

1. 표지

농생명산업기술개발사업 R&D Report

발간등록번호

11-1543000-001917-01

# 참다래 궤양병균 집단 분석용 분자마커 개발 및 유전적 특성 구명

## 최종보고서

2017. 9. .

주관연구기관 / 순천대학교  
협동연구기관 / (주)바이오메딕

농림축산식품부

## 2. 제출문

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “참다래 궤양병균 집단 분석용 분자마커 개발 및 유전적 특성 구명”(개발기간 : 2015. 8. 14. ~ 2017. 8. 13.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017. 9. 26.

주관연구기관명 : 순천대학교산학협력단      김응곤  
협동연구기관명 : (주)바이오메딕              조건형



주관연구책임자 : 고영진  
세부연구책임자 : 정재성  
협동연구책임자 : 김호방

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

### 3. 보고서 요약서

#### 보고서 요약서

과제고유번호		해 당 단 계 연 구 기 간		단 계 구 분	(해당단계)/ (총 단 계)
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	참다래 퀘양병균 집단 분석용 분자마커 개발 및 유전적 특성 구명			
연구책임자	해당단계 참 여 연구원 수	총: 14명 내부: 8명 외부: 6명	해당단계 연 구 개 발 비	정부: 400,000천원 민간: 34,000천원 계: 434,000천원	
	총 연구기간 참 여 연구원 수	총: 14명 내부: 8명 외부: 6명	총 연구개발비	정부: 400,000천원 민간: 34,000천원 계: 434,000천원	
연구기관명 및 소속부서명	순천대학교 산학협력단			참여기업명: (주)바이오메딕	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자: 고 영 진	
<ul style="list-style-type: none"> <li>● 우리나라 참다래 재배 지역 및 품종별 참다래 퀘양병 발생특성 파악</li> <li>● 지역 및 품종별 맞춤형 참다래 퀘양병 방제매뉴얼 도출</li> <li>● 참다래 퀘양병 방제매뉴얼을 활용한 참다래 재배 현장 컨설팅</li> <li>● RAPD 분석을 통한 Psa1과 Psa2 특이적 primer 선발</li> <li>● 본 연구팀이 기 개발한 Psa3 특이적 primer의 성능 재검증</li> <li>● RAPD 분석을 통한 지리적 기원이 다른 Psa3 아집단 특이적 분자마커 개발</li> <li>● 우리나라에서 Psa3에 의한 퀘양병의 연도별 발생 추적</li> <li>● Psa3 2차 감염에 의한 퀘양병의 확산 추적</li> <li>● 국내 고유 Psa2 균주에 대한 complete genome 최초 완성 및 3가지 주요 biovar (Psa1, 2, 3)의 15개 균주에 대한 draft genome 확보. 비교유전체 분석으로 분자표지[SNP, PAV (Presence-Absence)] 대량 발굴</li> <li>● 5가지 biovar (Psa1, 2, 3, 4, 5)의 core/pangenome 최초 분석과 고병원성 Psa3 특이 병원성 인자 파악을 통한 방제 기술 개발의 기반 구축</li> <li>● Psa biovar 유전형 결정을 위한 분자표지 개발 및 농업 현장에의 활용</li> </ul>				보고서 면수: 132	

#### 4. 국문 요약문

		코드번호	D-01			
연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 지역 및 품종별 참다래 궤양병균 집단 비교분석 및 발병특성 조사</li> <li>● 지역 및 품종별 맞춤형 참다래 궤양병 방제매뉴얼 도출 및 방제 컨설팅</li> <li>● 참다래 궤양병균의 biovar 진단용 특이적 분자마커 개발</li> <li>● Psa 3 집단의 지리적 기원 추적용 분자마커 개발</li> <li>● 참다래 궤양병균 biovar별 유전체 비교 분석</li> <li>● 지리적 기원이 다른 집단별 유전체 비교 분석</li> </ul>					
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 우리나라 참다래 재배 지역 및 품종별 참다래 궤양병 발생특성 파악</li> <li>● 지역 및 품종별 맞춤형 참다래 궤양병 방제매뉴얼 도출</li> <li>● 참다래 궤양병 방제매뉴얼을 활용한 참다래 재배 현장 컨설팅</li> <li>● RAPD 분석을 통한 Psa1과 Psa2 특이적 primer 선발</li> <li>● 본 연구팀이 기 개발한 Psa3 특이적 primer의 성능 재검증</li> <li>● RAPD 분석을 통한 지리적 기원이 다른 Psa3 아집단 특이적 분자마커 개발</li> <li>● 우리나라에서 Psa3에 의한 궤양병의 연도별 발생 추적</li> <li>● Psa3 2차 감염에 의한 궤양병의 확산 추적</li> <li>● 우리나라에만 분포하는 biovar Psa2 2개 균주의 완전 유전체 수준 해독 및 core/pangenome 분석</li> <li>● 병원성 연관 유전자들의 심층 비교유전체 분석을 통한 맞춤형 방제 기술 개발을 위한 기반 구축</li> <li>● 3가지 주요 biovar (Psa1, 2, 3)에 대한 비교유전체 분석으로부터 genotyping을 위한 분자표지(SNP, PAV) 대량 발굴</li> <li>● 발굴된 분자표지를 활용한 농업 현장에의 활용</li> </ul>					
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 참다래 궤양병의 조기진단 가능</li> <li>● 참다래 궤양병의 합리적 관리체계 수립 가능</li> <li>● 지역별 품종별 참다래 궤양병 방제 대책 제시 가능</li> <li>● 참다래 재배농민 현장애로 해결 방안 제시 가능</li> <li>● 참다래 궤양병균의 biovar 동정을 통한 맞춤형 방제대책 가능</li> <li>● Psa3 집단의 확산 경로를 밝힘으로써 효율적 방제대책 수립</li> <li>● 지리적 기원이 다른 Psa3 균주의 구별 가능</li> <li>● Psa1 진단용 분자마커의 식물검역에 적용 가능</li> <li>● 국내 고유 Psa2 균주의 완전 유전체 완성 및 국제 학술논문 발표에 활용</li> <li>● 병원성 연관 유전자 기능 연구 및 궤양병 내병성 품종 육성에의 활용</li> <li>● 국내 참다래 궤양병균의 지속적 모니터링과 새로운 균주의 출현/진화의 예보</li> <li>● 농업 현장에서 궤양병균 진단 및 동정을 위한 분석 서비스 시스템 운영</li> </ul>					
중심어 (5개 이내)	bacterial canker	biovar	kiwifruit	molecular marker	Pseudomonas syringae pv. actinidiae	

5. 영문 요약문

< SUMMARY >

				코드번호	D-02
Purpose& Contents	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Investigation of Psa populations and characteristics according to cultivation regions and cultivars</li> <li>● Proper management manual for bacterial canker according to cultivation regions and cultivars and management consulting</li> <li>● Development of PCR primers specific to biovar 1, 2 and 3 strains based on RAPD analysis</li> <li>● Development of the rapid PCR-based method for the specific detection of individual sub-population of biovar 3 strains</li> <li>● Comparative genome analysis of three major Psa biovars (Psa1, 2, 3) and Psa3 strains originated from different regions</li> </ul>				
Results	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Characterization of bacterial canker occurrence according to cultivation regions and cultivars</li> <li>● Proposal of proper management manual for bacterial canker according to cultivation regions and cultivars</li> <li>● Management consulting based on management manual for bacterial canker</li> <li>● Development of Psa1 and Psa3 specific detection markers based on RAPD</li> <li>● Confirmation of specificity of Psa3 detection marker</li> <li>● Development of molecular markers discriminating Psa3 sub-population with different geographic origin</li> <li>● Monitoring of annual change of Psa3 distribution in Korea</li> <li>● Monitoring of spread of bacterial canker by secondary infection of Psa3 in Korea</li> <li>● Elucidation on complete genome level for Psa2 biovar that is endemic in Korea and analysis of core/pangenome for Psa biovars</li> <li>● Establishment of a fundamental technology for future development of a targeted pathogen control from the in-depth comparative genome analysis</li> <li>● Massive mining of molecular markers (SNP, PAV) for Psa genotyping from the comparative genome analysis of major biovars (Psa1, 2, 3)</li> <li>● Application to agricultural field work of the mined molecular markers</li> </ul>				
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Early diagnosis of bacterial canker of kiwifruits</li> <li>● Establishment of proper management system of bacterial canker</li> <li>● Guideline for management consulting of bacterial canker of kiwifruits</li> <li>● Optimization of control methods through the identification of Psa biovars</li> <li>● Discrimination of biovar 3 strains with different geographic origins</li> <li>● Establishment of effective control strategy by tracking the spread of Psa3</li> <li>● Monitoring the migration of Psa strains in quarantine program</li> <li>● Publication to an international journal on the complete genome of Psa2 biovar that is endemic in Korea</li> <li>● Functional analysis of pathogenicity-related genes and their application to the breeding of kiwifruit cultivars with resistance against bacterial canker</li> <li>● Establishment of monitoring and forecast system of Psa biovars</li> <li>● Operation of analysis service platform for identification/diagnosis of Psa biovars in the agriculture field</li> </ul>				
Keywords	bacterial canker	biovar	kiwifruit	molecular marker	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>

## 6. 영문목차

### < Contents >

1. Outline and performance goals of the project	7
2. Current status of national and overseas technology development	10
3. Research contents and results	11
4. Achievement of goal and contribution to related field	110
5. R&D Performance and its utilization plan	111
6. Overseas science and technology information collected during R&D process	112
7. Security level of research achievements	112
8. Research facility or equipments enrolled to National science and technology information system	112
9. Results of implementation to increase laboratory safety level	113
10. Representative research outputs	113
11. Others	113
12. References	114

## 7. 본문목차

### < 목 차 >

1. 연구개발과제의개요 .....	7
2. 국내외 기술개발 현황 .....	10
3. 연구수행 내용 및 결과 .....	11
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	110
5. 연구결과의 활용계획 등 .....	111
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	112
7. 연구개발성과의 보안등급 .....	112
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황 .....	112
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 .....	113
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적 .....	113
11. 기타사항 .....	113
12. 참고문헌 .....	114

<별첨> 자체평가의견서

# 1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
<p><b>1-1. 연구개발 목적</b></p> <p>○ 참다래 궤양병균 집단의 분석 및 유전적 특성 구명을 통한 맞춤형 참다래 궤양병 방제매뉴얼 도출</p> <p><b>1-2. 연구개발의 필요성</b></p> <p>○ 참다래의 경제적·산업적 중요성</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 참다래는 제주도를 비롯하여 전남과 경남 남해안지역을 중심으로 2,500여 농가, 약 1,400ha 정도가 재배되고 있으며, 생산량은 연간 15,000여톤 정도로 추정됨.</li> <li>✓ 참다래 소비량은 45,000톤 정도이지만 생산량 부족으로 매년 30,000톤 정도를 수입하고 있으며 국내 총 시장규모는 3,000억 이상으로 추정됨.</li> <li>✓ 암수딴그루인 참다래의 결실수 중에서 국내에서 주로 재배되는 대표적인 참다래 품종은 그린키위 계통인 헤이워드(<i>Actinidia deliciosa</i>)였으나 골드키위 계통인 Hort16A(<i>A. chinensis</i>)가 2004년부터 제주도에 재배하기 시작함.</li> <li>✓ 뉴질랜드 제스프리사에서 육성한 Hort16A는 제주도에 약 100 ha 정도가 OEM방식으로 재배되고 있으며 Hort16A 재배농가는 매출액의 15%를 로얄티로 지불하고 있음.</li> <li>✓ 이에 대응하여 2000년대 후반부터 국내에서도 Hort16A를 대체할 수 있는 새로운 참다래 품종의 개발이 이루어져 제시골드(<i>A. chinensis</i>), 한라골드(<i>A. chinensis</i>), 해금(<i>A. chinensis</i>) 등 골드키위 계통 신품종들이 200 ha 이상 재배되고 있음.</li> <li>✓ 또한 최근 소비자의 기호변화로 레드키위 품종인 홍양(<i>A. chinensis</i>) 뿐만 아니라 엔자골드(<i>A. chinensis</i>)와 엔자레드(<i>A. chinensis</i>) 등 외국산 골드키위 계통 신품종들의 재배도 급증하는 추세임.</li> <li>✓ 참다래는 FTA협정에 따른 수입개방에도 불구하고 대외경쟁력이 입증되어 농가 고소득 작목으로 정착하여 재배규모와 재배면적이 꾸준히 증가하고 있음.</li> </ul> <p>○ 참다래 산업에서 궤양병의 중요성</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>(Psa)라는 그람 음성균에 의해 발생하는 참다래 궤양병은 주간, 가지, 잎, 꽃봉오리, 뿌리 등 다양한 부위에 병징을 나타내는 전신성 병임.</li> <li>✓ 참다래 궤양병은 1980년 초반 일본에서 발생하기 시작하였으며, 국내에서는 본 연구팀이 1980년대 후반 Hayward와 2006년에 Hort16A에서 각각 최초로 궤양병 발생을 보고하였음.</li> <li>✓ 참다래 궤양병은 아시아에서 일본과 우리나라뿐만 아니라 키위(참다래) 최대 생산국인 중국과 최대 수출국인 뉴질랜드와 유럽에서 최대 생산국인 이탈리아를 비롯한 주요 생산국에서도 발병이 심각하여 예상손실액이 1,000억 이상이 될 것으로 추정되고, 뉴질랜드에서는 궤양병 방제비용으로 200억원을 책정함.</li> </ul> <p>○ 참다래 고병원성 궤양병균 Biovar Psa3의 출현과 세계적 확산</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Psa는 병원성을 일으키는 기작과 발견된 순서에 따라 Psa1, Psa2, Psa3 등 세 가지 Biovar로 분류함.</li> </ul>	

- ✓ Psa1은 phaseolotoxin을 생성하며 일본과 이탈리아, 중국 등에서 분포하고, Psa2는 coronatine을 생성하며 우리나라에만 분포하고, 고병원성 Psa3는 phytotoxin을 생성하지 않으며 이탈리아, 뉴질랜드, 칠레를 비롯하여 전세계적으로 분포함.
- ✓ Psa3는 최근 Hort16A를 비롯한 골드키위 계통 신품종들이 국내외에서 육성되고 재배면적이 확대되면서 재배 품종 변화에 따라 골드키위 계통 신품종들에 병원성이 강한 신훈주로 2008년부터 보고되기 시작함.
- ✓ Psa3를 비롯하여 전세계에 분포하는 참다래 궤양병균의 기원은 키위(참다래) 원산지인 중국으로 보고되었음.
- ✓ 이탈리아와 뉴질랜드 등 키위(참다래) 주요 생산국에서 재배되고 있는 주요 골드키위 계통 품종인 Hort16A는 Psa3에 대해 고도감수성을 보여 많은 과수원이 초토화될 만큼 피해를 입고 있음.
- ✓ 키위(참다래) 최대 수출국인 뉴질랜드에서는 Psa3에 대해 고도감수성인 Hort16A 재배를 포기하고 G3 등 신품종으로 대체하고 있음.
- ✓ Psa3에 의한 피해확산에 따라 참다래 궤양병이 전세계적인 관심사로 부각되어 2013년 11월 뉴질랜드에서 제1차 국제키위궤양병심포지움이 개최되었으며, 2015년과 2017년에는 이탈리아와 칠레에서 각각 제2차 국제키위궤양병심포지움과 제3차 국제키위궤양병심포지움이 개최됨.

#### ○ 참다래 고병원성 궤양병균 Biovar Psa3의 국내 출현과 확산

- ✓ Psa3는 본 연구팀에 의해 국내에서 2011년 전남 고흥군에서 재배되고 있던 엘로우킹(*A. chinensis*)과 홍양에서 최초로 발견됨.
- ✓ 농림축산검역본부의 역학조사결과(2014) 전남 고흥군의 엘로우킹과 홍양에서 발생한 Psa3의 국내 유입 경로는 감염된 묘목으로 추정하고 있음.
- ✓ Psa3는 2014년 제주도와 경남 사천시에서 발견되었고, 2015년에는 추가로 경남 고성군과 남해군, 전남 광양시, 순천시와 완도군 등으로 확산되고 있음.
- ✓ 2015년 현재 Psa3는 Hort16A뿐만 아니라 홍양, 제시폴드, 해금, 엔자레드, 헤이워드 등에서 발견되고 일부 과수원이 폐원되는 피해를 입고 있음.
- ✓ 2014년 제주도에서는 인공수분 후 초여름부터 결과지에서 주로 궤양병 증상이 발생하기 시작하였고 2015년에는 나무 전체로 전염되어 궤양병이 발생하고 있음.
- ✓ 결국 2014년과 2015년 제주도와 경남 및 전남에서 발생한 Psa3의 국내 유입 경로는 본 연구팀이 개발한 Psa3 진단마커를 이용하여 수행중인 역학조사에 의하면 아직 확증되지 않았지만 감염된 꽃가루로 추정되고 있음.
- ✓ 따라서 Psa3의 국내 유입 및 확산경로를 구명하기 위하여 Biovar별 진단용 분자마커와 지리적 기원이 다른 Psa3 검출용 분자마커를 개발하는 것이 시급함.
- ✓ 또한 Psa 집단별 맞춤형 방제매뉴얼을 도출하기 위하여 지역별 및 품종별 분포하는 궤양병균 집단의 유전체 해독을 통한 유전적 특성을 구명하는 것이 필요함.

