주의 약효를 나타내기 때문에 방제시기를 놓칠 경우 치료가 거의 불가능하다. 따라서 참다래 꽃썩음병에 대한

효과적인 방제법을 개발하기 위해서는 꽃썩음병의 병원학 (etiology) 및 진단법 (diagnosis), 꽃썩음병의 역학 (epidemiology) 및 발생 생태 (ecology), 꽃썩음병균의 집단유전 및 생물학 (population genetics & biology) 등에 관한 기초 연구가 선행되어야 할 것이다.

지금까지 국내에서는 참다래 꽃썩음병의 병원세균으로 *Pseudomonas syringae*가 보고 되었으나, 국외에서는 발생국가에 따라 원인균이 달리 보고 되고 있다. 다른 나라에서 참다래 꽃썩음병을 일으키는 것으로 알려진 병원세균으로는 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas viridiflava*, *Pseudomonas marginalis* 등이 보고 되고 있다. 따라서 참다래 꽃썩음병의 효과적 방제법을 개발하기 위해서는 우선 국외에서 참다래 꽃썩음병을 일으키는 것으로 보고 된 *Pseudomonas viridiflava*, *P. marginalis* 등이 국내에서도 참다래 꽃썩음병의 발병에 관여하는지를 구명할 필요가 있다.

참다래에 발생하는 또 다른 세균성 병해인 궤양병을 일으키는 병원세균은 *P. syringae* pv. *actinidiae*로 동정되었고 매실에 궤양병을 일으키는 세균은 *P. syringae* pv. *morsprunorum*으로 알려져 있다. 그런데 매실 궤양병균도 참다래에 약한 병원성을 나타내는 것으로 보고 되고 있다. 그러므로 국내에서 꽃썩음병균으로 동정된 *Pseudomonas syringae*의 pathovar를 정확하게 동정할 필요가 있다. 더불어 참다래에 공존하는 꽃썩음병과 궤양병을 일으키는 두 병원세균과의 유연관계를 구명하고 참다래 식물체상에서 두 세균병의 발병기작의 상호연관성을 또한 구명하는 것이 참다래 썩음병 방제법을 정립하기 위하여 반드시 필요하다.

이렇게 참다래 꽃썩음병의 병원을 명확하게 구명하고 나서 다음 단계로 참다래 꽃썩음병균만을 선별적으로 진단할 수 있는 marker의 개발이 필요하다. 참다래에는 꽃썩음병균과 궤양병균을 비롯하여 다양한 부생성 세균들이 존재하기 때문에 꽃썩음병균에 존재하는 독특한 염기서열이나 병원성 유전자를 이용하면 병원세균에 특이적인 molecular marker를 개발할 수 있을 것이다. 특이적인 molecular marker가 개발되면 nested PCR과 같은 기법을 이용하여 식물체상의 참다래 꽃썩음병균 유무를 빠르고 간편하게 진단할 수 있는 간이진단법의 개발이 가능하다. 간이진단법이 개발되면 참다래 식물체 상에서 참다래 꽃썩음병균의 존재유무 뿐 아니라 식물체 상에서 존재부위와 계절별 또는 시기별 밀도 등을 손쉽게 monitoring할 수 있을 것이다. 간이진단법을 이용하여 참다래 꽃썩음병균의 상시 monitoring이 가능해지면 적기에 약제방제를 통하여 참다래 꽃썩음병의 예방효과를 능률적으로 제고시킬 수 있을 것이다.

한편 국내에서 참다래 꽃썩음병 방제약제로는 아그리마이신과 농용신 수화제만이 품목 고시되어 있을 뿐이다. 두 약제 모두 주성분이 streptomycin으로 유사하기 때문에 약제의 연용은 필연적으로 저항성 세균의 출현을 야기시켜 방제효과를 떨어뜨릴 수밖에 없다. 따라서 참다래

꽃썩음병 약제로 품목 고시되어 있는 두 약제 외에 참다래 꽃썩음병 방제용으로 적용할 수 있는 약제를 다른 항생제, 동제 및 항생제와 동제의 합제 등으로 다양화시키는 것이 참다래 꽃썩음병에 대한 효과적인 방제를 위하여 수행되어야 할 또 하나의 선결과제이다. 약제를 다양화함으로써 다른 성분의 약제들을 교호 살포해야 약제 저항성 세균의 출현을 억제 또는 지연시킴으로써 약제방제효과를 높일 수 있다.

그러나 항생제 및 동제에 의한 약제방제에서 약제 저항성균의 출현은 불가피하기 때문에 참다래 재배지에 출현하는 꽃썩음병균 집단 내에서 약제 저항성균의 분포 및 빈도를 monitoring 하는 것은 약제방제의 효율성을 높이기 위하여 반드시 필요한 과제이다. 더구나 세균에 있어서 약제저항성 유전자는 plasmid와 불기분의 관계를 가지고 있는 것으로 보고 되고 있기 때문에 참다래 꽃썩음병 병원세균 집단에서의 약제저항성 발생 실태를 파악하고 약제저항성 유전자를 확인함과 동시에 병원세균 집단에서 존재하는 indigenous plasmid pattern을 비롯하여 RAPD와 같은 분자생물학적 기법을 이용하여 병원세균의 지리적 변이를 분석하는 집단유전학적인 연구는 보다 효율적으로 참다래 꽃썩음병균 집단을 관리하기 위하여 필요하다.

한편 약제방제가 참다래 재배농가에서 실행되고 있는 가장 일반적인 방제법이므로 화학적 방제법이 나타내는 부작용을 최소화하기 위하여 저농약, 고효율 방제체계의 확립이 참다래 꽃썩음병 약제방제에서 필수적이다. 저농약, 고효율 방제의 요점은 방제적기 구명과 더불어 약제 살포 회수를 최소화할 수 있는 약제 살포 프로그램의 개발이다. 월동 후의 참다래 식물체 상에서 간이진단법을 이용한 참다래 꽃썩음병균의 상시 monitoring을 통하여 약제 살포 적기를 파악하고 약제 살포 전후의 병원세균의 밀도와 병원세균의 유전적 변이를 monitoring함으로써 저농약, 고효율 방제를 이룰 수 있는 약제 살포 프로그램이 개발될 수 있을 것이다.

또한 세균병에 대한 약제방제의 한계점을 극복하기 위해서는 저농약, 고효율 약제방제와 더불어 화학적 방제법을 보완할 수 있는 경종적인 방제법의 체계화가 시급하다. 우리나라와 참다래 재배 조건이 비교적 유사한 일본에서 수행되고 있는 환상박피, 비가림 재배 등의 경종적인 방제법이 일부 국내 재배농가에서도 시도되고 있기 때문에 국내 참다래 재배 현실에 알맞게 개선하여 적극적으로 활용할 수 있도록 한국형 환상박피와 비가림 방법 및 실시시기 등에 관한 연구를 체계적으로 실시하여 그 결과를 통하여 농가에 보급하면 약제방제를 최소화시킬 수 있는 저농약, 고효율의 환경친화형 참다래 꽃썩음병 방제 모델을 개발할 수 있을 것이다.

2. 경제·산업적 측면

우리나라에서는 연간 12,000톤 이상 참다래가 생산되고 있지만 소비증가에 따른 생산량 부족으로 연간 8,000톤 이상의 참다래를 수입하고 있는 실정이다. 국내에서 생산되는 참다래는 당도와 산도 등 품질이 우수할 뿐만 아니라 참다래 주요 수출국인 뉴질랜드와 칠레 등 남반구의 참다래 주요 생산국과는 수확 및 출하 시기가 겹치지 않아 농산물의 수출입이 완전하게 자유경쟁 체제하에 놓인 WTO 체제하에서도 국제경쟁력을 갖춘 유망한 작목으로 평가되고 있다.

더구나 참다래가 주로 재배되고 있는 제주, 전남 및 경남 등 남해안 지역에서 황금작목으로 각광을 받아오던 감귤, 유자 등의 과수산업이 공급과잉과 수입 개방의 물결을 타고 가격 폭락으로 붕괴 직전에 이르고 있는데 반하여 참다래는 내수를 충당하기 어려울 만큼 공급이 부족하여 상당량의 과실을 수입하고 있는 실정이다. 따라서 참다래는 적절한 꽃썩음병 방제대책으로 충분한 참다래 생산이 이루어질 경우 수입 대체 효과가 크며, 과잉생산이 이루어지더라도 국제경쟁력이 높은 대표적인 과수이기 때문에 수출 작목으로 육성이 가능하여 감귤, 유자 등을 대체할 수 유망한 작목으로 평가되고 있어 지역 고소득 산업으로 육성할 합당한 가치를 부여할 수 있다.

최근 소비자의 인식의 변화에 따라 저공해, 저농약 농산물에 대한 선호 경향은 날로 증가하고 있어 고품질의 상품성에 환경친화성 및 식품안전성의 기능을 함께 지닌 참다래 생산기술 개발을 통한 기술적 우위 확보는 국가경쟁력을 제고시킴으로써 농산물의 대외 수출에도 일익을 담당할 것이므로 참다래 산업을 내수 뿐 만 아니라 수출용 산업으로 적극 육성하기 위하여 환경친화형 참다래 꽃썩음병 방제기술 개발이 시급하다.

3. 사회·문화적 측면

농약의 과다 사용은 환경 파괴와 많은 사회적 문제점을 야기 시키고 있다. 특히 청정한 먹거리를 추구하는 국민 의식의 변화에 따라 유기합성 농약의 사용은 지양되어야 마땅하다. 따라서 농약 사용을 최소화할 수 있는 저농약, 고효율의 화학적 방제 프로그램과 환경친화형 경종적 방제법을 체계화함으로써 불필요한 약제 살포나 과도한 약제 살포를 억제하여 참다래 재배자의 보건 증진에 기여하고, 저공해성 안전식품 생산으로 국민 건강 증진에 기여하기 위하여 환경친화형 참다래 꽃썩음병 방제기술의 실용화가 절실하게 요구되고 있다.

또한 참다래에서 꽃썩음병은 궤양병, 과실무름병과 함께 3대 주요병으로 꼽히고 있다. 그렇기 때문에 꽃썩음병을 중심으로 저농약, 고효율 참다래 주요병 방제체계가 확립이 되면 고품질, 환경친화적, 저농약 참다래의 생산이 증대될 것이다. 저공해 참다래에 대한 소비자의 선호는 소비 증대로 이어질 것이고 이에 따른 재배 농가의 생산 의욕 고취는 재배 농가에게 다양한

작목 선택의 폭을 넓혀 주어 의욕적인 영농 활동을 가능케 하여 안정적인 지역사회 유지를 위한 바탕을 제공할 수 있을 것이다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

본 연구팀이 연구 착수에 앞서 200여 참다래 재배 농가를 대상으로 한 설문조사에서 문제가 되는 참다래 병해로 궤양병의 피해가 가장 큰 것으로 조사된 바 있다. 그 다음으로 전체 응답자의 28%가 참다래 꽃썩음병이 문제가 된다고 답하였다. 그러나 최근 들어 궤양병에 대해서는 적절한 방제로 피해 사례가 없었으나 꽃썩음병에 대한 방제는 이루어지지 않아 심각한 병해로 대두되고 있었다.

2001년도의 경우, 개화기에 비가 잦았던 제주도와 전남지역에서는 60%이상의 발병률을 나타내었으며, 2002년도에는 전국적으로 대부분의 농가에서 50% 이상의 발병률을 나타내어 수확량이 크게 감소하여 효율적인 방제대책이 필요한 실정이다.

참다래 꽃썩음병은 꽃봉오리가 벌어질 무렵부터 발생하기 시작한다. 감염초기에는 꽃받침이 초코릿색으로 갈변하면서 위축되다가 꽃봉오리가 커지면서 흰색의 꽃잎이 노란색으로 변하게 되는데 이러한 현상은 꽃봉오리 안의 기관들이 썩어 짙은 갈색의 색깔이 배어 나오기 때문이다. 개화가 더 진행되면 감염된 꽃은 꽃받침이 뒤로 젖혀지지 않아 완전하게 개화되지 못하며 일반적으로 수술이나 화사가 황갈색으로 변하고 암술대가 위축되어 결국은 괴사하게 된다. 비교적 심하지 않게 감염된 경우라 하더라도 과실의 크기가 작게 되거나 기형과가 되게 하여 피해를 입힌다. 따라서 참다래 꽃썩음병은 꽃봉오리와 꽃에 직접 감염을 일으켜 낙화를 유도하여 결실률을 떨어뜨림으로써 수량감소를 직접적으로 일으킬 뿐만 아니라 결실이 된 과실에서도 기형과나 미숙과의 원인이 되기 때문에 참다래 품질을 떨어뜨려 재배농가에 막대한 수익감소를 일으킨다 (그림 1, 2 참조).



[그림 1] 참다래 꽃썩음병의 피해유형
(왼쪽: 정상화, 나머지: 이병화)



[그림 2] 꽃썩음병에 의한 과실피해증상
(왼쪽: 정상과실, 나머지: 이병과)

그러나 궤양병 등 다른 병해들이 참다래가 국내에서 재배된 지 수년이 경과한 후에 발생하기 시작했기 때문에 병 발생이나 피해를 재배자들이 체감적으로 느끼고 있는 것에 비해 꽃썩음병은 참다래 재배초기부터 꾸준히 발생하여 왔기 때문에 참다래 재배자들은 무의식 속에 꽃썩음병의 발생을 심각하게 생각하지 않고 매년 발생하는 통과의례처럼 당연한 것으로 받아들이고 방제노력을 경주하지 않는 경향이 있다.

이 병에 대한 관심이 소홀했던 또 다른 원인으로는 이 병이 주로 생식기관인 꽃에 감염되어 당해년도의 수확량에 영향을 줄 뿐 궤양병처럼 과수원을 폐원시킬 정도의 심각한 피해를 주지는 않는 점과 함께 강우 등의 환경 요인에 따라 영향을 받고 해에 따라 피해 정도가 다르므로 인해서 재배자가 지속적인 관심을 갖고 대처하지 못한 점도 원인이 될 것으로 생각된다.

참다래가 상업적으로 재배되기 시작한 시기를 1930년대로 알려져 있으므로 그 재배 역사가 다른 과수에 비해 짧음을 알 수 있다. 그러므로 참다래에 관한 한 앞서 언급한 대로 식물병의 문제가 없는 과수로 알려지기도 하였다. 그러나 그 후 참다래에서 꽃썩음병을 비롯하여 궤양병 등이 전 세계적으로 보고 되고 있어 참다래가 더 이상 무병과수가 아닌 상황이 되었으며 이들 두 식물병이 참다래 생산에 영향을 미치는 가장 큰 요인이 되고 있다.

참다래 꽃썩음병은 1973년 Wilkie 등에 의해 뉴질랜드에서 처음 보고되어 이 병의 원인균이 *Pseudomonas viridiflaxa*로 동정된 바 있다. 그러나 이 병이 처음 발견된 것은 이보다 몇 년 전인 것으로 알려지고 있다. 뉴질랜드 이외의 국가의 경우 일본에서는 1983년, 미국에서는 1986년, 이탈리아에서는 1988년 그 발생이 처음 보고 되고 있다. 꽃썩음병의 원인균에 대해서도 뉴질랜드에서 처음 *P. viridiflaxa*로 보고하였으나, 프랑스에서는 *P. viridiflaxa*와 함께 *P. syringae* pv. *syringae*를 꽃썩음병의 원인균이라는 보고가 있었고, 일본에서는 이들 두 세균과 함께 *P. marginalis*도 꽃썩음병에 관여되고 있다는 보고도 있을 정도로 현재 세계적으로 볼 때에도 이 분야에 대한 연구결과가 정립되어 있지 않은 실정이다.

국내에서는 다른 병해와는 달리 꽃썩음병에 관한 연구는 거의 이루어지지 않았으며, 본 연구팀에 의해 참다래 꽃썩음병을 일으키는 병원세균을 *P. syringae*로 동정한 것이 유일한 꽃썩음병에 관한 연구 보고일 뿐이며 참다래 꽃썩음병균의 정확한 증명 또는 pathovar에 관한 연구는 이루어지지 않았다. 또한 참다래에서 발생하는 또 다른 세균성 병해인 궤양병을 일으키는 병원세균인 *P. syringae* pv. *actinidiae*와 참다래 꽃썩음병균과의 유연관계나 참다래 식물체상에서 두 세균병의 상호 연관성 등에 관해서는 전혀 연구가 이루어지지 않았다.

더구나 참다래 꽃썩음병의 병원에 관한 기초 연구가 미진하기 때문에 꽃썩음병 진단 marker나 간이진단법에 관한 연구는 전무한 실정이다. 또한 참다래 꽃썩음병 전염원의 월동을 비롯하

여 침입, 감염 등 발생생태에 관한 연구도 아직 이루어지지 않았으며, 식물체나 포장에서 꽃썩음병균의 분포나 발생빈도 등을 monitoring할 수 있는 방법도 개발되지 않아 실질적인 참다래 꽃썩음병균 관리체계에 관한 연구는 지금까지 시도조차 되지 않은 실정이다.

한편 국내에서 등록되어 있는 참다래 꽃썩음병 예방약제는 아그리마이신 수화제와 농용신 수화제 뿐이어서 꽃썩음병을 효과적으로 예방하지 못하고 있으며, 약제 저항성 세균의 발생 상태 또한 불분명한 실정이다. 따라서 예방약제의 다원화가 절실한 실정이고, 예방적 차원의 약제 방제를 위한 꽃썩음병 방제적기나 최적 약제 살포횟수 등 합리적인 화학적 방제를 위한 기초 연구도 시급한 실정이다. 또한 참다래 재배시에 꽃썩음병 방제에 직접적으로 적용할 수 있는 환상박피, 비가림 재배 등의 경종적인 기술이 일본에서는 연구되어 있어 우리나라에서도 일부 재배자들이 활용하고 있으나 국내 참다래 재배 실정에 적합한 경종적인 시스템으로는 확립되어 있지 않은 실정이다.

제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

제 1 절 참다래 꽃썩음병균 특성 분석 및 monitoring 시스템 개발

1. 참다래 꽃썩음병균의 특성 분석

1) 병원균의 분류 및 동정

① 채집 및 발병율 조사

가. 재료 및 방법

2001년과 2002년에 국내의 참다래 주요 재배지역에서 개화기 무렵 (5월 20일 ~ 6월 3일)에 병원세균의 채집을 실시하였다. 꽃썩음병 발병율은 각 재배 지역별로 5 site를 지정하여 한 site 당 무작위로 200개의 꽃을 선발한 후, 꽃썩음병이 발생된 꽃을 선택하여 이를 백분율로 환산하였다.

나. 결과 및 고찰

참다래는 남해안 지역을 중심으로 1,400여 ha에 달하는 면적에서 재배되고 있다. 꽃썩음병은 강수에 따라 해마다 발병율에 다소 차이가 있지만 께양병, 과실무름병과 더불어 참다래 재배시 문제가 되고 있는 3대 질병 중의 하나이다.

2001년의 경우 표 1-1과 같이 경남지역에서는 꽃썩음병의 발병율이 5-15% 정도로 거의 나타나지 않았던 반면에 개화기에 비가 잦았던 제주도와 전라남도 지역에서는 모두 60% 이상의 발병률을 나타내었다. 2002년의 경우에는 개화기에 전국적으로 자주 비가 내려 개화기가 상대적으로 늦었던 해남군과 개화기 이전에 아그리마이신을 살포한 농가를 제외하고는 경남, 전남 구별 없이 거의 모든 농가에서 50%이상의 꽃썩음병 발병율을 나타내었다. 또한 비가림 재배를 한 경우가 노지 재배에 비해 상대적으로 꽃썩음병 발병율이 낮은 것으로 나타났으나 역시 50% 이상의 발병율을 나타내어 효율적인 방제대책이 시급한 것으로 나타났다. 그러나 개화시기에 강우량이 적은 2004년의 경우, 전국적으로 꽃썩음병 발병율이 10%대에 머물러 꽃썩음병의 발병이 강우와 아주 밀접한 관련이 있음을 확인할 수 있었다.

표 1-1. 채집지역에 따른 연도별 꽃색음병의 발병율

번호	채집지역	채집년도				비고
		2001		2002		
		발병율	강우량 ^a	발병율	강우량	
1	전남 해남군 삼산면	20.2		48.2		개화시기가 다른 곳보다
2	전남 해남군 옥천면	25.2	30	42.5	81	약 4인 정도 낮음
3	전남 보성군 득량면	63.2		53.3		
4	전남 보성군 조성면	84.5		71.8		
5	전남 보성군 벌교읍	50.5		68.5		
6	전남 고흥군 동강면	70.0		83.2		
7	전남 고흥군 대서면	67.5		79.0		
8	전남 고흥군 풍양면	66.2	48	82.0	113	
9	전남 고흥군 점암면	37.1		38.1		개화기 이전에 아그리마 이신을 2회 살포
10	전남 고흥군 두암면	60.1		78.8		
11	전남 광양시 옥곡면	42.0		53.0		
11	경남 통영시 산양면	5.0	49	50.1	133	비가림재배, 무농약재배
12	경남 통영시 도산면	10.0		67.1		방풍림
13	경남 고성군 하일면	15.0		54.7		비가림재배 농용신 살포
14	경남 고성군 하이면	10.0		65.2		
15	경남 사천시 송포농공단지	13.0		58.9		비가림재배
16	경남 하동군 양보면	15.0		45.1		
17	제주도 북제주군	80.0	109	75.0	125	
	평균	40.8		61.9		

a: 5월 강우량 (mm)

② 시험균주의 분리

가. 재료 및 방법

꽃썩음병이 발생되었거나 발병이 의심되는 조직을 saline buffer (0.85% NaCl)에 넣고 분쇄하여 peptone sucrose agar (PSA; peptone 20g, sucrose 20 g, agar 18 g/1L)에 도말한 후 20°C에서 배양하여 형성된 single colony를 분리하였다.

대조균 균주로 사용한 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*는 일본 Kyushu대학의 Matsuyama 교수로부터 분양 받아 사용하였으며, *P. syringae* pv. *maculicola*, *P. pv. morsprunorum*, *P. syringae* pv. *tabaci*는 독일의 DSMZ에서 분양 받아 사용하였다. 모든 균주들은 PSA plate에 접종하여 20°C 항온기에서 배양하였으며, 장기보존을 위하여 30% glycerol stock을 만들어 -70°C deep freezer에 저장하며 사용하였다.

나. 결과 및 고찰

2001년도와 2002년도 개화기에 채집된 sample에서 100개의 균주를 분리한 후 다음 실험에 사용하였다. 표 1-2에 지역별로 분리된 균주를 나타내었다.

표 1-2. 채집지역에 따른 분리균주 목록

채집지역	분리균주	균주수
전남 해남군 삼산면	HSS1, HSS3, HSS4, HSS5, HSS6, HSS7, HSS8	8
전남 해남군 옥천면	HOY1, HOY2, HOY3, HOY4	4
전남 보성군 득량면	BDR1, BDR2, BDR3, BDR4, BDR5, BDR7	6
전남 보성군 조성면	BJB1, BJB2, BJB3, BJB4, BJB5, BJB6, BJB7	7
전남 보성군 벌교읍	BBK1, BBK2, BBK3, BBK5, BBK6	5
전남 고흥군 동강면	KDK1, KDK2, KDK3, KDK4, KDK5, KDK6, KDK7, KDK8, KHP7	9
전남 고흥군 대서면	KDS1, KDS2, KDS3, KDS4	4
전남 고흥군 점암면	KJA1, KJA3, KJA2, KJA5, KJA6	5
전남 고흥군 두암면	KDA1, KDA2, KDA3, KDA4	4
전남 순천시 서면	SCS1, SCS2, SCS3, SCS4, SCS5	5
경남 통영시 도산면	TDS1, TDS2, TDS3, TDS4, TKS1, TKS2, TKS3, TKS4, TKS5, TKS7, TKS8	11
경남 사천시 서포면	SSB1, SSB2, SSB3, SSB4, SSB5, SSB6, SSB7, SSB8	8
경남 남해군 이동면	NYD1, NYD2, NYD3, NYH1, NYH2, NYH3, NYH4, NYH6, NYH7	9
경남 남해군 남해읍	NNH1, NNH2, NNH3, NNH4, NNH5, NNH6, NNH7	7
경남 하동군 진교면	HJD1, HJD2, HJD3, HJD4	4
경남 하동군 양보면	HYT1, HYT2, HYT3, HYT4	4
	합 계	100

③ 분리균주의 생리·생화학적 방법을 사용한 동정

분리된 균주는 Schaad 등(2001)의 생리·생화학적 동정 방법에 따라 동정하였다.

가. 실험재료 및 방법

㉠ King's B agar에서의 형광성

각 균주들은 King's B agar (proteose peptone 20g, K_2HPO_4 1.5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.5 g, glycerol 15ml, agar 15 g/1L)에 도말하여 26°C에서 24-48시간 배양한 후 자외선 아래에서 blue-green의 형광을 내는지 여부를 확인하였다.

㉡ LOPAT test

Levan production : 5% (w/v)의 sucrose가 첨가된 nutrient agar에 균주들을 접종하여 27°C에서 3-5일간 배양한 후, white mucoid colony가 생성되는지 여부를 관찰하였다.

Oxidase activity : 1% (w/v)의 glucose가 첨가된 nutrient agar에 접종한 균주들을 27°C에서 24시간 배양한 후, 1% tetramethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride 용액으로 적신 여과지에 배양된 균주를 문질러서 색의 변화유무를 관찰하였다. 1분 이내에 보라색을 나타내면 positive, 변화가 없으면 negative로 나타내었다.

Potato soft rot : 감자를 7-8 mm 두께로 잘라 5.25% sodium hypochlorite 용액에 10분간 침수시킨 후, 30분간 실온에서 건조시켰다. Petridish에 filter paper를 놓아 멸균수로 적셔 감자를 놓고 중심부에 3-4mm 정도의 홈을 만들었다. 24시간동안 nutrient glucose agar에 배양한 10^8 cfu/ml의 세균배양액을 접종한 후, 20°C에서 48시간동안 배양하여 관찰하였다. 접종한 가장자리가 무르게 되면 positive, 변화가 없으면 negative로 나타내었다.

Arginine dehydrolase activity : 시험관에 담긴 Thomley's 2A agar (peptone 1g, NaCl 5g, K_2HPO_4 0.3 g, agar 3 g, phenol red 0.01 g, arginine HCl 10 g/1L, pH 7.2)에 접종하여 vaseline을 녹여 부은 후, 27°C에서 4일간 배양하여 관찰하였다. 붉은색으로 변색이 되면 positive, 변화가 없으면 negative로 나타내었다.

㉢ GATTa test

Gelatine liquefaction: Gelatin (12%, w/v)이 첨가된 PS media에 균주를 접종한 후 20°C에서 7일간 배양한 후 4°C에 30분간 두어 배지가 굳으면 positive, 배지가 굳지 않으면 negative로 나타내었다.

Aesculin hydrolysis: Aesculin (0.1%, w/v)이 첨가된 PSA plate에 균주를 접종 한 후 25°C에서 3일간 배양하여 관찰하였다. 흑갈색으로 변색되면 positive, 변화가 없으면 negative로 나타내었다.

Tyrosinase activity: Tyrosine (0.1%, w/v)이 첨가된 PSA plate에 단 콜로니를 접종한 후 25°C에서 3일간 배양하여 clear zone이 생기면 positive, 생기지 않으면 negative로 나타내었다.

Tartrate utilization: 0.2%의 tartrate가 첨가된 Simmon's basic agar (NaCl 5 g, K₂HPO₄ 1 g, (NH₄)₂HPO₄ 1 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g, bromthymol blue 0.08 g/L, pH 6.9±0.2)에 접종한 후 25°C에서 배양하여 관찰하였다. 배지가 푸른색으로 변색되면 positive, 변화가 없으면 negative로 나타내었다.

나. 결과 및 고찰

참다래 꽃썩음병의 병원세균은 뉴질랜드에서 Young 등 (1988)에 의해 *P. viridiflava*로 동정 보고 된 반면 프랑스와 미국에서는 *P. viridiflava* 뿐만 아니라 *P. syringae* pv. *syringae*도 보고 되었다 (Luisetti와 Gagnard, 1987; Conn과 Gubler, 1993). 또한 일본에서는 *P. syringae* 뿐만 아니라 *P. viridiflava*와 *P. maginialis*도 꽃썩음병을 일으킨다고 보고하였다 (眞子, 1987; 丹原, 1988; 牛山, 1990).

국내의 참다래 꽃썩음병만으로부터 분리된 균주들을 Schaad (2001)의 방법에 따라 동정한 결과 대부분이 gram 음성균 이었으며 크립색의 콜로니를 형성하였다. 대부분이 King's medium B에서 강한 형광을 나타내어 *Pseudomonas*속 세균으로 동정되었다. 이들의 생리생화학적 특성을 알기 위해 LOPAT test와 GATTa test를 수행하였다 (Latorre와 Jones, 1979, 그림 1-1, 표 1-3).

분리된 균주들을 특성에 따라 7개의 group으로 나눌 수 있었으며, 각 group에 속한 균주들은 표 1-4에 나타내었다. 가장 많은 균이 속한 Group I의 경우 모든 test 결과가 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*와 동일하였다.

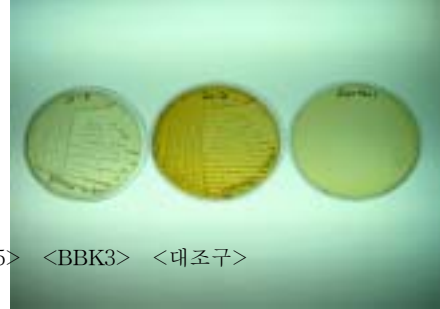
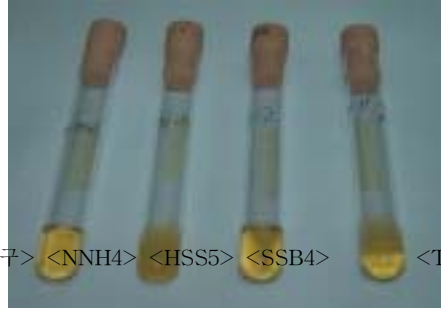
④ 분자생물학적 방법을 이용한 동정.

가. 실험재료 및 방법

생리·생화학적 test 결과에 의해 grouping된 분리 균주를 대상으로 병원성 테스트를 한 결과 병원성이 확인된 group I 과 VII의 세균을 실험에 사용하였다. Group I에서는 BBK3, KHP7, TDS2, SSB2 그리고 group VIII에서는 KDK8, SSB8을 선발하였고 이들의 16S rRNA 유전자와

A

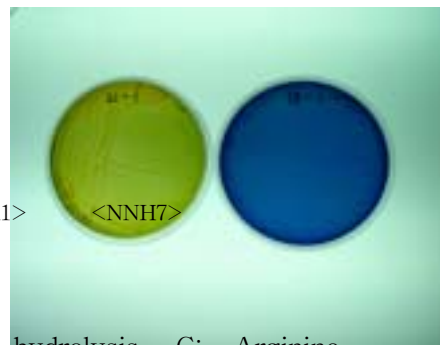
B



<대조구> <NNH4> <HSS5> <SSB4> <TDK5> <BBK3> <대조구>

C

D



<대조구> <HOY1> <SSB4> <BJB7> <KJA1>

그림. 1-1. 분리된 세균에 대한 생리생화학적 실험

A: Gelatin liquefaction, B: Aesculin hydrolysis, C: Arginine hydrolysis, D: Tartrate utilization

표 1-3. *P. syringae* pv. *syringae*와 참다래 꽃썩음병반에서 분리한 세균들의 특성 비교

Group	G ^a	K	L	O	P	A ^a	G ^b	A ^b	T	Ta
I	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+
II	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
III	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
IV	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
V	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+
VI	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>P. s. pv. syringae</i>	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+

G^a : gram stain, K : fluoresced green under UV light on KB, L : levan formation test, O : oxidase test, P : potato soft rot test, A^a : arginine dihydrolase test G^b : gelatin liquefaction test, A^b : aesculin hydrolysis test, T : tyrosinase activity test, Ta : tartrate utilization test

표 1-4. 생리·생화학적 실험 결과에 의한 참다래 꽃썩음병반에서 분리한 세균들의 그룹화

그룹	균주의 이름	총 수
I	BBK3, BBK5, BDR1, BJB2, BJB3, BJB4, HOY1, HSS1, HSS3, HSS7, HJD1, HJD2, KHP7, KDK1, KJA1, KJA3, KJA5, KJA6, SCS1, SCS2, SCS3, SCS4, TDS1, TDC2, TDC3, TDC4, TKS2, TKS3, TKS4, TKS7, SSB2, SSB3, SSB5, SSB7, NNH2, NNH3, NNH4, NYH3, NYH7, HYT1, HSS6,	41
II	HSS4, HSS5, BDR2, BDR3, BDR4, BDR5, TKS1, TKS8	8
III	TKS5, SSB1, SSB4, SSB6, NYD1, NYD2, NYD3, NYH1, NYH2	9
IV	HSS8, HOY2, HOY3, HOY4, BDR7, BJB1, BJB5, BJR6, BJB7, BBK1, BBK2, BBK6, BDR7, KDK2, KDK3, KDK4, KDK5, KDK7, KDS1, KDS3, KDS4	21
V	KDK6, KDS4, KDA1, KDA2, KDA3, KJA2, SCS5, NYH4, NYH6, NNH1, NNH5, NNH6, NNH7, HJD3, HJD4	15
VI	KDA4, HYT2, HYT3, HYT4	4
VII	KDK8, SSB8	2
	total number	100

intergenic spacer region의 염기서열을 분석하였다.