### 1-3. 연구개발 범위

#### □ 연구개발의 주요내용

- ✓ 참다래 궤양병균 집단 분석용 분자마커 개발
- ✓ 참다래 궤양병균 집단별 유전체 비교 분석
- ✓ 참다래 궤양병균 집단의 유전적 특성 구명
- ✓ 지역 및 품종별 맞춤형 참다래 궤양병 방제매뉴얼 도출

#### □ 과제별 연구개발의 목표 및 주요내용

##### ○ 1세부과제 : 참다래 궤양병균 집단의 유전적 특성 구명 및 맞춤형 방제매뉴얼 도출

- ✓ 목표: 1) 지역 및 품종별 참다래 궤양병균 집단 비교분석 및 발병특성 조사  
2) 지역 및 품종별 맞춤형 참다래 궤양병 방제매뉴얼 도출 및 방제 컨설팅
- ✓ 내용: 1) 지역 및 품종별 참다래 궤양병균 집단 비교 분석 및 발병 특성 조사  
▷지역 : 제주도, 경남, 전남의 주요 재배 지역  
▷품종 : 헤이워드, Hort16A, 홍양, 제시골드, 한라골드, 해금 등  
2) 지역 및 품종별 맞춤형 참다래 궤양병 방제매뉴얼 도출 및 방제 컨설팅  
▷지역 : 제주도, 경남, 전남의 주요 재배 지역  
▷품종 : 헤이워드, Hort16A, 홍양, 제시골드, 한라골드, 해금 등

##### ○ 2세부과제 : 참다래 궤양병균 집단 분석용 분자마커 개발

- ✓ 목표: 1) 참다래 궤양병균 Biovar 진단용 특이적 분자마커 개발  
2) Psa3 집단의 지리적 기원 추적용 분자마커 개발
- ✓ 내용: 1) 참다래 궤양병균 Biovar 진단용 특이적 분자마커 개발  
▷RAPD 분석을 통한 Psa1과 Psa2 특이적 primer 선발  
▷본 연구팀이 기 개발한 Psa3 특이적 primer의 성능 재검증  
2) Psa3 집단의 지리적 기원 추적용 분자마커 개발  
▷RAPD 분석을 통한 지리적 기원이 다른 Psa3 특이적 primer 선발  
▷중국, 뉴질랜드, 이탈리아 등 주요 참다래 생산 국가에서 유래하는 Psa3 균주 식별

##### ○ 1협동과제 : 참다래 궤양병균 유전체 비교 분석을 통한 맞춤형 방제기술 기반 구축

- ✓ 목표: 1) 참다래 궤양병균 Biovar별 유전체 비교 분석  
2) 지리적 기원이 다른 집단별 유전체 비교 분석
- ✓ 내용: 1) Psa Biovar(Psa1, Psa2, Psa3) 및 지리적 기원이 다른 Psa3 집단의 유전체 해독 및 gene annotation  
2) 비교 유전체 분석 - phytotoxin 생합성 구조 유전자(phaseolotoxin/coronatine gene cluster 등), secretion system 관련 유전자, effector protein 유전자(*hop*, *avr* 등), 약제저항성 관련 유전자(copper resistance, antibiotic detoxification), 병원성 관련 유전자(peptolytic enzyme 등) 등에서 변이 집중 분석  
3) 병원성 관련 유전자들에서 intrapathovar 서열 변이(SNP, INDEL 등) 집중 분석

## 2. 국내외 기술개발 현황

코드번호	D-04
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Psa에 관한 연구동향을 Thomson Reuters사의 Web of Science™ 데이터베이스에 대해 검색한 결과 총 80여 편의 논문이 검색됨.</li> <li>○ 연도별 논문 발표 현황을 보면, 2011년부터 이전에 비해 논문 발행 편수가 지속적으로 증가하는 것을 볼 수 있었는데, 이는 키위 재배 면적과 지역의 확대, 2008-2009년 고병원성 Psa3의 출현 및 세계적인 궤양병의 확산 등과 밀접한 관련이 있는 것으로 판단됨.</li> <li>○ 국가별 논문 발표 현황을 살펴보면 키위 산업의 주요 선진국인 이탈리아와 뉴질랜드가 각각 51%와 23%를 차지하였으며, 한국은 약 9%로 세 번째를 차지함.</li> <li>○ 참다래 궤양병 집단의 구조가 복잡하다는 보고는 있지만 이탈리아를 비롯한 유럽의 여러 나라, 뉴질랜드 및 칠레 등은 각각 단일한 PSA 아집단으로 구성되어 있어서 각 집단을 분석할 수 있는 분자마커에 대한 연구결과는 보고된 바 없지만 본 연구결과 개발된 분자마커는 궤양병균 집단을 명확히 구분할 수 있게 하여 궤양병의 전 세계적 이동 및 확산 경로를 파악하는데 이용되고, 식물검역에도 활용될 수 있음.</li> <li>○ 2011년 이탈리아 연구자들에 의해 Psa1과 Psa3 biovar에 대한 초안 유전체(draft genome) 서열이 발표된 이래, 현재까지 biovar 1, 3, 5에 대한 완전 유전체(complete genome) 해독이 이루어졌으며, 5가지 biovar에 속하는 50개 이상의 균주들에 대한 초안 유전체 해독이 이루어져 온 반면, 국내 고유 Psa2 biovar에 대해서는 초안 수준의 유전체 해독만 보고되었음.</li> <li>○ 유전체 분석 초기에는 주로 Roche 454나 Illumina 플랫폼을 이용하여 초안(draft) 수준의 유전체가 확보되고 연구되어 왔으나, 최근에는 PacBio RS II 플랫폼 (<a href="http://www.pacificbiosciences.com/">http://www.pacificbiosciences.com/</a>)을 이용하여 비교적 용이하게 완전 유전체 정보를 확보하여 비교 유전체 분석에 활용하고 있음.</li> <li>○ 완전 혹은 초안 유전체 정보를 활용한 비교 유전체 분석을 통해 궤양병의 발생 및 확산과 관련이 있는 병원성 인자들에 관한 연구가 이루어지고 있음.</li> <li>○ 비교 유전체 분석을 통해 확보된 유전체 서열 변이 정보를 기반으로 biovar 및 균주 수준에서의 genotyping을 위한 분자표지들이 개발되고 있음.</li> <li>○ 향후 완전 유전체 정보가 지속적으로 축적될 것으로 전망되며, pan genome 및 core genome 분석을 통한 유전체 진화에 관한 연구가 활발히 이루어지고, 병원성과 독성 관련 최소 유전자 파악 및 이들의 기능 분석 관한 연구가 활발히 이루어질 것으로 전망됨.</li> <li>○ 본 연구 과제를 통해서 3개 biovar (Psa1, 2, 3)에 속하는 15개 균주에 대한 초안 수준의 유전체를 확보하였고, 이 중에서 국내 고유 Psa2 biovar에 속하는 2개 균주에 대해서는 국내외 처음으로 완전 유전체 수준의 정보를 확보하고 분석하였음.</li> <li>○ 본 연구를 통해 축적된 정보는 향후 유전자 기능 및 유전체 진화 등의 연구에 활용 가능하며, 더 나아가 맞춤형 방제를 위한 표적 유전자 설정, 궤양병 저항성 참다래 육종 등의 기초 및 응용 연구에 활용 가능할 것으로 전망됨.</li> <li>○ 또한 본 과제를 통해 확보된 유전체 변이 정보 및 개발된 분자표지는 검역 및 역학 조사 등의 농산업 현장에 활발히 활용될 수 있을 것으로 전망됨.</li> <li>○ 참다래 궤양병에 대한 방제법은 국가별로 단편적으로 제시되고 있지만 지역이나 품종별 맞춤형 방제법은 제시되지 않음.</li> </ul>	

### 3. 연구수행 내용 및 결과

코드번호

D-05

## ○ 연구내용, 연구결과

### 제1세부과제: 참다래 궤양병균의 유전적 특성 구명 및 맞춤형 방제매뉴얼 도출

키위 궤양병은 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa)에 의해 발생하는 전염병으로 키위 재배에 심각한 피해를 주는 치명적인 질병이다(Serizawa 등, 1989; Takikawa 등, 1989). 1988년 국내에서 궤양병이 처음 발생한 제주도의 키위 재배지는 해발 150~250 m에 이르는 한라산 중턱에 위치한 중산간 지역으로 겨울철에 동해가 상습적으로 발생하는 지역이기 때문에 궤양병에 대한 정보와 경험이 전혀 없었던 재배자들은 단순한 동해로 판단하고 그 지역에서 키위 재배를 포기했었다(Koh, 1995; Koh와 Lee, 1992; Koh 등, 1994).

키위 궤양병이 Psa라는 세균에 의해 발생하는 것이 밝혀진 후에도 궤양병 발생 초기에 적절한 대응에 실패할 경우에는 과수원이 폐원에 이를 정도로 심각한 피해를 주고 있어서 일단 궤양병이 발생하면 키위 재배를 포기하는 농가가 적지 않은 실정이다. 키위 궤양병은 세균성 병으로 일단 발생하면 식물체내에서 빠르게 진전되고 다른 식물체로 2차감염이 잘 되어 방제가 매우 어렵기 때문이다(Kim 등, 2016a; 2016b; Son 등, 2016).

암수딴그루인 키위의 암나무 품종은 2005년까지 국내에서는 그린키위 품종인 헤이워드(Hayward)가 대부분이었다(Huang, 2014)). 따라서 헤이워드에서 궤양병이 주로 발생했지만 2004년부터 제주도에 재배되기 시작한 골드키위 품종인 Hort16A에 2006년부터 궤양병이 발생하기 시작하면서 Hort16A도 피해를 받기 시작했다(Koh 등, 2010). 2010년까지 국내에서 키위에 궤양병을 일으키는 Psa biovar는 Psa2뿐이었지만 2011년부터 골드키위와 레드키위 품종에 보다 큰 피해를 주는 Psa3가 국내로 유입되어 골드키위와 레드키위 품종을 재배하는 농가들에게 더욱 심각한 피해를 주면서 확산되고 있다(Kim 등, 2016a; 2016b; Koh 등, 2012a).

따라서 우리나라에 분포하는 키위 궤양병균 집단의 유전적 특성을 파악하고, 지난 30년 동안 수행한 궤양병에 대한 연구결과와 키위 재배현장 컨설팅 경험 등을 토대로 키위 궤양병 방제매뉴얼로 작성하고, 우리나라 키위 재배 지역 및 품종별 맞춤형 방제매뉴얼을 도출함으로써 키위 재배자들이 궤양병의 발생을 사전에 예방하고 궤양병이 발생한 경우에 신속하게 대처함으로써 피해를 경감시키는데 활용할 수 있도록 제시하고자 한다.

#### 1. 우리나라 참다래 궤양병균 집단의 유전적 특성

##### 가. 우리나라에서 키위 궤양병 대발생 원인

식물병이 성립되기 위해서는 식물병삼각형(disease triangle)을 구성하는 세 가지 요인인 병원성이 강한 병원체, 감수성이 큰 식물체 및 발병에 적합한 환경요인이 동시에 갖추어져야 한다(Agrios, 2005). 키위 궤양병이 최근에 대발생하는 원인은 키위 궤양병의 성립에 적합하도록 식물병삼각형을 구성하는 세 가지 요인이 최근에 마련되었기 때문이다. 즉, 전세계적으로 유행하고 있는 고병원성 Psa3가 국내로 유입되어 확산하고 있으며, Psa3에 감수성인 골드키위와 레드키위 품종들의 재배면적이 급증하고 있으며, 아열대과수인 키위 생육에 지장을 주고 저온성 Psa의 활동을 조장하는 기후변화에 의한 이상난동과 이상저온이 자주 발생하여 키위 궤양병 발병유인으로 작용하고 있다(Kim 등, 2016a; 2016b; Koh 등, 2010).

(1) 고병원성 키위 궤양병균 Psa3의 확산

다래나무과 다래나무속 키위나무에 궤양병을 일으키는 Psa는 분류학적으로 Proteobacteria 문, Gamma-proteobacteria강, Pseudomonadales목, Pseudomonadaceae과, *Pseudomonas*속, *Pseudomonas syringae* species complex 중 genomospecies 8에 속하며 기주식물에 대한 병원성 차이에 따른 분류체계인 pathovar *actinidiae*에 속한다. Psa는 최근 병원성 정도, 유전자지문(genomic fingerprinting), 16S rDNA/16S-23S internal transcribed spacer 서열, multilocus sequence analysis (MLSA), phytotoxin과 effector protein 종류 등에 따라 biovar로 세분하고 있다(Scortichini 등, 2012).

지금까지 알려진 biovar 중에서 일본에서 최초로 보고되었고 이탈리아와 중국에도 분포하는 biovar 1 (Psa1)은 phytotoxin으로 phaseolotoxin을 생성하고, 우리나라에만 분포하는 biovar 2 (Psa2)는 phytotoxin으로 coronatine을 생성하는데, Psa1과 Psa2의 병원성은 중간 정도로 알려졌다(Han 등, 2003; Sawada 등, 2002).

반면에 biovar 3 (Psa3)는 phaseolotoxin과 coronatine을 생성하지 않지만 병원성에 관여하는 effector protein들이 콜드키위와 레드키위에 고병원성을 나타낸다. 뉴질랜드와 오스트레일리아에 분포하고 잎에만 약한 점무늬 증상을 나타내어 저병원성 집단으로 분류되었던 biovar 4 (Psa4)는 최근에 새로운 pathovar인 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum* (Psaf)으로 재분류되었다(Cunty 등, 2015)(Fig. 1).

최근에 일본에서는 Psa3처럼 phytotoxin을 생성하지 않지만 계통분류학적으로는 우리나라에만 분포하는 Psa2와 근연관계에 있는 biovar 5 (Psa5)가 발견되었고, Psa1으로 분류되지만 phaseolotoxin을 생성하는 유전자가 없는 균주들도 발견되고 있어서 현재 사용하고 있는 Psa의 biovar는 안정적인 분류체계는 아닌 것으로 판단된다(Fujikawa와 Sawada, 2016; Sawada 등, 2014).

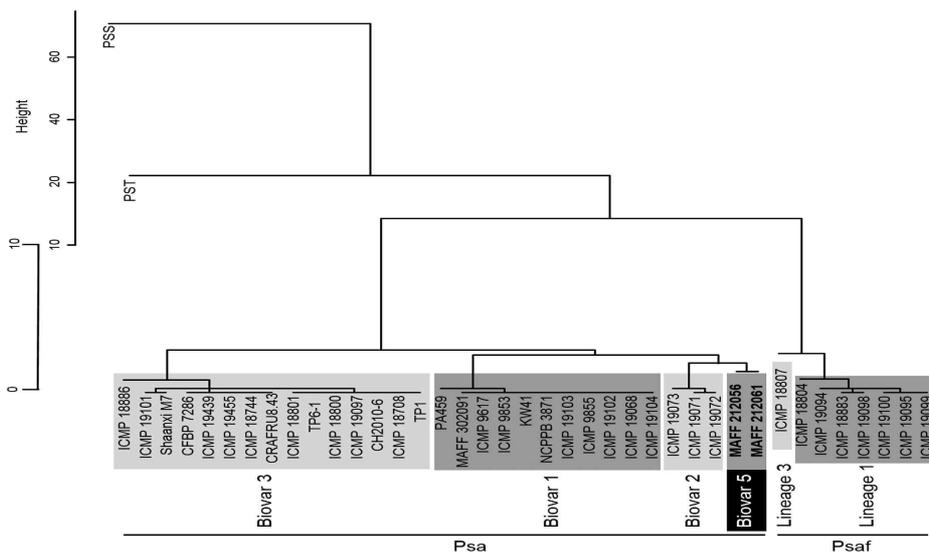


Fig. 1. Dendrogram for ANI values. ANI value for each combination between strains was calculated, and a dendrogram was constructed using UPGMA. Psa “biovar 4” had been transferred to the new pathovar *actinidifoliorum* (Psaf) with four lineages (lineages 1 to 4), of which lineage 1 and lineage 3 were included in this analysis (lineages in Psaf are considered to be equivalent to biovars in Psa)(Fujikawa와 Sawada, 2016).

국내에서는 Psa2에 의한 궤양병은 1988년부터 제주도 북제주군 조천읍에서 재배하는 일부 헤이워드 과수원에서 발생하기 시작하였다. 1990년까지는 전남 완도군, 해남군과 고흥군 일부 헤이워드 과수원에서만 Psa2에 의한 궤양병이 발생해지만 점차 궤양병 발생지역이 확산되어 지난 20여 년간 Psa2에 의한 궤양병 발생지역은 키위 재배지 전역으로 확산되어 있다 (Fig. 2).

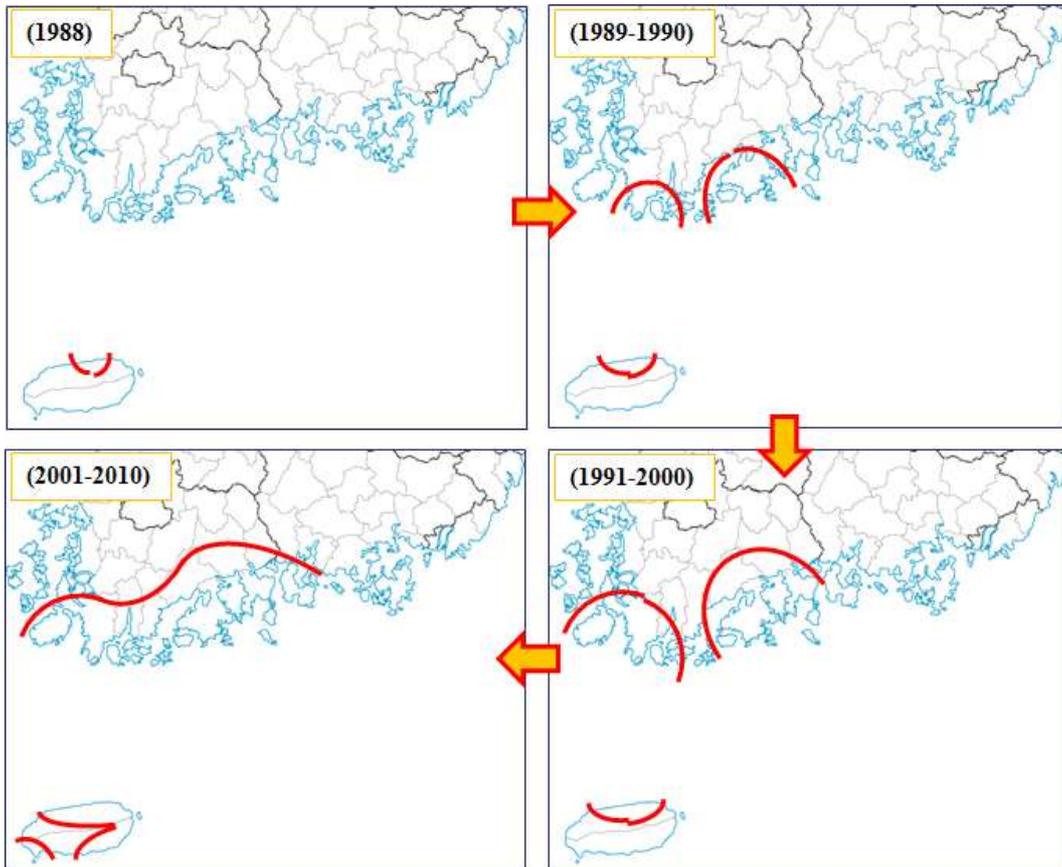


Fig. 2. Distribution regions of kiwifruit orchards infected by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* biovar 2 (Psa2) from 1988-2010 in Korea (Kim 등, 2016b).

한편, 고병원성 키위 궤양병균 Psa3는 2011년 전남 고흥군에서 최초로 검출되었으며 2014년 9월 11일 공적방제에 의해 최초로 Psa3에 의한 궤양병이 발생한 과수원은 폐원조치되었다 (Koh 등, 2012a).

그러나 2014년 제주도에서부터 Psa3에 의한 궤양병이 Hort16A를 비롯한 골드키위와 레드키위 품종들에서 발생하기 시작하여 최근에는 국내 주요 키위 재배지 전역에서 Psa3에 의한 궤양병이 대발생하고 있다.

국내에서 빠르게 확산되고 있는 Psa3의 유입경로에 대한 역학조사 결과 2011년에 발견된 Psa3는 2006년 중국에서 감염된 묘목 또는 접수를 통해 유입된 것으로 확인되었으며, 2014년부터 확산되고 있는 Psa3는 뉴질랜드와 중국에서 오염된 꽃가루를 통해 유입된 것으로 추정하고 있다(Kim 등, 2016b)(Fig. 3).

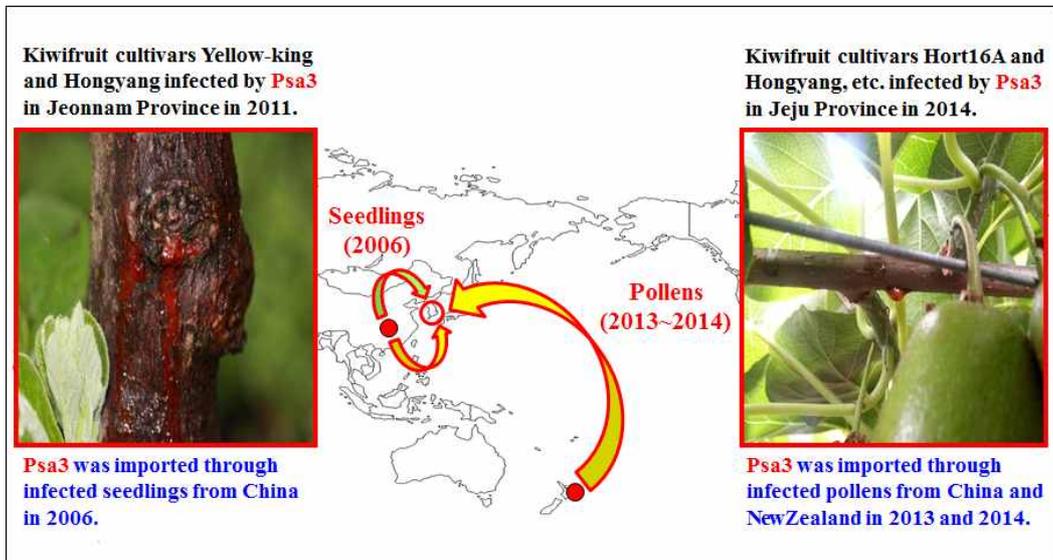


Fig. 3. Possible domestic flow route of Psa3 strains of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* responsible for recent bacterial canker epidemics in Korea (Kim 등, 2016b).

수입산 꽃가루를 통해 국내로 유입된 고병원성 Psa3에 의한 궤양병의 발생으로 피해를 입은 농가수는 2014년부터 매년 두 배 정도씩 증가하고 있어서 갈수록 Psa3에 의한 궤양병의 발생과 피해는 심해질 것으로 전망된다(Kim 등, 2016a)(Fig. 4).

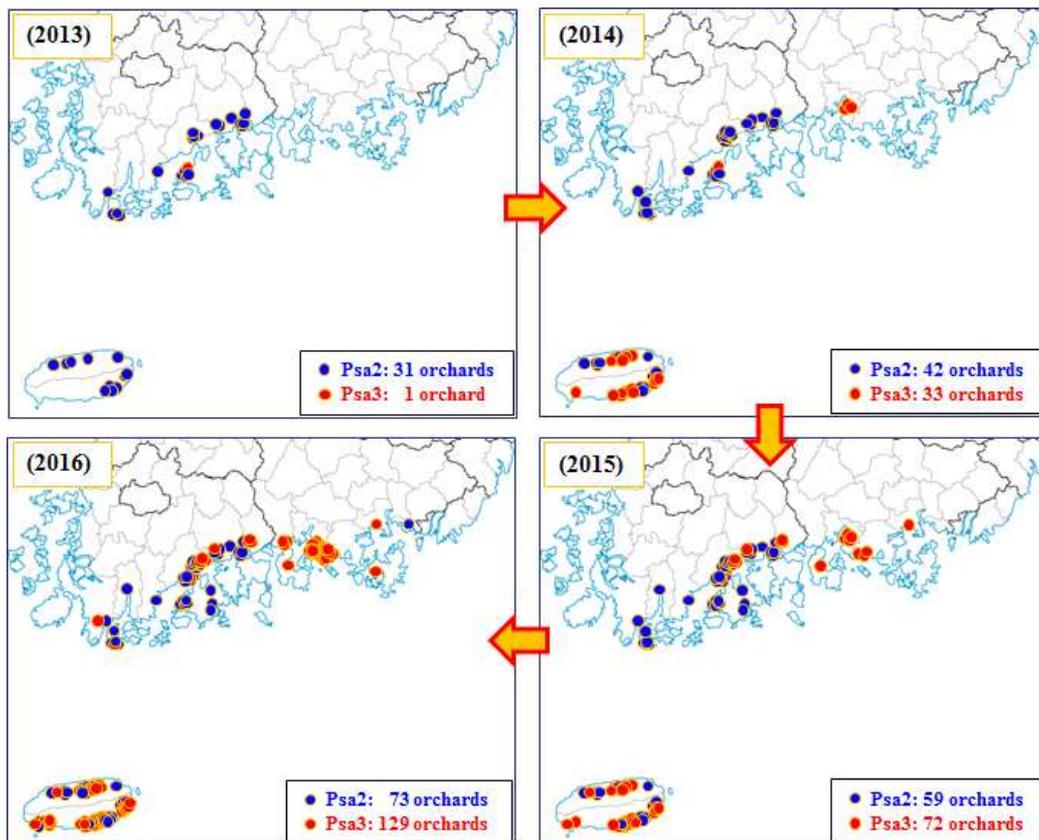


Fig. 4. Annual change of distribution sites of kiwifruit orchards infected by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* biovar 2 (Psa2) and biovar 3 (Psa3) from 2013 to 2016 in Korea.

(2) 감수성 키위 품종의 재배 증가

우리나라에 키위가 보급된 것은 1970년 후반이고 본격적으로 재배되기 시작한 것은 1980년 무렵이다. 키위 재배면적과 생산량은 꾸준히 증가하고 있어서 키위 재배면적은 약 1,300 ha이고, 연간 키위 생산량은 약 25,000톤에 이르고(Fig. 5), 전남과 경남 그리고 제주도가 주요 재배지역이다(Fig. 6).

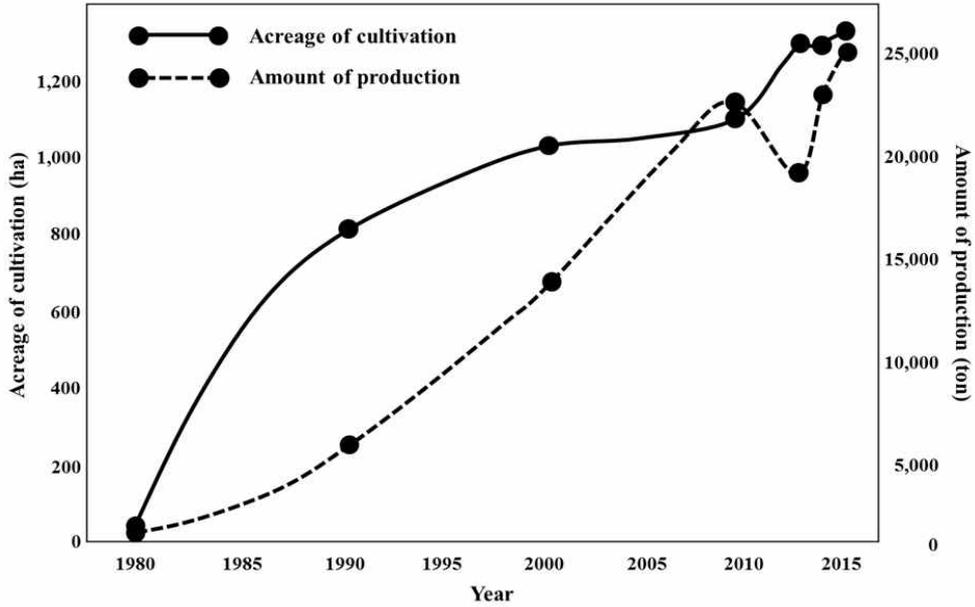


Fig. 5. Acreage of cultivation and amount of production of kiwifruit in Korea from 1980-2015.

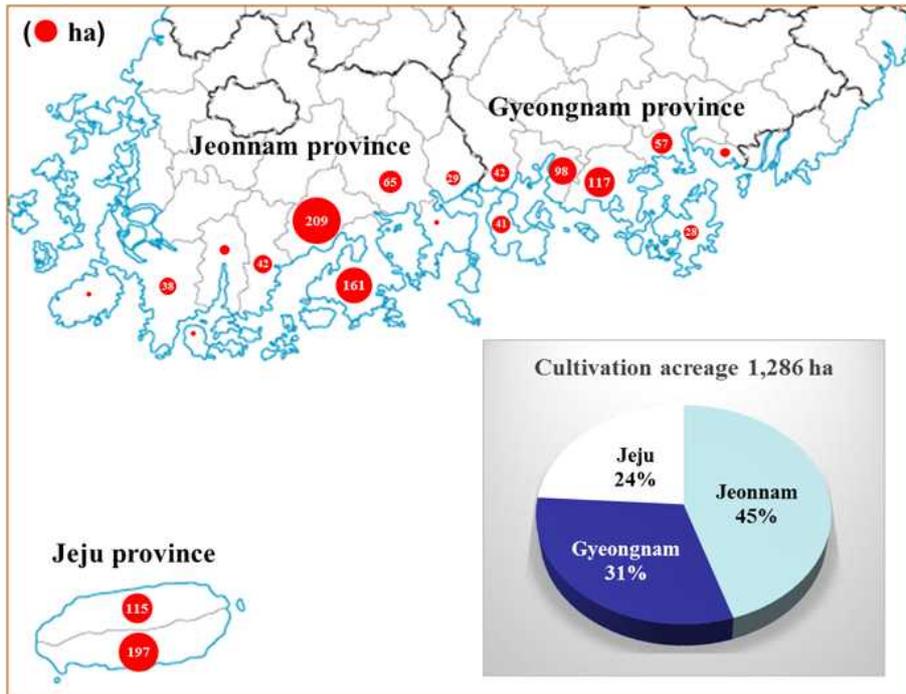


Fig. 6. Cultivation acreage of kiwifruit in major kiwifruit growing regions in Korea. Area of circle represents cultivation acreage in each region in Korea.

1970년대부터 국내에서 재배되기 시작한 암나무 키위 품종은 대표적인 그린키위 품종인 헤이워드 일색이었으나 뉴질랜드에서 육성된 골드키위 품종인 Hort16A가 2004년부터 제주도에 도입되어 약 100 ha에서 재배되고 있다.

이를 계기로 Hort16A로 대표되는 골드키위를 선호하는 소비자들이 증가함에 따라 뉴질랜드 제스프리사에 지불하는 로얄티경감 차원에서 국내에서 육성된 골드키위 품종인 제시골드, 한라골드, 해금, 골드윈 등이 2000년대 후반부터 농가에 보급되어 재배되는 한편 중국에서 육성된 홍양과 뉴질랜드에서 육성된 엔자레드(Enza-red) 등 레드키위 품종들도 국내에 도입되어 재배되면서 골드키위와 레드키위 재배면적이 급증하고 있는 추세이다(Fig. 7).

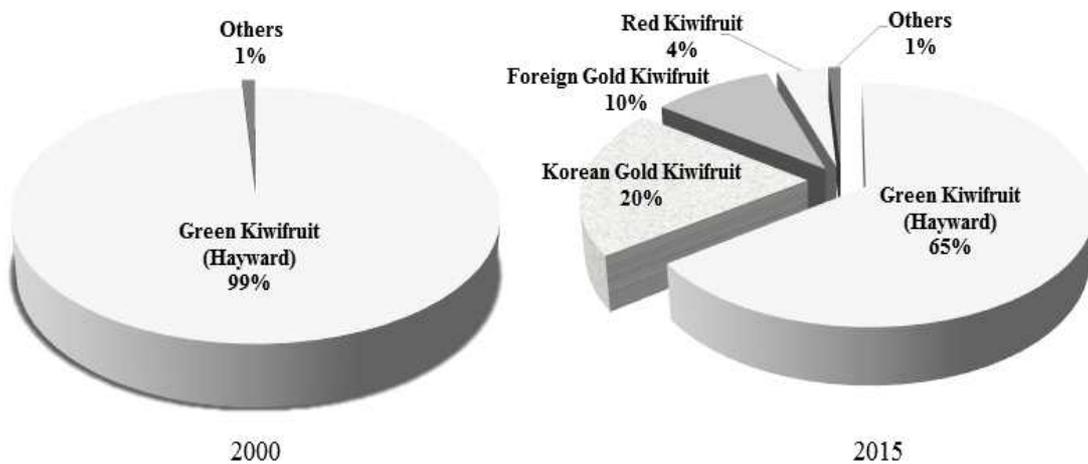


Fig. 7. Change of cultivation acreage of kiwifruit cultivars in Korea during the latest 15 years.

헤이워드처럼 그린키위 품종들은 분류학적으로 *Actinidia deliciosa*에 속하며 과육이 초록색을 띠고 과실표면에 긴 털이 많은 특징을 가지고 있다. 반면에 Hort16A처럼 골드키위 품종들은 *A. chinensis*에 속하며 과육이 노란색을 띠고 과실표면에 긴 털이 없다. 홍양처럼 레드키위 품종들은 골드키위와 같은 종인 *A. chinensis*에 속하지만 노란색 과육의 중심에 붉은색을 띠기 때문에 편의상 레드키위라고 부르고 있다.

그린키위에 비해 재배역사가 짧은 골드키위와 레드키위는 생장이 왕성하고 수확량도 많으면서 과실은 신맛이 적고 단맛이 강해서 재배자와 소비자 모두에게 호평을 받는 반면에 궤양병과 과실무름병을 비롯하여 여러 가지 병에 취약한 단점을 가지고 있다(Kim 등, 2013; Koh 등, 2010; 2012b). 국내에서만 분포하는 Psa2는 그린키위를 비롯하여 골드키위와 레드키위에 모두 비슷한 병원성을 나타내지만 Psa3는 그린키위보다 골드키위와 레드키위에는 강한 병원성을 나타내는 것으로 알려졌다.

실제 Psa3는 뉴질랜드에서 재배되는 골드키위 품종인 Hort16A를 완전히 초토화시켜 G3 품종으로 대체시킬 만큼 골드키위와 레드키위에 강한 병원성을 가진 것으로 확인되었으며, 전세계적으로 골드키위와 레드키위에 치명적인 피해를 주면서 확산되고 있다(Balestra 등, 2009; Butler 등, 2013; Everett 등, 2011; Ferrante와 Scortichini, 2009; 2010; Kim 등, 2016a; 2016b; Mazzaglia 등, 2012; McCann 등, 2013; Sawada 등, 2015; Vaneste 등, 2013).

2016년 Psa2와 Psa3에 의한 궤양병이 발생한 과수원에서 재배되는 품종별 발병율을 살펴 보면 그린키위 품종인 헤이워드에서 가장 발병율이 높았고, 골드키위 품종인 Hort16A, 레드키위 품종인 홍양, 골드키위 품종인 제시골드 순이었다(Kim 등, 2016a)(Table 1).

그런데 Psa3는 그린키위 품종인 헤이워드에는 잎에만 점무늬 병징을 나타낼 뿐 줄기에는 궤양 증상을 나타내지 않았지만 Hort16A와 제시골드 등 골드키위 품종과 홍양 등 레드키위 품종에는 나무 전체에 치명적인 피해를 나타내었다.

따라서 국내에서 불과 10년 사이에 키위재배면적의 30% 이상을 점유할 만큼 Psa3에 감수성인 골드키위와 레드키위의 재배면적이 급증하는 추세인 점을 감안하면 갈수록 궤양병에 의한 피해는 증가할 것으로 예상된다.