㉠ Primer의 제조

꽃썩음병원균들의 16S rDNA를 증폭시키기 위하여 진정세균에서 conserve되어 있는 염기서열의 5'과 3' 말단부위에서 primer를 선택하였다 (Marchesi 등, 1998). 또한 16S rDNA의 염기서열 분석을 위해 이미 밝혀진 *Pseudomonas*속의 16S rDNA의 염기서열 중 conserve되어 있는 부위를 선택하여 염기서열 분석용 primer P16S를 제작하였다. ITS region을 증폭하기 위한 primer는 16S rDNA에서 forward primer를, 23S rDNA에서 reverse primer를 설계하였다 (Louws 등, 1994). primer의 염기서열과 PCR product의 예상된 크기는 표 1-5에 나타내었다.

표 1-5. 실험에 사용한 primer들의 염기서열

이름	염기서열 (5' → 3')	관련 유전자	예상된 크기	참고문헌
27r	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	<i>rrs</i>	1.5 kb	Marchesi 등, 1998
1428f	TCACACAGGAAACAGCTATGAC			
P16S-1	ATGCAAGCGTTAATCGGAAT	<i>rrs</i>	-	this study
P16S-2	CCAACATCTCACCACACGAG			
ITS-F	GAGTTTGATCATGGCTCAG	ITS	0.6 kb	Louws 등, 1994
ITS-R	TTGCGGGACTTAACCCAACAT			

㉡ 16S rDNA 와 ITS의 증폭

PCR을 위한 template DNA를 얻기 위하여 single colony를 100 μ l의 0.1% chelex-100 (Bio-rad) 용액에 넣어 현탁 시킨 후 끓는 물에서 5분간 끓여 원심분리 하였다. PCR 반응액은 1 μ l의 template DNA, 0.25 M의 primer, 각각 200 M의 deoxyribonucleic acid, 1.5 mM의 MgCl₂, 2.5 μ l의 10 \times buffer (100 mM Tris-HCl, 25 mM MgCl₂, 500 mM KCl, pH 8.3), 1.25 unit의 *Taq* DNA polymerase (Takara)를 포함하여, 멸균증류수로 총 부피를 25 μ l가 되게 조절하였다. PCR 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 초기 denaturation을 행한 뒤, 94 $^{\circ}$ C에서 30초간 denaturation, 55 $^{\circ}$ C에서 30초간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 30초간 extension과정을 35회 반복하였다. 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 반응시켰다.

㉢ 16S rDNA 와 ITS의 염기서열 분석

각 균주에 대한 PCR 산물은 AccuPrep™ PCR purification kit (Bioneer)를 이용하여 정제하였다. PCR 반응산물에 5배 부피의 PB buffer 넣고 잘 섞어 binding column tube에 옮긴 후 4°C의 10,000 xg에서 1분간 원심분리 하였다. column을 통과한 여과액을 버리고 다시 tube에 장착하여 750 μ l의 W buffer(12 ml W concentrate, 48 ml absolute ethanol)를 넣은 뒤 원심분리 하였다. 여과액을 버리고 2분간 원심분리한 후, column을 새로운 1.5 ml microcentrifuge tube로 옮겨 SpinVac을 이용하여 1분간 진공 건조시켰다. 20 μ l의 E buffer를 넣고 실온에서 2분간 반응시킨 후 원심분리 하여 얻어진 여과액을 염기서열 분석에 이용하였다. 염기서열 분석은 ALF-Express automatic sequencer (Pharmacia Biotech, Lyon, France)를 이용하였고, 염기서열의 상동성은 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) program을 이용하여 분석하였다.

나. 결과 및 고찰

㉠ 16S rDNA의 염기서열 분석

16S rRNA 유전자를 증폭시킨 후 얻어진 PCR 산물을 정제하여 염기서열 분석에 사용하였다. BBK3, KHP7, TDS2 그리고 SSB2의 16S rDNA의 염기서열 중 1,462 bp를 분석한 결과 모두 *P. syringae* pv. *syringae* FG11, *P. syringae* pv. *phaseolicola*, pv. *glycinea*, pv. *myrice*, *erobotryae*, pv. *mori*, pv. *syringae*, pv. *tagetis*, *Pseudomonas coronafaciens* 순으로 98%의 상동성을 나타내었다 (그림 1-2). 또한 국내 분리균주들 사이에는 BBK3, SSB2, TDS2는 100% 동일하였으며, KHP7은 이들과 1bp의 차이가 나타나 99.9%의 상동성을 나타내 16S rDNA내에서 유전자 변이는 거의 없는 것으로 나타났다. 일반적으로 *P. syringae*의 16S rDNA는 pathovar 수준에서 대부분 98%의 상동성을 가지고 있어 16S rDNA만을 가지고 유전적 유연관계를 파악하는 것은 불가능하여 다음 단계로 ITS의 염기서열을 분석하였다.

KDK8과 SSB8의 경우, *P. fluorescense*와 1,462 bp 중 5~6bp의 차이를 보여 99%의 높은 상동성을 나타내었다. 국내에서 분리한 그룹 VII의 16S rDNA 염기서열을 그림 1-3에 나타내었다.

㉡ 16S-23S spacer region의 염기서열 분석

각 균주의 ITS region을 PCR을 통해 증폭시킨 후 얻어진 산물을 정제하여 염기서열을 결정하였다. group I 에 속한 4개의 균주의 경우, ITS region (그림 1-4)의 610bp에 대한 상동성을 분석한 결과, BBK3, TDS2, SSB2는 100% 동일

하였으며 KHP7은 이들과 1 bp의 차이를 나타내어 국내에서 분리한 균주들 사이에서는 ITS region내에서의 유전적 변이가 거의 없는 것으로 나타났다. *P. syringae* pv. *syringae* strain 61과는 4 bp와 5bp의 차이를 나타내어 99%의 상동성을 나타내었고, pv. *apata*, pv. *garcae*, pv. *maculicola*, pv. *porri*와 각각 97%, *P. syringae* pv. *apii*와는 96%가 일치하는 것으로 나타났다.

KDK8과 SSB8의 ITS region은 511 bp가 100% 동일하였으며 *P. fluorescense* 와 3-4bp의 차이를 보여 99%의 상동성을 나타내었고, *P. tolaasii* LMG 2342와 98%의 상동성을 나타내었다 (그림 1-5).

```

BBK3 1 GGGTTGAACG CTGGCGGCAG GCCTAACACA TGCAAGTCGA GCGGCAGCAC GGGTACTTGT
KHP7  .....
FG11 .....
61 ACCTGGTGGC GAGCGGCGGA CGGGTGAGTA ATGCCTAGGA ATCTGCCTGG TAGTGGGGGA
.....
121TAACGCTCGG AAACGGACGC TAATACCGCA TACGTCCTAC GGGAGAAAGC AGGGGACCTT
.....
181CGGGCCTTGC GCTATCAGAT GAGCCTAGGT CGGATTAGCT AATTGGTGAG GTAATGGCTC
.....
241ACCAAGGCGA CGATCCGTAA CTGGTCTGAG AGGATGATCA CCCAACACTG GAACTGAGAC
.....
301ACGGTCCACA CTCCTACGGT GAGGCACCAG TGGGGAATAT TGGACAATGG GCGAAAGCCT
.....
361GATCCAGCCA TGCCGCATGT GTGAAGAAGG TCTTCGGATT GTAAAGCACT TTAAGTTGGG
.....
421AGGAAGGGCA GTTACCTAAT ACGTGAAGTGT TTTGACGTTA CCGACAGAAT AACCACCGGC
.....
481TAACCTCTGTG CCACCAGCCG CGGTAATACA GAGGGTGCAA GCGTTAATCG GAATTACTGG
.....
541GCGTAAAGCG CGCGTAGGTG GTTTGTTAAG TTGAATGTGA AATCCCCGGG CTCAACCTGG
.....
601GAACTGCATC CAAAACCTGGC AAGCTAGAGT ATGGTAGAGG GTGGTGGAAT TTCCTGTGTA
.....

```

(그림 1-2, 계속)


```

661 GCGGTGAAAT GCGTAGATAT AGGAAGGAAC ACCAGTGGCG AAGGCGACCA CCTGGA CTGA
.....
.....
.....A.....
721 TACTGACACT GAGGTGCGAA AGCGTGGGA GCAAACAGGA TTAGATACCC TGGTAGTCCA
.....
.....
.....A.....
781 CGCCGTAAAC GATGTCAACT AGCCGTTGGG AGCCTTGAGC TCTTAGTGGC GCAGCTAACG
.....
.....
.....
841 CATTAAGTTG ACCGCCTGGG GAGTACGGCC GCAAGGTTAA AACTCAAATG AATTGACGGG
.....
.....
.....T.....
.....A.....
901 GGCCCGCACA AGCGGTGGAG CATGTGGTTF AATTCGAAGC AACCGAAGA ACCTTACCAG
.....
.....
.....
961 GCCTTGACAT CCAATGAACT TTCCAGAGAT GGATTGGTGC CTCGGGAACA TTGAGCACAG
.....
.....
.....
1021 GTGCCTGCAT GGCTGTCGTC AGCTCGTGTG GTGAGATGTT GGGTTAAGTC CCGTAACGAG
.....
.....
.....
1081 CGCAACCCTT GTCCTTAGTT ACCAGCACAT TATGGTGGGC ACTCTAAGGA GACTGCCGGT
.....
.....
.....G.....G.....
1141 GACAAACCGG AGGAAGGTGG GGATGACGTC AAGTCATCAT GGCCCTTACG GCCTGGGCTA
.....
.....
.....
1201 CACACGTGCT ACAATGGTCG GTACAGAGGG TTGCCAAGCC GCGAGGTGGA GCTAATCTCA
.....
.....
.....
1261 CAAAACCGAT CGTAGTCCGG ATCGCAGTCT GCAACTCGAC TGCGTGAAGT CGGAATCGCT
.....
.....
.....
1321 AGTAATCGCG AATCAGAAATG TCGCGGTGAA TACGTTCCCG GGCCTTGTAC ACACCGCCCG
.....
.....
.....
1381 TCACACCATG GGAGTGGGTT GCACCAGAAG TAGCTAGTCT AACCTCGGGG GGACGGTTAC
.....
.....
.....A.....
1441 CACGGTGTGA TTCATGACTG GG
.....
.....
.....

```

그림 1-2. 국내에서 분리한 *Pseudomonas* sp. strains BBK3, TDS2와 *P. syringae* pv. *syringae* FG11의 16S rRNA 유전자의 염기서열 비교

KDK8 1 AGGCCTAACA CATGCAAGTC GAGCGGTAGA GAGAAGCTTG CTTCTCTTGA GAGAGGCGGA
SSB8
D8401
61 CGGGTGAGTA AAGCCTAGGA ATCTGCCTGG TAGTGGGGGA TAACGTTCCG AAACGGACGC
.....
.....
121 TAATACCGCA TACGTCCTAC GGGAGAAAGC AGGGGACCTT CGGGCCTTGC GCTATCAGAT
.....
.....
181 GAGCCTAGGT CGGATTAGCT AGTTGGTGAG GTAATGGCTC ACCAAGGCGA CGATCCGTAA
.....
.....
241 CTGGTCTGAG AGGATGATCA ATCACACTGG AACTGAGACA CGGTCCAGAC TCCTACGGGA
.....
..... G
301 GGCAGCAGTG GGGAAATATTG GACAATGGGC GAAAGCCTGA TCCAGCCATG CCGCGTGTGT
.....
.....
361 GAAGAAGGTC TTCGATTGT AAAGCACTTT AAGTTGGGAG GAAGGCATT AACCTAATAC
.....
..... G
..... G·G
421 GTTAGTGT TTGACGTTACC GACAGAATAA GCACCGGCTA ACTCTGTGCC AGCAGCCGCG
.....
.....
481 GTAATACAGA GGGTGCAAGC GTTAATCGGA ATTACTGGGC GTAAAGCGCG CGTAGGTGGG
.....
.....
541 TTGTTAAGTG GGATGTGAAA TCCCCGGGCT CAACCTGGGA ACTGCATTCA AAACCTGACTG
.....
.....
601 ACTAGAGTAT GGTAGAGGGT GGTGGAATTT CCTGTGTAGC GGTGAAATGC GTAGATATAG
.....
.....
661 GAAGGAACAC CAGTGGCGAA GCGACCACC TGGACTAATA CTGACTGA GGTGCGAAAG
.....
.....
721 CGTGGGGAGC AAACAGGATT AGATACCCTG GTAGTCCACG CCGTAAACGA TGTCAACTAG
.....
.....

(그림 1-3, 계속)

```

781 CCGTTGGGAG CCTTGAGCTC TTAGTGGCGC AGCTAACGCA TTAAGTTGAC CGCCTGGGGA
.....
.....
841 GTACGGCCGC AAGGTTAAAA CTCAAATGAA TTGACGGGGG CCCGCACAAG CGGTGGAGCA
.....
.....
901 TGTGGTTTAA TTCGAAGCAA CGCGAAGAAC CTTACCAGGC CTTGACATCC AATGAACTTT
.....G.....C.....
.....G.....T.....
961 CTAGAGATAG ATTGGTGCCT TCGGGAACAT TGAGACAGGT GCTGCATGGC TGTCGTCAGC
.....
.....
1021 TCGTGTCTGT AGATGTTGGG TTAAGTCCCG TAACGAGCGC AACCTTGTC CTTAGTTACC
.....
.....
1081 AGCACGTAAT GGTGGGCACT CTAAGGAGAC TGCCGGTGAC AAACCGGAGG AAGGTGGGGA
.....
.....
1141 TGACGCAAG TCATCATGGC CCTTACGGCC TGGGCTACAC ACGTGCTACA ATGGTCCGTA
.....
.....
1201 CAGAGGGTTG CCAAGCCGCG AGGTGGAGCT AATCCACAA AACCGATCGT AGTCCGGATC
.....T.....
.....
1261 GCAGTCTGCA ACTCGACTGC GTGAAGTCGG ATCGCTAGTA AATCGCGAAT CAGAATGTGG
.....
.....
1321 CGGTGAATAC GTTCCCGGGC CTTGTACACA CCGCCCGTCA CACCATGGGA GTGGGTTGCA
.....
.....
1381 CCAGAAGTAG CTAGTCTAAA CTTCGGGAGG GCGGTTACCA CGGTGTGATT CATGACTGGG
.....C.....
.....
1441 GTGAAGTCGT AACAAGGTAG CC
.....
.....

```

그림 1-3. 국내에서 분리한 *Pseudomonas* sp. strains KDK8, SSB8과 *P. fluorescense* D8401의 16S rRNA 유전자의 염기서열 비교

```

BBK3 1 AGTTTCGGGG GACGGGGAGC GTGCGGTAGG GGGGACGGAG CTCGGGCGTG GCGGGCCGGT
KHP7  .....
S 61  .....
61 AGGTCGGCCC CGGCAGCGGA CGTTTCGTTG GGTTCGGTG GAGGACGGAC CGACGTAGAG
.....
.....A..
121 GCAGCGCCCG ACTTCGGGTC TGTAGCTCAG TTGGTTAGAG CGCACCCCTG ATAAGGGTGA
.....
.....G.....
181 GGTCCGCAGT TCGAATCTGC CCAGACCCAC CAGTTTACTG GGGAGATAGC TGGTCAGAGT
.....
.....T.....
241 AGACGCCTCC ACGGTATGTA GAAATACGGG GCCATAGCTC AGCTGGGAGA GGCCTGCCT
.....
.....
301 TGCACGCAGG AGGTCAGCGG TTCGATCCCG CTGGCTCCA CCACTTACTG CTTCTGTTTG
.....
.....
361 AAAGCTTAGA AATGAGCATT CCACCTGCA AAACAAAGGG TCGTGAATG TTGATTTCTA
.....
.....T.....
.....T.....
421 GTCTTTGATT AGATCGTTCT TAAAAAATTT GGTATGTGA TAGAAAGAAA TATAGACCGG
.....
.....T.....
481 GCACCTCTTT CACTGGTGTG TGTCGGGCT AAGGTAAAGT TTGTGAATGC AAACTTTCGG
.....
.....
541 CGAATGTCGT CTTACAGTA TAACCAGATT GCTTGGGGT TATATTGCA AGGGAAGAAG
.....
.....
601 GCGGCATGAC
.....
.....

```

그림 1-4. 국내에서 분리한 *P. syringae* pv. *syringae* TDS2, KHP7과 *P. syringae* pv. *syringae* strain 61 (S61)의 16S-23S intergenic spacer region의 염기서열 비교

```

KDK8 1 AATCGACGAC ATCAGCTGCT CCATGAGTTC CCACACGAAT TGCTTGATTG ATTGAAGAAG
Pf 1  .....
Pf 2  .....
61 ACGAAAGAAG CAGCCCGAAA TTGGGTCTGT AGCTCAGTTG GTTAGAGCGC ACCCCTGATA
.....
121 AGGGTGAGGT CGGCAGTTCG AATCTGCCCA GACCCACCAA TTTTGTGTGG GAAACGCCTG
.....
181 TAGAATACGG GGCCATAGCT CAGCTGGGGA GAGCGCCTGC CTTGCACGCA GGAGGTCAAC
.....
241 GGTTTCGATCC CGTTTGGCTC CACCACTACT GCTTCTGTTG TATAAAGCTT AGAAATGAGC
.....
301 ATTCCATCGT TGTGATGGTG AATGTTGATT TCTAGTCTTT GACTAGTTCG TTCTTTAAAA
.....T .....
.....G .....
361 ATTTGGGTAT GTGATAGAAA GATAGACTGA ACGTTACTTT CACTGGTAAC GGATCAGGCT
.....
421 AAGGTAAAAT TTGTGAGTTC TCTTAAGTCA GAATTCCAAT TTTCGGCGAA TGTCGTCTTC
.....C·G· .....A .....
.....C·G· .....T .....
481 ACAGTATAAC CAGATTGCTT GGGGTTATAT G
.....
.....

```

그림 1-5. 국내에서 분리한 *Pseudomonas* sp. KDK8와 *P. fluorescense*들 (*Pf* 1, *Pf* 2)의 16S-23S intergenic spacer region의 염기서열 비교

생리·생화학적 실험과 16S rDNA와 ITS의 염기서열 분석결과를 종합해 보면 group I에 속한 균은 *P. syringae* pv. *syringae*로 그리고 group VII은 *P. fluorescense*로 동정되었다.

지금까지 참다래 꽃썩음병원균은 전 세계적으로 *P. syringae* pv. *syringae*가 보고 되고 있으며, 이외에 *P. viridiflaxa*와 *P. marginalis* 등이 보고 된 바 있다. 그러나 *P. fluorescense*는 아직까지 원인균으로 보고 된 바 없다. 따라서 지금까지 꽃썩음병원균으로 밝혀진 세균들과 *P. fluorescense*가 다른 종임을 정확히 구명하기 위해 *P. viridiflaxa* 및 *P. marginalis*와 구별되는 sorbitol, trehalose, sucrose, D-arabinose에 대한 탄소 이용능을 비교 실험하였다.

대조균 균주로는 국내의 참다래에서 분리한 *P. marginalis* BJW1과 독일의 DSMZ에서 분양 받은 *P. viridiflaxa* 및 *P. fluorescense*를 사용하였다. 예상한 바와 같이 group VII에 속한

KDK8과 SSB8은 *P. fluorescense*와 동일한 양상을 보였으며 *P. viridiflaxa* 및 *P. marginalis*와는 전혀 다른 결과를 나타내었다 (표 1-6).

병원성 test, 생리·생화학적 실험과 16S rDNA와 ITS의 염기서열 분석결과를 종합하여 국내에서 참다래 꽃썩음병을 일으키는 원인균으로는 *P. syringae* pv. *syringae*와 *P. fluorescense*임을 확인할 수 있었다.

표 1-6. 탄소원 이용능 확인 실험

탄소원	균주명 KDK8	SSB8	<i>P. fluorescense</i> (DSMZ)	<i>P. viridiflaxa</i> (DSMZ)	<i>P. marginalis</i> (BJWI)	<i>Ps</i> pv. <i>syringae</i> (HSJA1)
sorbitol	+	+	+	+	+	+
trehalose	+	+	+	-	+	-
sucrose	+	+	+	-	+	+
D-arabinose	+	+	+	-	-	-

2. 병원균의 병원성 검정 및 기주범위 조사

가. 실험재료 및 방법

㉠ 실험실에서 개화 초기의 건전화를 이용한 병원성 검정

개화기 초기에 건전화를 채취하여 실험에 사용하였다. Petri-dish에 멸균증류수로 적신 멸균 여과지를 깔고, 그 위에 slide glass를 놓은 뒤 건전화를 놓고 0.1ml의 세균 현탁액 (1×10^7 cfu/ml)을 주입하였다. Petri-dish를 parafilm으로 밀봉시킨 뒤, 25°C에서 3일간 관찰하였다. 대조군은 꽃봉오리에 멸균증류수를 접종하였으며 꽃봉오리의 주요부분이 갈색이 되거나 썩었을 경우를 병원성이 있는 것으로 보았다.

㉡ 포장에서의 병원성 검정

Young 등 (1997)의 방법을 변형하여 실험하였다. 세균배양액을 1×10^7 cfu/ml로 희석한 후 한 줄기에서 개화기 초기의 2-3개의 꽃봉오리를 선택하여 micropipet을 이용하여 100 μ l씩을 주입하였다 (그림 1-6). 감염된 부위를 24시간 동안 아래쪽에 구멍이 뚫린 plastic bag으로 씌운 후 bag을 제거하였으며 1주, 2주, 4주 간격으로 병원성 여부를 관찰하였다.



그림 1-6. 포장에서 병원성 검정을 하기위해 균을 접종하는 모습

나. 결과 및 고찰

참다래 꽃썩음병반으로부터 분리한 균주들의 병원성을 조사한 결과 group I과 group VII에 속한 세균들만이 꽃잎과 암술을 갈변시키는 등의 병징을 나타내었고 다른 group은 병징이 나타나지 않았다.

특히 group I과 group VII의 병징이 뚜렷한 차이를 나타내었다. 먼저 실험실에서 병원세균을 접종하여 병원성을 검정한 결과 group I에 속한 TDS2의 경우는 그림 1-7. A와 같이 암술을 제외한 수술과 꽃잎이 썩어 검은색을 나타낸 반면 group VII에 속한 KDK8의 경우는 그림 1-7. B에 제시한 바와 같이 암술, 꽃잎 뿐 만 아니라 수술도 썩어 모두 흑갈색을 띄었다.

(A)

(B)

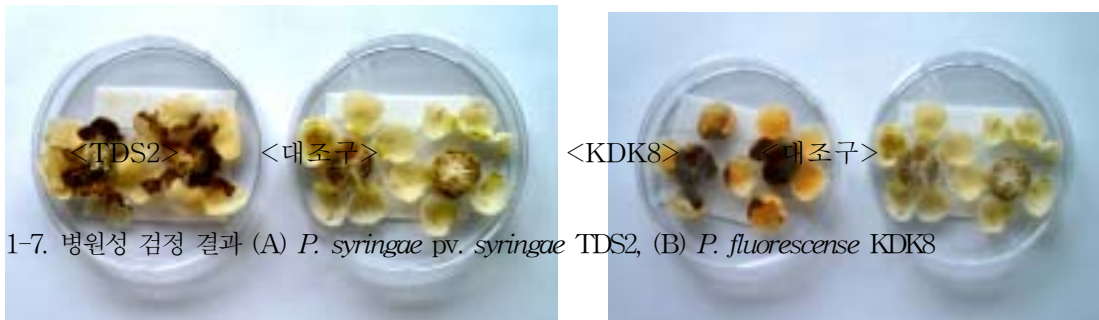


그림 1-7. 병원성 검정 결과 (A) *P. syringae* pv. *syringae* TDS2, (B) *P. fluorescense* KDK8

또한 포장에서 병원성검정을 한 결과, TDS2는 접종 1주일 후 꽃이 개화가 되면서 수술부위가 검게 변한 뒤에 2주까지 지속되다가 4주 후에는 기형과가 생기거나 열매가 떨어졌다 (그림 1-8). KDK8는 접종 1주일 후 개화가 되지 않고 바로 땅으로 떨어지거나 또는 암술과 수술 모두 검게 변한 후 2주에서 4주 사이에 모두 나무에서 떨어졌다 (그림 1-9).

앞에서 이들 균을 동정한 결과 국내에서 참다래 꽃썩음병을 일으키는 group I은 *P. syringae* pv. *syringae*이고, group VII는 *P. fluorescense*였다. Group I의 경우 병반에서 분리된 100개의 세균 군집 중 41개가 이에 속하였으나, group VII의 경우는 겨우 2개가 분리되어 일반적으로 참다래 꽃썩음병원균이 *P. syringae* pv. *syringae*라고 알려진 것과 무관하지 않을 것으로 생각된다.

국내에서 분리된 참다래 꽃썩음병의 원인이 되는 세균은 *P. syringae* pv. *syringae*와 *P. fluorescense*로 2종류이며 참다래 꽃에 일으키는 증상에 뚜렷한 차이가 있음을 확인할 수 있었다.



그림 1-8. 국내에서 분리한 *P. syringae* pv. *syringae* TDS2의 병원성 검정



그림 1-9. 국내에서 분리한 *P. fluorescens* KDK8의 병원성 검정

3. 병원균의 병원성 유전자 분석

가. 재료 및 방법

*Pseudomonas syringae*는 병원성을 나타내는 식물에 따라 57종류의 pathovar로 나뉘어 지며 (Gardan 등, 1997), lipodepsipeptides (syringomycin, syringopeptin), phaseolotoxin, coronatine, tabtoxin 등과 같은 다양한 독소를 각기 생산하는 것으로 알려져 있다 (Bender 등, 1999). 여러 실험을 통해 국내에서 분리한 참다래 꽃썩음병 원인균들도 독소를 생산하는 것으로 생각되어 독소 생합성 유전자의 종류와 세포내에서의 위치를 파악하기 위해 PCR 및 Southern hybridization을 수행하였다.

㉠ *P. syringae* pv. *syringae* plasmid 및 genomic DNA의 추출

Plasmid의 분리는 Ausubel 등 (1999)의 방법을 변형하여 수행하였으며 RNase가 첨가된 TE buffer에 녹여 -70°C에 보관하면서 다음 실험에 이용하였다. 참다래 꽃썩음병균들의 genomic DNA는 Maniatis 등 (1982)의 방법을 변형하여 추출하였다.

㉡ Primer의 제조

P. syringae pv. *syringae*는 syringomycin과 syringopeptin 등 두 종류의 독소를 생성하는 것으로 알려져 있다. 이 독소의 생합성에 관여하는 syringomycin gene cluster 중에서 *syrB*와 *syrD* 유전자의 염기서열이 잘 보존되어 있으므로 (Quigley와 Gross, 1994), 이 유전자 중에서 특이적인 primer를 선발하여 PCR을 수행함으로써 국내에서 분리한 꽃썩음병균들이 lipodepsipeptides 생합성 관련 유전자를 가지고 있는지 여부를 확인하고자 하였다. Primer의 염기서열과 PCR product의 예상되는 크기는 표 1-7에 나타내었다.

표 1-7. 실험에 사용된 primer들의 염기서열

이름	염기서열 (5'→3')	관련된 유전자	산물의 크기(bp)	참고문헌
syB1	CTTCCGTGGTCTTGATGAGG	syrB	752	Sorensen 등, (1998)
syB2	TCGATTTTGCCGTGATGAGTC			
syD1	AAACCAAGCAAGAGAAGAAGG	syrD	446	
syD2	GGCAATACCGAACAGGAACAC			

㉢ PCR

추출된 total DNA 1 μ l (30 ng/ μ l)를 PCR의 template DNA로 사용하였다. PCR 반응액은 0.25 M의 primer, 각각 200 M의 deoxyribonucleic acid, 15 mM 의 MgCl₂, 2.5 μ l의 10 \times buffer (100 mM Tris-HCl, 25 mM MgCl₂, 500 mM KCl, pH 8.3), 1.25 unit의 *Taq* DNA polymerase (Takara)를 포함하여 총 부피를 25 μ l로 조절하여 수행하였다. Syringomycin 생합성 유전자를 검출하기 위한 PCR 조건은 94°C에서 5분간 초기 denaturation을 행한 뒤, 94°C에서 30초간 denaturation, 62°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 extension과정을 35회 반복하였다. 마지막으로 72°C에서 5분간 반응시켰으며, Perkin Elmer사 (USA)의 GeneAmp PCR system 2400을 사용하였다. 얻어진 PCR 산물은 1% agarose gel에서 전기영동하여 ethidium

bromide (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)로 염색한 후 관찰하였다.

㉔ 병원성 유전자의 cloning

Agarose gel로부터 DNA purification kit (Mo Bio)를 통해 얻어진 PCR 산물을 pGEM-T Easy Vector System (Promega co., USA)을 이용하여 cloning하였다. Insert와 vector의 비를 3:1로 조절하여 첨가하였다. 적당량의 DNA에 1 μl 의 10 \times buffer, 1 μl 의 pGEM-T Easy vector (50 ng/ μl), 1 μl 의 T4 DNA ligase (3 Weiss unit/ μl)를 넣었고, 멸균증류수를 이용하여 최종 부피를 10 μl 로 조절한 후에 4 $^{\circ}\text{C}$ 항온수조에서 16시간 동안 반응시켰다. ligation이 끝난 후 50 μl 의 competent cell (*E. coli* JM109)을 반응액에 넣어 섞은 후, 얼음에 20분간 방치하였다. 이 용액을 42 $^{\circ}\text{C}$ 항온수조에서 50초간 열처리 한 뒤, 즉시 얼음으로 옮겼다. 여기에 950 μl 의 SOC 배지 (0.5% yeast extract, 2% tryptone, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 20 mM MgSO_4 , 20 mM glucose)를 넣어 잘 섞은 후, 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 150 rpm으로 1시간 30분 동안 진탕배양 하였다. 이 배양액을 ampicillin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 20 μl 의 X-gal (50 mg/ml in dimethylformamide), 100 μl 의 isopropyl -D-thiogalactopyranoside (IPTG, 100 Mm)가 첨가된 LB 고체배지에 도말하고 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 16~24시간 배양한 후 흰색 colony를 선발하였다. 선발된 균주는 항생제가 첨가된 LB 액체배지에 배양하였고, plasmid DNA를 분리하여 *EcoRI*로 처리한 뒤 전기영동을 통해 cloning 유무를 확인하였다.

Competent cell은 Inoue 등 (1990)의 방법을 변형시켜 사용하였다. *Escherichia coli* JM109를 LB 고체배지 (10 g tryptone, 5 g yeast extract, 5 g NaCl, 18 g agar, 1M NaOH 1 ml/l)에 배양한 후 3~4개의 single colony를 취하여 250 ml의 SOB 액체배지 (20 g tryptone, 5 g yeast extract, 0.5 g NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , pH7.0)에 접종한 후 22 $^{\circ}\text{C}$ 의 암실에서 OD₆₀₀가 0.6이 될 때까지 진탕배양 하였다. 배양액을 얼음에 10분간 방치한 후 tube에 옮겨 원심분리 하였다 (4 $^{\circ}\text{C}$, 2,500 xg, 10분). 침전물에 40 ml의 차가운 transformation buffer (TB, 10 mM PIPES, 55 mM MnCl_2 , 15 mM CaCl_2 , 250 mM KCl, pH 6.7)를 넣고 현탁시켜 얼음에 10분간 방치한 후 원심분리 하였다 (4 $^{\circ}\text{C}$, 2,500xg, 10분). 침전물에 20 ml의 차가운 TB와 dimethylsulfoxide를 최종농도 7%가 되게 넣어 잘 현탁 시킨 후 1.5ml의 microcentrifuge tube에 200 μl 씩 분주한 즉시 액체질소로 얼려 -70 $^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다.

㉕ Cloning된 plasmid DNA의 추출

Single colony를 ampicillin (50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)이 첨가된 LB배지에 접종하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 의 진탕배양기에서

포화 배양한 후, Ultra Clean™ Mini plasmid prep kit (Mo Bio)를 이용하여 DNA를 분리하였다. 배양액을 microcentrifuge tube에 옮겨 4°C, 10,000 xg에서 1분간 원심분리한 뒤 침전물에 50 μ l의 cell resuspension solution (10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, 20 μ g/ml RNase A, pH 7.5)을 넣고 현탁 시켰다. 여기에 100 μ l의 cell lysis solution (0.2 N NaOH, 1% SDS)을 넣어 현탁액이 투명해질 때까지 섞은 후, 325 μ l의 binding buffer (3 M potassium acetate, 10% binding salt)를 넣어 2분간 원심분리 하였다. 상층액을 spin filter에 넣어 원심분리한 후, 300 μ l의 wash solution (70% ethanol, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0)을 넣어 원심분리 하였다. Spin filter를 새 tube로 옮겨 50 μ l의 증류수를 넣어 원심분리한 뒤 DNA를 -20°C에 보관하였다. DNA농도는 Hoefer사의 DNA fluorometer (TKO-100)를 이용하여 정량하였다.

㊸ Southern hybridization

국내에서 분리한 균주들의 병원성 유전자를 확인하기 위해 이미 구조가 밝혀진 유전자들과의 DNA-DNA hybridization을 수행하였다. Probe는 재조합 plasmid DNA를 추출하여 *EcoR* I 으로 처리하거나 PCR 산물을 정제하여 준비하였다. 얻어진 DNA 절편은 DIG high prime starter kit II DNA labelling and detection kit (Boehringer Mannheim)를 이용하여 표지 시킨 후 probe로 사용하였다.

국내에서 분리한 참다래 꽃썩음병원균들의 chromosomal DNA는 0.8% agarose gel에서 분리하였다. 전기영동이 끝난 agarose gel을 gel이 잠길 정도의 denaturation solution (1.5 M NaCl, 0.5 N NaOH)에 넣고 실온에서 45분 동안 반응시켰다. Gel을 증류수로 세척한 후, neutralization solution (1.5 M NaCl, 1 M Tris, pH 8.0)으로 45분간 세척하였다. 반응시키는 동안 nylon membrane (Boehringer Mannheim)을 증류수에 적셨다가 10 \times SSC (1.5 M NaCl, 0.15 M Na-citrate, pH 7.0)에 10분간 흡수시켰다. Gel을 뒤집어서 그 위에 nylon membrane 을 두고, 2 \times SSC (0.3 M NaCl, 30 mM Na-citrate)에 적신 여과지를 올려놓았다. 여기에 10 cm 높이의 paper towel을 놓고 그 위를 500 g 정도의 무게로 눌러 8시간 이상 두었다. DNA를 transfer시킨 후, 5 \times SSC (0.75 M NaCl, 75 mM Na-citrate) 용액에 membrane을 실온에서 5분 동안 반응시켰다. 실온에서 30분 이상 건조시킨 후 80°C에서 1~2시간 동안 baking시켰다.

DNA 고정이 끝난 membrane을 비닐주머니에 20 ml의 prehybridization 용액 (5 \times SSC, 0.02% SDS, 0.1% N-lauroylsarcosine, 1% blocking reagent)과 함께 넣고 봉합하였다. 이 비닐 주머니를 68°C에서 30분 동안 배양시킨 후 미리 준비해 두었던 probe DNA (5~25 ng/ml)를 넣고 68°C에서 16시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 nylon-membrane을 실온에서 solution I

(2× SSC, 0.1% SDS)으로 5분간 2회 세척한 후, 68°C에서 solution II (0.1× SSC, 0.1% SDS)로 15분간 2회 세척하였다. Washing buffer (0.1 M maleic acid, 0.3% Tween 20, 0.15 M NaCl, pH 7.5)로 1~5분간 세척한 후 blocking solution (0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl, 1/10 10× blocking solution)에 넣어 30분간 반응시켰다. 20 ml의 blocking solution에 antibody solution을 75 mU/buffer로 희석하여 30분간 반응시켰다. 100 ml의 washing buffer로 15분간 2회 세척한 후, 20 ml의 detection buffer (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9.5)로 2~5분간 반응시켰다. Membrane을 hybridization bag 위에 놓고 1ml의 CSPD[®] ready-to-use solution을 떨어뜨린 후, 기포가 생기지 않게 조심스럽게 위쪽을 덮어 실온에서 5분간 반응시켰다. 용액을 제거하고 가장자리를 밀봉하여 37°C에서 5~15분간 배양한 후 X-ray film에 노출시켰다.

⊗ 염기서열의 분석

Cloning을 통해 얻어진 세포로부터 plasmid DNA를 분리·정제거나 PCR product를 정제한 후 염기서열 분석에 사용하였다. 염기서열의 분석은 ALF-Express automatic sequencer (Pharmacia Biotech, Lyon, France)를 이용하였다.

염기서열의 homology는 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) program을 이용하여 분석하였다.

나. 결과 및 고찰

*P. syringae*는 각 병원형에 따라 기주 범위가 정해져 있고, 각 병원 형에 의해 생성되는 독소가 알려져 있으므로 (표 1-8), 독소의 생합성에 관련된 유전자의 존재 유무를 검출함으로써 병원성 세균의 유무를 간접적으로 확인할 수 있다. 다행히 독소 유전자들이 *P. syringae*의 여러 병원형 사이에서 잘 보존되어 있어 PCR을 통해 이 부분을 증폭함으로써 독소생산 세균을 특이적으로 검출할 수 있다 (Audy 등, 1996; Bereswill 등, 1994; Sorensen 등, 1998). 지금까지 *P. syringae*의 병원형을 동정하는데 사용되어 온 생리학적, 생화학적 및 병리학적 방법들은 시간이 많이 소요되는 단점이 있으므로 PCR을 이용하여 독소생산에 관련된 유전자를 검출하여 신속하게 병원형을 동정하는 방법들이 개발되고 있다 (Bultrey와 Gheysen, 1999). 이 방법들은 특히 동일한 작물에 비슷한 병징을 일으키는 서로 다른 병원성 세균의 감염여부를 확인하려 할 경우 유용하게 쓰일 수 있다.

Lipodepsipeptide는 *P. syringae* pv. *syringae*에서 합성되어 식물체에 독성을 나타내는 구조

적으로 유사한 화합물을 일컫는다. Lipodepsipeptide는 아홉 개의 아미노산 잔기가 ω -hydroxy fatty acid와 결합되어 있고 분자량이 약 1,200 Da 가량인 lipodepsinonapeptide와 22개 또는 25 개의 아미노산 잔기를 가지고 있어 보다 복잡한 구조를 갖는 분자량이 약 2,500 Da에 달하는 syringopeptin으로 크게 나뉘어 진다.

Lipodepsinonapeptide는 다시 약간의 구조적 변형에 따라 syringomycin, syringotoxin, syringostatin, pseudomycin 등으로 분류 된다 (Bachmann 등, 1997). Lipodepsinonapeptide의 생합성에 관여하는 유전자들은 염색체내에 존재하며 약 35kb 정도의 부위에 여섯 개의 ORF가 모여 cluster를 형성하고 있다 (그림 1-10). 이 중 *syrB1*, *syrB2*, *syrC*, *syrE* 유전자 산물은 syringomycin의 합성에 관여한다. *syrD*는 *syrB*, *syrC*와 반대방향으로 전사되며 막 단백질을 암호화하여 syringomycin을 세포 밖으로 분비하는 역할을 담당한다.

표 1-8 *Pseudomonas syringae* pathovar들에 의해 생산되는 식물독소

Phytotoxins	<i>P. syringae</i> pathovars	References
Lipodepsinonapeptide		
(syringomycin,	pv. <i>syringae</i>	Bachmann et al. (1997)
syringotoxin,	pv. <i>apata</i>	Gross and DeVay (1977)
syringostatin,	pv. <i>atropurpurea</i>	Vassilev et al. (1996)
pseudomycin)		
Syringopeptin	pv. <i>syringae</i>	Ballio et al. (1991)
	pv. <i>atropurpurea</i>	Nishiyama et al. (1976)
	pv. <i>actinidiae</i>	Jung et al. (unpublished data)
Coronatine	pv. <i>glycinea</i>	Mitchell and Young (1978)
	pv. <i>maculicola</i>	Wiebe and Campbell (1993)
	pv. <i>morsprunorum</i>	Liang et al. (1994)
	pv. <i>tomato</i>	Bender et al. (1987)
Phaseolotoxin	pv. <i>actinidiae</i>	Tamura et al. (1989)
	pv. <i>phaseolicola</i>	Mitchell (1976)
Tabtoxin	pv. <i>tabaci</i>	Stewart (1971)
	pv. <i>coronafaciens</i>	Sinden and Durbin (1970)
	pv. <i>garcae</i>	Lydon and Patterson (2001)

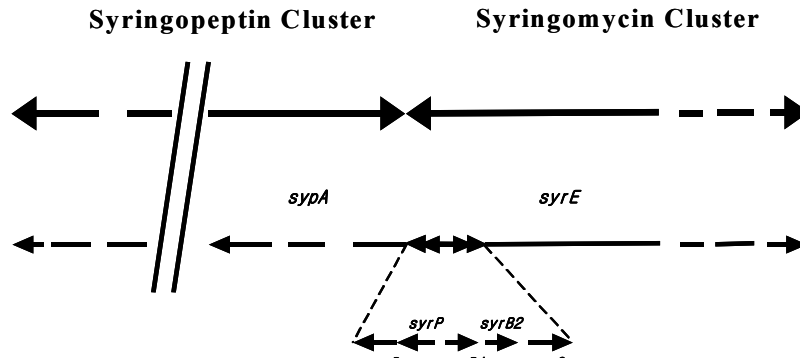


그림 1-10. *P. syringae* pv. *syringae*의 염색체에 존재하는 syringomycin과 syringopeptin gene cluster의 유전자 지도.

㉠ PCR

국내에서 분리한 참다래 꽃썩음병원균들에 존재하는 병원성 관련 유전자를 확인하고 이를 병원균을 진단할 수 있는 marker로의 활용여부를 확인하였다.

국내에서 참다래 꽃썩음병원균으로부터 분리한 균주들에 대해 syringomycin의 생산과 관련된 *syrB* 유전자를 검출할 수 있는 syB1과 syB2 primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과, 병원성이 확인된 균주들 중에서 Group I의 *P. syringae* pv. *syringae*들에서는 752 bp의 band를 검출할 수 있었던 반면에 KDK8에서는 예상했던 band를 확인할 수 없었다 (그림 1-11). 독소의 분비와 관련되어 있는 *syrD* 유전자를 검출하기 위한 syD1, syD2 primer를 사용하여 PCR을 수행한 결과, group I 뿐만 아니라 group VII에 속한 균주들에서 *P. syringae* pv. *syringae* HSJA1과 동일한 446 bp의 단일 band를 검출할 수 있었다 (그림 1-12). 국내에서 분리된 참다래 꽃썩음병 원인균들은 모두 *syrD* 유전자를 가지고 있음을 확인할 수 있었다. 이를 활용하여 참다래 꽃썩음병원균들을 검출하는 진단 marker로 개발하였다.

국내에서 분리한 참다래 꽃썩음병원균인 *P. syringae* pv. *syringae*들은 *syrB*와 *syrD*를 함께 가지고 있어 syringomycin을 생산함을 알 수 있었다. 그러나 *P. fluorescense* KDK8은 *syrD* 유전자는 가지고 있으나 *syrB* 유전자는 가지고 있지 않는 것으로 보아 syringopeptin을 생산하는 것으로 추정할 수 있었다. syringopeptin은 *P. syringae* pv. *syringae* 뿐만 아니라 *P. syringae* pv. *atrofaciens* (Vassiev 등, 1996)와 *P. fuscovaginae* (Flamand 등, 1996)등에 의해 생산되는 것으로 보고 되고 있다.

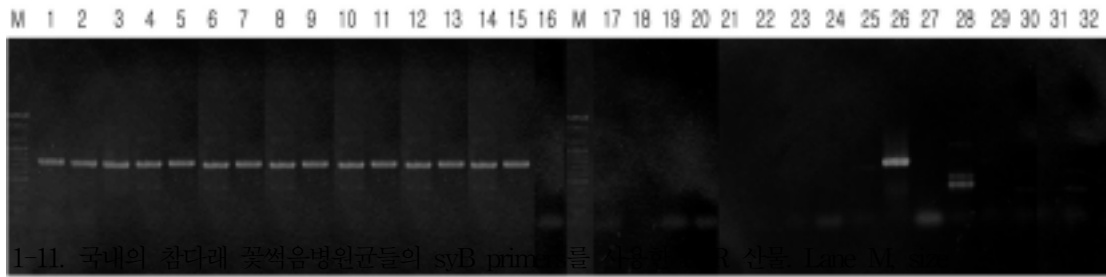


그림 1-11. 국내의 참타래 꽃썩음병원균들의 syB primers를 사용한 PCR 산물. Lane M, size marker (100 bp ladder); lane 1-15, *P. syringae* pv. *syringae* TKS4, TKS7, SSB3, SSB5, HOY1, KJA1, SSB2, BJB2, NYH3, HSS3, TDS2, TDS3, NNH4, BDR1, KHP7; lane 16, *P. fluorescense* KDK8; Lane 17, BDR4; lane 18, SSB4; lane 19, KDK5; lane 20, SCS5; lane 21, BJB7; lane 22, NNH1; lane 23, BJB7; lane 24, HYT2; lane 25, HJD3; lane 26, *P. syringae* pv. *syringae* PSJA1; lane 27, *P. syringae* pv. *glycinea*; lane 28, *P. syringae* pv. *phaseolicola*; lane 29, *P. syringae* pv. *atropurpurea*; lane 30, *P. syringae* pv. *tomato*; lane 31, *P. syringae* pv. *maculicola*; lane 32, *P. syringae* pv. *tabaci*.



그림 1-12. 국내의 참타래 꽃썩음병원균들의 syD primers를 사용한 PCR 산물. Lane M, size marker (100 bp ladder); lane 1-15, *P. syringae* pv. *syringae* TKS4, TKS7, SSB3, SSB5, HOY1, KJA1, SSB2, BJB2, NYH3, HSS3, TDS2, TDS3, NNH4, BDR1, KHP7; lane 16, *P. fluorescense* KDK8; Lane 17, BDR4; lane 18, SSB4; lane 19, KDK5; lane 20, SCS5; lane 21, BJB7; lane 22, NNH1; lane 23, BJB7; lane 24, HYT2; lane 25, HJD3; lane 26, *P. syringae* pv. *syringae* PSJA1; lane 27, *P. syringae* pv. *glycinea*; lane 28, *P. syringae* pv. *phaseolicola*; lane 29, *P. syringae* pv. *atropurpurea*; lane 30, *P. syringae* pv. *tomato*; lane 31, *P. syringae* pv. *maculicola*; lane 32, *P. syringae* pv. *tabaci*.

㉔ *syrB*와 *syrD* 유전자의 염기서열 분석

국내에서 분리한 균주들과 일본 균주의 *syrD* 유전자 일부의 염기서열을 비교 분석한 결과, 일본 균주인 *P. syringae* pv. *syringae* PSJA의 경우 이미 발표된 *P. syringae*의 *syrD* 유전자와 100% 일치하였다. 국내 분리균주 중 *P. syringae* pv. *syringae* HSS3은 446 bp 중 1 bp의 염기치환이 확인되었고, *P. syringae* pv. *syringae* TDS2는 446 bp 중 2 bp가 다른 444 bp가 일치하여 99.6%의 높은 상동성을 나타내었다. *P. fluorescense* KDK8은 446 bp 중 5 bp의 차이를 나타내어 98.8%의 상동성을 나타내었다 (그림 1-13).

PSJA1	1	AAA CCA AGC AAG AGA AGA AGG CCA	GAC CAG GCT CGA TCA	TGC GTC TGT	TAT GGA GCA	GCC
HSS3	
TDS2	
KDK8	
	61	ATC CCT GGC TGA CGT TCT TTA CGC	TGC TGA CAG GGC TCA	TCA GCG GCG	TTG CGT CCA	TTG
	
	
	121	CGG TGG TCA ATG TGA TCA ACC AGG	CGA TTC ACG AGG AGA	CCT TTC AGC	GTC AGT CGC	TGT
	
	
	181	TCT GGT TTG TCG GCC TGA GCG TGG	TGG CGC TCC TGT TCC	GCA ACG GTG	CGT CGC	TGT TTC
	
	
	241	CGG CTT ACG CCA GCA TGC GCA TCA	TGA CCC GTC TGC GCA	TTG CCC TGT	GCC GCA AGA	TCC
	
	
	301	TCG GCA CGC CGC TTG AGG AAG TCG	ACC GCC GCG GTG CGC	CGA ATG TGC	TGA CCC TGC	TGA
	
	
	361	CCA GCG ATA TTC CGC AAC TCA ACG	CCA CGC TGT TGA TCA	TGC CGA CGA	TCC TGG TGG	AGT
	
	
	421	CGG CGI TGT TCC TGT TCG GTA TTG	CC	446		
	
	

그림 1-13. *Pseudomonas spp.*에 존재하는 *syrD* 유전자의 염기서열 비교. PCR에 사용된 primer의 위치는 음영으로 처리하였다.



국내에서 분리한 참다래 꽃썩음병균들에 대한 *syrB* 유전자의 염기서열을 분석한 결과를 그림 1-14에 나타내었다. 모든 균주의 염기서열이 이미 발표된 *P. syringae* pv. *syringae*의

syringomycin 합성과 관련되어 있는 생합성효소 1의 유전자 (*syrB1*)와 100%의 상동성을 나타내어 이 유전자에서는 유전적 변이가 전혀 없음을 확인할 수 있었다.

```

1  CTTTCCGTGG TCTTGATGAG GCCGATCGTG GCAACACCGC GCCGCTGGCG CTGCGCTACG
61  TGGTGCTCGG TGGCGAAGCG TTGCCGCCA GCGTGCTGCG TCCCTGGGTC GAGCGCCACG
121 GTGACCAGAA GCCCGCGCTG ATCAACATGT ACGGCATCAC TGAGGCCACC GTTCACACCA
181 CCTTCAAGCG AGTGTTGGCG CAGGACCTGG AAACAGCAGC CATGGTGTGCG CTGGGCAAGC
241 CGCTGGACGG CTGGCGCCTG CACCTGCTTG ACGCCAACCA GCGGCCGGTC GCGGCAGGCA
301 CTACCGGCGT GCTGTACATC GAAGGCGCGG GCGTGCTCA GGGTACCTG AACCGTGAGG
361 CGCTCAACGT CGAGCGCTTC GTCGAGTTAC CCGGTGCTGT GCGCGCCTAT CGTACTGGCG
421 ACCTGATGAC CCTGGAGAGT AATGGCGAAT ACCGTTATGC CGGTCGCTGC GACGAGCAAT
481 TGAAAATCAG CGGTTTCCGC ATCGAGCCCG GCGAGATCGA AGCCTCTCTG CAAACCAGCC
541 CGAGCGTGCC CGCGGCCCAT GTCGCGTAC ATGATTACGG CGATGGTGAC CTGCGCCTGG
601 TAGCTTACGT GGTGCCAGGC CAGGGCGTCG ACGCCTGGAC CGAACAGGCT CGCAGCGAAG
661 TTGCCGCATT GATGGCCGAA AATTTGCCGG GGTACATGCG TCCCTCGGTG TATGTGCCGC
721 TGGCAGAGCT GCCGGTGACT CATCACGGCA AAATCGA 757

```

그림 1-14. 국내에서 분리한 *P. syringae* pv. *syringae*의 *syrB* PCR 산물의 염기서열. Primer의 위치는 음영으로 나타내었다.

㉔ Southern hybridization

국내에서 분리한 8개의 *P. syringae* pv. *syringae* (BBK3, TDS2, SCS2, NNH2, HOY1, KJA3, BDRL, HJD1)와 일본균주인 PSJA1 그리고 *P. fluorescense* KDK8과 SSB8의 chromosomal DNA를 전기영동한 후, *syrD*유전자를 probe로 사용하여 hybridization을 실시한 결과, 그림 1-15에서와 같이 *syrD*유전자는 병원성 세균의 종류에 상관없이 chromosomal DNA에 존재함을 확인할 수 있었다.

(A) (B)

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

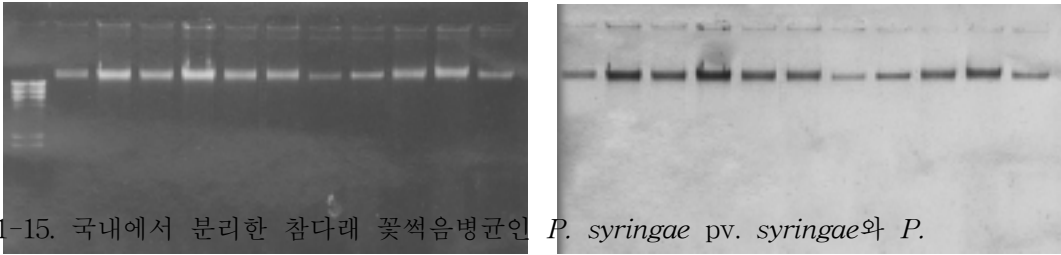


그림 1-15. 국내에서 분리한 참다래 꽃썩음병균인 *P. syringae* pv. *syringae*와 *P. fluorescense*의 염색체 DNA의 전기영동사진 (A)과 *syrD*를 probe로 사용한 Southern blot analysis (B). Lane M, 1kb ladder (Bioneer co.); Lane 1 to 9, *P. syringae* pv. *syringae* (BBK3, TDS2, SCS2, NNH2, HOY1, KJA3, BDR1, HJD1, PSJA1); Lane 10 to 11, *P. fluorescense* (KDK8, SSB8)

제 2 절 참다래 꽃썩음병원균 간이진단법 개발

1. 병원균의 진단 marker 개발

가. 재료 및 방법

국내에서 분리한 참다래 꽃썩음병원균들이 가지고 있는 병원성 유전자를 확인한 결과 *P. syringae* pv. *syringae*들은 syringomycin 생산과 분비에 관련되어 있는 *syrB*와 *syrD* 유전자를 동시에 가지고 있었으며, *P. fluorescense*는 syringomycin이나 syringopeptin의 분비에 관련되어 있는 *syrD* 유전자만을 가지고 있었다. 따라서 본 연구에서는 위에서 사용한 *syrD* 유전자를 검출하기 위한 primer를 개발하여 다음 단계의 실험에 사용하였다. 사용한 primer는 표 2-1에 나타내었으며 PCR 조건은 앞서와 동일하게 수행하였다.

국내 참다래 꽃썩음병반에서 분리한 *P. syringae* pv. *syringae* TDS2를 25°C에서 하룻밤 진탕배양한 후 배양액을 1/10씩 순차적으로 희석하였다 ($10^9 \sim 10^0$ cfu/ml). 100 μ l씩의 희석된 배양액을 cell lysis를 통해 상청액을 얻어 PCR에 이용하였다. 또한 nested-PCR을 통해 검출할 수 있는 세균 수의 한계를 측정하기 위해 희석된 세포배양액 각각을 100 μ l씩 PS agar에 도말시켜 배양한 뒤 균체수를 세어 살아있는 세포수를 측정하였다.

표 2-1. Nested PCR에 사용한 primer들의 염기서열

이름	염기서열 (5'→3')	관련된 유전자	산물의 크기(bp)	참고문헌
syD1	AAACCAAGCAAGAGAAGAAGG	<i>syrD</i>	446	Sorensen 등, (1998)
syD2	GGCAATACCGAACAGGAACAC			
syD3				
syD4				
		<i>syrD</i>	381	this study

나. 결과 및 고찰

첫 번째 PCR 결과 10^3 배 희석액 까지 예상된 446 bp의 band가 검출되었으며 두 번째 PCR의 경우, 10^5 배 희석액 까지 예상된 381 bp의 band가 검출되었다 (그림 2-1). 하룻밤 진탕배양한 배양액을 희석한 뒤 고체배지에 도말하여 확인한 세균 수는 3×10^8 cfu/ml이었다. 따라서 검출 한계는 첫 번째 PCR은 3×10^4 cfu/ml까지, 두 번째 PCR의 경우는 3×10^2 cfu/ml임을 확인할 수 있었다.

따라서 위의 2쌍의 primer를 참다래 꽃썩음병균의 진단시 marker로 활용할 수 있을 것으로 생각되었다.

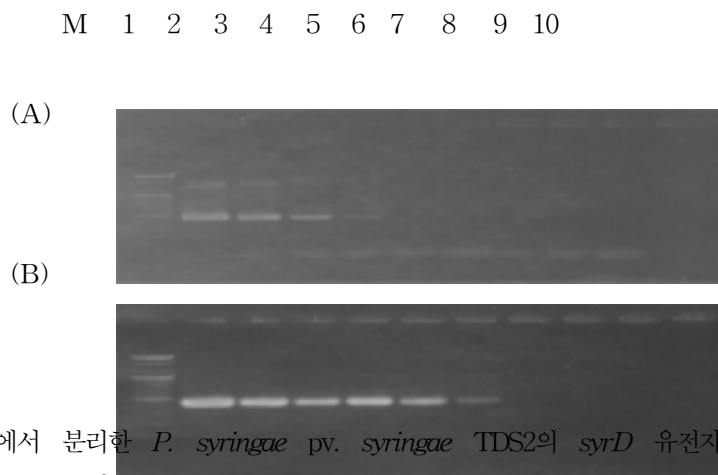


그림 2-1. 국내에서 분리한 *P. syringae* pv. *syringae* TDS2의 *syrD* 유전자에 대한 nested-PCR 산물. Lane M, size marker, 100 bp ladder (bioneer co.); lane 1-9, serial dilution of TDS2 culture (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9}).

2. 병원세균 간이진단법 개발

가. 재료 및 방법

syrD 유전자를 참다래 꽃썩음병균을 진단하는 marker를 삼아 nested-PCR을 수행하였을 경우의 검출한계는 3×10^2 cfu/ml이었다. 그러나 자연환경에서 채취된 시료에는 PCR 반응을 저해하는 여러 가지 불순물이 포함되어 있어 검출한계는 이보다 높아질 것으로 생각된다. 이러한 문제점을 극복하기 위해 PCR에 앞서 꽃썩음병균을 증식시켜 개체수를 늘리는 방법을 사용하였다. 2세부과제의 연구결과, 꽃썩음병균의 생육에 적합한 온도는 $20 \sim 25^\circ\text{C}$ 이므로 20°C 에서 세균을 배양한 후 배양액을 PCR실험에 사용하였다.

병원세균의 간이진단을 위해 개화기에 이병화와 건전화를 채집하였다. 이병화와 건전화를 1g씩 적당하게 잘라 각각 20 ml의 PS broth에 넣은 후 20°C 에서 24시간 배양하였다. 각각 100 μl 의 배양액을 lysis 시킨 후 얻어진 상청액을 PCR에 사용하였다.

나. 결과 및 고찰

참다래 꽃썩음병균의 간이진단을 위해 건진화와 이병화를 PS배지에 배양한 후, 이 배양액에서 DNA를 추출하여 PCR을 수행한 결과, 건진화에서는 *syrD* 유전자가 검출되지 않았으나 이병화의 배양액에서는 446 bp의 band가 검출되어 (그림 2-2), 손쉽게 병원세균의 존재여부를 확인할 수 있었다. 따라서 이를 활용하면 국내에서 발생하는 참다래 꽃썩음병균의 생태를 연구하는데 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

(A)

(B)

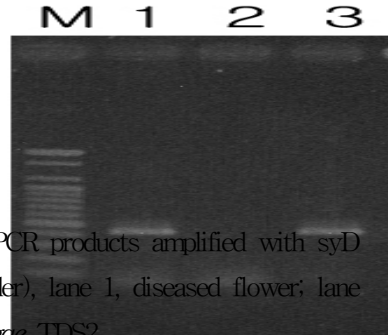


그림 2-2. 참다래의 건진화 (왼쪽)와 이병화 (오른쪽) (A). PCR products amplified with *syD* primers (B). Lane M, size marker (100 bp ladder), lane 1, diseased flower; lane 2, healthy flower; lane 3, *P. syringae* pv. *syringae* TDS2.

제 3 절 참다래 꽃썩음병균 발생생태 조사

1. 참다래 꽃썩음병균 전염원 월동 부위 조사

가. 재료 및 방법

전남 순천시 해룡면 소재 참다래 (*Actinidia deliciosa*, Hayward 품종) 포장에서 2002년 1월 중순부터 개화기 전인 5월 중순까지 약 1개월 간격으로 1월 19일, 2월 15일, 3월 16일, 4월 17일과 5월 10일 등 총 5회에 걸쳐 참다래에 꽃썩음병을 일으키는 병원세균인 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 전염원이 참다래 과수원의 어느 부위에서 월동하는지를 조사하였다.

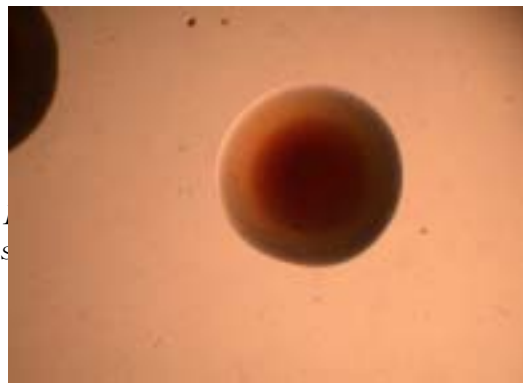
전체 참다래 포장에서 무작위로 선정된 장소에서 참다래 나무의 주간, 주지, 가지, 신초눈, 과경지, 전정가지, 낙엽, 토양 등에서 전염원 월동 여부를 조사하기 위하여 각 부위별로 1 g씩 10 반복으로 채취한 후 9 ml의 멸균수가 들어있는 무균병에 넣어 현탁액을 만들었다.

포장에서 채취한 시료들은 *P. syringae* pv. *syringae*만을 선택적으로 배양 할 수 있는 SPS 배지 (NH₄H₂PO₄ 1.0 g, KCl 0.2 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g, adonitol 2.0 g, phenol red 20 mg methyl violet 1 mg pheneticillin potassium 50 mg, cetrinide 10 mg agar 15 g, pH 6.8 per 1,000 ml of distilled water)(Miyoshi와 Tachibana, 1994) plate 위에 100 μl씩 도말한 후 20°C 항온기에서 배양한 후 SPS 배지 plate 상에 형성되는 유백색 가장자리를 가진 보라색의 특이적인 균총수를 세어서 조사하였다 (그림 3-1과 3-2).

그림 3-1. SPS 배지 plate 상에 나타나는 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 균총 사진



그림 3-2. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 균총 사진



나. 결과 및 고찰

참다래에 꽃썩음병을 일으키는 병원세균인 *P. syringae* pv. *syringae*는 SPS 배지 plate 위에 그림 3-1처럼 나타나는 특이적인 형태의 균총이 형성되므로 각종 월동부위에서 채집한 시료에 존재하는 *P. syringae* pv. *syringae*의 밀도를 간편하게 조사할 수 있었다.

참다래 포장에 있는 참다래 나무의 주간, 주지, 가지, 신초눈, 과경지, 전정가지, 낙엽, 토양 등에서 채집한 시료로부터 분리·배양하여 SPS 배지 plate 위에 형성된 균총으로 참다래 포장에 존재하는 각 월동 부위별 *P. syringae* pv. *syringae*의 검출 빈도를 조사한 결과는 표 3-1과 같다.

표 3-1. 참다래 과수원에서 각 월동 부위별 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*의 검출율

채집 시기	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> 균총수 (cfu/g)							
	참다래 나무					전정 가지	낙엽	토양
	주간	주지	가지	신초눈	과경지			
1월 19일	5.0×10 ⁴	1.8×10 ⁴	6.3×10 ⁴	2.5×10 ⁵	3.2×10 ⁵	1.8×10 ⁵	4.0×10 ⁵	5.0×10 ⁴
2월 15일	8.5×10 ⁴	1.9×10 ⁵	9.3×10 ⁴	2.4×10 ⁵	4.5×10 ⁵	5.3×10 ⁵	3.4×10 ⁵	3.6×10 ⁴
3월 16일	2.4×10 ⁵	2.1×10 ⁵	1.4×10 ⁵	2.6×10 ⁵	7.2×10 ⁵	6.5×10 ⁵	2.7×10 ⁵	1.4×10 ⁵
4월 17일	3.1×10 ⁵	4.6×10 ⁵	1.8×10 ⁵	2.9×10 ⁵	2.2×10 ⁶	7.8×10 ⁵	4.4×10 ⁵	2.1×10 ⁵
5월 10일	9.4×10 ⁵	4.3×10 ⁵	7.5×10 ⁵	7.4×10 ⁵	4.6×10 ⁶	-	-	-
평 균	3.3×10 ⁵ (8.5%)	2.6×10 ⁵ (6.7%)	2.5×10 ⁵ (6.4%)	3.5×10 ⁵ (9.0%)	1.7×10 ⁶ (43.7%)	5.3×10 ⁵ (13.6%)	3.6×10 ⁵ (9.3%)	1.1×10 ⁵ (2.8%)

전체 참다래 포장에서 *P. syringae* pv. *syringae*가 월동할 수 있다고 추정되는 부위 중에서 가장 높게 병원세균이 검출된 부위는 죽은 전년도 과경지였다. 1월부터 5월까지 총 5회에 걸쳐 채집된 과경지로부터 검출된 병원세균 평균 균총수는 1.7×10⁶cfu/g로 조사되었는데, 이러한 균총수는 본 시험에서 조사한 모든 월동 부위에서 검출된 전체 병원세균 균총수의 43.7%를 차지

하였다. 그 다음으로 검출빈도가 높은 부위는 전정가지로 전체 검출된 병원세균 균총수 중에서 13.6%를 차지하였으며, 낙엽에서도 전체 검출된 병원세균 균총수의 9.3%가 검출되어 세 번째로 검출빈도가 높게 나타났다. 그러나 과수원 토양에서는 전체 검출된 병원세균 균총수의 2.8%에 불과한 평균 1.1×10^5 cfu/g의 균총 만이 검출되어 조사 대상인 월동부위 중에서 가장 낮은 검출빈도를 나타내었다.

이러한 결과는 참다래에 꽃썩음병을 일으키는 *P. syringae* pv. *syringae* 전염원의 가장 주요한 월동 장소는 참다래 나무나 과수원에 존재하는 잔존물이라는 것을 추정케 해 준다. 그 중에서도 전년도에 수확한 참다래 과실이 달려있었던 죽은 과경지에서 가장 높은 밀도의 전염원이 검출된 사실이나 참다래 과수원에 방치되어 있는 전정된 가지나 낙엽에서도 높은 밀도의 전염원이 검출된 사실은 참다래 꽃썩음병의 발생을 예방하기 위하여 참다래 과수원의 포장위생이 대단히 중요함을 시사해 준다.