Table 1. Bacterial canker occurrence on various kinds of kiwifruit cultivars by Psa2 or Psa3 in 2016

Scientific name	Fruit type	Cultivar	Number of orchards infected with bacterial canker			
			Psa2	Psa3	Total	
<i>Actinidia deliciosa</i>	Green-fleshed	Hayward	31	33	64	
		Daeheung	6	2	8	
		Mega-green	1	1	2	
		Gamrok	0	1	1	
<i>Actinidia chinensis</i>	Yellow-fleshed	Hort16A	11	26	37	
		Jecy-gold	3	17	20	
		Haegeum	4	6	10	
		Yellow-king	0	3	3	
		Golden yellow	0	1	1	
		Enza-gold	2	1	3	
		Halla-gold	1	1	2	
		Gold-one	0	1	1	
		Red-fleshed	Hongyang	10	21	31
			Enza-red	2	2	4
Hongsim	0		1	1		
Red-vita	0		1	1		
<i>Actinidia arguta</i>	Kiwiberry	Chiak	0	1	1	
		Mansu	1	0	1	
		Unknown	1	0	1	
<i>Actinidia hybrid</i>	Kiwiberry	Skinny-green	0	1	1	
<i>Actinidia sp.</i>	Male	Unknown	0	9	9	
Total			73	129	202	

### (3) 키위 궤양병 발병에 적합한 환경

아열대과수인 키위는 국내에서 월동이 가능한 남해안과 제주도에서 주로 재배되고 있다. 그런데 기후변화에 의한 이상난동과 이상저온이 반복되는 현상이 해동기인 늦겨울 또는 이른 봄에 자주 발생하여 키위 궤양병의 발병유인으로 작용하고 있다.

특히 1~2월에 이상난동 후 3~4월에 찾아오는 기습적인 한파는 아열대과수인 키위의 저항성을 약화시키고 수액이 이동하고 있는 키위나무 주간부나 주지에 동해를 발생시켜 상처가 생기게 함으로써 Psa가 키위나무로 침입할 수 있는 통로를 제공한다(Ferrante와 Scortichini, 2014). 또한 Psa는 일평균기온이 0℃ 정도에서도 활동을 하며 물관부와 체관부를 통하여 4℃에서 빠르게 전파되기 때문에 봄철 기습적인 한파는 오히려 궤양병의 대발생을 조장한다(Gao 등, 2016; Huang, 2014).

한편 키위는 수입개방에도 불구하고 농가 고소득 작목으로 각광을 받으면서 경작면적에 비해 수입이 낮은 논을 키위 과수원으로 전환하는 면적이 급증하고 있다. 그런데 논처럼 배수와 통기성이 불량한 점질토에서 자라는 키위는 뿌리발육이 나빠 생육부진으로 궤양병에 대한 저항성이 감소된다.

더구나 인접한 논에 감수성인 골드키위를 집단적으로 재배하면서 Psa가 쉽게 전파될 수 있는 여건이 마련되어 궤양병이 급속하게 확산될 수 있는 발병유인으로 작용하고 있다. 또한 기상이변에 의한 잦은 강우와 폭우는 키위 생육에는 불리한 반면에 Psa의 전파와 침입에는 유리한 환경이 자주 형성되어 궤양병이 격발하는 원인이 되고 있어서 갈수록 궤양병의 발생과 피해는 심해질 것으로 관측된다.

#### 나. 키위 궤양병 병징

Psa에 감염된 키위나무 줄기에서 흘러나오는 세균유출액이 대표적인 줄기궤양병 병징이다 (Fig. 8A). 지난 수년간 키위 궤양병의 발생양상을 관찰한 경험에 의하면 국내에서는 보통 2월 중순부터 3월에 걸쳐 세균유출액이 흘러나오기 시작한다.

키위나무 주지와 가지의 세균유출액은 초기에는 무색투명했다가 점차 누런색으로 변하고 (Fig. 8B), 나중에 검붉은색으로 변한 세균유출액은 3월말부터 4월 초순 사이에 절정을 이루었으며 (Fig. 8C), 비슷한 시기에 일부 키위나무의 주간부에서도 검붉은색 세균유출액이 관찰되었다 (Fig. 8D).

키위나무 주간부나 주지 또는 가지에서 세균유출액이 흘러내리는 줄기 표면은 갈색 마름 증상이 동반되는데 (Fig. 8E) 줄기 표피를 벗겨보면 체관부가 갈변된 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 8F). 검붉은색 세균유출액은 Psa에 의해 파괴된 수피 조직으로부터 검붉은 색소가 세균 덩어리와 혼합되어 흘러내리기 때문이라는 것을 시사한다.

보통 Psa는 잎에 있는 기공이나 수공 또는 분비모 (trichome) 등을 통해 잎으로 침입하는데, 초기 병반은 엽맥 사이에 노란색~연두색으로 탈색된 둥근 달무리 무늬로 나타났다 (Fig. 8G). 점차 궤양병이 진전되면서 먼저 감염된 세포들이 죽으면서 달무리 중앙이 갈색으로 변하여 전형적인 키위 궤양병 병징인 노란 테두리를 가진 갈색 점무늬로 변했다 (Fig. 8H). 비가 내리고 난 후에 궤양병에 심하게 감염된 잎 가장자리로부터 잎궤양병 표징인 무색투명한 세균유출액이 관찰되기도 했다 (Fig. 8I).

5월 중순 무렵 강우가 잦은 날씨와 장마철에는 노란 테두리가 없는 급성형 갈색 점무늬들만 엽맥 사이에 불규칙하게 형성되거나 (Fig. 8J), 잎 가장자리로부터 수침상으로 갈변하면서 마르는 급성형 잎재양병 증상을 보였다 (Fig. 8K). 10월 하순 무렵에 새로운 병반이 아주 드물게 관찰되었다 (Fig. 8L). 9월 하순 무렵까지 20~25℃ 정도의 기온이 유지되다가 10월 초순 무렵에 최저기온이 10℃ 이고 최고기온이 20℃ 정도가 되는 날씨가 되자 Psa가 서서히 활동을 재개하여 10월 중순 무렵에 잎에서 새로운 병반을 형성한 것으로 추정된다.

재양병에 감염된 꽃봉오리는 꽃받침만 갈변되고 꽃잎은 감염되지 않았으며 일부 꽃받침에서는 투명한 세균유출액이 흘러나왔다 (Fig. 8M). 또한 군데군데 화경지가 감염되어 말라버린 꽃봉오리는 개화가 되지 않고 낙화되었다 (Fig. 8N).

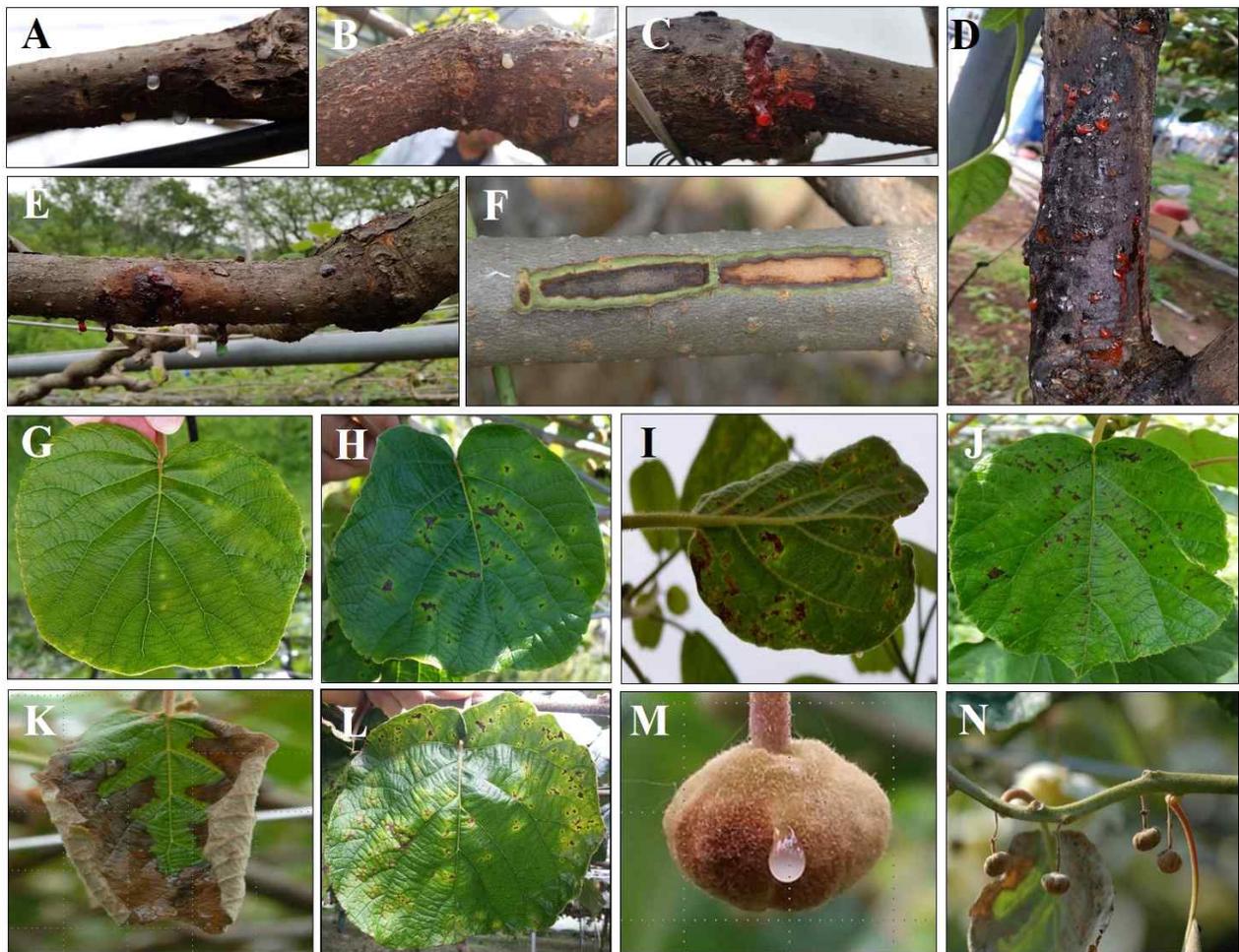


Fig. 8. Various kinds of symptoms or signs of bacterial canker on green-fleshed kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) trees caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. A: Transparent bacterial ooze on a leader, B: Milky-colored exudates on a leader, C: Red-rusty ooze on a leader, D: Red-rusty ooze on a trunk, E: Twig blight, F: Brown-colored dead tissue on a blighted leader, G: Yellowish chlorotic halos on a leaf, H: Brown spots surrounded by halos on a leaf, I: Bacterial ooze on a leaf, J: Irregular necrotic spots without halos on a leaf, K: Water-soaked leaf blight, L: Brown spots with halos on a leaf at late growth stage, M: Bacterial ooze on a blossom with necrotic calyx, N: Blossom necrosis with blighted stalks.

다. 키위 궤양병 발생 생태

키위 궤양병을 효율적으로 관리함으로써 피해를 최소화하기 위해서는 궤양병의 발생생태를 정확하게 파악하는 것이 필요하다. 키위 궤양병의 발생생태는 Fig. 9의 병환으로 요약할 수 있다.

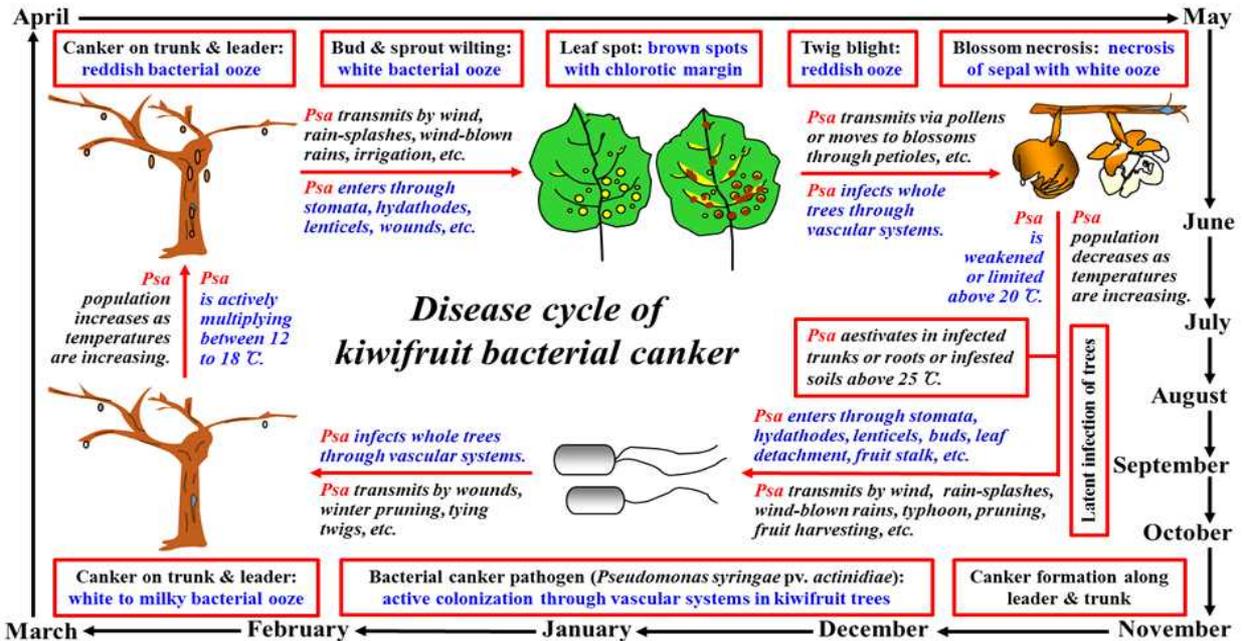


Fig. 9. Disease cycle of bacterial canker on green-fleshed kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*.

키위나무가 월동한 후 수액이동기인 이른 봄에 Psa에 감염된 주지와 가지에서 흘러내리는 세균유출액이 연중 가장 일찍 관찰되는 궤양병 증상이다. 발병초기인 2월에는 무색투명했다가 점차 누런색으로 변하고, 나중에 검붉은색으로 변하는 세균유출액은 3월말부터 4월 초순 사이에 절정을 이루고, 5월말 또는 장마철까지 지속되는데, 비슷한 시기에 키위나무의 주간부에서도 검붉은색 세균유출액이 관찰된다. 세균유출액이 흘러내리는 주간부나 주지 또는 가지의 체관부가 변색되고 표피는 갈색 마름 증상을 나타낸다.

키위 궤양병이 늦겨울 또는 이른 봄 수액이동기에 처음 발생하기 시작하는 것은 동해 발생으로 키위나무에 상처가 생겨 Psa의 침입통로가 되었고, 해동기에 저온다습한 기후가 Psa의 발병유인으로 작용했기 때문으로 추정된다(Ferrante와 Scortichini, 2014; Ferrante 등, 2012). 일본에서 궤양병이 최초로 발생한 시즈오카현과 국내에서 궤양병이 최초로 발생한 제주도 과수원들은 각각 해발 150 m 이상인 후지산과 한라산 중턱으로 겨울철 동해가 발생하기 쉬운 해발고도가 높은 고지대에 위치하고 있다(Koh, 1995; Koh와 Lee, 1992; Koh 등, 1994; Serizawa 등, 1989). 또한 국내에서 궤양병의 대발생으로 과수원이 집단적으로 폐원된 과수원들은 완도, 진도, 고흥군 거금도 등의 도서지역으로 겨울철 차가운 바닷바람에 의해 동해가 발생하기 쉽고 Psa의 발병을 조장하는 해안가에 위치하고 있다(Ko 등, 2000a; 2000b; 2002; Koh 등, 2010). 또한 산기슭이나 계곡 또는 분지에도 겨울철 냉기류가 침체되어 동해가 발생하기 쉽기 때문에 궤양병이 격발한다.

Psa는 생태적으로 적응능력이 뛰어난 활동을 할 수 있도록 만들어주는 다양한 유전자들을 가지고 있어서 연중 키위나무에 쉽게 침입하고 감염을 일으킬 수 있다(Scortichini 등, 2012). 그람음성 세균으로 1~2개의 편모를 가지고 있어서 물을 좋아하지만 고온에 약한 Psa는 겨울철에 일평균기온이 0°C 정도에서도 활동을 하며 물관부와 체관부를 통하여 4°C에서 빠르게 확산되는 것으로 알려졌다(Gao 등, 2016; Huang, 2014).

Psa는 일평균기온이 0°C 정도가 유지되면 서서히 활동하고 2~5°C에서도 날이 맑은 날이 지속되면 궤양병을 일으키는데 오히려 춥고 습한 봄철에 궤양병이 발생이 심한 것으로 알려졌다. 이러한 기상조건에 부합하는 것이 2월과 3월 사이에 해당되며 이 시기에 전형적인 궤양병 증상으로 세균유출액이 줄기에서 흘러내린다.

세균유출액은 과수원 내부나 과수원 외부로 Psa를 전파시키는 가장 중요한 전염원이다(Serizawa 등, 1989; 1994; Serizawa와 Ichikawa, 1993c). 봄철에 잦은 강우로 습도도 높고 기온이 12~18°C일 때 Psa가 가장 빠르게 증식하므로(Serizawa와 Ichikawa, 1993b), 잎이 나왔을 때 키위나무 표면에 있던 세균유출액에 의해 감염된 잎에서 잎자루를 통하여 어린 줄기로 이동하고(Serizawa와 Ichikawa, 1993a), 감염된 어린 가지에서 Psa는 물관부와 체관부를 통하여 이동하면서 궤양병을 진전시킨다(Gao 등, 2016; Spinelli 등, 2011).