또한 참다래 나무의 주간, 주지, 가지, 신초눈 부위에서도 각각 *P. syringae* pv. *syringae* 전염원은 비교적 높은 빈도로 검출되었다. 신초눈 부위에서 1월부터 5월까지 총 5회에 걸쳐 검출된 병원세균 평균 균총수는 3.5×10^5 cfu/g로 조사되었는데, 이는 전체 검출된 병원세균 균총수의 9.0% 수준이며 주간, 주지, 가지에서도 전체 검출된 병원세균 균총수의 8.5-6.4% 정도의 균총들이 검출됨으로써 *P. syringae* pv. *syringae* 전염원은 참다래 나무의 각 부위에서도 고루 월동하는 것으로 밝혀졌다. 이러한 사실은 참다래 과수원에서 불필요한 식물체 잔존물을 제거하는 포장위생을 철저히 하더라도 식물체 상에 존재하는 전염원 제거도 불가피함을 시사해 준다.

따라서 *P. syringae* pv. *syringae* 전염원은 참다래 과실을 수확하고 남은 과경지나 참다래 포장내에 방치해 있는 전정된 가지나 낙엽 등 식물체 잔존물에서 높은 밀도로 월동하는 것으로 밝혀졌으므로 참다래 꽃썩음병을 방제하기 위한 1차적인 방법은 참다래 포장에 존재하는 불필요한 식물체 잔존물들을 수거하여 소각함으로써 포장을 청결하게 유지하는 방법이다. 더불어 참다래 신초눈을 비롯하여 주간, 주지, 가지 등 식물체 상에서도 *P. syringae* pv. *syringae*는 고루 월동하는 것으로 추정되기 때문에 포장위생 외에도 참다래 나무에 약제를 살포하여 전염원을 제거하는 것이 추가적인 예방법으로 판단된다.

더불어 1월 중순부터 개화기에 가까운 5월 중순까지 5개월동안 *P. syringae* pv. *syringae*의 채집 밀도 변화를 조사한 결과 기온이 상승할수록 점차 채집 밀도가 모든 월동 부위에서 높아졌다. 결국 각 월동 부위에서 월동에 성공한 *P. syringae* pv. *syringae*의 전염원 밀도가 1월 중순부터 꾸준히 기온이 상승함에 따라 증가하기 때문에 가능하면 1월 중순 겨울철 전정 직

후에 약제방제를 수행하는 것이 전염원 밀도를 최소화시키기에는 효과적이라고 할 수 있다.

한편 참다래에는 꽃썩음병과 더불어 궤양병이 포장에서 발생하여 참다래에 치명적인 피해를 주는 세균병으로 보고 되었다 (고, 1995; 고 등, 1994). 참다래에 궤양병을 일으키는 병원세균인 *P. syringae* pv. *actinidiae*도 *P. syringae* pv. *syringae*와 비슷한 특성을 지닌 세균이기 때문에 겨울철 전정 직후에 전정된 가지나 낙엽을 비롯하여 식물체 잔존물들을 제거하는 포장위생 관리는 참다래 꽃썩음병과 궤양병을 동시에 예방하는 효과를 거둘 수 있을 것이다. 또한 월동기에 참다래 나무에 약제를 살포하는 것도 꽃썩음병과 궤양병균을 일으키는 병원세균의 전염원을 동시에 제거하는 효과를 거둘 수 있을 것으로 추정된다.

2. 참다래 꽃썩음병 발병조건 구명

가. 재료 및 방법

전남 순천시 해룡면 소재 참다래 포장에서 2002년 5월 11일 개화 직전의 꽃봉오리와 5월 23일 개화한 꽃에 다양한 농도의 *P. syringae* pv. *syringae*를 접종하여 참다래 꽃썩음병을 일으킬 수 있는 최소발병 병원세균의 농도를 조사하였다.

순천대학교 응용생물학과에 보존 중인 *P. syringae* pv. *syringae* 균주 PSJA1와 PS5107를 전염원으로 사용하였다. OD₆₀₀으로 접종농도 1×10^9 cfu/ml로 조정된 후 10^1 부터 10^6 까지 희석된 병원세균 현탁액을 0.1 ml씩 참다래 (*Actinidia deliciosa*, Hayward 품종) 꽃에 직접 분무 접종하여 발병유무를 관찰하였다.

또한 *P. syringae* pv. *syringae*의 최적 성장 온도 조건을 규명하기 위해 5°C부터 40°C까지 5°C 간격으로 배양온도를 설정하여 LB broth에 *P. syringae* pv. *syringae*를 접종시켜 12시간 동안 진탕배양 시킨 후 각 온도별 성장량을 OD₆₀₀에서 흡광도를 조사하여 비교하였다.

나. 결과 및 고찰

참다래 개화 직전 꽃봉오리와 개화한 꽃에 *P. syringae* pv. *syringae* 균주 PSJA1와 PS5107를 각각 접종한 결과 고농도에서는 물론이고 최소희석농도인 10^6 농도에서도 꽃봉오리와 개화한 꽃 모두에서 꽃썩음병이 발생하였다 (그림 3-2).

Conn 등 (1993)에 의하면 참다래 꽃썩음병을 일으키는 병원세균인 *P. syringae* pv. *syringae*는 10^6 - 10^4 cfu/ml의 농도에서 발병하는 것으로 나타났으며 병원세균의 농도에 비례하여 꽃썩음병의 발병량이 증대되는 것으로 보고하였다.

본 실험에서도 10^1 부터 10^6 까지 희석하여 실험을 한 결과 고농도에서는 병 발생이 더 심하게 이루어지는 것을 볼 수 있었으며, 발병 최소농도는 Conn 등 (1993)의 실험결과와 비슷한 결과를 얻었으므로 참다래 꽃썩음병을 일으킬 수 있는 병원세균의 발병 최소농도를 1×10^4 cfu/ml로 추정할 수 있다.



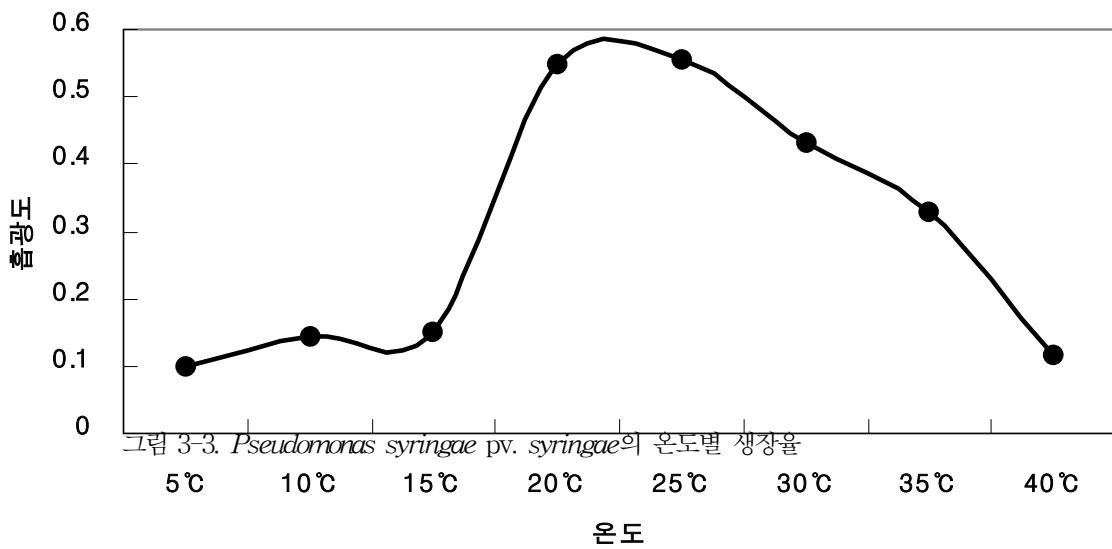
그림 3-3. 참다래 꽃썩음병(左)에 의한 참다래 꽃썩음병징(右).

P. syringae pv. *syringae*의 최적 성장 온도 조건을 조사하기 위하여 LB broth에서 5°C부터 40°C의 온도범위에서 *P. syringae* pv. *syringae*를 배양시켰을 때 5°C에서는 거의 성장하지 않았고 10-15°C 사이의 저온에서도 아주 느린 성장율을 나타내었으나 20-25°C 사이에서 가장 높은 성장율을 나타내었다. 그러나 30°C 이상의 고온에서는 성장율이 상대적으로 급속하게 감소하였으며 40°C에서는 거의 성장하지 않는 것으로 나타났다 (그림 3-3).

이러한 실험 결과로 보아 참다래에 꽃썩음병을 일으키는 *P. syringae* pv. *syringae*의 최적 성장 온도범위는 20-25°C 사이로 확인되었다. 이러한 결과는 *P. syringae* pv. *syringae* 전염원의 월동 부위 조사 실험에서 확인된 바처럼 기온이 20-25°C 정도로 상승하는 5월에 이룰수록 참다래 포장에 분포하는 전염원의 검출밀도가 급속하게 증가한 내용과도 일치한다. 이러한 두 실험 결과로부터 실제 우리나라에서 참다래가 재배되고 있는 남부지방에서 기온이 20-25°C가 유지되는 4, 5월에 *P. syringae* pv. *syringae*의 최적 생장이 이루어지고 활발한 감염 및 발병이 일어난다는 사실을 유추할 수 있었다.

따라서 참다래를 재배하는 과수원에서 참다래에 꽃썩음병을 일으키는 병원세균인 *P. syringae* pv. *syringae* 전염원의 완벽한 제거가 이루어지지 않는다면 생존한 *P. syringae* pv.

*syringae*는 참다래 나무 위나 참다래 과수원 포장에 존재하는 식물체 잔존물이나 토양 등에서 월동을 한 후 참다래 꽃봉오리가 형성되는 4월 중순 무렵부터 개화가 이루어지는 5월 하순 사이에 병원세균의 생장에 적합한 온도 조건이 갖추어지면 각종 월동 부위에서 참다래 꽃썩음 병을 일으킬 수 있는 병원세균의 발병 최소농도 이상으로 급속한 증식이 이루어지고 증식된 병원세균은 개화 전에 참다래 꽃봉오리나 개화중인 꽃으로 전반되어 감염을 일으키고 꽃썩음 병을 일으키는 병환을 되풀이 하는 것으로 추정할 수 있다.



제 4 절 참다래 꽃썩음병 예방약제 최적 살포 프로그램 정립

1. 참다래 꽃썩음병 예방약제 선발 및 약효검정

가. 재료 및 방법

참다래 꽃썩음병에 대한 예방약제의 실내 선발을 위해 국내에서 참다래 꽃썩음병 방제약제로 등록되어 있는 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제 및 농용신·쿠퍼 수화제와 여러 가지 세균병에 대해 방제약제로 등록되어 있는 가드 수화제, 가스란 수화제, 가스신 액제, 농용신 수화제, 디치돈 수화제, 베나솔 입제, 옥사디실·쿠퍼 수화제, 옥쏘리닉에시드 수화제, 코퍼설페이트베이직 수화제, 쿠퍼 수화제, 트리베이직코퍼설페이트 액상수화제, 웨림존·트리졸 수화제 등 14개의 약제를 사용하였다 (표 4-1).

순천대학교 응용생물학과에 보존중인 참다래 꽃썩음병을 일으키는 병원세균인 *P. syringae* pv. *syringae* PSJA1 균주와 PS5107 균주를 사용하여 참다래 꽃썩음병에 대한 예방약제의 실내 선발 시험을 수행하였다. 두 가지 균주를 PSA 배지 (Bacto peptone 20 g, sucrose 25 g, agar 15 g, pH 6.8 per 1,000 ml of distilled water)에서 배양하여 얻은 신선한 균총으로 10^6 cfu/ml로 조정하여 만든 현탁액을 PSA 배지에 도말 한 다음 각 약제들을 표 4-1에 제시된 농약공업협회의 권장사용농도로 맞춘 후 paper disc에 약제를 묻혀 배지 상에 올려놓고 20°C 항온기에서 3일간 배양한 후 형성된 *P. syringae* pv. *syringae* PSJA1 균주와 PS5107 균주의 균총 성장 저지대의 크기를 측정하여 각 약제들의 생장억제 효과를 조사하였다 (그림 4-1).



표 4-1. 참다래 꽃썩음병 예방약제 선발 시험에 사용한 약제의 일반명, 유효성분, 사용약량 및 대표적인 상품명

일반명	유효성분	사용약량	상품명
스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제	streptomycin sulfate 18.8% + oxytetracyclin 1.5%	20g/20ℓ	아그리마이신
농용신·쿠퍼 수화제	streptomycin 10% + copper hydroxide 50%	20g/20ℓ	타미나
가드 수화제	kasugamycin 1.38% + fthalide 2%	40g/20ℓ	올타
가스신 액제	kasugamycin 2.3%	40ml/20ℓ	가스가민
가스란 수화제	kasugamycin 5.5% + copper oxychloride 45%	20g/20ℓ	가스란
농용신 수화제	streptomycin 20%	20g/20ℓ	부라마이신
디치돈 수화제	dithianon 13% + copper oxychloride 42%	40g/20ℓ	델란케이
베니솔 입제	probenazole 6%	4kg/10a	오리자
옥사딕실·쿠퍼 수화제	oxadixyl 8% + copper hydroxide 62%	20g/20ℓ	산도판골드
옥쏘리닉에시드 수화제	oxolinic acid 20%	20g/20ℓ	일품
코퍼설페이트베이직 수화제	copper sulfate 58%	40g/20ℓ	네오보르도
쿠퍼 수화제	copper hydroxide 77%	40g/20ℓ	코사이드
트리베이직코퍼설페이트액상수화제	tribasic copper sulfate 15%	40ml/20ℓ	새빈나
헤림존·트리클졸 수화제	ferimzone 30% + tricyclazole 10%	20g/20ℓ	논브라

참다래 꽃썩음병에 대한 예방약제의 실내 선발 실험 결과 PSA 배지에서 *P. syringae* pv. *syringae*의 성장억제 효과가 확실한 것으로 조사된 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제, 농용신·쿠퍼 수화제, 옥쏘리닉에시드 수화제, 농용신 수화제, 디치돈 수화제 중에서 농용신 수화제는 농용신·쿠퍼 수화제와 유효성분이 비슷하므로 제외하고 나머지 네가지 약제를 참다래 포장에서 참다래 꽃썩음병에 대한 방제효과를 검증하기 위하여 사용하였다.

전남 순천시 해룡면과 고흥군 동강면 소재 참다래 과수원에서 2002년 5월 1일, 5월 11일, 5월 23일에 각 과수원당 약제별로 표 4-1에 제시된 농약공업협회의 권장사용농도로 희석하여 참다래 10주 수관에 분무 살포하였다. 각 약제를 살포한 후 참다래 꽃 만개기인 2002년 5월 26

일 참다래 나무에서 각 약제별 처리구당 임의로 선발한 1,000개의 꽃봉오리 또는 꽃에서 꽃썩음병 발병유무를 조사하여 참다래 꽃썩음병에 대한 방제효과를 검증하였다.

나. 결과 및 고찰

참다래 꽃썩음병에 대한 예방약제의 실내 선발 실험에 사용한 14개의 약제들이 참다래 꽃썩음병을 일으키는 병원세균인 *P. syringae* pv. *syringae* PSJA1 균주와 PS5107 균주에 대한 생장억제 효과를 요약하면 표 4-2와 같다.

표 4-2. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*에 대한 예방약제의 생장억제 효과

약 제	저지대의 크기 (mm)			비 고
	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> PSJA1	PS5107	평 균	
스트렙토마이신황산염·옥시 테트라사이클린 수화제	20.0	28.0	24.0 a	등록약제
농용신·쿠퍼수화제	22.0	25.0	23.5 a	등록약제
가드 수화제	0	0	0 e	
가스란 수화제	0	0	0 e	
가스신 액제	0	0	0 e	
농용신 수화제	11.0	11.0	11.0 c	
디치돈 수화제	4.0	6.0	5.0 d	
베니솔 입제	0	0	0 e	
옥사디실·쿠퍼 수화제	0	0	0 e	
옥쏘리닉에시드 수화제	20.0	20.0	20.0 b	
코퍼설페이트베이직 수화제	0	0	0 e	
쿠퍼 수화제	0	0	0 e	
트리베이직코퍼설페이트 액상수화제	0	0	0 e	
훼림존·트리졸 수화제	0	0	0 e	

시험에 사용한 약제들 중에서 옥소리닉에시드 수화제는 20 mm 크기의 저지대를 나타내어 국내에서 참다래 꽃썩음병 방제약제로 등록되어있는 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제 및 농용신·쿠퍼수화제가 각각 나타내는 약 24 mm 크기의 저지대와 비교하였을 때 *P. syringae* pv. *syringae*의 두 균주에 대한 생장억제 효과가 비슷하게 나타났으며, 농용신 수화제와 디치돈 수화제는 각각 11 mm와 5 mm 크기의 저지대를 나타내어 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제 및 농용신·쿠퍼수화제보다 다소 낮은 생장억제 효과를 나타내었다. 그러나 가드 수화제를 비롯하여 나머지 9개 약제들은 *P. syringae* pv. *syringae*에 대해서 효과가 전혀 없는 것으로 나타났다.

실내 실험을 통하여 선발된 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제, 농용신·쿠퍼 수화제, 옥소리닉에시드 수화제 및 디치돈 수화제를 살포한 참다래 포장에서 약제 처리별 꽃썩음병의 발병율을 조사한 결과는 표 4-3과 같다.

표 4-3. 참다래 꽃썩음병 방제약제 살포시 꽃썩음병 발병율과 방제기

살포 장소	참다래 꽃썩음병 발병화율(%)				방제기
	살포 약제				
	농용신·쿠퍼 수화제	스트렙토마이신 황산염·옥시테트라사이클린 수화제	옥소리닉에시드 수화제	디치돈 수화제	무처리
순 천	44	58	46	56	21.8
고 흥	41	7.0	5.9	5.7	25.9
평 균	4.3 a	6.4 a	5.3 a	5.7 a	23.9 b
방제기(%)	82.0	73.2	77.8	76.2	-

순천과 고흥 두 지역간에 네 가지 약제 처리구의 꽃썩음병 발병율이 다소 차이가 있었지만 농용신·쿠퍼수화제는 순천과 고흥에서 평균 꽃썩음병 발병율이 4.3%로 가장 낮았으며, 옥소리닉에시드 수화제는 5.3%, 디치돈 수화제는 5.7%의 발병율을 나타냈다. 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제는 6.4%의 발병율을 나타내었다. 따라서 참다래 꽃썩음병 방제약제로 등록되어 있는 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제에 비하여 옥소리닉에시드 수화제와 디치돈 수화제는 방제효과가 우수하므로 장차 참다래 꽃썩음병 방제 약제로 개발

할 수 있을 것으로 기대된다.

지금까지 참다래 꽃썩음병 방제는 주로 약제 살포에 의해 이루어져 왔다 (Tachibana, 1988; 고, 1995; Koh 등, 2001). 그러나 세균병해는 항생제와 동제 등 극히 제한된 종류의 약제만 유효하기 때문에 유사한 약제의 연용에 의한 약제 저항성균의 출현은 이미 잘 알려진 사실이다. 참다래 꽃썩음병을 일으키는 병원세균인 *P. syringae* pv. *syringae*와는 병원형 (pathovar)만 다른 병원세균인 *P. syringae* pv. *actinidiae*에 의해 발생하는 궤양병에 대한 방제도 약제 살포에 의해 이루어져 왔으며, 그 결과 *P. syringae* pv. *actinidiae*에 대한 약제 저항성균이 보고되었다 (Ushiyama, 1993; Goto 등, 1994; Nakajima 등, 1995). 따라서 참다래 꽃썩음병에 대한 약제방제가 지속적으로 이루어질 때 필연적으로 약제 저항성균의 발생이 예상된다. 결국 이러한 약제 저항성균의 발생을 억제시킬 수 있는 방안으로 새로운 방제약제 선발 및 개발을 통한 방제약제의 다양화는 필수불가피한 일이라고 판단된다.

2. 참다래 꽃썩음병 예방약제 살포적기 및 적정 살포횟수 구명

가. 재료 및 방법

참다래 꽃썩음병 예방약제의 살포적기를 구명하기 위하여 국내에서 참다래 꽃썩음병 방제약제로 등록된 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제와 농용신·쿠파 수화제를 월동기, 신초소생기, 화아유도기, 개화기 등 네 가지 살포시기로 구분하여 참다래 수관에 분무 살포하여 각 약제별 살포적기를 평가하였다 (그림 4-2). 각 약제들은 표 4-1에 제시된 농약공업협회의 권장사용농도로 희석하여 살포하였다.

그림 4-2. 참다래 꽃썩음병 약제살포 포장 전경



또한 참다래 꽃썩음병 예방약제의 적정 살포횟수를 살포적기 평가 시험과 동시에 조사하기 위하여 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제와 농용신·쿠파 수화제를 각 살포 시기에 1회부터 10일간격으로 5회까지 다양한 횟수로 참다래 수관에 살포한 후 꽃썩음병의 발생률과 방제효과를 조사하여 적정 살포횟수를 구명하였다.

예방약제의 살포 시기는 월동기인 경우는 2003년 1월 5일부터 2월 14일까지, 신초소생기는 2월 14일부터 3월 25일까지, 화아 유도기는 3월 25일부터 5월 5일까지, 개화기는 4월 25일부터 5월 25일까지로 잡아 각 살포시기에 두 가지 약제를 10일 간격으로 1회부터 5회까지 각각 살포하였는데, 각 살포시기에서 약제 살포횟수별 약제 살포날짜는 표 4-4와 같다.

각 시험은 전남 순천시 해룡면 소재 참다래 포장에서 난괴법 3반복으로 수행하였으며, 참다래 만개기인 2003년 5월 27일 각 처리 당 400개의 꽃봉오리 또는 꽃에 발생한 꽃썩음병 발생율을 조사한 후 무처리구의 발생율과 비교하여 방제효과를 평가하였다.

나. 결과 및 고찰

국내에서 참다래 꽃썩음병 방제약제로 등록된 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제와 농용신·쿠파 수화제를 월동기부터 개화기까지 네 가지 살포시기로 나누고 각 시기별로 1회부터 5회까지 살포하였을 경우 살포시기 및 살포횟수에 따른 참다래 꽃썩음병 발생률 및 각 약제별 방제효과는 표 4-5와 같다.

약제를 살포하지 않은 무처리구의 참다래 꽃썩음병 평균 발생률이 36.4%인 반면에 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제와 농용신·쿠파 수화제는 월동기에 1회부터 5회까지 살포한 처리구에서는 각각 13.5-5.0%와 14.3-5.0%의 발생율을 나타내어 두 가지 약제 간 꽃썩음병 방제효과에 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다.

이와 유사하게 신초 소생기에도 1회부터 5회까지 살포한 처리구에서는 두 가지 약제가 각각 11.3-4.2%와 12.5-4.1%의 유사한 발생율을 나타내었고, 화아 유도기에도 1회부터 5회까지 살포한 처리구에서는 두 가지 약제가 각각 13.1-3.0%와 12.0-3.0%의 유사한 발생율을 나타내었으며, 개화기인 경우에도 1회부터 4회까지 살포한 처리구에서는 두 가지 약제가 각각 10.1-1.9%와 11.6-1.4%의 유사한 발생율을 나타내었다.

따라서 월동기, 신초소생기, 화아유도기 및 개화기 등 네 가지 예방약제 살포시기에서 동일한 살포시기 내에서는 두 가지 약제 간 꽃썩음병 방제효과에 대한 유의적인 차이가 없는 것으로 확인되었다. 또한 두 가지 약제를 각 살포시기에서 1회부터 5회까지 살포하였을 경우 동일한 살포횟수에서도 두 가지 약제 간 꽃썩음병 방제효과에는 유의적인 차이가 없는 것으로 확

인되었다. 그러나 동일한 살포횟수별로 살포 시기간 약제방제효과를 비교해 보면 월동기 약제 살포에서부터 신초소생기, 화아유도기, 개화기 약제 살포에 이룰수록 꽃썩음병에 대한 방제효과가 증대되는 것으로 확인되었다.

표 4-4. 참다래 꽃썩음병 예방약제의 살포시기, 살포횟수 및 살포날짜

살포시기	살포횟수	살포날짜				
	1	1월 25일				
	2	1월 15일	1월 25일			
월동기	2		1월 25일	2월 4일		
	3		1월 25일	1월 25일	2월 4일	
	4	1월 5일	1월 15일	1월 25일	2월 4일	
	4		1월 15일	1월 25일	2월 4일	2월 14일
	5	1월 5일	1월 15일	1월 25일	2월 4일	2월 14일
신초 소생기	1		3월 5일			
	2		2월 24일	3월 5일		
	2		3월 5일		3월 15일	
	3		2월 24일	3월 5일	3월 15일	
	4	2월 14일	2월 24일	3월 5일	3월 15일	
화아 유도기	4		2월 24일	3월 5일	3월 15일	3월 25일
	5	2월 14일	2월 24일	3월 5일	3월 15일	3월 25일
	1		4월 15일			
	2		4월 5일	4월 15일		
	2		4월 15일		4월 25일	
개화기	3		4월 5일	4월 15일	4월 25일	
	4	3월 25일	4월 5일	4월 15일	4월 25일	
	4		4월 5일	4월 15일	4월 25일	5월 5일
	5	3월 25일	4월 5일	4월 15일	4월 25일	5월 5일
	1		5월 15일			
개화기	2		5월 5일	5월 15일		
	2		5월 15일		5월 25일	
	3		5월 5일	5월 15일	5월 25일	
	4	4월 25일	5월 5일	5월 15일	5월 25일	

표 4-5. 참다래 꽃썩음병 예방약제 살포시기 및 살포횟수별 참다래 꽃썩음병 발병율

살포 시기	살포 횟수	살포날짜	스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제		농용신·쿠퍼수화제	
			발병율 (%)	방제가 (%)	발병율 (%)	방제가 (%)
월동기	0	-	36.4 f	-	36.4 f	-
	1	1/25	13.5 a	62.9	14.3 a	60.7
	2	1/15, 1/25	10.8 b	70.3	8.1 b	77.7
	2	1/25, 2/ 4	9.1 bc	75.0	8.4 bc	76.9
	3	1/15, 1/25, 2/ 4	6.5 cd	82.1	8.1 cd	77.7
	4	1/ 5, 1/15, 1/25, 2/ 4	6.2 de	83.0	6.0 de	83.5
	4	1/15, 1/25, 2/ 4, 2/14	5.8 de	84.1	6.4 de	82.4
	5	1/ 5, 1/15, 1/25, 2/ 4, 2/14	5.0 e	86.3	5.0 e	86.3
	0	-	36.4 f	-	36.4 f	-
	1	3/ 5	11.3 a	62.9	12.5 a	60.7
2	2/24, 3/ 5	9.1 ab	75.0	11.5 ab	68.4	
신초	2	3/ 5, 3/15	9.1 b	75.0	10.9 b	70.1
소생기	3	2/24, 3/ 5, 3/15	6.8 c	81.3	8.8 c	75.8
	4	2/14, 2/24, 3/ 5, 3/15	5.4 d	85.2	5.8 d	84.1
	4	2/24, 3/ 5, 3/15, 3/25	5.0 d	86.3	4.4 d	87.9
	5	2/14, 2/24, 3/ 5, 3/15, 3/25	4.2 d	88.5	4.1 d	88.7
	0	-	36.4 f	-	36.4 f	-
	1	4/15	13.1 a	64.0	12.0 a	67.0
2	4/ 5, 4/15	9.1 b	75.0	10.8 b	70.3	
화아	2	4/15, 4/25	8.8 b	75.8	10.2 b	79.7
유도기	3	4/ 5, 4/15, 4/25	7.4 c	79.7	5.9 c	83.8
	4	3/25, 4/ 5, 4/15, 4/25	5.4 d	85.2	4.2 d	88.5
	4	4/ 5, 4/15, 4/25, 5/ 5	2.8 d	92.3	3.2 d	91.2
	5	3/25, 4/ 5, 4/15, 4/25, 5/ 5	3.0 d	91.8	3.0 d	91.8
	0	-	36.4 f	-	36.4 f	-
	1	5/15	10.1 a	72.3	11.6 a	68.1
개화기	2	5/ 5, 5/15	3.9 b	89.3	5.2 b	85.7
	2	5/15, 5/25	3.5 b	90.4	4.2 b	88.5
	3	5/ 5, 5/15, 5/25	2.6 bc	92.9	3.3 bc	90.9
	4	4/25, 5/ 5, 5/15, 5/25	1.9 c	94.8	1.4 c	96.2

일본에서 수행한 참다래 꽃썩음병 약제방제시험에서도 스트렙토마이신황산염·옥시테트라싸이클린 수화제를 월동기부터 신초소생기 사이에 살포하였을 경우에 비하여 개화기에 살포하였을 경우에 방제효과가 훨씬 높게 조사되어 본 연구 결과와 비슷한 결과가 보고 된 바 있다 (Tachibana, 1988). 따라서 참다래 꽃썩음병 예방약제의 네 가지 살포시기 중에서 개화기 살포가 월동기, 신초생성기, 화아유도기 등 다른 살포시기에 비해 상대적으로 적은 약제 살포로 참다래 꽃썩음병의 발생을 효과적으로 억제시킬 수 있는 살포시기로 확인되었다.

한편 동일한 약제 살포시기 내에서는 약제 살포횟수가 증가함에 따라 미세하지만 점진적으로 약제방제효과가 증가하는 것으로 확인되었다. 그렇지만 모든 조합의 약제처리구중에서 화아유도기 4회 살포구 (4월 5일, 4월 15일, 4월 25일, 5월 5일)와 5회 살포구 (3월 25일, 4월 5일, 4월 15일, 4월 25일, 5월 5일) 및 개화기 3회 살포구 (5월 5일, 5월 15일, 5월 25일)에서는 약 3%의 꽃썩음병 발병을 만을 나타내어 90% 이상의 우수한 비슷한 수준의 방제효과를 나타내었고, 개화기 4회 살포구(4월 25일, 5월 5일, 5월 15일, 5월 25일)는 2% 이하의 발병율을 나타내어 96% 이상의 가장 우수한 방제효과를 나타내었다.

그러나 화아유도기 4회 살포와 5회 살포구의 꽃썩음병 발병율 간에는 통계적인 유의차가 없었으며, 개화기 3회 살포와 4회 살포구의 꽃썩음병 발병율 간에도 두 가지 약제 모두에서 통계적인 유의차가 없었다. 실제 포장에서 세균성병해인 참다래 꽃썩음병에 대하여 90% 이상의 방제효과를 나타내면 대단히 방제효과가 높은 것이고 개화기 3회 살포와 4회 살포 그리고 화아유도기 4회 살포와 5회 살포 모두 90% 이상의 방제효과를 나타내었으므로 약제 살포 횟수가 가장 적은 개화기 3회 살포가 참다래 꽃썩음병 예방을 위한 최적 살포횟수로 추정되었다. 따라서 저농약 고효율 참다래 꽃썩음병 방제를 위한 예방약제의 적정 살포횟수는 참다래 꽃 만개기 20일전인 5월 초순부터 10일간격 3회 살포로 판명되었다.

우리나라에서 참다래가 재배되고 있는 남부지방에서 5월 초순부터 개화기인 5월 하순 사이는 기온이 20-25℃가 유지되어 참다래에 꽃썩음병을 일으키는 병원세균인 *P. syringae* pv. *syringae*의 최적 생장이 이루어지는 시기이므로 참다래 나무 위나 참다래 과수원 포장에 존재하는 식물체 잔존물이나 토양 등에서 월동을 한 병원세균이 급속하게 증식하여 개화 전에 참다래 꽃봉오리나 개화중인 꽃으로 전반되어 꽃썩음병 감염을 일으키게 된다. 따라서 참다래 꽃 만개기 20일전인 5월 초순부터 개화기까지 예방약제인 스트렙토마이신황산염·옥시테트라싸이클린 수화제나 농용신·쿠퍼 수화제를 10일간격 3회 살포하는 것은 병원세균 전염원이 월동부위로부터 건전한 꽃봉오리나 꽃으로의 전반과 감염을 사전에 예방할 수 있는 합리적인 참다래 꽃썩음병 예방약제 최적 살포 프로그램이라고 판단된다.

물론 세균성병해에는 항생제 외에 동제도 방제효과가 있기 때문에 본 시험에 사용한 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제나 농용신·쿠파 수화제를 대신하여 동제에 의한 참다래 꽃썩음병 방제도 가능하리라 여겨진다. 고 등 (1999)은 참다래에 꽃썩음병을 일으키는 병원세균인 *P. syringae* pv. *syringae*와 병원형(pathovar)만 다른 *P. syringae* pv. *actinidiae*가 일으키는 궤양병에 대한 약제방제 시험 결과 대표적인 항생제인 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제, 농용신 수화제 및 가스신 수화제나 농용신·쿠파 수화제 외에도 대표적인 동수화제인 쿠파 수화제도 참다래 궤양병 방제효과가 우수한 것으로 보고하였다.

그러나 이러한 약제들의 적용 시기는 약제마다 달라서 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제과 농용신 수화제의 방제적기는 4월 중순부터 5월 초순인 반면에 쿠파 수화제의 방제적기는 1월 중순부터 2월 초순인 것으로 확인되었다 (고 등, 1999). 따라서 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제인 경우 참다래 꽃썩음병 방제적기와 궤양병 방제적기가 거의 일치하므로 조화롭게 사용하면 최소량의 약제 살포로 두가지 병해를 동시에 방제하는 효과를 거둘 수 있을 것으로 판단된다.

그리고 쿠파 수화제와 같은 동제인 경우 꽃썩음병에 대한 방제효과가 인정된다면 궤양병에 대한 쿠파 수화제의 방제적기가 1월 중순부터 2월 초순인 것처럼 꽃썩음병에 대해서도 참다래 월동기인 12월이 사용적기가 될 것으로 추정된다. 이러한 동제를 참다래 잎에 살포할 경우 약해를 일으키는 것으로 보고 되었기 때문에 참다래 월동기 외에는 살포를 제한할 수밖에 없기 때문이다 (고 등, 1999). 따라서 동제를 사용하여 참다래 꽃썩음병 방제 프로그램을 연구한다면 본 시험에서 사용한 항생제에 의해 도출된 참다래 꽃썩음병 예방약제 최적 살포 프로그램과는 다른 결과가 도출될 수 있을 것이다.

제 5 절 참다래 꽃썩음병균 집단 분석

1. 병원균의 약제저항성 발생실태 파악

가. 재료 및 방법

① 시험 균주

참다래 꽃썩음병균의 약제저항성 실태를 파악하기 위해 2001년과 2002년에 분리된 균주들 중 *P. syringae* pv. *syringae* 41균주와 *P. fluorescense* 2균주를 실험에 사용하였다. 대조균주로는 일본에서 분리된 꽃썩음병균인 *P. syringae* pv. *syringae* PSJA1과 국내의 참다래 궤양병균인 *P. syringae* pv. *actinidiae* JYG3와 일본에서 분리된 *P. syringae* pv. *actinidiae* Pa11을 사용하였다 (표 5-1).

② 시험 균주들의 약제저항성 조사

참다래 꽃썩음병반으로부터 분리한 균주들의 약제저항성 정도를 조사하기 위하여 방제 약제로 사용되고 있는 아그리마이신 수화제(streptomycin sulfate + oxytetracycline WP)의 주성분인 streptomycin과 농용신 코퍼수화제 등 동 수화제의 주성분인 copper sulfate에 대한 각 균주들의 약제저항성 정도를 조사하였다.

참다래 꽃썩음병반에서 분리한 *P. syringae* pv. *syringae* 균주들과 *P. fluorescense*에 대해 streptomycin 저항성을 확인하였다. 0, 10, 50, 100, 200, 500, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 항생제가 첨가된 PS 액체배지에 10 μl 의 배양액 ($\text{OD}_{600}=1.0$)을 접종하고 25°C에서 48시간 동안 진탕 배양한 후, 최소저해농도 (MIC; minimal inhibition concentration)를 측정하였다.

아울러 참다래 꽃썩음병균들에 대한 copper 저항성 정도를 측정하기 위해 0, 0.5, 1.25, 3, 5 mM의 copper sulfate가 첨가된 PS 액체배지에 10 μl 의 배양액 ($\text{OD}_{600}=1.0$)을 접종하고 25°C에서 48시간 동안 진탕 배양한 후, 최소저해농도를 측정하였다.

나. 결과 및 고찰

우리나라에서 참다래 꽃썩음병의 방제를 위한 약제로 streptomycin이 주성분인 아그리마이신 수화제와 copper sulfate가 주성분인 농용신 코퍼수화제가 등록 고시되어 있었으나, 대부분의 참다래 재배 농가에서는 꽃썩음병의 피해를 중요하게 여기지 않아 특별한 방제를 하지 않았었다. 그러나 최근 들어 여러 가지 환경변화와 개화기의 잦은 강우로 인해 꽃썩음병의 피해가 커

표 5-1. 실험에 사용한 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*과 *Pseudomonas* spp.

Code	Strain name	<i>Pseudomonas</i> strain	Geographic origin	Year of collection	Source
1	BBK3	pv. <i>syringae</i>	Bosung, Jeonnam, Korea	2001	this study
2	BBK5	pv. <i>syringae</i>	Bosung, Jeonnam, Korea	2001	this study
3	BDR1	pv. <i>syringae</i>	Bosung, Jeonnam, Korea	2002	this study
4	BJB2	pv. <i>syringae</i>	Bosung, Jeonnam, Korea	2002	this study
5	BJB3	pv. <i>syringae</i>	Bosung, Jeonnam, Korea	2002	this study
6	BJB4	pv. <i>syringae</i>	Bosung, Jeonnam, Korea	2002	this study
7	HOY1	pv. <i>syringae</i>	Haenam, Jeonnam, Korea	2001	this study
8	HSS1	pv. <i>syringae</i>	Haenam, Jeonnam, Korea	2002	this study
9	HSS3	pv. <i>syringae</i>	Haenam, Jeonnam, Korea	2001	this study
10	HSS6	pv. <i>syringae</i>	Haenam, Jeonnam, Korea	2002	this study
11	HSS7	pv. <i>syringae</i>	Haenam, Jeonnam, Korea	2002	this study
12	KDK1	pv. <i>syringae</i>	Koheung, Jeonnam, Korea	2002	this study
13	KHP7	pv. <i>syringae</i>	Koheung, Jeonnam, Korea	2002	this study
14	KJA1	pv. <i>syringae</i>	Koheung, Jeonnam, Korea	2002	this study
15	KJA3	pv. <i>syringae</i>	Koheung, Jeonnam, Korea	2002	this study
16	KJA5	pv. <i>syringae</i>	Koheung, Jeonnam, Korea	2001	this study
17	KJA6	pv. <i>syringae</i>	Koheung, Jeonnam, Korea	2002	this study
18	SCS1	pv. <i>syringae</i>	Suncheon, Jeonnam, Korea	2002	this study
19	SCS2	pv. <i>syringae</i>	Suncheon, Jeonnam, Korea	2002	this study
20	SCS3	pv. <i>syringae</i>	Suncheon, Jeonnam, Korea	2002	this study
21	SCS4	pv. <i>syringae</i>	Suncheon, Jeonnam, Korea	2002	this study
22	TDS1	pv. <i>syringae</i>	Tongyoung, Gyungnam, Korea	2002	this study
23	TDS2	pv. <i>syringae</i>	Tongyoung, Gyungnam, Korea	2001	this study
24	TDS3	pv. <i>syringae</i>	Tongyoung, Gyungnam, Korea	2002	this study
25	TDS4	pv. <i>syringae</i>	Tongyoung, Gyungnam, Korea	2002	this study
26	TKS2	pv. <i>syringae</i>	Tongyoung, Gyungnam, Korea	2001	this study
27	TKS3	pv. <i>syringae</i>	Tongyoung, Gyungnam, Korea	2002	this study
28	TKS4	pv. <i>syringae</i>	Tongyoung, Gyungnam, Korea	2002	this study
29	TKS7	pv. <i>syringae</i>	Tongyoung, Gyungnam, Korea	2002	this study
30	SSB2	pv. <i>syringae</i>	Sacheon, Gyungnam, Korea	2001	this study
31	SSB3	pv. <i>syringae</i>	Sacheon, Gyungnam, Korea	2002	this study
32	SSB5	pv. <i>syringae</i>	Sacheon, Gyungnam, Korea	2002	this study
33	SSB7	pv. <i>syringae</i>	Sacheon, Gyungnam, Korea	2001	this study
34	NNH2	pv. <i>syringae</i>	Namhae, Gyungnam, Korea	2002	this study
35	NNH3	pv. <i>syringae</i>	Namhae, Gyungnam, Korea	2002	this study
36	NNH4	pv. <i>syringae</i>	Namhae, Gyungnam, Korea	2002	this study
37	NYH3	pv. <i>syringae</i>	Namhae, Gyungnam, Korea	2002	this study
38	NYH7	pv. <i>syringae</i>	Namhae, Gyungnam, Korea	2002	this study
39	HJD1	pv. <i>syringae</i>	Namhae, Gyungnam, Korea	2002	this study
40	HJD2	pv. <i>syringae</i>	Namhae, Gyungnam, Korea	2002	this study
41	HYT1	pv. <i>syringae</i>	Namhae, Gyungnam, Korea	2002	this study
42	PSJA1	pv. <i>syringae</i>	Chiba, Japan	1995	Dr. Matsuyama
43	KDK8	<i>P. fluorescense</i>	Koheung, Jeonnam, Korea	2001	this study
44	SSB8	<i>P. fluorescense</i> .	Sacheon, Gyungnam, Korea	2002	this study
45	JYG3	pv. <i>actinidiae</i>	Wando, Jeonnam, Korea	1999	previous study
46	Pa11	pv. <i>actinidiae</i>	Kanagawa, Japan	1995	Dr. Nakajima

지게 되었고, 꽃썩음병에 대한 관심이 높아지면서 이 약제들을 빈번하게 사용하고 있어 이 약제들에 대한 저항성 세균의 발생은 시간문제라고 할 수 있다.

국내에서 분리한 참다래 꽃썩음병균들의 약제 저항성 정도를 파악한 결과, 총 분리균주 41개 중 streptomycin에 저항성을 가지는 균주는 KHP7과 BJB3, 2균주로 5%의 출현빈도를 나타내었으며, copper sulfate에 저항성을 가지는 균주는 HSS3 KJA3, NYH3 및 NNH4, 4균주로 10%의 출현빈도를 보였다 (표 5-2, 5-3). 참다래 재배지역에 따른 저항성 균주의 출현을 보면 streptomycin 저항성 균주의 경우, 전남 보성군과 고흥군에서 각 1균주씩 출현하였으며, copper 저항성 균주의 경우 전남 해남군과 고흥군에서 각 1균주씩, 그리고 경남 남해군에서 2균주가 분리되었다. 특히, 전남 고흥군의 경우에는 streptomycin과 copper 저항성균주가 동시에 출현하였는데, 이는 다른 지역의 참다래 재배 농가에서는 참다래 꽃썩음병에 대한 화학적 방제를 하지 않는 반면에 이 지역 대부분의 참다래 재배농가들은 개화기 이전에 아그리마이신이나 농용 신쿠퍼 수화제를 사용하여 두 번 이상 방제를 하고 있어 이와 무관하지 않을 것으로 생각되며, 약제 방제가 계속됨에 따라 앞으로 더욱 많은 저항성 균주들이 나타날 것으로 예상된다. *P. fluorescense*의 경우는 약제에 대해 저항성이 있는 균주가 분리되지 않았다.

표 5-2. 국내에서 분리한 참다래 꽃썩음병균인 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*와 *Pseudomonas fluorescense*

분리 지역	균주		저항성 균주	
	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	<i>Pseudomonas fluorescense</i> .	streptomycin	copper sulfate
Haenam Jeonnam	HOY4, HSS1, HSS3, HSS6, HSS7			HSS3
Bosung Jeonnam	BBK3, BBK5, BDR1, BJB2, BJB3, BJB4		BJB3	
Koheung Jeonnam	KDK1, KHP7, KJA1, KJA3, KJA5, KJA6	KDK8	KHP7	KJA3
Suncheon Jeonnam	SCS1, SCS2, SCS3, SCS4			
Tongyoung Gyeongnam	TKS4, TKS7, TDS1, TDS2, TDS3, TDS4, TKS2, TKS3			
Sacheon Gyeongnam	SSB2, SSB3, SSB5, SSB7,	SSB8		
Namhae Gyeongnam	NNH2, NNH3, NNH4, NYH3, NYH7			NYH3, NNH4
Hadong Gyeongnam	HJD1, HJD2, HYT1			

표 5-3 국내에서 분리한 참다래 꽃썩음병원균들의 streptomycin과 copper sulfate에 대한 최소저해농도 (MIC, Minimal inhibition concentration)

Pathovar	최소저해농도와 약제저항성세균의 발생률								
	Streptomycin ($\mu\text{g}/\text{ml}$)				Copper sulfate (mM)				Total
	10	50	100	200	0.5	1.25	3	5	
<i>Pseudomonas syringae</i>	39	-	2	-	37	-	4	-	41
<i>pv. syringae</i>	(95%)	-	(5%)	-	(90%)	-	(10%)	-	(100%)
<i>Pseudomonas fluorescense</i>	2	-	-	-	2	-	-	-	2
	(100%)	-	-	-	(100%)	-	-	-	(100%)

국내에서 분리한 streptomycin 저항성 균주의 경우, 2 균주 모두 최소저해농도 (MIC)가 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 나타내었으며, copper sulfate 저항성 균주의 경우에도 최소저해농도가 3 mM도 비교적 낮은 저항성 농도를 나타내어 저항성 균주 출현의 초기단계로 생각되며 앞으로 이에 대한 지속적인 감시가 필요할 것으로 생각된다.

2. 병원균의 약제저항성 유전자 확인

1) Streptomycin 저항성 유전자

Streptomycin은 1950년대 후반부터 세균성 질환의 치료제로 널리 사용되어 왔으나 임상병원균에서 streptomycin 저항성 세균이 출현하게 됨에 따라 저항성 기작에 대한 많은 연구가 진행되어 왔다 (Palmer 등, 1997; Sundin과 Bender, 1995, 1996). Streptomycin 저항성과 관련된 불활성효소는 aminoglycoside phosphotransferase인 APH(6), APH(3'), aminoglycoside nucleotidyltransferase인 ANT(6), ANT(3') 등이 알려져 있다. 이들 중 가장 먼저 밝혀진 저항성 유전자는 *strA*와 *strB*가 intergeneric space 없이 병렬로 연결되어 있는 *strA-strB*구조를 가지고 있는 경우로 비접합성 plasmid에서 보고 되었다 (Sundin과 Bender, 1993). 이 유전자는 aminoglycoside phosphotransferase인 APH(3')와 APH(6)을 각각 encoding하는 것으로 밝혀졌으며 (Jones 등, 1991; Minsavage 등, 1990), *P. syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv.

papularis, *X. campestris* pv. *vesicatoria* 및 몇몇 식물 병원세균의 집합성 plasmid에서도 *strA-strB* 유전자가 존재하는 것이 보고 되었다 (Chiou와 Jones, 1993; Sundin과 Bender, 1995). 식물병원성 세균에서 *strA-strB*구조는 대부분 Tn5393과 함께 발견되고 있으며 (Fig. 1) 기주 범위도 식물과 관련된 세균 뿐 만 아니라 임상 병원균에서도 발견되고 있다 (Chiou와 Jones, 1995; Tauch 등, 2000). 뿐만 아니라 IS1133이나 IS6100 등의 insertion sequence가 삽입되어 promoter를 제공함으로써 저항성 유전자의 발현을 증가시킴이 보고 되고 있다 (Sundin과 Bender, 1995). *strA-strB* 구조에서 *strB*의 염기서열은 세균의 종류에 상관없이 100% 일치하는 것으로 알려져 있으나 *strA*의 경우 804 bp의 염기서열 내에서 5 bp의 polymorphism이 발견된다는 보고도 있다 (Sundin, 2000).

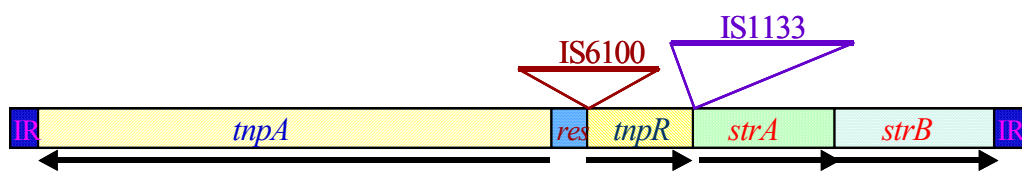


그림 5-1. *E. amylovora* and *X. campestris* pv. *vesicatoria*에서 IS1133과 IS6100의 삽입 위치를 포함하는 Tn5393의 유전자 지도. 전사의 방향은 굵은 화살표로 나타내었다. 가는 화살표는 PCR과 염기서열 분석에 사용한 primer들의 위치이다.

가. 재료 및 방법

㉠ Primer의 제조

식물에서 분리한 세균들이 가지고 있는 streptomycin 저항성 유전자는 일반적으로 Tn5393에 *strA-strB* 유전자를 가지고 있거나 IS6100이나 IS1133과 같은 insertion sequence들이 삽입되어 저항성 정도에 영향을 끼치는 것으로 알려져 있다. 따라서 국내에서 수집된 꽃썩음병원균에서도 *strA-strB* 유전자와 더불어 이와 같은 transposon이 존재하는지 확인하기 위해 염기서열을 Primer3 Input site (<http://www.genome.wi.mit.edu>)에 대입한 후 적절한 크기의 primer를 설계하였다.

Primer의 염기서열과 예상되는 산물의 크기는 표 5-4 에 나타내었다.

표 5-4. 실험에 사용한 primer들의 염기서열

이름	염기서열 (5'→3')	관련된 유전자	산물의 크기(bp)	참고문헌
StrAB-1	TGAATCGCATTTCTGACTGGTT	<i>strA-strB</i>	1,640	Palmer 등, 1997
StrAB-2	GCTAGATCGCGTTGCTCCTCT			
tnpA-F	GGCGGGATCTGCTTGTAGAG	<i>tnpA</i>	300	this study
tnpA-R	GCTTTCCATGGTCTCTGAGC			
tnpR-F	AACACGGTGAAGGAGCTGTC	<i>tnpR</i>	486	this study
str-7	TCACCACGTGCGAAAAACAAA			

㉠ PCR

Single colony를 100 μ l의 0.1% chelex-100 (Bio-rad)용액에 넣고 잘 혼합한 뒤 5분간 끓여 원심분리하였다. 1 μ l의 상층액을 PCR의 template DNA로 사용하였다. PCR 반응액의 조성은 위의 병원성 유전자의 PCR 조건과 동일하게 수행하였다. Streptomycin 저항성 유전자를 검출하기 위한 PCR 온도 조건은 94°C에서 5분간 초기 denaturation을 행한 뒤, 94°C에서 30초간 denaturation, 58°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 30초간 extension과정을 40회 반복하였다. 마지막으로 72°C에서 5분간 반응시켰으며, Perkin Elmer사 (USA)의 GeneAmp PCR system 2400을 사용하였다.

㉡ 저항성 유전자의 염기서열 분석 및 southern hybridization

약제저항성 유전자를 PCR을 통해 검출한 후 DNA purification kit (Mo Bio)를 사용하여 gel로부터 DNA를 분리하였다. 모든 반응은 위와 동일한 조건으로 수행하였으며, 얻어진 산물은 염기서열분석과 Southern hybridization을 위한 probe로 사용하였다. Streptomycin 저항성 유전자 확인을 위한 probe는 1,640 bp의 *strAB* 유전자의 일부를 이용하였다. 국내에서 분리한 참다래 꽃썩음병균 중 streptomycin에 저항성을 나타내는 *P. syringae* pv. *syringae* KHP7, BJB3 과 참다래 궤양병반에서 분리한 *P. marginalis* BJW1 그리고 일본의 참다래 궤양병균인 *P. syringae* pv. *actinidiae* Pa11을 대조군주로 사용하였다.

나. 결과 및 고찰

Streptomycin에 저항성을 나타내는 두 개의 꽃썩음병균 KHP7과 BJB3의 저항성 유전자를 확

인하기 위해 PCR을 수행하였고 positive control로 참다래 궤양병균 중 streptomycin 저항성이 있는 *P. syringae* pv. *actinidiae* Pa11을 사용하였다. StrAB primer set로 PCR을 수행한 결과 그림 5-2에서와 같이 예상하였던 band가 검출되었다. 또한 *tnpA*와 *tnpR* 유전자와 insertion sequence의 유무를 확인하기 위해 동일 조건으로 PCR을 수행한 결과, *tnpA*의 경우에서도 예상하였던 크기의 band가 검출되었다 (그림 5-3). *tnpR* primer를 이용하여 PCR을 수행하였을 때 insertion sequence가 존재할 경우에는 1,776 bp의 band가 검출되어야 하지만 실험결과 486 bp의 band만 검출되어 두 균주 모두 insertion sequence가 존재하지 않음을 확인할 수 있었다 (그림 5-4).

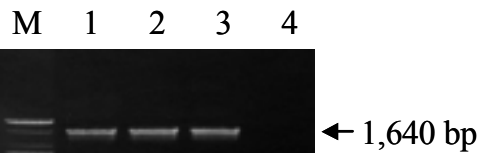


그림 5-2. strAB primer를 사용한 PCR 산물.

Lane M, 100 bp ladder (Bioneer Co.); lane 1, *P. s.* pv. *syringae* KHP7; lane 2, *P. s.* pv. *syringae* BJB3; lane 3, positive control, *P. s.* pv. *actinidiae* Pa11; lane 4, negative control.

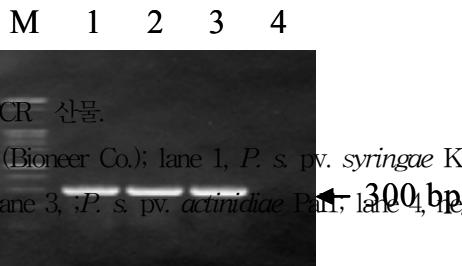


그림 5-3. *tnpA* primer를 사용한 PCR 산물.

Lane M, 100 bp ladder (Bioneer Co.); lane 1, *P. s.* pv. *syringae* KHP7; lane 2, *P. s.* pv. *syringae* BJB3; lane 3, *P. s.* pv. *actinidiae* Pa11; lane 4, negative control.

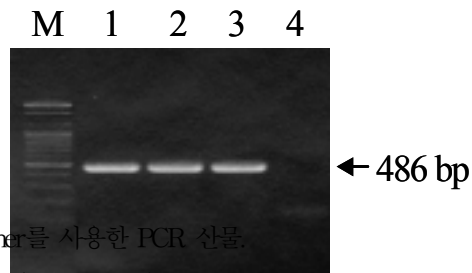


그림 5-4. tnpR-F and str-7 primer를 사용한 PCR 산물.

Lane M, 100 bp ladder (Bioneer Co.); lane 1, *P. s. pv. syringae* KHP7; lane 2, *P. s. pv. syringae* BJB3; lane 3, *P. s. pv. actinidiae* Pa11; lane 4, negative control.

P. syringae pv. *syringae* KHP7과 BJB3이 가지고 있는 *strA-strB* 유전자의 염기서열의 변이를 파악하기 위해 *strA-strB*를 cloning하여 분석한 결과 *strA*는 *Pseudomonas syringae* A2, *Xanthomonas campestris*, *Erwinia amylovora*, *Corynebacterium striatum*의 Th5393과 같은 polymorphism 양상을 보여주었으며 (표 5-5) *strB*는 지금까지 알려진 염기서열과 100% 동일하였다.

Streptomycin 저항성 유전자의 위치를 확인하기 위해 StrAB primer로 증폭된 DNA 절편을 probe로 사용하여 Southern hybridization을 수행한 결과, 그림 5-5와 같이 국내에서 분리한 *P. syringae* pv. *syringae* KHP7과 BJB3가 가지고 있는 3개의 plasmid 중 약 100 kb 정도의 크기가 큰 plasmid에 유전자가 존재하였다. 대조군으로 사용한 *P. syringae* pv. *actinidiae* Pa11의 경우는 2개의 plasmid에 streptomycin 저항성 유전자를 가지고 있었으며 이 중 하나는 국내의 참다래 꽃썩음병균이 가지고 있는 저항성 plasmid와 크기가 비슷하였다. *P. marginalis* BJW1은 chromosomal DNA에 저항성 유전자를 가지고 있었다.

표 5-5. 다양한 병원성 세균에 존재하는 streptomycin 저항성 유전자 *strA*에 대한 염기서열의 polymorphism 분석

<i>strA</i> 염기서열의 다형성		균주 명	특징
1	69 80 204 467 470 593	<i>Aeromonas salmonicida</i> 1682/92	
		<i>Corynebacterium striatum</i> M82B	
		<i>Erwinia amylovora</i> CA11	
		<i>Pseudomonas syringae</i> A2, 7B12, 8C32	
T	T	<i>Pseudomonas</i> spp. BixF6, PsR9, PsR17	Tn5393 variants
T	T	<i>Xanthomonas campestris</i> BV5-4a	
G		<i>Yersinia pestis</i> 16/95	
A		<i>Pseudomonas marginalis</i> BJW1	
		<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> KHP7	this study
		<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> BJB3	
-	-	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> Pa11	
A	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MUS	
		<i>Haemophilus dureyi</i> CH37	nonconjugative plasmid
-	C	<i>Pasteurella multocida</i> Pml096	
		<i>Escherichia coli</i> HM69	
		<i>Salmonella enterica</i> sv. <i>typhi</i> CT18	large plasmid location
		<i>Shigella flexneri</i> 2731	
-	C	<i>Pasteurella haemolytica</i> A1	nonconjugative plasmid
-	-	Broad range plasmid RSE1010	

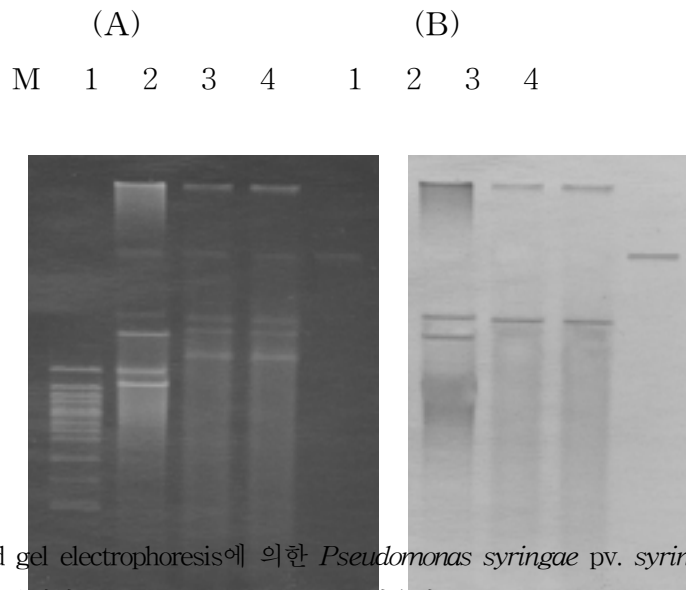
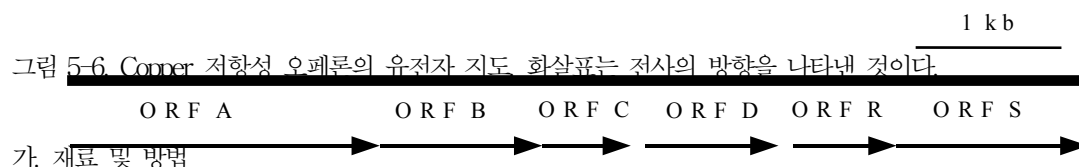


그림 5-5. Pulsed field gel electrophoresis에 의한 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*의 총 DNA의 분리와 (A) and strAB probe를 이용한 Southern blot analysis (B). Lane M, size marker (8-43 kb ladder, Gibco BRL.); lane 1 *P. syringae* pv. *actinidiae* PaI; lane 2 to 3, *P. syringae* pv. *syringae* strains (KHP7, BJB3); lane 4, *P. marginalis* BJW1.

2) Copper 저항성 유전자

Streptomycin과 함께 copper 화합물도 농작물의 세균성 및 진균성 질병에 대한 항 미생물제 (antimicrobial agent)로서 병원균의 방제에 오랫동안 사용되어 왔다. 그 결과로 copper 저항성을 가진 미생물들이 농업환경에서 발견되고 있어 이들에 대한 방제가 문제로 대두되고 있다 (Cooksey, 1987; Sundin과 Bender, 1993; Scheck 등, 1996). 전 세계적으로 사용되고 있는 copper를 기본으로 한 살균제에는 Bordeaux mixture, cupric hydroxide, cuprous oxide, fatty acids의 copper salts, ammonical copper, tribasic copper sulfate, cupric hydroxide와 ethylene bis-dithiocarbamates (EBDC)의 혼합액 등이 있으며 *Pseudomonas*와 관련된 질병의 방제에 효과적인 것으로 알려져 있다 (Gaignard와 Luisetti, 1992; Lee 등, 1993; Wimalajeewa 등, 1991). 그러나 국내에서는 쿠퍼수화제 (cupric hydroxide) 또는 보르도액 (Bordeaux mixture) 과 같은 약제만이 주로 사용되어 Cu^{2+} 에 대해 저항성을 나타내는 균주가 빈번하게 출현할 가능성이 많다. Copper는 살균제로서 뿐만 아니라 몇몇 세균 효소의 필수적인 구성원소이기도 하여

copper 저항성 세균 중에는 매우 낮은 수준에서 저항성을 나타내는 균주들도 존재 한다 (Kidambi 등, 1995). 일반적으로 copper 저항성 유전자는 plasmid에 존재하는 것으로 알려져 있으며 *Escherichia coli*, *Mycobacterium scrofulaceum*을 비롯하여 식물성 병원세균인 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* 등에서 발견되었다 (Garde와 Bender, 1991; Bender와 Cooksey, 1986, 1987). 일반적으로 알려져 있는 copper 저항성 유전자는 한 방향을 갖는 4개의 ORF (A, B, C, D)로 구성된 *cop* operon을 형성하고 있고 (Mellano와 Cooksey, 1988) (그림 23), CopR과 CopS라는 activator 단백질을 만들어내는 조절유전자 *copR*과 *copS*가 바로 옆에 위치하고 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 *X. campestris* pv. *vesicatoria*의 copper 저항성 유전자의 일부를 cloning하여 만든 probe가 다른 *X. campestris* pathovars나 *Pseudomonas*와는 혼성화 되지 않아 비슷한 환경에서 자라는 식물성 병원세균일지라도 copper에 대한 저항성 유전자가 서로 다르다는 보고가 있었다 (Garde와 Bender, 1991).



㉠ Primer의 제조

P. syringae pathovar들 중에서 copper 저항성 유전자의 염기서열이 밝혀진 경우는 미국에서 보고된 *P. syringae* pv. *tomato* (Mellano와 Cooksey, 1988)와 일본에서 보고된 *P. syringae* pv. *actinidiae* Pa429였다 (published only in GenBank database, GI8388755). 이들의 copper 저항성과 관련된 유전자를 NCBI의 blast search로 분석한 결과, ORF A, B, C, D는 14~36%로 매우 낮은 상동성을 보여 저항성 유전자가 서로 다르다는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 이들의 *copR*과 *copS*의 경우 94%정도의 상동성을 가지고 있는 것으로 나타나 매우 유사한 조절유전자를 가지고 있음을 알 수 있었다. 따라서 국내에서 분리한 참다래 궤양병균이 가지고 있는 copper 저항성 유전자가 이들 두 종류의 pathovar가 가지고 있는 저항성 유전자 중 어느 것과 유사한지를 확인하기 위해 *copR*의 염기서열 중 서로 상동성을 가지고 있지 않은 부분으로

primer를 설계하여 PCR에 사용하였다. Primer의 염기서열과 예상되는 산물의 크기는 표 16 에 나타내었다.

표 5-6. 실험에 사용한 primer들의 염기서열

이름	염기서열 (5'→3')	관련된 유전자	산물의 크기(bp)	참고문헌
cop-AC-F	ACCTATCGGTTTGTGGCAG		982	this study
cop-AC-R	GCGATCTGGTTAATCGCTTC	<i>copR</i>		
cop-TO-F	GAGTGTGCCTGACCCTGTTC		771	this study
cop-TO-R	GCAATCTGGGTAATCGCTTC			

㉠ PCR

Copper 저항성 유전자의 확인을 위한 PCR 조건은 annealing 온도가 53°C였고, 다른 조건은 위와 같은 조건으로 수행하였다. 얻어진 PCR 산물은 agarose gel에서 전기영동하여 ethidium bromide (0.5 µg/µl)로 염색한 후 관찰하였다.

㉡ 저항성 유전자의 염기서열 분석 및 southern hybridization

약제저항성 유전자를 PCR을 통해 검출한 후 DNA purification kit (Mo Bio)를 사용하여 gel로부터 DNA를 분리하였다. 모든 반응은 위와 동일한 조건으로 수행하였으며, 얻어진 산물은 염기서열분석과 Southern hybridization을 위한 probe로 사용하였다. Copper 저항성 유전자의 경우는 *copR*을 probe로 이용하였다.

나. 결과 및 고찰

Copper에 저항성을 가진 4개의 참다래 꽃썩음병균 (HSS3, KJA3, NNH2, NNH4)에 대해 PCR을 수행한 결과, cop-TO primer set를 사용한 경우에는 4개의 균주 모두 band가 검출되지 않았으나 cop-AC primer set를 이용한 경우에는 982 bp의 예상하였던 band를 확인할 수 있었다 (그림 5-6). 따라서, 국내에서 분리한 참다래 꽃썩음병균이 가지고 있는 copper 저항성 유전자는 *P. syringae* pv. *actinidiae*의 유전자와 유사한 구조를 하고 있음을 알 수 있었다.

M 1 2 3 4 5 6

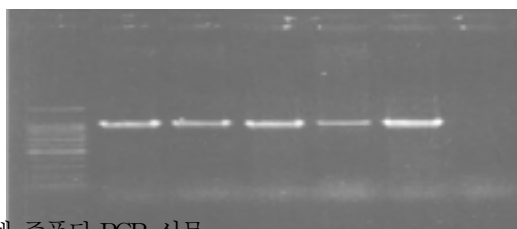


그림 5-6. cop-AC primer에 의해 증폭된 PCR 산물

Lane M, size marker, 100 bp ladder; lane 1 to 4, *P. syringae* pv. *syringae* strains (HSS3, KJA3, NYH3, NNH4); lane 5, *P. syringae* pv. *actinidiae* JYG3; lane 6, negative control.