키위나무 잎에 나타나는 노란 테두리를 가진 불규칙한 갈색 점무늬 병징이 대표적인 잎궤양병 병징이다. 보통 Psa는 잎에 있는 기공이나 수공 또는 분비모(trichome) 등을 통해 잎으로 침입하는데(Serizawa와 Ichikawa, 1993a; 1993b; Spinelli 등, 2011), 잎이 전개되는 4월에 나타나는 초기 병반은 엽맥 사이에 노란색~연두색으로 탈색된 둥근 달무리 무늬로 나타난다. 점차 궤양병이 진전되면서 먼저 감염된 세포들이 죽으면서 달무리 중앙부가 괴사하면서 갈색으로 변하여 노란 테두리를 가진 갈색 점무늬로 변하는데, 비가 내리고 난 후에 궤양병에 심하게 감염된 잎 가장자리로부터 잎궤양병 표징인 무색투명한 세균유출액이 관찰된다.

5월 중순 무렵 강우가 잦은 날씨와 장마철에는 노란 테두리가 없는 급성형 갈색 점무늬들만 엽맥 사이에 불규칙하게 형성되거나, 잎 가장자리로부터 수침상으로 갈변하면서 마르는 급성형 잎궤양병 증상을 나타낸다. 새순이 나오는 시기에 Psa에 심하게 감염되는 경우에는 가지마름 증상과 더불어 새순이 마르는 급격하게 시드는 증상을 나타낸다.

6월에는 줄기에서 궤양병의 진전은 거의 없고 장마철에는 잎에서 궤양병의 진전이 두드러지지만 7월 중순 무렵에 최저기온 20°C, 최고기온 25°C 이상에서는 활동이 둔화되기 시작하여 30°C 이상에서는 여름잠을 자거나 사멸하는 것으로 보고되었다(Choi 등, 2014; Froud 등, 2015; Scortichini 등, 2012; Serizawa 등, 1993d; Son 등, 2016).

Psa는 늦가을에 다시 활동을 재개하여 10월 중순부터 키위나무 잎에 새로운 병반이 아주 드물게 나타난다. 키위 잎궤양병은 연중 두 차례, 즉 수액이 이동하는 시기부터 초여름 사이 봄철과 수확기 무렵인 가을철에 발생한다.

키위나무 주간, 주지, 가지 등에서 증식된 Psa는 평균기온이 10~20°C가 유지되는 4월과 5월에 바람, 빗물, 비바람, 관개수, 전정가위, 곤충 등에 의해 전파되기 시작하여 잎에 기공이나 수공을 통하여 침입하고 줄기에 있는 상처나 피목을 통하여 침입한다(Gao 등, 2016; Spinelli 등, 2011; Scortichini 등, 2012). 잎에 침입한 Psa는 16°C에서 가장 빠르게 증식하고 이동하기 때문에 4월 하순 또는 5월 초순부터 여러 가지 형태의 병징을 유발하고 증식을 거듭하여 5월 하순 개화기가 다가올 무렵에 화경지와 꽃봉오리를 감염시킨다.

개화를 시작하기 약 10~15일전인 5월 중순 무렵부터 궤양병에 감염된 꽃봉오리는 꽃받침이 갈변되는 증상을 나타내며 일부 심하게 감염된 꽃받침에서는 투명한 세균유출액이 흘러 나온다. 또한 군데군데 화경지가 감염되어 말라버린 꽃봉오리는 개화가 되지 않고 낙화된다. 그러나 키위나무 열매에서는 궤양병 증상을 관찰할 수 없었으며 Psa도 검출되지 않았다.

그 후 다시 기온이 내려가 최저기온 10℃, 최고기온 20℃ 정도가 되는 10월 하순과 11월에 바람, 빗물, 비바람, 관개수, 전정가위 등에 의해 피목이나 겨울눈으로 전반되어 새로운 감염을 일으킨다(Gao 등, 2016; Serizawa 등, 1994; Serizawa와 Ichikawa, 1994). 특히 가지에서 Psa는 16℃ 나 25℃에서보다 4℃에서 오히려 더 빠르게 확산되었다. 대부분의 세균성 식물병들이 고온다습한 환경에서 대발생하고 추운 겨울철에는 월동을 하는 것과는 달리 키위 궤양병은 저온다습한 환경에서 격발하고 무더운 여름철에는 월하를 하는 매우 특이한 발생생태를 가지고 있다.

**라. 우리나라 참다래 궤양병균 집단의 유전적 특성**

우리나라에 분포하는 참다래 궤양병균 집단은 유전적으로 계통이 다른 Psa2와 Psa3 집단이 혼재되어 분포하고 있다. 2016년 조사에서 우리나라 주요 참다래 재배지에서 Psa2에 의해 감염된 과수원은 73개였고 Psa3에 의해 감염된 과수원은 129개였다. 비록 이 결과가 전수조사에 의해 얻은 결과는 아니지만 20여 년간 꾸준히 참다래 궤양병을 연구해오면서 확립된 산학연 network를 통하거나 직접 농가를 방문하여 시료를 채취하여 얻은 결과로서 우리나라에서 궤양병에 감염되었을 것으로 추정되는 전체 농가과수원의 약 69%로 추정되었다.

Fig. 10에 나타난 바처럼 지역별로 분포양상은 차이를 보였는데, 경남지역에는 Psa2가 검출된 김해시 1개 과수원을 제외하면 모두 Psa3만 검출되었다. 반면에 전남지역에는 광양시, 순천시, 보성군, 완도군의 일부 과수원에서만 Psa3가 검출되었고, 전남 대부분 참다래 주요 재배 지역에서는 Psa2가 검출되었다. 제주도에서는 같은 지역에 있는 과수원에도 Psa2와 Psa3가 혼재되어 분포하고 있었는데 Psa3가 우점하는 것으로 밝혀졌다.

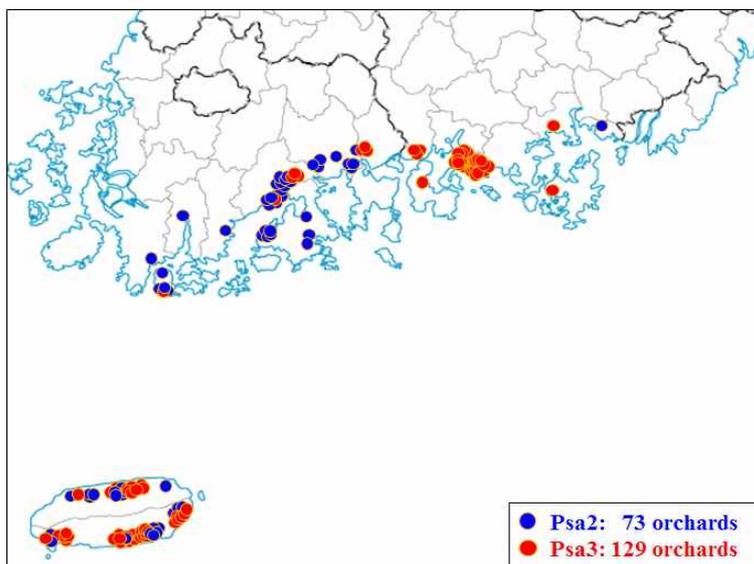


Fig. 10. Distribution sites of 202 kiwifruit orchards infected by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* biovar 2 (Psa2) and biovar 3 (Psa3) in 2016 in Korea.

Psa2는 우리나라에만 분포하는 궤양병균인데 반하여 Psa3는 전세계적으로 분포하고 급속하게 확산하면서 pandemic을 일으키고 유전적으로 다양한 집단으로 알려졌기 때문에 2017년 제2세부과제에서 Psa3의 유전적 다양성을 분석한 결과에 따라 53개 과수원에서 검출된 Psa3 균주들이 6개의 Psa3 subgroup에 구분되었는데 각 group에 속하는 균주들의 지리적 분포를 나타내면 Fig. 11과 같다.

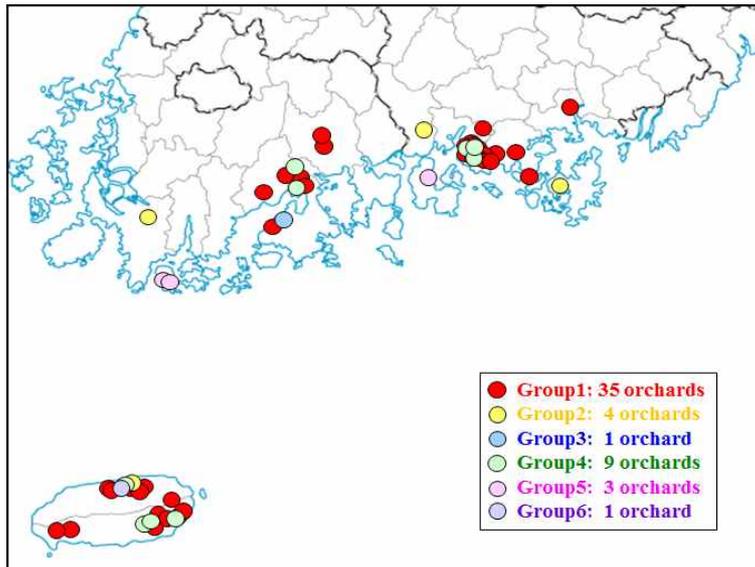


Fig. 11. Distribution sites of 53 kiwifruit orchards infected by 6 subgroups of Psa3 in 2017 in Korea.

Group I에 속하는 Psa3는 뉴질랜드에 분포하는 Psa3 집단인데 우리나라에서도 가장 우점하는 Psa3 집단으로 경남지역, 전남지역과 제주도에 고루 분포하는 것으로 밝혀졌다. 이 균주 집단은 2013년과 2014년 뉴질랜드에서 수입된 오염된 꽃가루를 통하여 국내로 유입되어 주요 참다래 재배지 전역으로 확산된 것으로 추정된다.

Group II에 속하는 Psa3는 유럽에 분포하는 Psa3 집단인데 경남지역 2개 과수원, 전남지역과 제주도에 각각 1개 과수원에서 검출되었다. 이 균주 집단의 국내 유입경로는 불명확하다.

Group III에 속하는 Psa3는 2011년 전남 고흥군에 있는 1개 과수원에서 국내 최초로 검출된 Psa3로 중국에서 수입된 묘목을 통하여 국내로 유입된 것으로 확인되었으며 지금은 폐원 조치되어 분포하지 않는다.

Group IV에 속하는 Psa3는 경남, 전남과 제주도에 분포하고, Group V에 속하는 Psa3는 경남과 전남에만 분포하고, Group VI에 속하는 Psa3는 제주도에 있는 1개 과수원에서만 검출되었는데, 이 Psa3 집단들의 기원은 불명확하다.

이러한 결과로 보아 우리나라에 분포하고 있는 Psa3 집단은 세계에서 유래를 찾아보기 힘들 만큼 유전적으로 아주 다양한 집단들이 분포하는 것으로 추정된다. 더구나 이미 주요 참다래 재배지에서 여러 가지 Psa3 group 들이 혼재하고 있는 것으로 파악되어서 우리나라 참다래 궤양병균 집단의 유전적 특성과 지리적 분포에 따른 방제매뉴얼을 세분화하여 도출하기는 불가능한 것으로 판단되었다.

제2세부과제 결과에 따라 6개의 Psa3 subgroup에 속하는 균주들이 검출된 53개 과수원에서 식재된 키위 품종들은 Table 2와 같다.

Table 2. Host cultivars of 6 subgroups of Psa3 detected from 53 kiwifruit orchards in 2016

Group	Strain	Cultivar	Location		
I	JYG1561	Hongyang	Sacheon	Gyeongnam	
	KYH1561	Hayward	Goseong		
	CHS1561	Hort16A	Sacheon		
	MHS1561	Hayward	Changwon		
	KSS1641	Hongsim	Sacheon		
	LYJ1661	Jecygold	Sacheon		
	SPD21661	Hayward	Sacheon		
	KJS31661	Hayward	Sacheon		
	KDS1664	Jecygold	Sacheon		
	LSJ1661	Hongyang	Sacheon		
	KHO1741	Hayward	Tongyeong		
	KSHY1741	Jecygold	Goseong		
	LYJ1741	Hongyang	Sacheon		
	JYM1741	Jecygold	Goseong		
	I	GDG12	Hayward		Goheung
LCHG1549		Haegueum	Gwangyang		
YBH1561		Hayward	Beolgyo		
LCH1645		Haegueum	Gwangyang		
JC1641		Hayward	Joseong		
ASR1561		Haegueum	Boseong		
HJC14061		Jecygold	Sacheon		
KSS14611		Golden yellow	Sacheon		
HYH1461		Hort16A	Seongsan		
KTS21461		Hort16A	Jocheon		
KBJ1461		Enzared	Jocheon		
LSC1461		Hort16A	Seongsan		
JKS1471		Hort16A	Pyoseon		
KDW1531		Hort16A	Seongsan		
KSR1531		Hort16A	Seongsan		
II	SDK1561	Pollen(Mega)	Jeju-si	Jeju	
	LJH1621	Hort16A	Jeju-si		
	KHS1621	Hongyang	Andeok		
	KSJ1721	Hort16A	Pyoseon		
	KDN1731	Jecygold	Daejung		
	HJH1741	Hongyang	jeju-si		
	KHH16511	Jecygold	Hadong		Gyeongnam
	LSJ21661	Jecygold	Geoje		
	HNF1661	?	Haenam		Jeonnam
	KTS21471	Hort16A	Jocheon		Jeju
III	SYS1	Yellowking	Goheung	Jeonnam	
IV	KDS1541	Haegueum	Sacheon	Gyeongnam	
	HI-KH1651	Jecygold	Goseong		
	14004	Hallagold	Sacheon		
	YMS1721	Jecygold	Beolgyo	Jeonnam	
	14016	Jecygold	Beolgyo		
	KJB1451	Jecygold	Namwon		
	KGC1451	Hort16A	Namwon		
HSG1461	Hort16A	Jocheon	Jeju		
KST1531	Hort16A	Seongsan			
V	PSG1535	Hongyang	Namhae	Gyeongnam	
	HJJ1471	Daeheung	Wando	Jeonnam	
	KCO15630	Haegueum	Wando		
VI	KKB1531	Enzared	Jeju-si	Jeju	

Group I에 속하는 Psa3는 경남지역에서는 홍양, 제시골드, 헤이워드, 홍심에서 검출되었고, 전남지역에서는 헤이워드와 해금에서 검출되었고, 제주도에서는 Hort16A, 홍양, 제시골드, 엔자레드, 골든엘로우에서 검출되어 기주범위가 매우 다양한 것으로 파악되었다.

Group II에 속하는 Psa3는 홍양, Hort16A, 제시골드에서 검출되었으며, Group III에 속하는 Psa3는 옐로우킹에서 검출되었고, Group IV에 속하는 Psa3는 Hort16A, 제시골드, 한라골드, 해금에서 검출되었고, Group V에 속하는 Psa3는 홍양과 대홍에서 검출되었고, Group VI에 속하는 Psa3는 엔자레드에서 검출되었다.

이러한 결과로 볼 때 Psa3의 각 Group별로 기주특이성은 없는 것으로 판단되고 분포하는 지역별 우점하는 품종들에서 높은 빈도로 검출되었다. Psa3 중에서 국내에 가장 많이 분포하는 Group I의 경우를 보더라도 국내에서 재배되는 모든 품종들에서 검출되고 있으므로 저항성 품종을 이용하거나 Psa3 세부집단별 방제매뉴얼을 도출하기는 불가능한 것으로 판단되었다.

한편, 2011년 이탈리아에서 3개의 Psa 균주(Psa1 2개, Psa3 1개)에 대한 최초의 draft genome 해독에 관한 보고가 이루어졌으며, 현재까지 3가지 biovar (Psa1, Psa3, Psa5)에 대한 complete genome 해독이 이루어졌지만 아직까지 우리나라에만 분포하는 biovar Psa2에 대해서는 draft genome 해독만이 이루어졌을 뿐 complete genome에 대해서는 보고된 바 없기 때문에 제1협동과제서 1999년과 2008년에 분리된 2개의 Psa2 균주(CJW7-1999년 *Actinidia deliciosa* 'Hayward'에서 분리; KBE9-2008년 *A. chinensis* 'Hort 16A'에서 분리)에 대하여 PacBio NGS 플랫폼을 이용한 유전체 해독을 수행하였다.

유전체 해독 결과, CJW7과 KBE9에 대해 각각 6개와 4개의 contig가 확보되었고, 완전한 플라스미드 서열을 포함한 전체 유전체 크기는 각각 6,482,518 bp와 6,565,175 bp였다. 두 균주에 대해 확보된 contig를 바탕으로 추정된 유전자의 수는 각각 5,914개와 6,000개였다. 현 단계에서 1~2개의 contig로 이루어진 complete genome을 완성하지 못하였으나, 완성된 contig의 수, 유전체의 크기, 예측 유전자의 수 및 플라스미드의 확인으로 미루어 본다면, 국내 고유 Psa2 균주에 대해 거의 완전한 형태의 genome 해독이 국내외에서 처음으로 이루어진 것으로 판단된다. 분리된 년도와 품종이 서로 다른 2개 Psa2 균주 간에도 각 균주 특이적인 유전자가 존재하였는데, 이러한 결과는 플라스미드 유전자 배열 구조에서의 차이와 더불어 국내에 분포하는 Psa2 균주에서도 지속적인 진화가 진행되고 있음을 보여준다. 5가지 biovar(Psa1, 2, 3, 4, 5)에 속하는 20개 균주에 대해 core-genome을 최초로 분석한 결과, 4,162개의 유전자가 core gene sets 즉, 20개 유전체 모두에서 발견되는 것을 볼 수 있었다. 병원성과 밀접한 연관성을 갖는 Type III effector protein, 식물 독소(coronatine) 생합성, 식물 호르몬 생합성, elicitor 생합성 및 LuxI/LuxR quorum sensing (QS) 시스템 유전자 등에 대하여 5가지 주요 biovar에 대한 심층적인 비교 분석을 수행한 결과, 현재 세계 키위 산업에 막대한 피해를 입히고 있는 고병원성 Psa3 biovar 특이적인 일부 병원성 인자[3개의 type III effector (*hopZ5*, *hopH1*, *hopAMI-1*)와 quorum sensing 시스템 관련 *luxR3* 유전자]를 확인하였다(Table 3).

Table 3. Summary on major differences of pathogenicity-related factors among three major

Features	Psa1	Psa2	Psa3
Plasmid	Yes	Yes	Yes
Phytotoxin biosynthesis & regulation (location)	Phaseolotoxin (Nuclear genome)	Coronatine (Plasmid)	None
Type III effector (T3E)	50 genes	44 genes	50 genes (Psa3 specific genes- <i>hopZ5</i> , <i>hopH1</i> , <i>hopAMI-1</i> )
Auxin biosynthesis & inactivation	<i>iaaM</i> , <i>iaaL</i>	<i>iaaM</i> , <i>iaaL</i>	None
Quorum sensing system	<i>luxR1/luxR2</i>	<i>luxR1/luxR2</i>	<i>luxR1/luxR2/luxR3</i>

Psa biovars (Psa1, 2, 3) obtained from genome analysis.

Psa2 균주(CJW9, KBE9)에서는 coronatine 생합성 및 조절에 관여하는 유전자가 플라스미드에 존재하였으나, 고병원성 Psa3 biovar 균주에서는 coronatine 외에 phaseolotoxin의 생합성 및 조절에 관여하는 유전자도 발굴되지 않았다. 이러한 결과는 Psa3 biovar의 고병원성이 식물 독소 생성과는 연관이 없음을 제시한다. 병원성 인자 중의 하나인 옥신의 생합성(*iaaM*) 및 불활성화(*iaaL*)에 관여하는 유전자는 Psa1과 Psa2에서는 발견되었으나, Psa3 균주 등에서는 발견되지 않았다(Table 3).

이상의 결과들을 요약하면, 우리나라 주요 참다래 재배지에 분포하는 궤양병 집단이 지역 및 품종별 차이가 있고 Psa2와 Psa3간에 일부 유전적 특성도 차이도 있는 것으로 밝혀졌지만 발생생태가 대동소이하고, 궤양병 방제에 가장 중요한 방제약제에 대한 반응이 Psa2와 Psa3 균주들간에 차이가 없을 뿐만 아니라 Psa3의 각 Group간에도 차이가 없기 때문에 모든 Psa에 대해 적용 가능한 일반적인 방제매뉴얼을 작성한 후 지역 및 품종별 맞춤형 방제매뉴얼을 도출하였다.

## 2. 키위 궤양병 방제매뉴얼

### 가. Psa 정착 전 키위 궤양병 예방 매뉴얼

#### (1) 적지 재배

아열대과수인 키위는 저온과 강풍에 취약하기 때문에 동해, 냉해, 서리 등 겨울과 봄철에 발생하는 저온 피해와 여름과 가을철에 발생하는 태풍 피해가 발생하지 않는 재배 적지를 선정하여 과수원을 조성하고 키위나무를 건강하게 재배하는 것이 궤양병 발생과 피해를 회피할 수 있는 최선책이다. 일본과 국내에서 궤양병이 최초로 발생한 지역은 겨울철 동해가 발생하기 쉬운 해발고도가 높은 고지대였고(Koh, 1995; Serizawa 등, 1989), 국내에서 궤양병의 대발생으로 과수원이 집단적으로 폐원된 주요 지역은 제주도, 완도, 진도, 고흥군 거금도 등 겨울철 차가운 바닷바람이 동해를 일으켰거나 태풍피해가 발생하기 쉬운 도서지역이었다(Fig. 12A)(Koh 등, 2010). 또한 산기슭이나 계곡에는 겨울철 냉기류가 침체되어 동해가 발생하고 논에는 습해가 발생하여 Psa의 발병유인이 되기 때문에 키위 재배에 부적합하다(Fig. 12B).



Fig. 12. Completely destroyed orchards cultivated at seaside in Wando (A) and at paddy field (B) in Goheung infected by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*.

**(2) 동해 예방**

국내 주요 키위 재배지에는 Psa가 만연되어 있기 때문에 이미 조성된 키위 과수원에서 궤양병이 발생하지 않았더라도 동해가 발생하면 상처를 통하여 Psa의 침입과 감염을 일으킬 가능성이 높기 때문에 동해를 예방하는 것이 궤양병 발생과 피해를 최소화할 수 있는 차선책이다.

**(가) 주간부 보호**

키위 과수원내에서 가장 차가운 기류는 지상 5~30 cm에 머물기 때문에 이 높이의 주간부를 보호함으로써 동해나 냉해 발생을 예방한다(Tanbara, 1988). 겨울철에 벗짚으로 주간부를 감싸는 방법은 벗짚이 빗물을 머금거나 벗짚 위쪽으로 빗물이 스며들 경우에는 오히려 동해를 유발시켜 피해를 가중시킬 수 있기 때문에 흰색 수성페인트를 칠하거나(Fig. 13A) 흰색 부직포나 필름 또는 종이로 주간부를 감싸는 방법(Fig. 13B)이 주간부 보호에 효과적이다. 이 방법은 주간부를 보온해 주는 효과가 아니라 햇빛을 반사시켜 키위나무의 해동을 가급적 늦춰 봄철 동해나 늦서리와 같은 저온 피해를 예방하는 원리다. 이 경우에도 벗짚으로 감쌌을 때처럼 위쪽으로 빗물이 스며들면 오히려 동해를 유발시킬 수 있으므로 빗물이 스며들지 않도록 해야 한다. 수성페인트를 칠하는 경우에는 페인트에 동제나 석회유황합제를 혼합하여 처리하면 주간부 표면에 부착하는 병원균을 살균하는 효과도 함께 기대할 수 있다.

**(나) 공기 강제순환**

분지나 지형적으로 주변보다 낮은 곳에 조성된 키위 과수원에 상습적으로 냉기류가 정체되는 경우에는 방상환(Fig. 14)을 설치하여 과수원 아래쪽에 침체된 기류를 순환시켜줌으로써 동해나 늦서리 피해와 같은 저온 피해를 예방한다. 또한 키위 과수원에서 군데군데 전정한 가지 또는 왕겨 등을 태워주면 연기와 함께 더운 공기가 상승하면서 과수원 내부 냉기류를 순환시켜줌으로써 저온 피해를 예방할 수 있다(Tanbara, 1988).



Fig. 13. Trunks of kiwifruit trees covered by white paint (A) and white textile (B) to prevent cold injury.



Fig. 14. Fan built in kiwifruit orchard to prevent frost injury.

**(다) 비가림 시설**

비닐하우스를 이용하는 비가림재배는 겨울철 찬바람을 막아 보온해주고 비바람에 의한 Psa의 전파를 차단시켜주고 강풍에 의해 키위나무에 생기는 상처발생을 줄여주기 때문에 가장 이상적인 궤양병 예방방법이다(Fig. 15A). 비닐하우스는 제주도에서 시작되어 전남과 경남 지역으로 확대되고 주요 키위 재배 국가들에서도 벤치마킹하여 실용화하려고 시도되고 있다. 그러나 비닐하우스에서 재배되는 키위나무는 겨울철 이상고온을 접할 경우에 지나치게 일찍 수액이동이 시작되어 이른 봄 동해나 늦서리 피해와 같은 저온 피해를 입을 수 있다. 따라서 수액이동이 일찍 시작된 경우에는 비닐하우스 내부 온도가 영하로 떨어지지 않도록 열풍기를 가동시켜야 저온 피해를 예방할 수 있다(Fig. 15B). 여름철 고온기에 비닐하우스의 측창을 모두 닫고 키위나무가 고온장해를 입지 않을 만큼 고온처리를 해주면 비닐하우스에 있는 Psa 밀도를 낮출 수 있다.



Fig. 15. Rain-proof polyvinyl installation (A) and heating machine for hot air circulation at kiwifruit growing greenhouses (B).

**(라) 방풍 시설**

겨울철 찬바람과 태풍같은 비바람을 차단시켜주는 과풍망(Fig. 16A)과 방풍림(Fig. 16B)도 비가림시설보다는 약하지만 Psa의 전파를 차단시킬 수 있고 키위나무에 상처발생도 줄일 수 있어 궤양병 예방 효과가 있어 키위 재배에는 거의 필수적인 시설로 자리매김하고 있다(Ko 등, 2002).



Fig. 16. Windbreak net installation (A) and windbreak forest (B) at kiwifruit orchards.

### (3) 경종적 방제

키위나무를 건강하게 키위 궤양병에 대한 저항성을 증진시킴으로써 Psa의 침입과 감염을 회피하거나 궤양병 피해를 경감시킬 수 있다.

#### (가) 배수 개선

배수가 불량한 논이나 점질토양에 조성된 과수원에 식재된 키위나무는 습해를 받게 되어 생육이 불량하고 허약한 상태가 되어 Psa의 침입과 감염에 취약해진다. 최근에는 기상이변으로 잦은 강우와 집중 호우가 많기 때문에 배수가 불량한 과수원에서 배수로를 확보하는 것이 바람직하다. 명거배수는 식재된 키위나무 사이로 1 m 정도 깊이 도랑을 경사방향으로 길게 이어 파서 배수시키는 방법으로 확실한 배수효과를 볼 수 있는 반면에 농사작업에 불편을 끼칠 수 있다(Fig. 17A). 암거배수는 1 m 이상 깊은 땅속에 도랑을 파고 유공관을 묻어 배수시키는 방법으로 농사작업에 지장은 없지만 유공관이 막힐 수가 있다. 배수가 불량한 과수원에서 심토파쇄로 토양보수력을 낮추고 통기성을 증대시킬 수 있다(Fig. 17B). 심토파쇄는 인위적으로 깊은 토양 속에 공기를 불어넣어 단단하게 굳은 토양입자를 깨뜨리는 방법인데 여러 가지 심토파쇄기가 개발되어 실용화되고 있다.

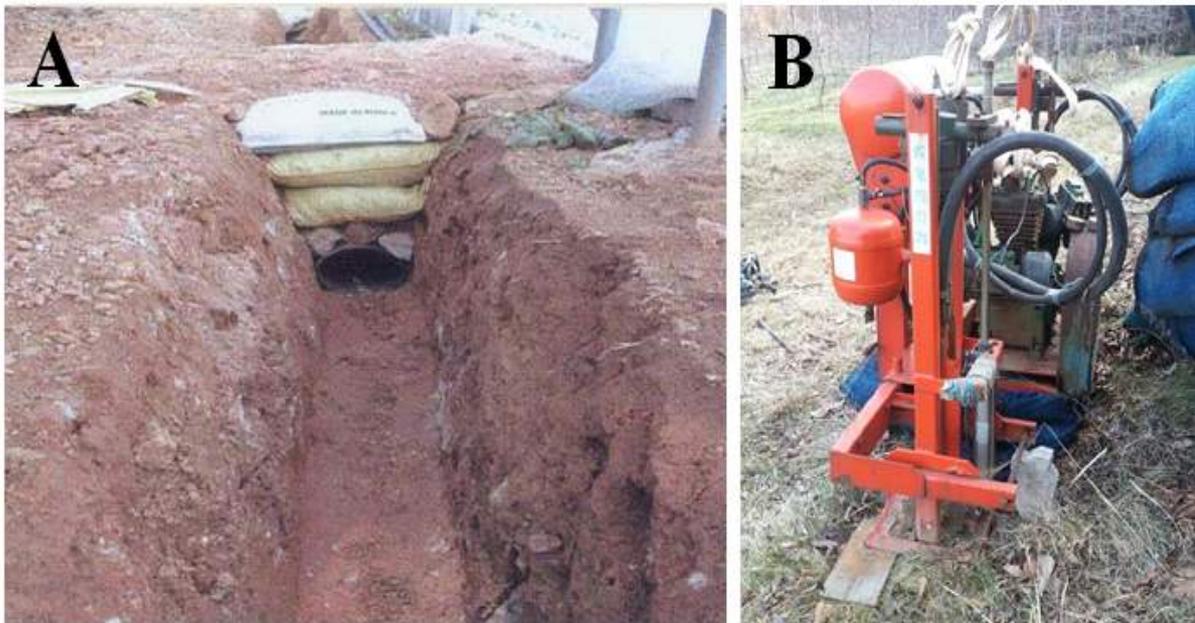


Fig. 17. Drain (A) and soil fragmenting machine (B) at paddy orchards.

#### (나) 시비 개선

화학비료를 사용하지 않고 유기질 퇴비를 사용하는 과수원에서는 궤양병에 대한 저항성이 증진되어 궤양병에 잘 걸리지 않을 뿐만 아니라 궤양병이 발생하더라도 화학약제에 의한 방제노력이 없어도 수량손실을 초래하지 않고 비교적 건강하게 관리가 되는 사례가 있다. 따라서 속효성인 화학비료보다는 유기질 비료를 사용하고 주기적으로 과수원토양 분석을 통하여 부족하거나 과다한 성분을 파악하여 적정하게 시비관리를 한다.

(다) 수형 개선

키위나무에 과도한 결실을 목적으로 전정을 적게 할 경우에는 수관이 지나치게 무성하게 우거져 통풍이 잘 안되고 햇빛이 잘 들지 않아 과수원 내부가 음습하게 되어 Psa가 쉽게 전염되고 침입과 확산이 빠르게 진행될 수 있다. 따라서 키위 품종에 따른 적절한 재식거리로 식재하고 전정을 적절하게 하고 통풍이 잘 되고 햇빛이 잘 들도록 수형을 관리해주면 키위나무가 건강하게 자라 궤양병에 대한 저항성이 증진되어 궤양병에 잘 걸리지 않게 된다.

(4) 전파 차단

Psa는 비바람이나 태풍, 관수 등 물에 의해 가장 잘 전파될 뿐만 아니라 묘목, 꽃가루, 작업화, 농기계, 전정기구, 곤충, 사람에 의해서도 전파된다(Fig. 18). 따라서 이러한 Psa의 전파수단을 차단시키면 궤양병을 효과적으로 방제할 수 있다.



Fig. 18. Various dissemination methods of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* at kiwifruit orchards.

(가) 물의 의한 전파 차단

비닐하우스는 빗물에 의한 Psa 전파를 가장 효과적으로 차단시킨다. 비가림시설과 더불어 파풍망과 방풍림 설치도 태풍이나 비바람에 의한 Psa 전파를 차단시키고 상처 발생을 예방해 주는 효과가 있다. 키위나무에 관수를 할 때 물에 의해 Psa가 전파되고 키위나무가 젖어 있을 때 Psa는 기공이나 수공을 통한 침입이 잘 이루어질 수 있기 때문에 키위 재배 과수원에서 설치되어 있는 관수시설의 노즐위치는 가급적 수관에 물이 닿지 않도록 최대한 낮게 설치한다.

**(나) 묘목에 의한 전파 차단**

Psa에 감염된 묘목을 통한 궤양병의 확산은 일부 농가에서 확인되었을 만큼 주요 Psa 전파 수단이다. 키위나무는 접목을 통한 영양번식방법으로 묘목을 생산하기 때문에 대목이나 접수부터 Psa에 감염된 경우도 있지만 접목묘를 만들 때 사용하는 접목용 칼이 Psa에 오염되어 Psa에 감염된 묘목이 양산되기 때문에 접목용 칼을 수시로 70% 에탄올에 소독하거나 화염살균 후 사용한다.

**(다) 꽃가루에 의한 전파 차단**

키위 인공수분에 사용되는 꽃가루는 Psa를 전파시키는 것으로 보고되었는데(Everett 등, 2012; Gallelli 등, 2011; Stefani와 Giovanardi, 2012; Vaneste, 2013), 최근 국내에서 재배되는 골드키위와 레드키위 품종들에서 대발생한 궤양병은 수입산 꽃가루를 통한 Psa3의 국내유입으로 시작되었으며(Kim 등, 2016a; 2016b), 2014년 12월 18일부터 농림축산검역본부에 의해 Psa3가 검역대상 병원균으로 지정되어 수입꽃가루에 대한 식물검역을 시행하고 있음에도 불구하고 검역을 거친 꽃가루에서도 Psa3가 검출되는 사례가 발생하고 있고, 키위 재배농가에서 생산하는 자가채취용 꽃가루에서도 Psa3가 검출되고 있으므로 건전한 꽃가루만을 선별하여 사용한다.

**(라) 전정기구에 의한 전파 차단**

키위 재배 과수원에서 궤양병에 감염된 한 그루 또는 일부 키위나무에서 전체 과수원으로 급속하게 확산되어 과수원을 폐원시킬 만큼 커다란 피해를 초래하게 만드는 원인은 겨울철 전정가위를 통한 Psa 전파로 확인되었으므로(Fig. 19A) 전정가위를 비롯한 전정기구를 키위나무 한 그루씩 전정을 마칠 때마다 수시로 70% 에탄올에 소독하거나 화염살균 후 사용한다(Fig. 19B)(Koh 등, 2010).



Fig. 19. Pruning scissor (A) sterilized by flaming torch (B).

**(마) 농기계에 의한 전파 차단**

승용형 약제살포기나 예초기와 같은 농기계를 사용할 경우에도 Psa에 오염된 흙이 바퀴에 묻어 전파될 수 있으므로 사용 후에는 흙을 털어내고 깨끗하게 소독한다.

**(바) 사람에 의한 전파 차단**

과수원에 출입하는 사람의 신발이나 작업복 또는 장갑 등에도 Psa가 묻어 전파될 수 있으므로 불필요한 사람들의 과수원 출입을 금지시키고, 과수원 입구에 신발소독약품(물 9: 락스 1)이 담긴 발판을 마련하여 신발을 소독하거나(Fig. 20A) 일회용 비닐장화를 착용한 후 과수원에 출입하도록 하고(Fig. 20B), 작업복이나 장갑 등을 매일 바꿔 착용한다.



Fig. 20. Sterilizing solution (A) and polyvinyl boots (B).