이 PCR product의 일부분에 대하여 염기서열을 분석한 결과, 국내에서 분리한 *P. syringae* pv. *actinidiae* JYG3의 *copR*과 98%, 일본균주인 *P. syringae* pv. *actinidiae* Pa429과 95%의 상동성을 나타내었고 *P. syringae* pv. *tomato*와는 90%의 상동성을 나타내어 국내에서 분리한 참다래 꽃썩음병균에 존재하는 *copR*의 염기서열이 국내의 참다래 궤양병균과 유사함을 확인할 수 있었다 (그림 5-7). 또한 *copR*의 위치를 파악하기 위하여 국내균주의 plasmid DNA와 chromosomal DNA를 분리하여 *copR* probe로 southern hybridization을 시행한 결과, copper에 저항성을 나타내는 균주인 HSS3, KJA3, NYH3, NNH4 모두 두 개의 plasmid 중 약 60 kb 정도 크기의 plasmid에 copper 저항성유전자가 존재하는 것으로 확인되었다 (그림 5-8). 또한 참다래 궤양병균인 *P. syringae* pv. *actinidiae* JYG3의 copper 저항성 유전자와도 크기가 비슷함을 확인하였다. 저항성 유전자가 plasmid DNA에 존재한다는 것은 앞으로 국내의 농업생태 환경에서 copper 저항성 균주가 높은 빈도로 출현할 가능성을 시사하는 것으로 사료된다.

식물병원세균에서 유전적 분화는 plasmid와 genomic DNA 상에서 발생하는 다양한 유전적 변이에서 유래한다. 특히 일부 식물병원세균에서 약제저항성을 비롯한 표현형적인 기능들은 plasmid와 연관이 있음이 보고 되었다 (Chiou와 Jones, 1993; 1995; Minsavage 등, 1990; Scholz 등, 1994; Sundin과 Bender, 1993; Stall 등, 1986). Mellano와 Cooksey (1988)는 *P. syringae*에서 copper 저항성 유전자는 plasmid에 존재하며 염기서열 분석결과 한 방향을 가진 4개의 ORF로 구성된 *cop* operon을 형성하고 있다고 보고하였다. 또한 Nakajima 등 (1995)은 참다래 궤양병균의 streptomycin 저항성 유전자는 각각 80 kb 크기의 pPaCu1과 280 kb 크기의 pPaCu2 plasmid에 존재한다고 보고 된 바 있다.

```

JYG3 1 ATGAAACTGG TGGTAGCCGA AGACGAACCG AAGACTGGAA TCTATCTGCA GCAAGGCCTG
HSS3  .....G.....
Pa429 .....T.....
61 CGGAAGGCCG GCCTCAATGT GGACCGCGTG GTCACAGGCA CAGATGCCGT TGACCAGGCG
.....
.....G.....T.....
121 CTCAATGAAG CCTATGACCT GATGATTCTT GACGTGATGA TGCCTGGCCT GGATGGCTGG
.....A.....
.....T.....G.....
181 GCAGTCATCA GACGCCTTCG CACCGCTGTC CAGTCCGTAC CGGTGCTGTT TCTGACCGCA
.....A.C.....G.C.....
.....A.....G.....
241 CGCCACGGGG TAGACGACGG GCTCAAGGGC CTGGAGCTGG GCGCCGATGA TTACCTGGTT
.....C.....C.....C.....GG.....
.....G.....C.G.....
301 AAGCCAATTG CTTTATCAGA ACTGCTGGCA CGGGTGCAGAA CACTGCTACG GCGCGGCAGC
.....C.....
.....T.....T.....
361 CGCAGGCTGC CGGTCAAAC AAGCCTGCAA ATCGGAGACC TTCAAGTGGA TTTGCTCAAG
.....G.....
421 CGTCCGGCGA CTCGGGGCGG CAAGCGAATC GACCTTACGG CCAAGGAGTT CGCACTGCTG
.....G.....A.....
481 GCGTTACTGA TGGCCCGGCA AGGTGAGGTG TTGTCCAAAT CGCTGATAGC TTCCAGGTC
.....
.....
541 TGGGACATGG ATTTTCGACAG CGACACAATT GTTATCGACG TGGCGATACG GCGCTTGAGC
.....G.....
.....A.....A.G.....G.....
601 GCCAAGATTG ACGATGACTT CGAGGCTAAA CTGCTGCATA CCTGCCCGG GATGGGTTAC
.....A.....G.....
661 ATGCTAGACG CGCAGGACGA AGGATGA
.....
.....

```

그림 5-7. 한국에서 분리한 참다래 꽃썩음병균인 *P. syringae* pv. *syringae* HSS3와 참다래 궤양병균인 *P. syringae* pv. *actinidiae* JYG3 그리고 일본에서 분리된 참다래 궤양병균인 *P. syringae* pv. *actinidiae* Pa429에 존재하는 *copR* 의 염기서열 비교.

(A) (B)
M 1 2 3 4 5 1 2 3 4 5

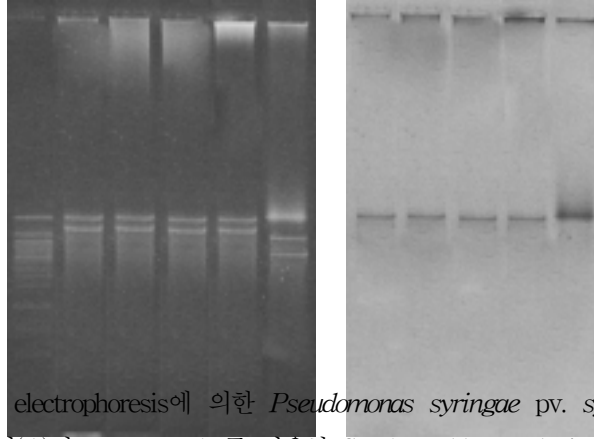


그림 5-8. Pulsed field gel electrophoresis에 의한 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*의 total DNA의 분리(A)와 *corR* probe를 사용한 Southern blot analysis. Lane M, size marker (8-43 kb ladder, Gibco BRL.); lane 1 to 3, *P. syringae* pv. *syringae* strains (HSS3, KJA3, NYHB, NNH4); *P. syringae* pv. *actinidiae* JYG3.

3. 병원균의 plasmid 분석

가. 재료 및 방법

Plasmid pattern을 분석하기 위한 시험 균주는 국내의 8곳 채집지역에서 분리된 병원성을 가지고 있는 41개의 *P. syringae* pv. *syringae*, 2개의 *P. fluorescense*, 그리고 *P. syringae* pv. *syringae* PSJA1를 실험에 사용하였다.

Plasmid DNA의 추출은 앞과 동일한 방법으로 수행하였으며 분리된 plasmid는 BIO-RAD사의 CHEF-DR II pulsed field electrophoresis system을 이용하여 0.65% agarose gel (Seakem Gold agarose, Takara) 상에서 전기영동 하였다. 전기영동은 0.5× TBE buffer를 사용하였으며 6 V/cm로 14°C를 유지시켜 8시간 동안 수행하였으며, ethidium bromide (0.5 µg/µl)로 염색한 후 관찰하였다

Plasmid DNA의 크기를 확인하기 위해 단일 Plasmid를 제한효소 *EcoRI*으로 처리한 후

PFGE를 수행하였다. 6시간 동안 전기영동 한 것을 제외한 모든 조건은 앞과 동일하게 시행하였다.

나. 결과 및 고찰

시험에 사용한 균주들이 가지고 있는 plasmid의 수를 분석한 결과, 각 균주에서 추출된 plasmid의 수는 없는 것에서부터 1-4개로 나타났으며 크기까지 고려하여 6개의 group으로 나눌 수 있었다 (그림 5-9, 표 5-7). 지리적으로 다른 곳에서 분리하였음에도 불구하고 *P. syringae* pv. *syringae* 중 34개 (82%)가 2개의 plasmid를 가지고 있는 group III에 속해 있었다. group I은 plasmid가 존재하지 않는 경우로 *P. syringae* pv. *syringae* BDR1과 HJD1 그리고 *P. fluorescense* KDK8 및 SSB8이 여기에 속했다.

group II는 1개의 plasmid가 존재하는 경우로, *P. syringae* pv. *syringae* HJD2가 이에 속하며, 크기가 약 85 kb 정도였다 (그림 5-10). group IV의 경우는 전남 고흥에서 분리된 *P. syringae* pv. *syringae* KHP7과 전남 보성에서 분리된 BJB3가 해당되었다. Group V는 plasmid의 수는 3개이나 group IV의 plasmid들과는 크기가 다른 경우로 경남 남해에서 분리한 NNH2와 NNH3가 여기에 해당되었다. group VI의 *P. syringae* pv. *syringae* KJA1은 4개의 plasmid가 존재하여 다른 분리균들과 다른 형태의 plasmid를 가지고 있음이 확인되었다. 일본에서 분양 받은 균주의 경우에도 국내 분리균주와 크기가 동일한 2개의 plasmid DNA를 가지고 있어 우리나라와 일본의 *P. syringae* pv. *syringae*가 유전적으로 가까운 것으로 생각된다.

M 1 2 3 4 5 6

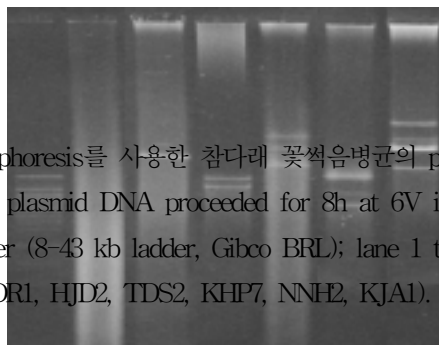


그림 5-9. Pulsed-field gel electrophoresis를 사용한 참다래 꽃썩음병균의 plasmid pattern의 비교. Electrophoresis of plasmid DNA proceeded for 8h at 6V in 0.65% agarose gel. Lane M, size marker (8-43 kb ladder, Gibco BRL); lane 1 to 6, *P. syringae* pv. *syringae* strains (BDR1, HJD2, TDS2, KHP7, NNH2, KJA1).

표 5-7. 국내에서 분리한 참다래 꽃썩음병균의 plasmid 크기와 수에 따른 그룹

		균 주 명			
그룹 plasmid의 수		<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 개체수		<i>P. fluorescense</i> 개체수	
I	0	BDRI, HJD1	2 (4%)	SSB8, KDK8	2 (100%)
II	1	HJD2	1 (2%)		
III	2	BBK3, BBK5, BJB4, HOY1, HSS1, HSS3, HSS6, HSS7, KDK1, KJA3, KJA5, KJA6, SCS1, SCS2, SCS3, SCS4, TDS1, TDS2, TDS3, TDS4, TKS2, TKS3, TKS4, TKS7, SSB2, SSB3, SSB5, SSB7, NNH4, NYH3, NYH7, HYT1, PSJA1	34 (82%)		
IV	3	KHP7, BJB3	2 (4%)		
V	3	NNH2, NNH3	2 (4%)		
VI	4	KJA1	1 (2%)		
		분리된 균의 수	41 (100%)		2 (100%)

1 2 3

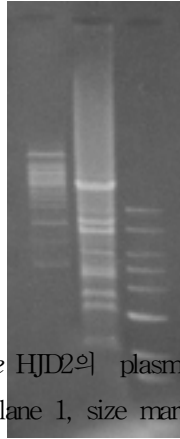


그림 5-10. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* HJD2의 plasmid DNA를 *Eco*R I 으로 절단한 pulsed-field gel electrophoresis. lane 1, size marker, (8-43 kb ladder, Gibco BRL); lane 2, plasmid DNA digested with *Eco*R I; lane 3, 1kb plus ladder (Gibco BRL)

4. 병원균의 지리적 변이 분석

가. 재료 및 방법

국내에서 분리한 꽃썩음병원균의 genomic DNA를 이용하여 RAPD를 수행함으로써 병원균의 지리적 기원에 따른 변이를 분석하였다. 먼저 지리적 기원이 같은 지역 내에서의 변이를 확인하기 위해 전남 해남지역에서 분리한 4개 균주 DNA를 주형으로 사용하여 PCR을 수행하였다. 서로 다른 지역에서 분리한 균들간의 변이를 확인하기 위해 국내의 8곳 채집지역에서 분리된 *P. syringae* pv. *syringae* 대표 균주 1개씩, 일본균주인 *P. syringae* pv. *syringae* PSJA1, 또 다른 꽃썩음병원균인 *Pseudomonas fluorescense* KDK8, 그리고 국내에서 분리된 참다래 궤양병원균인 *P. syringae* pv. *actinidiae* JYG3를 실험에 사용하였다.

RAPD를 수행하기 위한 PCR 반응액의 조성은 앞서와 같으며, primer는 Operon사의 56개의 random primer를 이용하였다. 반응 온도 조건은 94°C에서 5분간 초기 denaturation을 행한 뒤, 94°C에서 30초간 denaturation, 38°C에서 40초간 annealing, 72°C에서 40초간 extension과정을 45회 반복하였다. 마지막으로 72°C에서 5분간 반응시켰으며, Perkin Elmer사 (USA)의 GeneAmp PCR system 2400을 사용하였다. 얻어진 PCR 산물은 1.2% agarose gel에서 전기영

동하여 ethidium bromide (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)로 염색한 후 관찰하였다.

나. 결과 및 고찰

동일지역에서 분리한 균주들 사이의 변이를 분석하기 위해 RAPD를 수행한 결과, 그림 5-11에서 보는 바와 같이 변이가 전혀 없는 것으로 나타나 유전적으로 동일함을 짐작할 수 있었다.

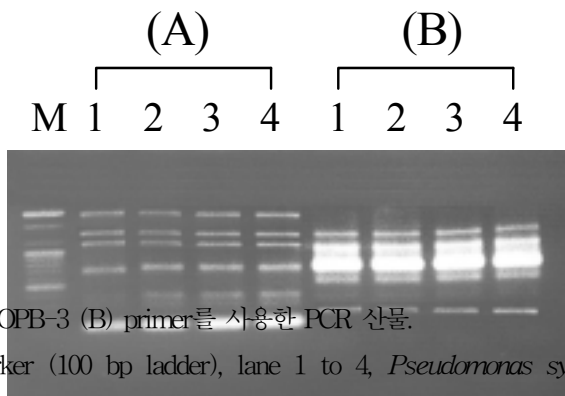


그림 5-11. OPA-13 (A) and OPB-3 (B) primer를 사용한 PCR 산물.

Lane M, size marker (100 bp ladder), lane 1 to 4, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (HOY4, HSS1, HSS3, HSS6,) isolated from Haenam, Jeonnam.

실험에 사용한 균주들에 대하여 RAPD 분석한 결과 국내의 서로 다른 지역에서 채집된 8개의 *P. syringae* pv. *syringae*들의 경우, 56개의 primer 중 51개의 primer에서는 모두 동일한 band pattern을 나타내었으며, 단지 5개의 primer(OPB-19, OPC-6, OPC-8, OPD-3, OPE-3)에서 polymorphic한 band pattern을 나타내었으며 그림 5-12에 제시하였다. 따라서 국내의 참다래 꽃썩음병반으로부터 분리한 *P. syringe* pv. *syringae* 들은 지리적 기원에 따른 유전적 변이가 거의 없는 것으로 생각된다. 다른 꽃썩음병균인 *Pseudomonas* spp. KDK8과 *P. syringae* pv. *actinidiae* JYG와는 모든 primer에서 확연하게 다른 polymorphism을 나타내어 유전적으로 거리 멀다는 것을 확인할 수 있었다.

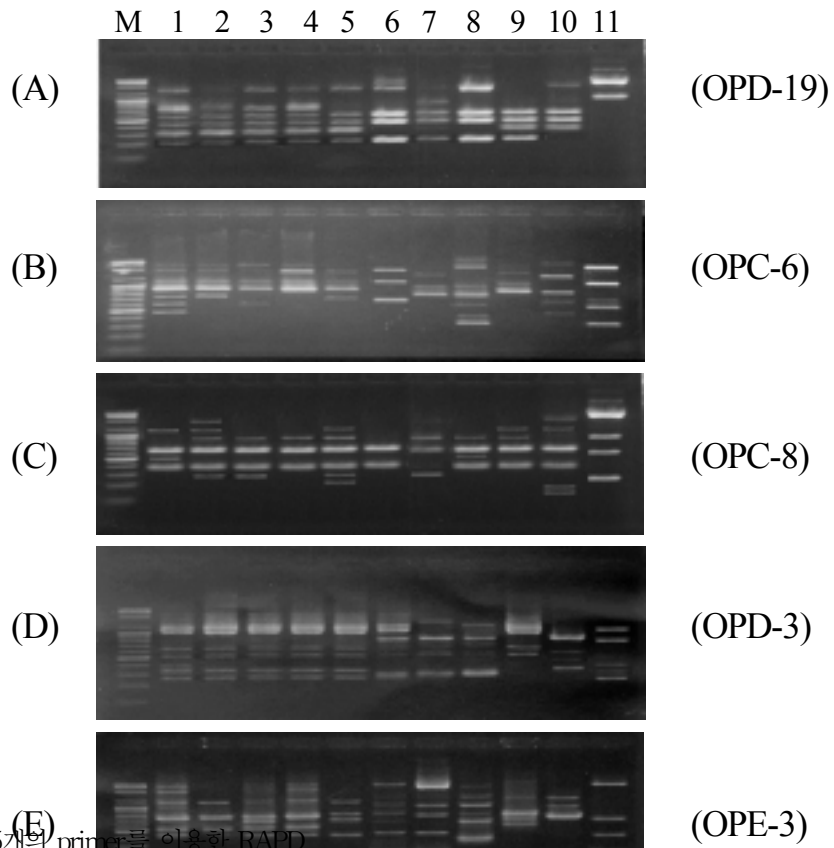


그림 5-12. 5개의 primer를 이용한 RAPD

Lane M, size marker (100 bp ladder); lane 1 to 9, *Pseudomonas syringae* strains (HOY4, BBK3, KHP7, SCS1, TKS2, SSB2, NNH2, HJD1, PSJA1); lane 10, *Pseudomonas fluorescense* KDK8; lane 11, *P. syringae* pv. *actinidiae* JYG3.

제 6 절 참다래 꽃썩음병 경종적 방제 체계 확립

1. 참다래 꽃썩음병 방제용 한국형 환상박피 체계화

가. 재료 및 방법

환상박피에 의한 참다래 꽃썩음병 방제효과를 극대화시킬 수 있는 환상 박피 시기를 조사하기 위하여 전남 순천지방에서 참다래 꽃의 평균 만개일인 5월 25일을 기준으로 만개기 약 보름(16일) 전인 2003년 5월 8일, 만개기 약 한달(29일) 전인 4월 26일, 만개기 약 한달 반(44일) 전인 4월 11일, 만개기 두달(60일) 전인 3월 26일, 만개기 두달 반(75일) 전인 3월 11일에 각각 그림 6-1과 같은 방법으로 참다래 주간부위에 환상박피를 하였다.

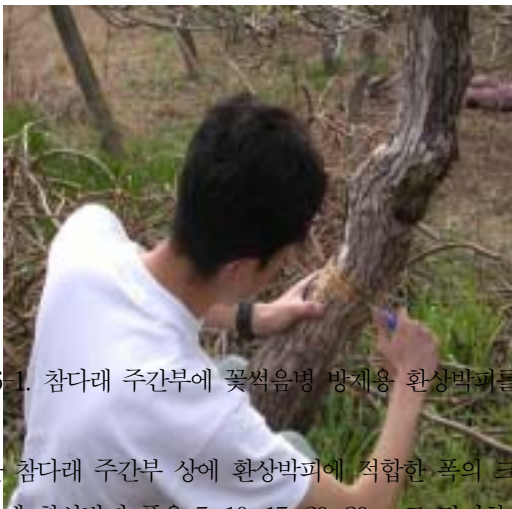


그림 6-1. 참다래 주간부에 꽃썩음병 방제용 환상박피를 하는 모습

또한 참다래 주간부 상에 환상박피에 적합한 폭의 크기를 구명하기 위하여 2003년 3월 26일 주간부에 환상박피 폭을 5, 10, 15, 20, 30 mm로 달리한 후에 꽃썩음병 발병율과 방제효과를 조사하였으며, 지상에서 환상박피에 적합한 참다래 주간부위의 높이를 구명하기 위하여 주간부에 지상으로부터 10, 20, 30, 40, 60, 80 cm 높이에 환상박피를 하여 꽃썩음병 발병율과 방제효과를 조사하였다.

각 시험은 전남 순천시 해룡면 소재 참다래 과수원에서 난괴법 3반복으로 수행하였으며,

2003년 5월 27일 각 처리당 400개의 꽃봉오리와 꽃에 발생한 꽃썩음병 발생율을 조사하여 무처리구의 발병율과 비교하여 방제효과를 평가하였다.

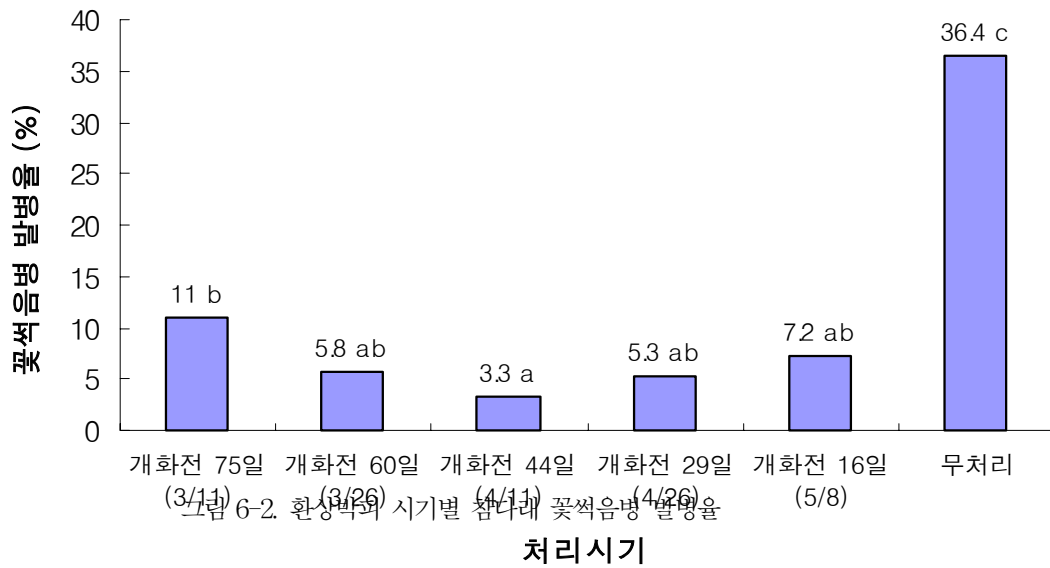
나. 결과 및 고찰

전남 순천지방에서 참다래 꽃의 평균 만개일인 5월 25일기준으로 만개기 약 한달반 전에 환상박피를 한 경우 3.3%의 꽃썩음병 발병율로 무처리구에 대해 90.9%의 가장 높은 방제효과를 보인 반면에 만개기 약 한달 전과 두달전에 환상박피를 한 경우는 각각 이 보다 다소 높은 5.3%와 5.8%의 발병율을 나타내어 무처리구에 대해 각각 85.4%와 84.1%의 방제효과를 보였다. 그러나 만개기 약 보름 전과 만개기 두달반전에 환상박피를 한 경우는 각각 7.2%와 11.0%의 발병율을 나타내어 방제효과가 다른 처리시기에 비하여 상대적으로 크게 떨어졌다 (표 6-1, 그림 6-2).

표 6-1. 참다래 주간부에 처리한 환상박피 시기별 참다래 꽃썩음병 발병율 및 방제가

환상박피 처리시기	꽃썩음병 발병율(%)	방제가(%)
무 처리	36.4 c	-
만개전 16일 (5월 8일)	7.2 ab	80.2
만개전 29일 (4월 26일)	5.3 ab	85.4
만개전 44일 (4월 11일)	3.3 a	90.9
만개전 60일 (3월 26일)	5.8 ab	84.1
만개전 75일 (3월 11일)	11.0 b	69.8

따라서 참다래 꽃의 만개 약 한달반전에 환상박피를 했을 때 90% 이상의 가장 높은 꽃썩음병 방제효과를 얻었으므로 참다래 재배시 환상박피에 의한 꽃썩음병 방제효과를 극대화시킬 수 있는 환상박피 최적 시기는 만개기 약 한달 반전인 4월 10일 전후인 것으로 확인되었다. 또한 만개기 약 한달 전과 두달전에 환상박피를 했을 때 약 85% 수준의 방제효과를 보였으므로 참다래 꽃썩음병에 대하여 85% 이상의 방제효과를 얻을 수 있도록 4월 10일을 전후한 약 1개월 동안이 환상박피를 시행할 수 있는 유효기간이라 추정되었다. 이와같은 시험 결과는 3월 하순 또는 5월 초순에 환상박피를 시행한 경우보다 4월 (4월 초순 또는 4월 하순)에 환상박피를 시행한 경우에 참다래 꽃썩음병 방제효과가 높다는 Kajitani 등 (1991)의 보고와도 일치한다.



한편 참다래 주간부에서 환상박피에 적합한 폭의 크기를 알아보기 위한 시험 결과는 환상박피 폭을 5 mm로 한 경우에 꽃썩음병 발병율이 8.8%, 10 mm인 경우 6.5%, 15 mm인 경우 5.4%였으며 무처리구에 대한 꽃썩음병 방제효과가 75.8-85.2%였다. 반면에 환상박피 폭을 20 mm와 30 mm로 한 경우에는 꽃썩음병 발병율이 각각 3.9%와 3.7%로 환상박피 폭을 15 mm 이하로 한 경우에 비하여 훨씬 낮았으며 무처리구에 대한 방제가 각각 89.3%와 89.8%로 높게 나타났다 (표 6-3, 그림 6-3).

표 6-3. 참다래 주간부에 처리한 환상박피 폭별 참다래 꽃썩음병 발병율 및 방제가

환상박피 폭	꽃썩음병 발병율(%)	방제가(%)
무 처리	36.4 e	-
5 mm	8.8 d	75.8
10 mm	6.5 c	82.1
15 mm	5.4 b	85.2
20 mm	3.9 a	89.3
30 mm	3.7 a	89.8

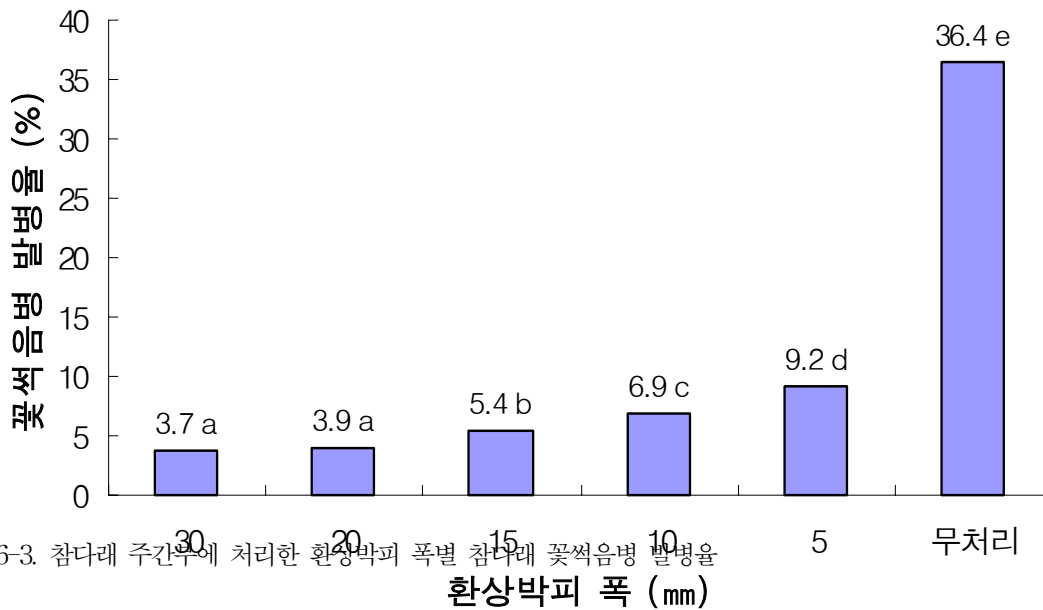


그림 6-3. 참다래 주간부에 처리한 환상박피 폭별 참다래 꽃썩음병 발병율

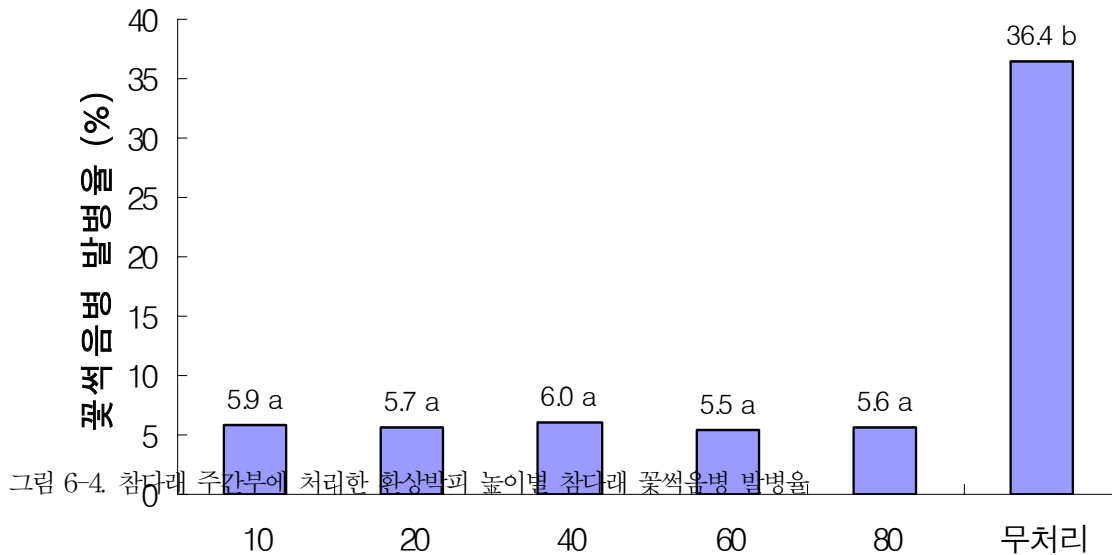
이러한 시험 결과는 환상박피 폭을 5 mm로 하는 것이 가장 적합하다고 일본에서 Kajitani 등 (1991)이 보고한 결과와는 다르게 우리나라에서는 환상박피 폭을 20-30 mm로 시행하는 것이 보다 높은 꽃썩음병 방제 효과를 얻을 수 있다는 것을 시사한다. 따라서 환상박피 폭을 20 mm와 30 mm로 한 경우에는 꽃썩음병 발병율에서 통계적으로 유의차가 없기 때문에 우리나라 실정에 맞게 참다래 주간부에 환상박피 폭을 20 mm로 시행하는 것이 꽃썩음병 방제에 가장 적합한 것으로 판명되었다.

또한 참다래 주간부에서 환상박피 시행에 적합한 높이를 구명하기 위한 시험 결과는 지상에서 10 cm 높이에 환상박피를 시행한 경우부터 80 cm 높이에 환상박피를 시행한 경우까지 주간부에서 환상박피를 시행한 높이가 달라도 꽃썩음병 발병율은 거의 차이가 없이 5.5-6.1% 수준이었으며, 무처리구에 대한 방제율도 85.0-83.2%로 처리간에 통계적인 유의차가 없었다. 따라서 참다래 꽃썩음병 방제를 위한 환상박피 위치는 주간부에서 어느 부위에 시행하든지 상관이 없는 것으로 확인되었다 (표 6-4, 그림 6-4).

이상의 결과를 종합해 보면 참다래 꽃 만개기 약 한달반 전인 4월 10일을 전후한 약 1개월 동안에 참다래 주간부위에 20 mm의 폭으로 환상박피를 시행하는 것이 우리나라 실정에 적합한 가장 이상적인 한국형 환상박피 방법이라고 결론지을 수 있다.

표 6-4. 참다래 주간부에 처리한 환상박피 높이별 참다래 꽃썩음병 발병율 및 방제가

환상박피 처리 높이	꽃썩음병 발병율(%)	방제가(%)
무 처 리	36.4 b	-
10 cm	5.9 a	83.8
20 cm	6.1 a	83.2
40 cm	6.0 a	83.5
60 cm	5.5 a	85.0
80 cm	5.6 a	84.6



환상박피가 참다래 꽃썩음병에 대하여 탁월한 방제효과를 나타낸다는 실증 시험연구 결과 보고에도 불구하고 환상박피의 꽃썩음병 발병 억제 기작은 명확하지 않다 (Kajitani 등, 1991). 본 시험에서도 환상박피가 최고 90% 이상의 꽃썩음병 방제효과를 나타내는 것을 확인하였다. 따라서 이러한 환상박피가 참다래 꽃썩음병 방제에 널리 활용되기 위해서는 환상박피의 꽃썩

음병 발병 억제 기작을 비롯하여 참다래 생육과 수량에 미치는 영향 등에 종합적인 연구 검토가 이루어져야 할 것이다.

2. 참다래 꽃썩음병 방제용 실용적 비가림 재배 체계화

가. 재료 및 방법

실용적 비가림 재배 방법을 체계화하기 위하여 비가림 시설에 따른 꽃썩음병 방제효과를 구명하기 위하여 전남 순천지방에서 참다래 꽃의 평균 만개일인 5월 25일 기준으로 만개기 60일 전인 2003년 3월 26일에 그림 6-5처럼 완전비닐피복 시설, 부분비닐피복 시설, 비닐터널 시설, 파풍망 시설을 설치하였다.