**나. Psa 정착 후 키위 궤양병 방제 매뉴얼**

**(1) 조기 진단**

키위 궤양병을 비롯한 세균성 식물병은 일단 발생하면 치료가 쉽지 않기 때문에 발병 초기에 정확하게 진단하고 빨리 적절한 방제 조치를 취해야 피해를 경감시킬 수 있다.

**(가) 육안 진단**

키위나무는 각 부위별로 연중 시기에 따라 Psa의 감염활동이 다르기 때문에 Psa가 검출되는 정도가 다르다(Table 4).

Table 4. Detection of the causal bacterium of canker, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, from stems, leaves and blossoms of kiwifruit trees

Part	Detection of <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> from kiwifruit trees											
	Jan.	Feb.	Mar.	Apr.	May	Jun.	Jul.	Aug.	Sep.	Oct.	Nov.	Dec.
Stems		± <sup>a</sup>	+	+	+	±	±					
Leaves				±	+	+	+			±	±	
Blossoms				±	+	±						

<sup>a</sup>+: *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* was easily detected, ±: *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* was sometimes detected.

또한 생육단계별로 궤양병의 병징과 표징이 다르게 나타나기 때문에 주기적으로 과수원을 모니터링하여 병징과 표징을 일찍 찾아내야 궤양병의 대발생을 초기에 차단할 수 있다(Son 등, 2016). 그린키위인 헤이워드 과수원을 기준으로 생육단계별로 육안으로 진단할 수 있는 키위 궤양병의 병징 또는 표징은 Fig. 21과 같다.



Fig. 21. Various kinds of symptoms or signs of bacterial canker on green-fleshed kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) trees caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* during different growth stages.

키위 궤양병의 병징 또는 표징은 계절별로 매우 특이적으로 발현되지만 병징과 표징만으로 궤양병 여부를 판단하는 육안진단에는 한계가 있다. 즉 과습한 날씨에 생기는 노란 테두리가 없는 갈색 점무늬 증상은 세균성 점무늬병에 의해서도 나타나고, 잎가장자리가 수침상으로 마르는 증상은 곰팡이성 잎마름병에 의해서도 나타나고, 가지와 주간부에 나타나는 세균유출과 가지마름 증상은 여름궤양병에 의해 나타나고, 꽃봉오리가 마르는 증상은 세균성 꽃썩음병에 의해서도 나타나기 때문에 육안으로 정확하게 진단하기가 곤란하다(Koh, 1995, Koh 등, 2008; Koh 등, 2012b).

**(나) 분자마커에 의한 진단**

키위 궤양병 진단전용 분자마커를 이용하면 발병 초기에 육안으로 완전하게 진단할 수 없는 한계를 해소하고, 발병 전에도 감염이 의심되는 증상을 조기에 정확하게 진단하여 키위 재배 과수원에서 궤양병 발생유무와 궤양병의 확산을 모니터링할 수 있고, 수입산 꽃가루의 국경검역이나 농가자가채취 꽃가루에 Psa 감염여부를 진단 및 궤양병의 국내방역에도 활용할 수 있다(Kim 등, 2016a; 2016b). Psa 진단용 universal primer와 더불어 Psa3 진단 용 TacF/R primer를 결합한 multiplex PCR 진단 방법이 개발되어 실용화되고 있으며(Balestra 등, 2013; Koh 등, 2014), Psa1과 Psa2를 각각 진단할 수 있는 분자마커도 개발되었다(Lee 등, 2016)(Table 5)(Fig. 22).

Table 5. Multiplex detection markers for Psa3 and detection markers for Psa1 and Psa2

Primer	Name	Sequence (5'→3')	Amplicon size (bp)	Specificity	Reference
Universal PSA Primer	Psa-F	CAG AGG CGC TAA CGA GGA AA	311	Psa	Balestra <i>et al.</i> , 2013
	Psa-R	CGA GCA TAC ATC AAC AGG TCA			
Tac Primer	Tac-F	CGG GCT AGA CAG TAC GCT GT	545	Psa3	This study
	Tac-R	CAG GCC CTT CTA CCG CTA C			
PsaJ Primer	PsaJ-F	GAC GTC GAC GAC AAG GTG AT	481	Psa1	This study
	PsaJ-R	AGT AAA CCG TGC CGT CAT CTC			
PsaK Primer	PsaK-F	GAC AAA GCC AAA AAG GCGA	413	Psa2	This study
	PsaK-R	TGC CAA GCC CAA GTA TCC AAG C			

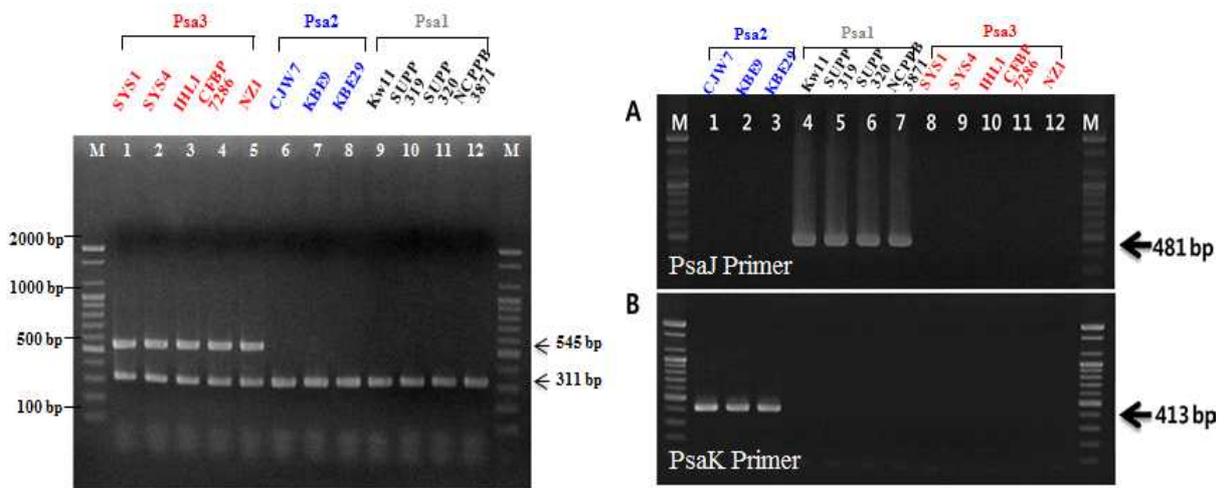


Fig. 22. Multiplex PCR products (Left) amplified by universal (311 bp) and Tac primer (545 bp) sets and PCR products (Right) amplified by PsaJ primer (481 bp) and PsaK primer (413 bp).

### (다) 전염원 제거

Psa의 전염원은 감염된 키위나무에서 병환부를 비롯하여 잠복부위, 폐원되어 방치한 과수원, 전정한 가지, 병들어 베어낸 뿌리, 병든 낙엽, 병든 꽃봉오리, 감염된 대목이나 접수, 오염된 꽃가루, 오염된 토양 등 매우 다양한데 전염원을 신속하게 제거하는 것이 궤양병의 병환을 차단시키는 시발점이다.

#### (1) 병환부 제거

Psa 초기 감염 단계에서 궤양병의 진전을 차단시키기 위해서는 병든 잎을 제거하고, 병든 가지는 육안으로 병징 또는 표징이 확인된 병환부 뿐만 아니라 잠복감염이 되었을 가능성을 고려하여 주간부 방향으로 1~2 m 안쪽 부위까지 충분히 여유를 두고 잘라낸 후 소각하고 자른 부위는 티오파네이트 도포제나 테부코나졸 도포제를 처리한다(Fig. 23).



Fig. 23. Pruning of infected branches.

#### (2) 병든 나무 제거

키위나무의 주간부까지 Psa에 감염되어 검붉은 세균유출액이 흘러내리는 경우에는 이미 주간부에 있는 통도조직이 파괴되어 재생이 불가능한 상태이기 때문에 키위나무를 베어내고 뿌리까지 뽑아내어 소각한다(Fig. 24).



Fig. 24. Diseased tree for eradication.

### (3) 병든 식물잔재물 제거

과수원에서 전정한 병든 가지, 병들어 베어낸 뿌리, 병든 낙엽 등 식물잔재물들을 모아 소각한다. 전정한 가지나 낙엽 등을 파쇄기를 이용하여 파쇄시키는 것은 오히려 과수원 내부에 Psa 전염원을 퍼뜨리는 결과를 초래하기 때문에 궤양병 발병을 조장한다(Fig. 25).



Fig. 25. Pruned branches and fallen leaves infected by bacterial canker.

### (4) 폐원된 과수원 정리

Psa에 의해 폐원된 과수원은 즉시 정리하고 방역소독을 하여 주변 과수원으로 Psa가 확산되는 것을 차단한다. 폐원된 과수원을 방치해 놓아 주변 과수원으로 Psa가 확산되어 집단적으로 폐원된 사례들이 전남 완도군 군외면, 고흥군 금산면, 보성군 조성면 등 주요 키위 재배지에서 많이 관찰할 수 있었다(Fig. 26). 반면에 국내에서 Psa3가 최초로 검출된 전남 고흥군 도덕면 과수원은 2014년 9월 11일 농촌진흥청에서 폐원조치하는 발빠른 공적방제를 실시한 덕분에 지금까지 고흥군에는 Psa3에 의한 궤양병이 발생하지 않고 있다(Kim 등, 2016b).



Fig. 26. Completely destroyed orchards infected by bacterial canker.

**(5) 감염된 묘목 폐기**

Psa에 감염된 묘목이나 대목 또는 접수는 건전한 인접 키위나무로 궤양병을 전파시키기 때문에 묘목을 구입하여 식재하기 전에 Psa 감염 여부를 해당 지자체의 농업기술원에 진단 의뢰하여 감염된 묘목은 폐기한다.

**(6) 오염된 꽃가루 소독**

Psa에 오염된 꽃가루도 키위나무에 궤양병을 대발생시키기는 전염원이 되기 때문에 인공 수분에 사용하기 전에 발아율 검사와 더불어 Psa 감염 여부를 해당 지자체의 농업기술원에 진단 의뢰하여 오염된 꽃가루는 사용하지 않는다(Kim 등, 2016a; 2016b). 불가피하게 Psa에 오염된 꽃가루를 사용해야 하는 경우에는 Everett 등(2012)이 제시한 방식으로 Psa 감염 밀도가  $10^6$  cfu/ml 이하인 꽃가루를 35°C, 상대습도 50% 이하에서 20시간 동안 열처리로 Psa를 소독한 후 사용한다.

**(7) 오염된 토양 소독**

Psa에 병들어 죽은 키위나무를 캐어냈거나 Psa에 오염된 토양에는 동제나 항생제 등을 충분히 관주하여 소독하거나 객토를 한 후에 보식한다.

**(라) 침입 차단**

Psa는 전정에 의해 가지에 생긴 상처, 태풍이나 강풍에 의해 가지나 잎 생긴 상처, 잎 표면에 부러진 trichome, 수확 후 남은 과경지, 낙엽흔 등을 통해 침입하거나 기공, 수공, 피목, 암술 주두 등 자연개구를 통하여 침입하기 때문에 Psa의 침입 장소를 차단시키면 궤양병을 효과적으로 방제할 수 있다.

**(1) 전정부위를 통한 침입 차단**

전정은 키위나무의 수형을 바로잡고 불필요한 가지들을 제거하기 위하여 불가피한 작업이지만 전정으로 생긴 상처부위는 Psa가 침입할 수 있는 가장 중요한 통로가 된다(Fig. 20). 따라서 전정 후 즉시 전정부위에 티오파네이트 도포제나 테부코나졸 도포제를 처리하여 전정부위를 통한 Psa 침입을 차단시키고 상처유합을 촉진시킨다(Fig. 27).



Fig. 27. Pruning wounds protected by paste.

**(2) 상처를 통한 침입 차단**

비가림시설, 방풍림, 방풍망 등을 설치하여 태풍이나 강풍 등 자연재해에 의해 키위나무에 상처가 발생하는 것을 예방하고 불가피하게 상처가 생긴 경우에는 동제나 항생제를 살포하여 상처를 통한 Psa의 침입을 차단한다.

**(3) 자연개구를 통한 침입 차단**

기공, 수공, 피목 등 키위나무에 있는 자연개구를 통한 Psa의 침입을 완벽하게 차단할 수는 없지만 자연개구에 수분이 맺히지 않도록 비가림시설을 하거나 통풍을 원활하게 하여 수분이 맺히는 시간을 단축시켜 자연개구를 통한 Psa의 침입을 경감시킨다.

**(4) 기타 상흔을 통한 침입 차단**

열매를 수확한 후에 생기는 과경지와 늦가을에 낙엽 후에 생기는 낙엽흔은 키위 재배 중에 불가피하게 발생하는 현상이기 때문에 수확 후와 낙엽 후에 동제를 살포하여 상흔을 통한 Psa의 침입을 예방한다.

**(마) 약제 방제**

키위 궤양병 방제용 약제로 동제는 코퍼하이드록사이드 입상수화제와 코퍼셀페이트베이식 수화제, 항생제는 옥시테트라사이클린-스트렙토마이신황산염 수화제, 옥시테트라사이클린-스트렙토마이신황산염 입상수용제, 스트렙토마이신-발리다마이신에이 수화제, 동제와 항생제 합제는 코퍼옥시클로라이드-가스가마이신 수화제가 3월 하순부터 10일간격 3~5회 살포하도록 등록되어 있다(Table 6).

Table 6. Bactericides registered for the control of bacterial canker of kiwifruit in Korea

Bactericides	Dosage	Spray time and interval	Option for safe use
Oxytetracycline•streptomycin sulfate WP	13g/20 l	Spray up to 4 times at 10-day-intervals from late March to the end of flowering stage	Spray until 21 days before harvest
Oxytetracycline•streptomycin sulfate SG	13.4g/20 l	Spray up to 4 times at 10-day-intervals from late March	Spray before flowering
Streptomycin•validamycin-A WP	10g/20 l	Spray up to 5 times at 10-day-intervals from late March	Spray until 7 days before harvest
Copper oxychloride•kasugamycin WP	20g/20 l	Spray up to 3 times at 10-day-intervals from late March	Spray before the end of flowering stage
Copper sulfate basic WP	20g/20 l	Spray at 10-day-intervals from late March to the end of flowering stage	-
Copper hydroxide WG	20g/20 l	Spray at 10-day-intervals from late March to the end of flowering stage	-

WP; Wettable powder, SG; Water soluble granule, WG; Water dispersible granule.

그러나 살포시기에 따라 궤양병에 대한 방제효과가 다르기 때문에 필요한 시기에 적합한 약제를 선택하여 살포해야 높은 방제효과를 기대할 수 있다(Koh 등, 1999). 즉, 동제인 코퍼하이드록사이드 수화제는 전정 직후인 1월 중순부터 2월 초순 사이, 항생제인 가스가마이신 액제는 3월 중순부터 4월 초순 사이, 스트렙토마이신 수화제와 옥시테트라사이클린·스트렙토마이신황산염 수화제는 4월 중순부터 5월 초순 사이에 10일 간격 4회 또는 15일 간격 3회 살포하는 것이 궤양병에 대한 방제효과가 가장 높았다.

또한 지금까지는 키위나무 잎에 발생하는 궤양병 예방을 위하여 봄철에만 약제방제가 이루어져왔으나(Carmeron과 Sarojini, 2014; Koh 등, 1999; Serizawa 등, 1989), 키위나무 잎에 발생하는 궤양병은 연중 두 차례, 즉 수액이 이동하는 시기부터 초여름 사이 봄철과 수확기 무렵인 가을철에 발생하기 때문에(Huang, 2014; Son 등, 2016; Vanneste, 2013), 수확 직후와 낙엽 직후에 약제방제를 추가하는 것이 겨울철 키위나무에서 Psa 전염원의 밀도를 낮추는데 결정적인 역할을 할 것으로 판단된다. 따라서 그린키위인 헤이워드 과수원을 기준으로 작성한 연중 키위 궤양병의 약제방제력을 Fig. 28과 같다.

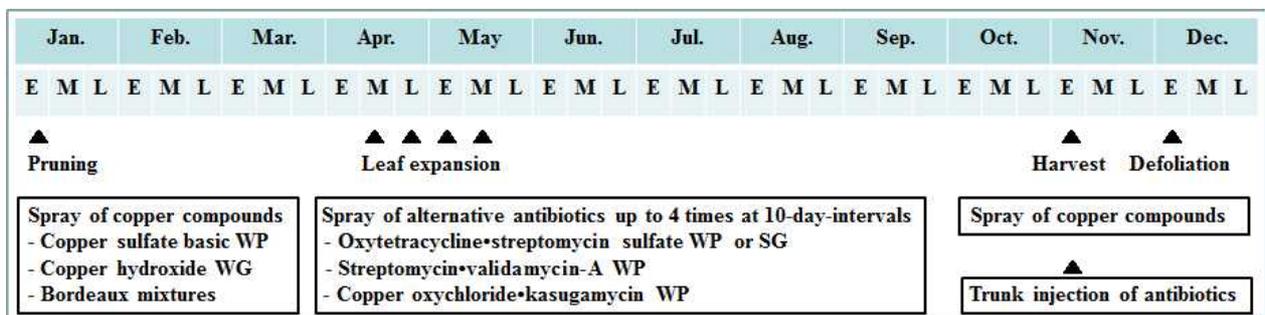


Fig. 28. A proposed spray schedule for the efficient control of bacterial canker on green-fleshed kiwifruit cultivar Hayward vines. E, early; M, middle; L, late; WP, wettable powder; WG, water dispersible granule; SG, water soluble granule.