그림 6-5. 참다래 꽃썩음병 방제용 비가림 시설 전경(上), 비닐터널 시설(下左) 및 부분비닐피복 시설(下右).



또한 참다래 꽃썩음병 방제의 효율을 극대화시킬 수 있는 비가림 시기를 조사하기 위하여 순천시방 참다래 꽃 평균 만개일 5월 25일 기준으로 만개기 약 보름(16일) 전인 2003년 5월 8일, 만개기 약 한달(29일) 전인 4월 26일, 만개기 약 한달반(44일) 전인 4월 11일, 만개기 두달(60일) 전인 3월 26일, 만개기 두달반(75일) 전인 3월 11일에 부분비닐피복 비가림 시설을 설치하였다.

각 시험은 전남 순천시 해룡면 소재 참다래 과수원에서 난괴법 3반복으로 수행하였으며, 2003년 5월 27일 각 처리당 400개의 꽃에 발생한 꽃썩음병 발생율을 조사하여 무처리구의 발병율과 비교하여 방제효과를 평가하였다.

나. 결과 및 고찰

비가림 시설 방법에 따른 참다래 꽃썩음병 방제효과를 구명하기 위하여 완전비닐피복 시설, 부분비닐피복 시설, 비닐터널 시설, 과풍망 시설을 설치하여 꽃썩음병 발생율을 조사한 결과, 무처리구에서 꽃썩음병 발병율이 36.4%였을 때 과풍망 시설에서는 꽃썩음병 발병율이 30.3%였고 무처리구에 대한 방제효과 16.8%에 불과한 반면에, 완전비닐피복 시설에서는 꽃썩음병 발병율이 0.5%, 비닐터널 시설에서는 1.7%, 부분비닐피복 시설에서는 2.5%의 발병율을 나타내었다 (표 6-5, 그림 6-6).

표 6-5. 참다래 꽃썩음병 방제용 비가림 시설별 참다래 꽃썩음병 발병율 및 방제가

비가림 시설	꽃썩음병 발병율(%)	방제가(%)
무처리	36.4 b	-
완전비닐피복	0.5 a	98.6
비닐터널	1.7 a	95.3
부분비닐피복	2.5 a	93.1
과풍망	30.3 b	16.8

이러한 결과로부터 완전비닐피복 시설, 비닐터널 시설, 부분비닐피복 시설은 모두 93% 이상의 높은 꽃썩음병 방제효과를 나타내지만 과풍망 시설은 꽃썩음병 방제효과가 거의 없음을 알 수 있었다. 결국 비를 막아주는 비가림 시설인 경우는 시설 설치 방법의 종류에 상관없이 꽃썩음병 방제에 효과적이었지만 단순히 바람만을 막아주고 비를 막아주지 못하는 과풍망 시설인

경우는 빗물에 의해 전반되는 참다래 꽃썩음병을 일으키는 병원세균의 이동과 전파를 막아주지 못하기 때문에 꽃썩음병 방제에 효과가 없는 것으로 판단된다.

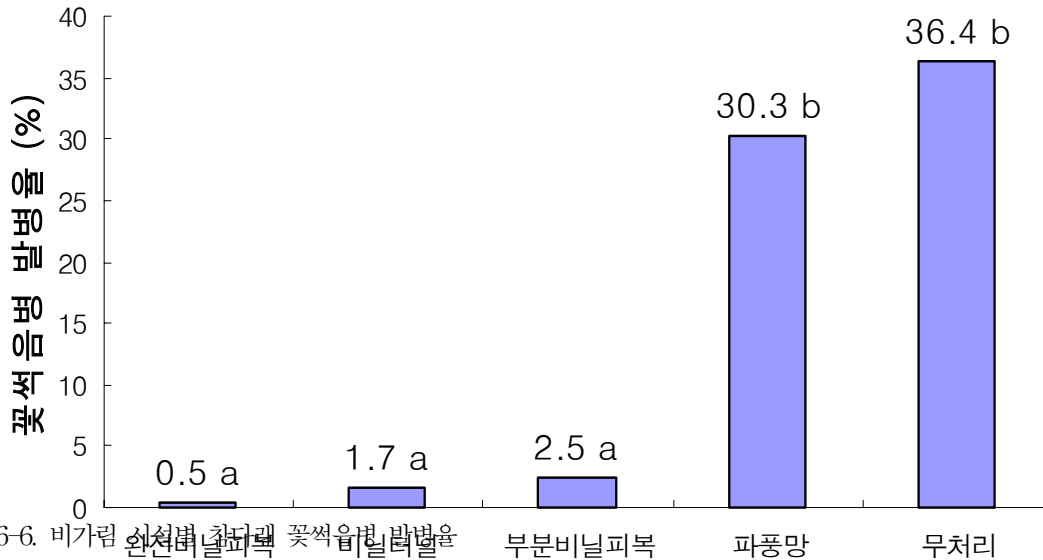


그림 6-6. 비가림 시설별 참다래 꽃썩음병 발생률

비가림시설

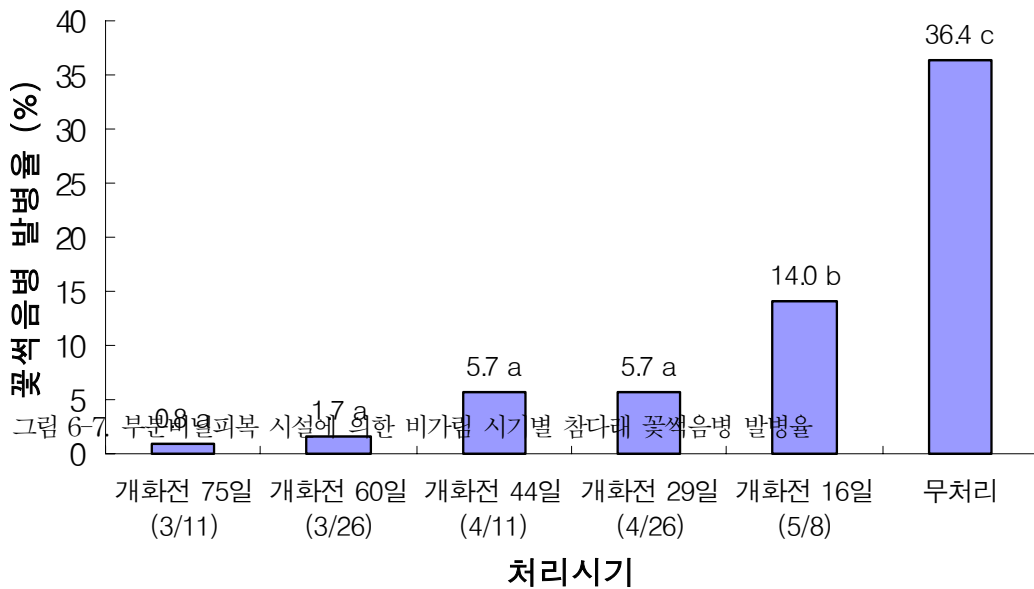
완전비닐피복 시설, 비닐터널 시설, 부분비닐피복 시설 등 세가지 비가림 시설 중에서 비가림 시설 설치시 소요되는 재료비, 인건비, 설치시간 등을 감안하면 완전비닐피복 시설 및 비닐터널 시설에 비하여 소요 설치비용이 저렴하고 설치방법이 간편한 부분비닐피복 시설인 경우도 93% 이상의 참다래 꽃썩음병 방제효과를 나타내었고 완전비닐피복 시설 및 비닐터널 시설에 의한 꽃썩음병 발병율과도 통계적으로 유의차가 없었으므로 구태여 완전비닐피복 시설이나 비닐터널 시설을 설치하지 않아도 참다래 수관부위 위쪽으로부터 비닐을 피복하여 비를 막아주면 충분히 꽃썩음병을 방제할 수 있을 것으로 전망된다.

비가림 재배에서 꽃썩음병 방제의 효율을 극대화시킬 수 있는 비가림 시설 설치 시기를 조사하기 위하여 부분비닐피복 시설을 이용하여 설치시기별 꽃썩음병 발병율을 조사한 결과, 만개기 두달반 전인 3월 11일에 비가림을 한 경우 꽃썩음병 발병율이 0.8%로 무처리구에 대한 방제 효과가 97.8%였으며 만개기 두달 전인 3월 26일에 비가림을 한 경우는 꽃썩음병 발병율

이 1.7%로 무처리구에 대한 방제 효과가 95.3%였다. 반면에 만개기 약 한달반 전인 4월 11일과 약 한달 전인 4월 26일에 비가림을 한 경우 모두 5.7%의 꽃썩음병 발병율을 나타내고 무처리구에 대한 방제 효과가 84.3%였다. 그러나 만개기 약 보름 전인 5월 8일에 비가림을 한 경우는 꽃썩음병 발병율이 14.0%였으며 무처리구에 대한 방제가는 61.5%에 불과하였다 (표 6-6, 그림 6-7).

표 6-6. 부분비닐피복 시설에 의한 비가림 시기별 참다래 꽃썩음병 발병율 및 방제가

비가림 시기	꽃썩음병 발병율(%)	방제가(%)
무처리	36.4 c	-
만개전 16일 (5월 8일)	14.0 b	61.5
만개전 29일 (4월 26일)	5.7 a	84.3
만개전 44일 (4월 11일)	5.7 a	84.3
만개전 61일 (3월 25일)	1.7 a	95.3
만개전 75일 (3월 11일)	0.8 a	97.8



참다래 꽃썩음병을 일으키는 병원세균인 *P. syringae* pv. *syringae* 전염원의 월동과 증식만큼이나 꽃썩음병의 발병에 지대한 영향을 미치는 요인은 *P. syringae* pv. *syringae* 전염원의 전반이다. *P. syringae* pv. *syringae* 전염원의 월동과 증식이 이루어진다고 해도 꽃썩음병을 일으킬 수 있는 참다래 꽃봉오리나 꽃으로 전반이 되지 못하면 감염을 일으킬 수 없기 때문이다. *P. syringae* pv. *syringae* 전염원이 월동 부위에서 건전한 참다래 꽃봉오리나 꽃으로 전반되는 가장 중요한 매개수단이 빗물이라고 보고되었으며, 특히 참다래 개화기의 강우량과 꽃썩음병 발병량과는 고도의 상관관계가 있는 것으로 밝혀졌다 (Koh 등, 2001; Pennycook과 Triggs, 1991). 따라서 참다래 개화기에 강우를 막아주는 비가림 시설이 꽃썩음병 발생을 감소시키리라는 것을 충분히 예측할 수 있다.

이러한 예측을 실증하기 위하여 참다래 꽃썩음병 방제용 부분비닐피복 시설을 설치하여 조사한 결과 비가림 시설 설치 시기와 꽃썩음병 발병율은 역상관계가 있는 것으로 확인되었다. 즉 비가림 시설을 일찍 설치할수록 꽃썩음병의 발병율은 감소하고 개화기에 가깝게 늦게 설치할수록 꽃썩음병 발병율이 증가하였다. 결국 비가림 시설을 일찍 설치할수록 월동 부위에 잠복해 있는 *P. syringae* pv. *syringae* 전염원이 비에 의해 건전한 참다래 꽃봉오리나 꽃으로 전반되는 것을 사전에 차단시켜 꽃썩음병의 발병율은 감소하고 결과적으로 비가림 시설에 의한 방제 효과는 증가하는 것으로 판단된다.

본 실험에서 만개기 약 보름 전인 5월 8일에 비가림을 한 경우는 무처리구에 대한 방제가가 61.5%였지만 만개기 약 한달 전인 4월 26일에 비가림을 한 경우 84.3%의 방제효과를 얻을 수 있었으며 만개기 두달반 전인 3월 11일에 비가림을 한 경우는 97.8%의 방제효과를 얻었다. 이와 유사하게 Kajitani 등 (1991)도 4월에 비가림을 한 경우는 약 5-10% 정도의 꽃썩음병이 발생하지만 2-3월에 비가림을 했을 때에는 꽃썩음병이 전혀 발생하지 않았다고 한다.

따라서 만개기 두달반 정도 이전에 부분비닐피복식 비가림 시설을 하면 참다래에 발생하는 꽃썩음병을 거의 완벽하게 예방할 수 있을 것으로 추정된다. 즉 만개기 두달반 정도 이전에 부분비닐피복식 비가림 시설을 하고 비가림 시설내에 존재하는 *P. syringae* pv. *syringae* 전염원을 제거시킨다면 외부에서 비에 의해 전반되는 *P. syringae* pv. *syringae* 전염원은 비가림 시설에 의해 차단되므로 참다래 꽃썩음병의 발생을 완벽하게 예방할 수 있게 된다.

한편 참다래가 아열대성 과수이기 때문에 온대지역인 우리나라 기후조건이 참다래 생육에 적합하다고 볼 수는 없다. 그러나 비가림 시설이 참다래 과수에 대한 보온효과를 나타낼 것이 확실하기 때문에 꽃썩음병 방제효과 뿐만 아니라 부수적으로 개화를 촉진하고 생육을 촉진시키는 긍정적인 효과도 예상된다. 이와 더불어 폴리에틸렌 필름과 같은 비가림 피복재료가 광선

의 투과성을 저하시켜 참다래 생육에 부정적인 영향을 미칠 가능성도 배제할 수 없다. 따라서 추후 비가림 시설이 참다래 생육에 미치는 긍정적인 영향과 부정적인 영향을 종합적으로 검토해야 바람직한 꽃썩음병 방제체계로 정착할 수 있을 것으로 전망된다.

제 7 절 참다래 꽃썩음병균 상시 monitoring 시스템 구축

1. 병원균의 식물체 부위별 분포 및 밀도 조사

가. 실험재료 및 방법

참다래에 꽃썩음병을 일으키는 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*가 참다래 과수원에서 어느 부위에 분포하는지 확인하기 위해 순천시 해룡면 소재 참다래 포장에서 시료를 채집하였으며 2003년 12월부터 2004년 7월 까지 15일 간격으로 14회 동안 조사하였으며 채집 시기는 다음과 같다.

1차 : 2003년 12월 22

2차 : 2004년 1월 12일, 30일

3차 : 2004년 2월 13일, 27일

4차 : 2004년 3월 12일, 26일

5차 : 2004년 4월 14일, 30일

6차 : 2004년 5월 13일, 28일

7차 : 2004년 6월 14일, 25일

8차 : 2004년 7월 8일

채집 부위는 전체 참다래 포장에서 무작위로 장소를 선정 후 참다래 나무의 주간, 주지, 가지, 꽃눈(신아), 과경지, 전정가지, 낙엽, 토양에서 채취하였다. 식물체에서는 1×1 cm의 크기로 10반복으로 채취하였고, 토양은 1 g씩 채취하였다. 소독된 메스를 이용하여 채취하여 멸균증류수로 10^{-2} ~ 10^{-4} 으로 희석한 후 SPS배지(Takanori와 Yasunobu, 1994)에 도말하였고, 25℃에서 48시간 배양한 후 병원세균의 밀도를 조사하였다.

나. 결과 및 고찰

참다래 나무에 존재하는 꽃썩음병균의 부위별 분포 및 밀도를 조사한 결과 63.5%가 작년에 열매를 수확한 후 제거되지 않은 과경지에 존재하는 것으로 나타났다 (표 7-1). 일반적으로 참다래 꽃썩음병은 토양이나 낙엽 등에서 월동을 하다가 빗물이나 바람에 의해 튀어서 꽃에 감염되어 발병이 되는 것으로 알려져 있다. 그러나 본 실험결과 대부분의 병원성 세균이 과경지

에 존재한다는 것을 알게 되었다. 따라서 수확 후 과경지를 제거하면 다음 해에 참다래 꽃썩음병의 발병을 크게 방지할 수 있을 것으로 사료된다. 참다래 나무의 부위별로 존재하는 꽃썩음균들은 주간, 주지, 가지에서는 4.1%~4.9%의 거의 비슷한 밀도로 분포하였으며 날이 따뜻해지면서 병원세균의 밀도 또한 증가하였다. 또한 전정가지 (9.3%), 낙엽 (7.8%), 토양 (4.9%) 등 포장내에 존재하는 토양 잔존물에서도 22% 정도 검출되어 포장을 청결하게 유지하는 것도 참다래 꽃썩음병 발병을 억제하는데 도움이 될 것으로 생각된다.

표 7-1. 참다래 과수원에서 채집시기에 따른 각 부위별 *P. syringae* pv. *syringae*의 cfu/g의 변화

채집 시기	참다래 나무					전정 가지	낙엽	토양
	주간	주지	가지	신아	과경지			
12월	2.1×10 ⁴	1.4×10 ⁴	3.1×10 ⁴	1.9×10 ⁴	3.8×10 ⁵	8.8×10 ⁴	3.7×10 ⁵	3.8×10 ⁴
1월	5.3×10 ⁴	1.5×10 ⁴	5.5×10 ⁴	2.1×10 ⁴	3.9×10 ⁵	9.0×10 ⁴	3.8×10 ⁵	4.0×10 ⁴
2월	8.1×10 ⁴	2.0×10 ⁴	9.9×10 ⁴	3.3×10 ⁴	4.2×10 ⁵	4.8×10 ⁵	3.7×10 ⁵	3.9×10 ⁴
3월	8.0×10 ⁴	2.4×10 ⁴	1.9×10 ⁵	4.9×10 ⁴	6.1×10 ⁵	7.5×10 ⁵	3.8×10 ⁵	4.4×10 ⁵
4월	3.1×10 ⁵	4.0×10 ⁵	2.1×10 ⁵	1.3×10 ⁵	4.3×10 ⁶	8.6×10 ⁵	5.1×10 ⁵	4.1×10 ⁵
5월	5.8×10 ⁵	5.5×10 ⁵	5.4×10 ⁵	-	7.8×10 ⁶	8.9×10 ⁵	5.5×10 ⁵	4.8×10 ⁵
6월	7.5×10 ⁵	5.7×10 ⁵	5.8×10 ⁵	-	9.1×10 ⁶	9.0×10 ⁵	7.1×10 ⁵	4.9×10 ⁵
7월	6.8×10 ⁵	5.6×10 ⁵	6.3×10 ⁵	-	8.9×10 ⁶	7.2×10 ⁵	6.6×10 ⁵	5.8×10 ⁵
평 균	3.2×10 ⁵ (5.0%)	2.6×10 ⁵ (4.2%)	2.9×10 ⁵ (4.6%)	3.1×10 ⁴ (0.5%)	4.0×10 ⁶ (63.6%)	5.9×10 ⁵ (9.4%)	4.9×10 ⁵ (7.8%)	3.1×10 ⁵ (4.9%)

2) 병원균의 계절별, 시기별 밀도 변화 추이 조사

참다래 꽃썩음균의 계절별 밀도 변화 추이를 조사한 결과, 표 7-2와 같이 겨울에는 포장내에서 전정가지와 낙엽 등에서 약 18.6%, 31.3%의 높은 밀도로 존재하였다. 참다래 나무에서 월동하는 경우에는 과경지에서 18.6%로 가장 높은 밀도로 존재하였다.

기온이 상승하면서 균의 밀도가 점점 높아졌으며, 특히, 겨울에서 봄이 되면서 균의 밀

도가 약 4배가 증가하였고 봄에서 여름이 되면서 또한 균의 밀도가 2배 이상 증가하였다.

특히 개화기인 5월 과 6월의 균의 밀도가 가장 높게 나타났다. 이는 이 시기의 월 평균 기온이 *P. syringae* pv. *syringae*의 최적의 성장온도를 유지하기 때문인 것으로 생각되었다.

표 7-2. 참다래 과수원에서 계절에 따른 각 부위별 *P. syringae* pv. *syringae*의 cfu/g의 변화

계절	참다래 나무						전정	낙엽	토양	총 균수	평균
	주간	주지	가지	신아	과경지	가지					
겨울 (12, 1, 2월)	5.2×10 ⁴ (4.4%)	1.6×10 ⁴ (1.4%)	6.1×10 ⁴ (5.2%)	2.4×10 ⁴ (2.0%)	4.0×10 ⁵ (33.8%)	2.2×10 ⁵ (18.6%)	3.7×10 ⁵ (31.3%)	3.9×10 ⁴ (3.3%)	1.2×10 ⁶ (100.0%)	1.5×10 ⁵	
봄 (3, 4월)	2.0×10 ⁵ (4.1%)	2.1×10 ⁵ (4.3%)	2.0×10 ⁵ (4.1%)	8.9×10 ⁴ (2.0%)	2.5×10 ⁶ (51.0%)	8.1×10 ⁵ (16.5%)	4.5×10 ⁵ (9.2%)	4.3×10 ⁵ (8.8%)	4.9×10 ⁶ (100.0%)	6.1×10 ⁵	
여름 (5, 6, 7월)	6.7×10 ⁵ (5.6%)	5.6×10 ⁵ (4.5%)	5.8×10 ⁵ (4.7%)	-	8.6×10 ⁶ (69.3%)	8.4×10 ⁵ (6.8%)	6.4×10 ⁵ (5.2%)	5.2×10 ⁵ (4.3%)	1.2×10 ⁷ (100.0%)	1.7×10 ⁶	

3. 효율적 상시 monitoring 시스템 구축

국내에서 분리된 참다래 꽃썩음병균을 진단할 수 있는 marker를 이용한 monitoring 시스템은 효율적이지 못하다. 그 이유는 상기의 연구 결과와 같이 국내에서 참다래에 꽃썩음병을 일으키는 주요 세균인 *P. syringae* pv. *syringae*의 경우, 식물체와 토양 잔존물 등에 상재해 있는 균들 중의 하나이다. 식물체 부위별, 계절별의 밀도를 조사한 결과, 적게는 1.4×10⁴ cfu/ml부터 많게는 9.1×10⁶ cfu/ml까지 발견되었다. 따라서 본 연구를 통해 개발된 marker는 nested-PCR을 통해 3×10² cfu/ml까지 검출이 가능하므로 자연환경에서 채취한 시료에 여러 가지 PCR 저해요인이 있다고 하더라도 배양을 통한 간이진단을 하게 될 경우, PCR을 통해 모든 sample에서 marker가 검출되게 된다. 따라서 전기영동을 통해 얻어진 band의 굵기나, 얻어진 산물의 정량을 통해 세균의 밀도를 측정할 수 있는 Real-time PCR 등을 활용하지 못하면 진단 marker를 이용한 상시 monitoring 시스템의 구축은 힘들게 된다. 현재로서는 시료를 생리식 염수로 희석하여 SPS에 도말하여 세균의 밀도를 측정하는 전통적인 방법을 통한 상시 monitoring 시스템이 효율적일 것으로 생각된다.

제 8 절 환경친화형 참다래 꽃썩음병 방제 모델 확립

가. 재료 및 방법

1, 2차년도에 수행한 연구결과들을 토대로 참다래 꽃썩음병 방제를 위한 최적의 방제모델을 찾기 위하여 약제살포, 환상박피, 비가림 시설 등 세가지 방제방법 단독처리구와 세 가지 방제방법을 여러 가지로 조합한 복합 처리구에 의한 꽃썩음병 방제효과를 비교하는 포장실험을 전남 순천시 해룡면 소재 참다래 과수원에서 수행하였다.

환상박피 단독 처리구는 전년도 시험에서 우리나라 실정에 가장 알맞은 환상박피 폭으로 판명된 20 mm 크기로 지상부로부터 60 cm 높이의 주간부에 환상박피를 시행하였으며, 비가림 시설 단독처리구도 전년도 시험에서 가장 경제적이면서도 효율적인 시설로 판명된 부분비닐피복 비가림 시설을 설치하였다. 환상박피와 부분비닐피복 비가림 시설은 모두 순천지방 참다래 꽃 평균 만개일인 5월 25일 기준으로 만개기 약 한달반 전인 2004년 4월 11일에 난괴법 3반복으로 수행하였으며, 참다래 만개기인 2004년 5월 27일 각 처리 당 400개의 꽃에 발생한 꽃썩음병 발생율을 조사하여 무처리구의 발생율과 비교하여 방제효과를 평가하였다 (표 8-1).

약제살포 단독 처리구는 이미 수행한 1, 2차년도 시험 결과 참다래 꽃썩음병 예방약제의 적정 살포횟수는 참다래 꽃 만개기 20일전인 5월 초순부터 10일간격 3회 살포로 확인되었으나 농약 사용량을 최소화하기 위한 방안으로 약제방제 횟수를 1회 살포와 2회 살포로 줄여 수행하였다. 우리나라에서 참다래 꽃썩음병 방제약제로 등록된 스트랩토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제를 표 4-1에 제시된 농약공업협회의 권장사용농도로 희석하여 1회 살포구에는 2004년 5월 1일과 5월 11일에 각각 1회씩 살포하였고, 2회 살포구에는 5월 1일과 5월 11일 살포 및 5월 11일과 21일 살포 등 각각 2회씩 참다래 수관에 분무 살포하였다. 각 시험은 난괴법 3반복으로 수행하였으며, 참다래 만개기인 2004년 5월 27일 각 처리 당 400개의 꽃에 발생한 꽃썩음병 발생율을 조사하여 무처리구의 발생율과 비교하여 방제효과를 평가하였다 (표 8-1).

한편 약제살포, 환상박피, 비가림 시설 등 세 가지 방제방법을 여러 가지로 조합한 복합처리구는 환상박피+약제살포 복합처리구, 비가림 시설+약제살포 복합처리구, 환상박피+비가림 시설 복합처리구, 환상박피+비가림 시설+약제살포 복합처리구로 구분하여 단독처리구와 동일하게 환상박피와 부분비닐피복 비가림 시설은 모두 순천지방 참다래 꽃 평균 만개일인 5월 25일 기준으로 만개기 약 한달반 전인 2004년 4월 11일에 시행하였고, 약제살포는 2004년 5월 1일과 5월 11일에 각각 1회씩, 5월 1일과 5월 11일 및 5월 11일과 21일 각각 2회씩 참다래 수관에 분무 살포하였다. 각 복합처리구 모두 난괴법 3반복으로 수행하였으며, 참다래 만개기인 2004년 5월

27일 각 처리당 400개의 꽃에 발생한 꽃썩음병 발생율을 조사하여 무처리구의 발병율과 비교하여 방제효과를 평가하였다 (표 8-1).

표 8-1. 환상박피, 비가림 및 약제살포 단독처리구 및 복합처리구의 처리 내용 및 처리 날짜

구 분	처리 내용	처 리 날 짜				
		환상박피 4월 11일	비가림 4월 11일	5월 1일	약제살포 5월 11일	5월 21일
	환상박피	●				
	비가림		●			
단독처리구				●		
	약제살포			●	●	
					●	●
복합처리구	환상박피+	●		●		
	약제살포	●		●	●	
		●			●	●
	비가림+		●	●	●	
	약제살포		●	●	●	●
		●			●	●
	환상박피+	●	●			
	비가림	●	●	●		
	환상박피+	●	●	●	●	
	비가림+	●	●	●	●	
약제살포	●	●	●	●	●	

나. 결과 및 고찰

단독처리구인 경우 약제살포구에서는 5월 1일과 11일에 스트렙토마이신황산염·옥시테트라 사이클린 수화제를 2회 살포하였을 때 72.0%의 가장 높은 꽃썩음병 방제효과를 나타내었으며, 5월 11일과 21일에 2회 살포하였을 때는 65.3%, 5월 11일과 5월 1일에 각각 1회만 살포하였을

때에는 각각 62.7%와 60.2%의 방제효과를 나타내었다 (표 8-2).

표 8-2. 여러 가지 방제모델에 의한 참다래 꽃색음병 방제효과

구분	방제모델	처리 내용 (처리 날짜)	발병율 (%)	방제가 (%)
단독 처리	환상박피	환상박피(4/11)	0.7 a	94.1
	비가림	비가림(4/11)	0.3 a	97.5
	약제살포	약제살포 1회(5/1)	47 c	60.2
	약제살포	약제살포 1회(5/11)	44 c	62.7
	약제살포	약제살포 2회(5/1 & 5/11)	3.3 c	72.0
	약제살포	약제살포 2회(5/11 & 5/21)	4.1 c	65.3
	환상박피(4/11)+약제살포 1회(5/1)	0.1 a	99.2	
	환상박피+	환상박피(4/11)+약제살포 1회(5/11)	1.2 b	89.8
	약제살포	환상박피(4/11)+약제살포 2회(5/1 & 5/11)	0.7 a	94.1
	약제살포	환상박피(4/11)+약제살포 2회(5/11 & 5/21)	0.0 a	100
복합 처리	비가림+	비가림(4/11)+약제살포 1회(5/11)	0.6 a	94.9
	약제살포	비가림(4/11)+약제살포 2회(5/1 & 5/11)	0.2 a	98.3
	약제살포	비가림(4/11)+약제살포 2회(5/11 & 5/21)	0.4 a	96.6
	약제살포	비가림(4/11)+약제살포 2회(5/11 & 5/21)	0.0 a	100
	환상박피+ 비가림	환상박피(4/11)+비가림(4/11)	0.1 a	99.2
	환상박피+ 비가림	환상박피(4/11)+비가림(4/11)+약제살포 1회(5/1)	0.0 a	100
	환상박피+ 비가림+	환상박피(4/11)+비가림(4/11)+약제살포 1회(5/11)	0.1 a	99.2
	약제살포	환상박피(4/11)+비가림(4/11)+약제살포 2회(5/1 & 5/11)	0.2 a	98.3
	약제살포	환상박피(4/11)+비가림(4/11)+약제살포 2회(5/11 & 5/21)	0.0 a	100
		무처리	11.8 d	-

약제살포 단독처리구에 비하여 환상박피 단독처리구와 부분비닐피복 비가림 시설 단독처리구에서는 훨씬 높은 참다래 꽃썩음병 방제효과를 나타내었는데, 4월 11일에 환상박피 단독처리구에서는 94.1%의 꽃썩음병 방제효과를 나타내었으며, 부분비닐피복 비가림 시설 단독처리구에서는 97.5%의 꽃썩음병 방제효과를 나타내었다 (표 8-2).

이와 같이 환상박피와 부분비닐피복 비가림 시설에 의한 단독처리구에서 높은 꽃썩음병 방제효과를 나타내기 때문에 복합처리구에서는 이 영향으로 대단히 높은 꽃썩음병 방제효과를 얻을 수 있었다. 환상박피와 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제 2회 살포를 혼합한 복합처리구인 경우 94.1%, 비가림과 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제 2회 살포를 혼합한 복합처리구인 경우 96.6%, 환상박피와 비가림을 혼합한 복합처리구인 경우 99.2%의 꽃썩음병 방제효과를 나타내었다. 또한 환상박피와 비가림에 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제 2회 살포 등 세가지 단독처리구를 모두 혼합한 복합처리구인 경우에도 98.3%의 꽃썩음병 방제효과를 나타내었다 (표 8-2).

참다래 꽃썩음병은 해마다 발생율에 커다란 차이가 있고 지역마다 발생율도 차이가 큰 것으로 알려졌다. 이렇게 차이가 크게 발생하는 이유는 해마다 그리고 지역마다 기상조건이 달라지기 때문인 것으로 밝혀졌다. 특히 기상조건 중에서 강우량과 참다래 꽃썩음병 발생율과는 밀접한 상관이 있는데, 일본 Nagasaki현에서 1983년부터 1989년까지 참다래 꽃썩음병 발병율을 조사한 결과 최소 발생율 14.8%에서 최대 발생율 67.0%까지 다양한 발생율을 보고한 바 있으며 (Morita, 1995), 이와 유사하게 우리나라에서도 참다래 꽃썩음병의 발병율은 해마다 차이가 있는 것으로 보고되었다 (Koh 등, 2000).

본 연구에서도 2002년도에 순천지방에 참다래 꽃썩음병 발병율이 21.8%였고 2003년도에는 36.4%였지만 2004년에는 예년의 꽃썩음병 발병율에 비하여 1/2에서 1/3 수준에 불과한 11.8%의 발병율만을 나타내었다. 이렇게 2004년도에는 꽃썩음병의 발병율이 예년에 비하여 낮았기 때문에 모든 처리구에서 꽃썩음병 발병율이 경미한 차이만을 나타내어 단독처리구와 복합처리구에서 꽃썩음병 방제효과의 차이를 상대적으로 비교하기 어렵게 만들었다. 따라서 단독처리구에 비하여 복합처리구에서 훨씬 높은 꽃썩음병 발병율을 기대했던 예상과는 달리 단독처리구와 복합처리구에서 꽃썩음병 방제효과의 차이가 미미하게 나타남으로써 단독처리구에 비하여 복합처리구에 의해 유도되는 참다래 꽃썩음병에 대한 방제효과의 상승효과를 확인할 수 없었다.

그럼에도 불구하고 이 실험을 통하여 참다래 꽃썩음병에 대한 방제법으로 환상박피와 부분비닐피복 비가림 시설이 약제방제를 대체할 수 있다는 결론을 확실하게 내릴 수 있었다. 참다

래 꽃썩음병에 대하여 각각 94.1%와 97.5%의 방제효과를 나타낸 환상박피 단독처리나 부분비닐피복 비가림 시설 단독처리만으로도 환상박피, 부분비닐피복 비가림 시설 및 약제살포를 조합한 복합처리구에서 얻을 수 있는 최소 89.8%에서 100%까지 꽃썩음병에 대한 방제효과와 통계적으로 유의성이 없는 대등한 방제효과를 얻을 수 있었기 때문이다.

따라서 약제방제를 대체할 수 있는 환경친화형 참다래 꽃썩음병 방제 모델로서 환상박피와 부분비닐피복 비가림 시설을 제시할 수 있다. 환상박피 단독처리구는 94.1%, 부분비닐피복 비가림 시설 단독처리구는 97.5%의 꽃썩음병 방제효과를 나타내어 약제살포구에 비하여 대단히 높은 방제가를 나타내었으며, 환상박피 단독처리구와 부분비닐피복 비가림 시설 단독처리구의 방제가의 차이가 미미하므로 두가지 방제모델의 우열을 가리기는 쉽지 않다. 다만 환상박피인 경우 처리비용이 소요되지 않는 장점이 있는 반면에 참다래 나무마다 매년 다시 처리해야 하는 번거로운 단점이 있고, 부분비닐피복 비가림 시설인 경우 매년 설치하는 번거로움을 피할 수 있는 장점이 있는 반면에 시설설치 비용이 소요되는 단점이 있다. 따라서 환상박피와 부분비닐피복 비가림 시설 중에서 참다래를 재배하는 농가의 실정에 적합한 방제모델을 선택하여 약제방제를 대체할 수 있는 환경친화형 참다래 꽃썩음병 방제 모델로서 참다래 재배 현장에 적용하는 것이 바람직할 것으로 판단된다.

한편 참다래 재배 농가에서 환경친화형 참다래 꽃썩음병 방제 모델로 활용할 수 있는 환상박피와 부분비닐피복 비가림 시설의 실용성을 증대시키려면 참다래에 피해를 주는 궤양병과 과실무름병 방제에도 효과가 있는지에 대한 검토가 필요하다. 참다래 꽃썩음병을 일으키는 병원세균인 *P. syringae* pv. *syringae*와 유사한 병원세균인 *P. syringae* pv. *actinidiae*가 일으키는 궤양병은 월동, 전반 등 생태적 특성이 꽃썩음병과 유사하기 때문에 부분비닐피복 비가림 시설은 *P. syringae* pv. *syringae* 뿐만 아니라 *P. syringae* pv. *actinidiae*가 비바람에 의하여 전파되는 것을 차단시켜 주리라 예상된다.

또한 참다래에는 과실무름병을 비롯하여 저장병이 발생하여 적지 않은 피해를 주고 있는 것으로 밝혀졌다 (고 등, 2003; Koh 등, 2003; Lee 등, 2001). 비록 참다래에 과실무름병을 일으키는 주요 병원곰팡이인 *Botryosphaeria dothidea*와 *Diaporthe actinidiae*는 바람에 의해 전파되므로 꽃썩음병과 궤양병과는 달리 부분비닐피복 비가림 시설이 *B. dothidea*와 *D. actinidiae*의 전파를 차단시켜주지는 못할지라도 비를 막아주기 때문에 참다래 과실에 빗물이나 이슬이 맺히는 것을 차단시켜 줌으로써 *B. dothidea*와 *D. actinidiae*의 발아와 침입을 예방하여 줄 것이라는 예측이 가능하다.

따라서 부분비닐피복 비가림 시설은 참다래에서 꽃썩음병을 비롯하여 궤양병과 과실무름병

등 다른 주요 병해에 대해서도 예방효과를 얻을 수 있을 것으로 기대된다. 물론 이러한 예측을 뒷받침하기 위해서는 부분비닐피복 비가림 시설에 의한 궤양병과 과실무름병 등 다른 주요 병해에 대한 방제효과를 검증할 수 있는 실증시험이 뒤따라야 할 것이다. 더불어 추후 비가림 시설이 참다래에 발생하는 여러 가지 병해에 대한 방제효과 뿐만 아니라 참다래 생육에 미치는 긍정적인 영향과 부정적인 영향을 종합적으로 검토함으로써 이상적인 참다래 병해 방제체계로 제시될 수 있을 것으로 전망된다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연구개발 목표 달성도

<연구개발 목표>

○ 참다래 꽃썩음병균 특성 분석 및 monitoring 시스템 개발

○ 저농약, 고효율 참다래 꽃썩음병 방제 모델 확립

⇒ 환경친화형 참다래 꽃썩음병 방제기술 개발

연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위	달성도
○ 참다래 꽃썩음병균 특성 분석 및 monitoring 시스템 개발	1. 참다래 꽃썩음병균의 특성 분석 1) 병원균의 분류 및 동정 2) 병원균의 병원성 감정 및 기주범위 조사 3) 병원균의 병원성 유전자 분석	100
	2. 참다래 꽃썩음병균 간이진단법 개발 1) 병원균의 진단 marker 개발 2) 병원균 간이진단법 개발 3. 참다래 꽃썩음병균 집단 분석 1) 병원균의 약제저항성 발생실태 파악 2) 병원균의 약제저항성 유전자 확인 3) 병원균의 plasmid 분석 4) 병원균의 지리적 변이 분석 4. 참다래 꽃썩음병균 상시 monitoring 시스템 구축 1) 병원균의 식물체 부위별 분포 및 밀도 조사 2) 병원균의 계절별, 시기별 밀도 변화 추이 조사 3) 효율적 상시 monitoring 시스템 구축	
○ 저농약, 고효율 참다래 꽃썩음병 방제 모델 확립	1. 참다래 꽃썩음병균의 발생생태 조사 1) 전염원 월동 부위 조사 2) 발병조건 구명 2. 꽃썩음병 예방약제 최적 살포 프로그램 정립 1) 예방약제 선발 및 약효 검증 2) 예방약제 살포적기 구명 3) 예방약제 적정 살포횟수 구명 4) 약제 최적살포 프로그램 정립 및 포장검증	100
	3. 참다래 꽃썩음병 경종적 방제 체계 확립 1) 한국형 환상박피 체계화 2) 실용적 비가림 재배 체계화 4. 환경친화형 참다래 꽃썩음병 방제 모델 확립 1) 환경친화형 참다래 꽃썩음병 방제 모델 구축 2) 방제 모델의 재배포장 검증	

본 연구개발과제에서 참다래 꽃썩음병균 특성 분석 및 monitoring 시스템 개발과 저농약, 고효율 참다래 꽃썩음병 방제 모델 확립을 통하여 환경친화형 참다래 꽃썩음병 방제기술이 성공적으로 개발되었다.

제1세부과제인 참다래 꽃썩음병균 특성 분석 및 monitoring 시스템 개발에서는 1) 참다래 꽃썩음병균의 특성 분석, 2) 참다래 꽃썩음병균 간이진단법 개발, 3) 참다래 꽃썩음병균 집단 분석, 4) 참다래 꽃썩음병균 상시 monitoring 시스템 구축 목표를 성공적으로 달성하였다.

참다래 꽃썩음병균의 특성 분석 결과 국내에서 발생하는 참다래 꽃썩음병을 일으키는 병원세균은 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*와 *P. fluorescense*로 확인되었다. *P. syringae* pv. *syringae*는 *syrB* 유전자와 *syrD* 유전자를 동시에 가지고 있어서 식물독소로 syringomycin을 생산하지만, *P. fluorescense*는 *syrD* 유전자만을 가지고 있어 syringomycin이 아닌 syringopeptine을 생산하는 것으로 추정할 수 있었다. *syrD* 유전자를 probe로 사용하여 독소 유전자의 위치를 확인한 결과 모두 chromosomal DNA에 존재함을 확인하였다.

참다래 꽃썩음병균 간이진단법 개발 결과 꽃썩음병균을 진단할 수 있는 marker로 *syrD* 유전자 부위를 증폭할 수 있는 primer와 검출한계를 높이기 위해 nested-PCR primer를 함께 개발하였다. 자연환경에서 채취한 시료에는 PCR 반응을 저해할 수 있는 여러 가지 불순물이 존재하므로 검출한계가 낮아질 것으로 사료되어 PCR에 앞서 시료를 20°C에서 12시간동안 증식시켜 개체수를 늘린 후 실험에 이용하는 간이진단법을 개발하였다. 이 방법을 이용하여 병든 꽃에 존재하는 병원세균의 병원성 유전자를 손쉽게 검출할 수 있었다.

참다래 꽃썩음병균 집단 분석 결과 streptomycin에 대해 5%의 약제저항성균 발생빈도를 나타내었고, 저항성 유전자는 *strA-strB* 구조로 전형적인 Tn5393과 염기서열이 동일하였다. 또한 3개의 plasmid를 가지고 있었으며 100 kb 크기의 plasmid에 *strA-strB* 유전자가 존재하였다. Copper에 대해 10%의 약제저항성균 발생빈도를 나타내었고, 저항성 유전자는 *P. syringae* pv. *actinidiae*에 존재하는 *copR*와 염기서열에서 98%의 상동성을 나타내었으며, 약 60 kb의 plasmid DNA에 존재하였다. *P. syringae* pv. *syringae* 집단은 plasmid pattern에 따라 6가지 group으로 구분할 수 있었지만, *P. fluorescense* 집단에는 plasmid가 존재하지 않았다. 병원균 집단에서 지리적 변이 분석을 위한 genomic DNA의 RAPD 결과 genomic DNA상에서 유전적 유사도가 매우 높은 것으로 나타났다.

참다래 꽃썩음병균 상시 monitoring 시스템 구축 결과 꽃썩음병원균은 주로 열매 수확 후 제거되지 않은 참다래 나무의 과경지에 63.5%가 존재하는 것으로 나타났으며, 전정가지, 낙엽, 토양 등 포장 내에 존재하는 토양 잔존물에서도 22% 정도 검출되었다. 계절별로 꽃썩음병원균의

밀도는 기온이 상승하면서 높아지고 개화기인 5월과 6월에 밀도가 가장 높았다. 국내에서 분리된 참다래 꽃썩음병균을 효율적으로 상시 monitoring 하기 위한 방법으로 시료를 생리식염수로 희석하여 SPS agar에 도말한 후 세균의 밀도를 측정하는 상시 monitoring 시스템을 개발하였다.

제2세부과제인 저농약, 고효율 참다래 꽃썩음병 방제 모델 확립에서는 1) 참다래 꽃썩음병균 발생상태 조사, 2) 참다래 꽃썩음병 예방약제 최적 살포 프로그램 정립, 3) 참다래 꽃썩음병 경종적 방제 체계 확립, 4) 환경친화형 참다래 꽃썩음병 방제 모델 확립 목표를 성공적으로 달성하였다.

참다래 꽃썩음병균 발생상태 조사 결과 *P. syringae* pv. *syringae* 전염원은 참다래 과실을 수확하고 남은 죽은 과경지나 참다래 포장내에 방치해 있는 전정된 가지나 낙엽 등 식물체 잔존물에서 높은 밀도로 월동하고 참다래 신초눈을 비롯하여 주간, 주지, 가지 등 식물체 상에서도 골고루 월동하는 것으로 밝혀졌다. 또한 *P. syringae* pv. *syringae*의 발병 최소농도는 1×10^4 cfu/ml였고, *P. syringae* pv. *syringae*의 최적 성장 온도범위는 20-25°C 사이로 확인되었다.

참다래 꽃썩음병 예방약제 최적 살포 프로그램 정립 결과 국내에서 참다래 꽃썩음병 방제약제로 등록되어 있는 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제와 농용신·쿠퍼 수화제 외에 농용신 수화제, 옥쓰리니에시드 수화제 및 디치돈 수화제가 참다래 꽃썩음병 방제약제로 개발할 수 있는 후보약제로 선발되었다. 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제와 농용신·쿠퍼 수화제의 살포적기는 개화기로 확인되었고, 저농약 고효율 참다래 꽃썩음병 방제를 위한 참다래 꽃썩음병 예방약제 최적 살포 프로그램은 참다래 꽃 만개기 20일전인 5월 초순부터 10일 간격 3회 살포로 판명되었다.

참다래 꽃썩음병 경종적 방제 체계 확립 결과 참다래 꽃 만개기 약 한달 반 전인 4월 10일을 전후한 약 1개월 동안에 참다래 주간부위에 20 mm의 폭으로 환상박피를 시행하는 것이 우리나라 실정에 적합한 가장 이상적인 한국형 환상박피 방법이었다. 완전비닐피복 시설, 비닐터널 시설, 부분비닐피복 시설은 모두 높은 꽃썩음병 방제효과를 나타내었지만 과풍망 시설은 꽃썩음병 방제효과가 거의 없었다. 참다래 꽃 만개기 두달 반 정도 이전에 부분 비닐피복식 비가림 시설을 하면 참다래에 발생하는 꽃썩음병을 거의 완벽하게 예방할 수 있을 것으로 추정되었다.

환경친화형 참다래 꽃썩음병 방제 모델 확립 결과 약제방제를 대체할 수 있는 환경친화형 참다래 꽃썩음병 방제 모델로서 환상박피와 부분비닐피복 비가림 시설임이 입증되었다. 환상박

피인 경우 처리비용이 소요되지 않는 장점이 있는 반면에 참다래 나무마다 매년 다시 처리해야 하는 번거로운 단점이 있고, 부분비닐피복 비가림 시설인 경우 매년 설치하는 번거로움을 피할 수 있는 장점이 있는 반면에 시설설치 비용이 소요되는 단점이 있으므로 참다래를 재배하는 농가의 실정에 적합한 방제모델을 선택하여 참다래 재배 현장에 적용하는 것이 바람직할 것으로 판단된다.

2. 관련분야에의 기여도

본 연구개발 분야의 목표 달성을 통하여 관련분야에 기대되는 효과는 다음과 같이 요약 정리될 수 있다.

○ 참다래 꽃썩음병균 특성 분석 및 monitoring 시스템 개발

참다래 꽃썩음병균의 특성 분석 결과 국내에서 발생하는 참다래 꽃썩음병을 일으키는 병원세균인 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 외에 *P. fluorescense*도 참다래에 꽃썩음병을 일으키는 것으로 확인되었다. 이와 더불어 두 가지 병원세균에 존재하는 병원성 유전자 분석 결과는 식물세균병학 연구분야에서 병원학 및 병원성기작 연구에 필요한 정보를 제공해 줄 것으로 기대된다.

참다래 꽃썩음병균 간이진단법 개발 결과 병든 꽃에 존재하는 병원세균의 병원성 유전자를 손쉽게 검출하여 감염 여부를 진단할 수 있는 간이진단법을 개발하였다. 이 방법을 이용하면 참다래 꽃봉오리나 꽃의 감염 여부를 사전에 진단할 수 있을 뿐만 아니라 참다래 과수원에 존재하는 병원세균의 분포와 밀도 변화를 예측할 수 있게 해 주어 참다래 꽃썩음병 방제시기 및 방제방법을 결정하는데 활용할 기초 자료로 제공될 것으로 기대된다.

참다래 꽃썩음병균 집단 분석 결과 국내에서 참다래 꽃썩음병 방제약제로 등록되어 있는 스트렙토마이신·옥시테트라사이클린 수화제와 농용신·쿠퍼 수화제의 주성분인 streptomycin에 대해 5%의 약제저항성균과 copper에 대해 10%의 약제저항성균 발생빈도가 확인됨으로써 향후 기존 등록약제를 대체할 수 있는 신규약제 개발의 필요성과 동기를 농약업계에 제공해 주는 계기가 되었다.

참다래 꽃썩음병균 상시 monitoring 시스템 구축 결과 꽃썩음병 월동 장소에서 채취한 병원세균의 시료를 생리식염수로 희석하여 SPS agar에 도말한 후 세균의 밀도를 측정하는 상시 monitoring 시스템이 개발됨으로써 참다래 꽃썩음병균 간이진단법과 더불어 참다래 과수원에

존재하는 병원세균의 분포와 밀도 변화를 예측할 수 있게 해 주어 참다래 꽃썩음병 방제체계 확립에 기여할 것으로 예상된다.

○ 저농약, 고효율 참다래 꽃썩음병 방제 모델 확립

참다래 꽃썩음병균 발생상태 조사 결과 밝혀진 전염원 월동 부위는 포장위생관리를 비롯한 경종적 방제체계 확립을 위한 기초 자료로 제공될 것이고 참다래 생육시기별 전염원 밀도 변화와 병원세균의 발병 최소농도 및 최적 생장 온도범위는 약제 살포시기를 비롯한 약제방제 체계 확립을 위한 기초 자료로 제공될 것이다.

참다래 꽃썩음병 예방약제 최적 살포 프로그램 정립 결과 국내에서 참다래 꽃썩음병 방제약제로 등록되어 있는 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제와 농용신·쿠퍼 수화제를 대체할 수 있는 후보약제로 선발된 옥쏘리닉에시드 수화제 및 디치돈 수화제는 참다래 꽃썩음병 방제 약제로 개발할 수 있는 후보약제로 농약업계에 제공될 것이다.

스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제와 농용신·쿠퍼 수화제의 살포적기는 개화기로 확인되었고, 살포횟수는 참다래 꽃 만개기 20일전인 5월 초순부터 10일 간격 3회 살포로 판명되었으므로 이것을 약제방제를 선호하는 재배자들에게 저농약 고효율 참다래 꽃썩음병 방제를 위한 참다래 꽃썩음병 예방약제 최적 살포 프로그램으로 활용토록 권장할 수 있을 것이다.

환경친화형 참다래 꽃썩음병 방제 모델 확립 결과 약제방제를 대체할 수 있는 환경친화형 참다래 꽃썩음병 방제 모델로서 환상박피와 부분비닐피복 비가림 시설임이 입증되었으므로 환상박피와 부분비닐피복 비가림 시설 중에서 참다래를 재배하는 농가의 실정에 적합한 방제모델을 선택하여 참다래 재배 현장에 적용하도록 권장할 수 있을 것이다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

참다래 꽃썩음병을 일으키는 병원세균인 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*와 *P. fluorescense*에 존재하는 병원성 유전자 분석 결과는 다른 유사한 병원세균의 유전자 분석에 활용할 수 있을 것이다.

참다래 꽃썩음병 진단용 molecular marker와 간이진단법은 특허출원하여 농업기술원이나 농업기술센터 등에 기술이전하며, 참다래 꽃썩음병균 뿐만 아니라 유사한 병해 진단법 개발에 활용할 수 있을 것이다.

참다래 꽃썩음병에 대한 저농약 고효율 약제방제체계는 저공해 고품질 참다래를 생산할 수 있는 꽃썩음병에 대한 환경친화형 예방법으로 즉시 농가에 보급·활용할 수 있다.

참다래 꽃썩음병균 집단에 분포하는 streptomycin과 copper에 대한 약제저항성균 발생 자료는 기존 약제의 활용의 방향과 신규약제 개발의 방향을 결정하는 참고자료로 활용할 수 있을 것이다.

참다래 꽃썩음병에 대해 선발된 옥쏘리닉에시드 수화제 및 디치돈 수화제 등의 유효약제들은 포장에서 검정된 결과를 이용하여 꽃썩음병 약제로 사용할 수 있도록 참다래 꽃썩음병 약제 품목고시 자료로 활용할 수 있을 것이다.

약제방제를 대체할 수 있는 환경친화형 참다래 꽃썩음병 방제 모델로서 환상박피와 부분비닐피복 비가림 시설에 의한 참다래 꽃썩음병 경종적 방제 체계화는 국내 참다래 재배현장에서 직접 이용할 수 있는 꽃썩음병 방제시스템으로 실용화할 수 있을 것이다.

참다래 꽃썩음병에 대해 실용성이 확인된 환경친화형 방제 모델은 기타 과수의 세균병 방제 체계 구축에 응용할 수 있을 것이다.

제 6 장 참고문헌

- Audy, P., Braat, C. E., Saindon, G., Huang, H. C. and Laroche, A. 1996. A rapid and sensitive PCR-based assay for concurrent detection of bacteria causing common and halo blights in bean seed. *Phytopathology* 86:361-366.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. 1999. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, Inc., New York, N. Y.
- Bachmann, R. C., Ballio, A., Barra, D., Bossa, F., Camoni, L., Di Giorgio, D., Di Nola, A., Ferranti, P., Grgurina, I., Iacobellis, N. S., Lavermicocca, P., Manetti, C., Marchiafava, C., Mirono, G., Mott, K. A., Paci, M., Pucci, P., Scaloni, A., Segre, A., Simmaco, M., Surico, G. and Takemoto, J. Y. 1997. Lipodepsipeptides from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. In: *Pseudomonas syringae* pathovars and related pathogens, ed. by K. Rudolph, T. J. Burr, J. W. Mansfield, D. Stead, A. Vivian and J. VonKietzell, pp. 170-175. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Ballio, A., Barra, D., Bossa, F., Collina, A., Grgurina, I., Marino, G., Moneti, G., Paci, M., Pucci, P., Segre, A. and Simmaco, M. 1991. Syringopeptines, new phytotoxic lipodepsipeptides of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *FEBS Lett.* 291:109-112.
- Bender, C. L., Alarcón-Chaidez, F., and Gross, D. C. 1999. *Pseudomonas syringae* phytotoxin: Mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 266-292.
- Bender, C. L., and Cooksey, D. A. 1986. Indigenous plasmids in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: conjugative transfer and role in copper resistance. *J. Bacteriol.* 165:534-541.
- Bender, C. L., and Cooksey, D. A. 1987. Molecular cloning of copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *J. Bacteriol.* 169:470-474.
- Bender, C. L., Stone, H. E., Sims, J. J. and Cooksey, D. A. 1987. Reduced pathogen fitness of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Tn5 mutants defective in coronatine production. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 30:278-283.
- Breswill, S., Bugert, P., Volksch, B., Ullrich, M., Bender, C. L. and Geider, K. 1994. Identification and relatedness of coronatine producing *Pseudomonas syringae* pathovars

- by PCR analysis and sequence determination of the amplification products. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:2924-2930.
- Bultrey, A. and Gheysen, I. 1999. Biological and molecular detection of toxic lipodepsipeptide-producing *Pseudomonas syringae* strains and PCR identification in plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1904-1909.
- Chiou, C. S., and Jones, A. L. 1995. Molecular analysis of high-level streptomycin resistance in *Erwinia amylovora*. *Phytopathol.* 85:324-328.
- Chiou, C. S., and Jones, A. L. 1993. Nucleotide sequence analysis of a transposon (Tn5393) carrying streptomycin resistance genes in *Erwinia amylovora* and other gram negative bacteria. *J. Bacteriol.* 175:732-740.
- Conn, K. E., Gubler, W. D. and Hasey, J. K. 1993. Bacterial blight of kiwifruit in California. *Plant Dis.* 77:228-230.
- Cooksey, D. A. 1987. Characterization of a copper resistance plasmid conserved in copper-resistant strains of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:454-456.
- Flamand, M. -C., Pelsser, S., Ewbank, E., and Maraite, H. 1996. Production of syringotoxin and other bioactive peptides by *Pseudomonas fuscovaginae*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 48:217-231.
- Gaignard, J. L., and Luisetti, J. 1992. A method using in vitro and in situ grapevine plant to screen chemicals active against *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Agronomie* 12:401-409.
- Gardan, L., Shaff, H. and Grimont, P. A. 1997. DNA relatedness among pathovars of *P. syringae* and related bacteria. In : *Pseudomonas syringae* Pathovars and Related Pathogens, ed. by Rudolph, K, Burr, T. J., Mansfield, J. W., Stead, D. Vivian, A. and Von Kietzell, J., pp445-448. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Garde, S., and Bender C. L. 1991. DNA probes for detection of copper resistance genes in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2435-2439.
- Goto, M., Hikota, T., Nakajima, M., Takikawa, Y., and Tsuyumu, S. 1994. Occurrence and properties of copper-resistance in plant pathogenic bacteria. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 60:147-153.

- Gross, D. C. and DeVay, J. E. 1977. Production and purification of syringomycin, a phytotoxin produced by *Pseudomonas syringae*. *Physiol. Plant Pathol.* 11:13-28.
- Han, H. S., Koh, Y. J., Hur, J. S., and Jung, J. S., 2003. Identification and characterization of coronatine producing *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 13:110-118.
- Jones, A. L., Norelli, J. L., and Ehret, G. R. 1991. Detection of streptomycin resistant *Pseudomonas syringae* pv. *papulans* in Michigan apple orchards. *Plant Dis.* 75:529-531.
- Kajitani, Y. 1993. Cultural methods for control of kiwifruit bacterial blossom rot. *Plant Quarantine* 47:177-179 (in Japanese).
- Kajitani, Y., Tsuusumi, T., Yamada, K., Ibaragi, T., Himeno, S. and Nishihara, J. 1991. Cultural control of kiwifruit bacterial blossom rot. *Proc. Assoc. Pl. Prot. Kyushu* 37:72-74 (in Japanese).
- Kidambi, S. P., Sundin, G. W., Palmer, D. A., Chakrabarty, A. M., and Bender, C. L. 1995. Copper as a signal for alginate synthesis in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2172-2179.
- Koh, Y. J., Lee, D. H., Shin, J. S. and Hur, J. S. 2001. Chemical and cultural control of bacterial blossom blight of kiwifruit caused by *Pseudomonas syringae* in Korea. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 29:29-34.
- Koh, Y. J., Lee, J. G., Lee, D. H., and Hur, J. S. 2003. *Botryosphaeria dothidea*, the causal organism of ripe rot of kiwifruit in Korea. *Plant Pathol. J.* 19:227-230.
- Latorre, B.A., and A.L. Jones. 1979. *Pseudomonas morsprunorum*, the cause of bacterial canker of sour cherry in Michigan, and its epiphytic association with *P. syringae*. *Phytopathology* 69:335-339.
- Lee, J. G., Lee, D. H., Park, S. Y., Hur, J. S., and Koh, Y. J. 2001. First report of *Diaporthe actinidiae*, the causal organism of stem-end rot of kiwifruit in Korea. *Plant Pathol. J.* 17:110-113.
- Lee, Y. -A., Schroth, M. N., Hendson, M., Lindow, S. E., Olson, X. -L., Buchner, R. P., and Teviotdale, B. 1993. Increased toxicity of iron-amended copper containing bactericides to the walnut blight pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*. *Phytopathology* 83:1460-1465.

- Liang, L. Z., Sobiczewski, P., Paterson, J. M. and Jones, A. L. 1994. Variation in virulence, plasmid content, and genes for coronatine synthesis between *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* and *P. s. syringae* from *Prunus*. *Plant Dis.* 78:389-392.
- Lydon, J., and Patterson, C. D. 2001. Detection of tabtoxin-producing strains of *Pseudomonas syringae* by PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* 32:166-170.
- Maniatis, T., Fritsh, E. F. F., and Sambrook, J. 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N. Y.
- Mellano, M. A., and Cooksey, D. A. 1988. Induction of the copper resistance opeorn from *Pseudomonas syringae*. *J. Bacteriol.* 170:4399-4401.
- Minsavage, G. V., Canteros, B. I., and Stall, R. E. 1990. Plasmid-mediated resistance to streptomycin in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* *Phytopathology* 80: 719-723.
- Mitchell, R. E. 1976. Isolation and structure of a chlorosis-inducing toxin of *Pseudomonas phaseolicola*. *Phytochemistry* 15:1941-1947.
- Mitchell, R. E., and Young, H. 1978. Identification of a chlorosis inducing toxin of *Pseudomonas glycinea* as coronatine. *Phytochemistry* 17:2028-2029.
- Miyoshi, T. and Tachibana, Y. 1994. A selective medium for isolation of *Pseudomonas syringae*, the pathogen of bacterial blossom blight of kiwifruit. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 60:729-734 (*in Japanese*).
- Morita, A. 1995. Occurrence of bacterial blossom blight of kiwifruit and its influence on fruit production in Nagasaki Prefecture. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 61:57-62 (*in Japanese*).
- Nakajima, M., Yamashita, S., Takikawa, Y., Tsuyumu, S., Hibi, T., and Goto, M. 1995. Similarity of streptomycin resistance gene(s) in *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. with *strA* and *strB* of plasmid RSF1010. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 61: 489-492.
- Nishiyama, K., Sakai, R. and Ezuka, A. 1976. Phytotoxic effect of coronatine produced by *Pseudomonas coronafaciens* var. *atropurpurea* on leaves of Italian ryegrass. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 42:613-614.
- Palmer, E. L., Teviotdale, B. L., and Jones, A. L. 1997. A relative of the broad-host-range plasmid RSF1010 detected in *Erwinia amylovora*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4604-4607.
- Pennycook, S. R. and Triggs, C. M. 1991. Bacterial blossom blight of kiwifruit—a 5-year

- survey. *Acta Horticulturae* 297:559-565.
- Quigley, N. B., and Gross, D. C. 1994. Syringomycin production among strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: conservation of the *syrB* and *syrD* genes and activation of phytotoxin production by plant signal molecules. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7: 78-90.
- Schaad, N. W., J. B. Jones, and W. Chun. 2001 Plant pathogenic bacteria. APS PRESS, Minnesota.
- Scheck, H., Pscheidt, J. W., and Moore, L. W.. 1996. Copper and streptomycin resistance in strains of *Pseudomonas syringae* from Pacific Northwest Nurseries. *Plant Dis.* 80:1034-1039.
- Scholz, P., V. Haring, B. Wittmann-Liebold, K. Ashman, M. Bagdasarian, and E. Scherzinger. 1989. Complete nucleotide sequence and gene organization of the broad-host range plasmid RSF1010. *Gene* 75:271-288.
- Sinden, S. L. and Durbin, R. D. 1970. A comparison of the chlorosis-inducing toxin from *Pseudomonas coronafaciens* with wildfire toxin from *Pseudomonas tabaci*. *Phytopathology* 60:360-364.
- Sorensen, K. N., Kim, K. H. and Takemoto, J. Y. 1998. PCR detection of cyclic lipopeptide-producing *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and similarity of strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:226-230.
- Stewart, W. W. 1971. Isolation and proof of structure of wildfire toxin. *Nature* 229:174-178.
- Sundin, G. W., and C. L. Bender, 1995. Expression of the *strA-strB* streptomycin resistance genes in *Pseudomonas syringae* and *Xanthomonas campestris* and characterization of IS6100 in *X. campestris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2891-2897.
- Sundin, G. W. 2000. Examination of base pair variants of the *strA-strB* streptomycin resistance genes from bacterial pathogens of humans, animals and plants. *J. Antimicrob. Chemother.* 46:848-849.
- Sundin, G. W. and Bender, C. L. 1993. Ecological and genetic analysis of copper and streptomycin resistance in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1018-1024.
- Sundin, G. W. and C. L. Bender. 1993. Expression of the *strA-strB* streptomycin resistance

- genes in *Pseudomonas syringae* and *Xanthomonas campestris* and characterization of IS6100 in *X. campestris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2891-2897.
- Sundin, G.W., and C.L. Bender. 1996. Dissemination of the *strA-strB* streptomycin-resistance genes among commensal and pathogenic bacteria from humans, animals and plants. *Mol. Ecol.* 5:133-43.
- Tachibana, Y. 1988. Occurrence of kiwifruit bacterial blossom rot and its control. *Plant Quarantine* 42:182-186 (in Japanese).
- Tamura, K., Takikawa, Y., Tsuyumu, S. and Goto, M. 1989. Characterization of the toxin produced by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, the causal bacterium of kiwifruit canker. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan.* 55:512.
- Tauch, A., Krief, S., Kalinowski, J., and Puhler, A. 2000. The 51,409 bp R plasmid pTP10 from the multiresistant clinical isolated *Corynebacterium satriatum* M82B is composed of DNA segments initially identified in soil bacteria and in plant, animal, and human pathogens. *Molecular General Genetics* 263:1-11.
- Ushiyama, K. 1993. Studies on the epidemics and control of bacterial canker of kiwifruit caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Bulletin of the Kanagawa Horticultural Experimental Station* 43:1-76.
- Vassilev, V., Lavermicocca, P., Di Giorgio, D. and Iacobellis, N. S. 1996. Production of syringomycins and syringopeptins by *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. *Plant Pathol.* 45:316-322.
- Wiebe, W. L. and Campbell, R. N. 1993. Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* and comparison with *P. s. tomato*. *Plant Dis.* 77:414-419.
- Wimalajeewa, D. L. S., Cahill, R., Hepworth, G., Schneider, H. G., and Washbourne, W. 1991. Chemical control of bacterial canker (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*) of apricot and cherry in Victoria. *Aust. J. Exp. Agric.* 31:705-708.
- Young, J. M., G. J. Cheesmur, F. V. Welham, and W. R. Henshall, 1988. Bacterial blight of kiwifruit. *Ann. Appl. Biol.* 112:91-105.
- 고영진, 서정규, 이동현, 신종섭, 김승화. 1999. 참다래 궤양병의 약제 방제. *식물병과 농업* 5:95-99.
- 고영진, 이재균, 허재선, 정재성. 2003. 우리나라 참다래 저장병 발병율과 병원균. *식물병연구*

9:196-2000.

고영진, 정희정, 김정화. 1993. *Pseudomonas syringae*에 의한 참다래 꽃썩음병. 한국식물병리학회지 9:300-303.

고영진, 차병진, 정희정, 이동현. 1994. 참다래 궤양병의 격발 및 확산. 한국식물병리학회지 10(1):68-72.

병원균 및 발생 생태. 순천대학교 논문집 12:83-93.

고영진. 1995. 참다래 주요 병. 식물병과 농업 1:3-13.

橘 泰宣, 1988. キウイフルーツ花腐細菌病の發生と防除. 植物防疫 42(4):182-186.

梶谷裕二, 1993. キウイフルーツ花腐細菌病に對する耕種的防除. 植物防疫 47(4):21-23.

三好孝典, 1991. キウイフルーツ花腐細菌病の生態と防除法. 今月の農業4月60-63.

三好孝典, 橘 泰宣, 1991. キウイフルーツ花腐細菌病菌の分離用選擇培地. 日植病報 60:729-734.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.