즉 겨울 전정 직후에 동제인 코퍼하이드록사이드 입상수화제, 코퍼설페이트베이식 수화제, 보르도액 중에서 한 가지를 선택하여 분무살포한다. 잎이 전개되는 시기인 4월 중순부터 항생제인 옥시테트라사이클린·스트렙토마이신황산염 수화제, 옥시테트라사이클린·스트렙토마이신황산염 입상수용제, 스트렙토마이신·발리다마이신에이 수화제, 동제와 항생제 합제인 코퍼옥시클로라이드·가스가마이신 수화제를 번갈아 10일 간격으로 4회 교호살포한다. 그리고 수확 직후와 낙엽 직후에 동제인 코퍼하이드록사이드 입상수화제, 코퍼설페이트베이식 수화제, 보르도액 중에서 한 가지를 선택하여 분무살포한다.

생육기 중에 동제를 살포할 경우에는 잎과 과실에서 약해가 발생할 수도 있기 때문에 크레프논을 혼용하면 약해 발생을 경감시킬 수 있다. 스트렙토마이신 수화제와 코퍼하이드록사이드 수화제는 키위에 등록되지는 않았지만 키위에 등록된 유사약제들과 동일한 조건으로 키위 재배 과수원에서 궤양병 방제시험을 수행한 결과 등록된 유사약제들과 효과가 비등하였고 약제잔류도 없었기 때문에 키위 궤양병 방제약제 품목으로 고시되면 키위 궤양병 방제용으로 실용화될 수 있을 것이다.

한편 국내에 분포하는 Psa 중에는 일본에서와는 달리 아직까지 동제와 항생제에 대한 저항성균이 보고되지 않았다(Goto 등, 2004; Lee 등, 2005; Masami 등, 2014; Nakajima 등, 1995; 2002).

그러나 세균성 식물병 방제용 약제인 동제와 항생제의 연용에 의해 저항성균이 출현하는 것은 불가피하기 때문에 약제저항성균의 출현을 지연시키기 위하여 작용기작이 다른 약제의 교호살포가 바람직하다.

## (바) 나무 치료

초본식물에 발생하는 질병은 치료가 불가능하지만 목본식물에 발생하는 질병은 내과적인 치료방법인 수간주사(나무주사)가 오래 전부터 시행되어 왔고(Costonis, 1981; Shigo 등, 1977), 주지 또는 가지에 국부적으로 발병한 경우에는 상처부위를 도려내어 치료하는 외과수술과 주간부 밑동을 잘라내고 새순을 받아 재생장을 유도하는 방법도 시도되고 있다.

### (1) 수간주사

수간주사는 통도조직 중에서 형성층 안쪽에 자리잡아 뿌리에서 흡수한 물이 잎까지 이동하는 통로인 목부조직에 구멍을 뚫어 약제를 투입하여 약액을 식물체 전체로 퍼지게 하는 원리를 이용한다(Lee, 2015). 키위나무에서 궤양병 치료를 위한 수간주사는 일본 가나가와시 협장에서 Ushiyama(1993)에 의해 중력식 수간주사 방식으로 처음 시도되었으며 수간주사용 스트렙토마이신 액제와 수간주사 세트가 판매되고 있다.

스트렙토마이신 액제 200 ppm 용액을 키위나무 수관(canopy) 1 m<sup>2</sup>당 200~300 ml 정도 주입했을 때 병든 대부분의 주지들에서 병징이 나타나지 않을 만큼 우수한 방제효과를 나타내었으나, 1 m<sup>2</sup>당 300 ml 이상 높은 농도로 주입했을 때에는 새순에서 약해가 나타났다. 옥시테트라사이클린과 가스가마이신을 사용한 경우에도 비슷한 방제효과를 나타내었지만 약해는 나타나지 않았다(Ushiyama, 1993).

국내에서는 수간주사용 스트렙토마이신 액제가 시판되지 않기 때문에 스트렙토마이신 수화제를 물에 희석시킨 후 200 ppm 농도의 상등액을 중력식 수간주사 방식으로 수관 1 m<sup>2</sup>당 200 ml 기준으로 수간주입을 했을 때 궤양병이 주간부까지 감염되지 않은 키위나무들은 거의 모두 완치시킬 수 있었다(Koh 등, 1996).

스트렙토마이신 수화제 대신에 옥시테트라사이클린-스트렙토마이신황산염 입상수용제를 사용하면 물에 잘 용해가 되어 사용하기가 편리하고 대등한 치료효과를 얻을 수 있기 때문에 수간주입 약제로 등록되면 실용화될 수 있을 것이다.

키위 궤양병 치료를 위한 중력식 수간주입은 5년생 키위나무를 기준으로 하면 수관면적이 20 m<sup>2</sup>가 정도가 되기 때문에 주당 4 l의 약제를 주간부 10~30 cm 높이에 주지방향으로 각각 2 l씩 주입했을 때 궤양병 치료효과가 가장 높았다(Fig. 29)(Koh 등, 1996).

수간주사는 지표면에 가까운 주간부에 직경 5 mm 정도, 깊이 1~2 cm로 구멍을 뚫어 물관부에 약제를 주입하는데 구멍이 클수록 키위나무에 피해를 줄 수 있다(Costonis, 1981). 보통 맑은 날에는 24시간 정도면 약제가 모두 주입되며 약제주입 후에는 구멍에 티오파네이트 도포제나 테부코나졸 도포제를 처리하여 물이나 부생균의 침입을 차단시킨다.

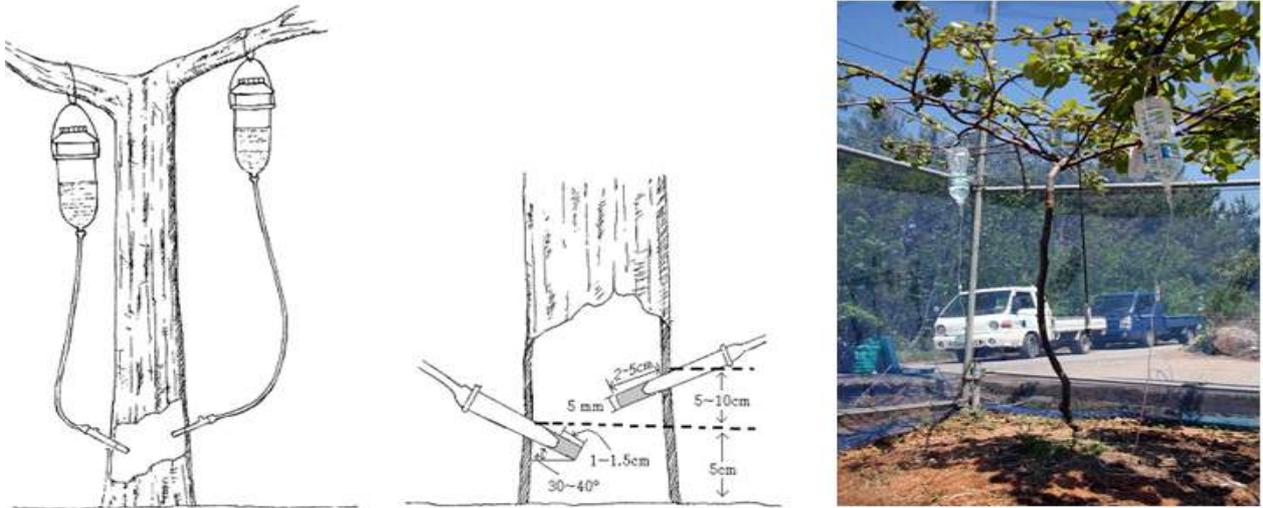


Fig. 29. Trunk injection of antibiotics to cure kiwifruit trees infected by bacterial canker.

수간주사는 잎이 있는 동안에는 언제나 가능하지만 약제잔류문제 때문에 열매를 수확한 직후가 바람직하다. 만약 궤양병에 걸린 키위나무를 살릴 목적으로 잎이 나온 4월부터 수확기 사이에 수간주사를 할 경우에는 열매에 약제가 잔류할 수 있기 때문에 열매를 모두 따버리고 이듬해 수확을 도모해야 한다.

보통 2월 또는 3월에 가지나 주간부에서 궤양병 표징인 세균유출액이 관찰되기 때문에 이 시기에 치료를 목적으로 중력식 수간주사를 시도하는 농가들이 있다. 그러나 이 시기에는 잎이 없기 때문에 증산작용이 일어나지 않아 강한 수압을 지닌 수액이 상승하면서 중력식 수간주사액을 역류시킨다. 따라서 잎이 없는 3~4월에 불가피하게 수간주사를 하고자 할 경우에는 가압식(압력식) 수간주사 방식을 이용해야 한다. 키위 궤양병 치료를 위한 가압식 수간주사 방법은 정립되지 않았으므로 뒷받침할 연구가 필요하다.

**(2) 외과수술**

키위나무가 국부적으로 궤양병 병징을 나타내는 경우에 병환부와 주변의 잠복감염 부위를 제거하기 위하여 병든 가지 또는 주지 전체를 잘라내는 것이 보편적인 외과적 처치방법이지만 그럴 경우에 잘라낸 부위 만큼 수확을 포기해야 하기 때문에 병든 부위만을 도려내고 약제를 처리하거나 병든 부위에 열처리를 하여 궤양병의 진전은 차단하고 수확량은 확보하는 방안이 시도되고 있다(Fig. 30).

그러나 이 방법은 육안으로 병징을 확인할 수 있는 병환부만 제거할 수 있고 병징이 드러나지 않은 잠복감염 부위는 비파괴적인 방법으로 확인할 수가 없기 때문에 계속 Psa의 전염원으로 남아 있게 되는 한계가 있다. 결국 Psa가 잠복감염된 부위에서 발병이 진전되어 병징이나 표징이 드러나면 새로운 병환부에 대한 외과적 처치를 궤양병 발생기에는 계속 되풀이해야 하기 때문에 시간과 노력이 많이 소요되지만 완치될 가능성은 희박하다. 더구나 Psa는 통도조직을 통해 키위나무 전체로 확산되는 전신병이기 때문에 약제 방제를 겸하지 않으면 외과수술만으로는 제대로 효과를 볼 수 없다.



Fig. 30. Surgical operation to cure kiwifruit trees infected by bacterial canker.

### (3) 재생장 유도

키위나무가 주간부 밑동까지 궤양병에 심하게 감염되었거나 주간부 상단까지 감염된 경우에 주간부 밑동을 잘라내고 접목 윗부분에 있는 접수에서 왕성하게 자라나오는 새순을 받아 재생장을 유도하는 방법도 시도되고 있다(Fig. 31).



Fig. 31. Regrowth of cut trunk of kiwifruit trees infected by bacterial canker.

이 방법은 병든 나무를 뿌리째 뽑아 낸 후 어린 묘목을 식재하는 것보다 키위나무를 빨리 성장시킬 수 있는 장점이 있지만 수간주사나 토양관주 등으로 항생제를 처리하여 키위나무 주간부 밑동과 뿌리에 잠복감염되어 있는 Psa를 완전하게 제거하지 않으면 새순이 어느 정도 성장한 후에 다시 궤양병에 감염되어 재생장에 실패할 수 있으므로 주간부 밑동과 뿌리에 Psa의 잠복감염 여부를 확인하고 철저하게 전염원을 제거하여야 한다.

**다. 치유 사례**

키위를 재배하는 농가마다 과수원 위치, 재배 면적, 재배 양식, 재배 품종, 재식 년수, 토양 종류, 시비 방법 등 재배 방법이 다양하고 농가 또는 인근지역에서 유행하고 있는 Psa biovar 종류도 달라서 농가마다 궤양병을 관리하는 방법도 농가에 적합하게 수행되어야 치유에 성공할 수 기 때문에 농가맞춤형 궤양병 관리방안이 필요하다. 따라서 키위 재배 농가에서 가장 보편적으로 수행할 수 있는 궤양병 관리방안과 성공적인 치유사례를 요약하면 Table 7과 같다.

Table 7. Recovery examples of kiwifruit orchards by the proper management practices of bacterial canker

Orchard	Region	Year	Cultivar	Psa biovar	Management practices applied
A	Goheung, Jeonnam Province	2009	Hayward	Psa2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eradication of severely infected trees</li> <li>• Cutting of diseased branches</li> <li>• Treatment of paste on cutting wounds</li> <li>• Eradication of diseased fallen leaves</li> <li>• Spray of bactericides</li> <li>• Trunk injection of bactericides</li> </ul>
B	Gangjin, Jeonnam Province	2014	Hayward	Psa2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eradication of severely infected trees</li> <li>• Cutting of diseased branches</li> <li>• Treatment of paste on cutting wounds</li> <li>• Eradication of diseased fallen leaves</li> <li>• Spray of bactericides</li> </ul>
C	Gwangyang, Jeonnam Province	2015	Skinny-green	Psa3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cutting of a diseased branch</li> <li>• Treatment of paste on the cutting wound</li> <li>• Spray of bactericides</li> <li>• Trunk injection of bactericides</li> </ul>
D	Seogwipo, Jeju Province	2015	Hongyang	Psa3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cutting of a diseased branch</li> <li>• Treatment of paste on the cutting wound</li> <li>• Spray of bactericides</li> <li>• Trunk injection of bactericides</li> </ul>
E	Seogwipo, Jeju Province	2014	Jecy-gold	Psa3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cutting of a diseased branch</li> <li>• Treatment of paste on the cutting wound</li> <li>• Spray of bactericides</li> </ul>

2009년 5월 전남 고흥군에 있는 대략 20년생 헤이워드 과수원이 Psa2에 심하게 감염되어 폐원에 처할 위기에 있었는데(Fig. 32A), 아주 심하게 주간부까지 병든 나무를 제거하고, 병든 주지 또는 가지는 전정한 후 소각하고, 전정부위에 도포제를 처리하고, 병든 낙엽을 모아 소각하고, 옥시테트라사이클린·스트렙토마이신황산염 입상수화제를 10일 간격으로 3회 살포하고, 옥시테트라사이클린·스트렙토마이신황산염 입상수화제를 물에 용해시켜 상등액을 나무당 4l 씩 주간주입하여 이듬해 완치시켰는데, 지금까지도 궤양병이 재발되지 않고 키위나무들이 건강하게 잘 자라고 있다(Fig. 32B).

2014년 5월 전남 강진군에 있는 5년생 헤이워드 과수원이 Psa2에 심하게 감염되어 폐원에 처할 위기에 있었는데, 심하게 주간부까지 병든 나무를 제거하고, 병든 주지 또는 가지는 전정한 후 소각하고, 전정부위에 도포제를 처리하고, 병든 낙엽을 모아 소각하고, 옥시테트라사이클린·스트렙토마이신황산염 입상수화제를 10일 간격으로 3-4회 살포하고, 전정직후에는 코퍼하이드록사이드 입상수화제를 살포하는 관리작업을 2년 동안 반복 수행하여 완치시켰다.



Fig. 32. Diseased kiwifruit orchard (A) and recovered orchard (B) by proper management of bacterial canker.

2015년 봄 전남 광양군에서 재배되고 있던 스키니그린(Fig. 33A)과 제주도 서귀포시에서 재배되고 있던 홍양(Fig. 33B)의 주지가 각각 Psa3에 감염되었었는데, 병든 주지를 전정한 후 소각하고, 전정부위에 도포제를 처리하고, 병든 옥시테트라사이클린·스트렙토마이신황산염 입상수화제를 10일 간격으로 3회 살포하고, 옥시테트라사이클린·스트렙토마이신황산염 입상수화제를 물에 용해시켜 상등액을 나무당 4l 씩 수간주입하여 이듬해 모두 완치시켰다.



Fig. 33. Cured Skinny-green kiwifruit orchard (A) and Hongyang kiwifruit orchard (B) by proper management of bacterial canker.

2014년 4월 제주도 서귀포시에서 재배되고 있던 제시골드의 주지가 Psa3에 감염되었었는데, 병든 주지를 전정한 후 소각하고, 전정부위에 도포제를 처리하고, 병든 옥시테트라사이클린·스트렙토마이신황산염 입상수화제를 10일 간격으로 2회 살포하여 이듬해 완치시켰다.

이렇게 궤양병을 조기에 진단하고 적극적인 대처로 궤양병에 의한 피해를 극복한 과수원들도 많지만, 궤양병을 조기에 진단하지 못해서 폐원된 과수원도 적지 않다. 2008년 봄 제주도 서귀포시에서 재배되고 있던 Hort16A 과수원에는 Psa2에 의해 궤양병이 대발생했음에도 불구하고 동해로 생각하고 방치했다가 이듬해 폐원되었고(Koh 등, 2010)(Fig. 34A), 2014년 여름 경남 고성군에서 재배되고 있던 제시골드 과수원에는 Psa3에 오염된 꽃가루에 의해 궤양병이 몇 그루에서 발생했지만 초동대처가 늦어 방제에 실패함으로써 2016년 폐원되었다(Kim 등, 2016a)(Fig. 34B). 키위 과수원에서 궤양병 발병 초기에 정확한 진단과 적절한 초동대처가 궤양병 방제 성패를 좌우함을 알 수 있다.



Fig. 34. Completely destroyed Hort16A kiwifruit orchard (A) and Jecy-gold kiwifruit orchard (B) by bacterial canker.

### 3. 키위 궤양병 맞춤형 방제매뉴얼

#### 가. 지역별 맞춤형 키위 궤양병 방제매뉴얼

##### (1) 경남지역

경남지역은 우리나라 전체 키위 재배면적의 31%를 차지하고 있다. 주요 재배지는 고성군이 117 ha, 사천시가 98 ha, 창원시가 57 ha, 하동군이 42 ha, 남해군이 41 ha, 거제시가 28 ha 등으로 주로 경남 서부지역에 분포하고 있으며, 김해시, 울산시 등에서도 소규모 재배가 이루어지고 있다.

경남지역의 키위 재배 유형은 노지재배가 대부분이며 비가림재배는 거의 없고 파풍망재배도 일부에 불과하며, 대다수의 과수원은 논에서 키위재배로 작목전환했거나 야산을 개간한 경우에도 점질토인 경우가 대부분이다. 재배품종은 헤이워드를 가장 많이 재배하고 다음으로 제시골드를 많이 재배하고 있으며, 최근 홍양과 해금, 골드윈 등 신품종을 도입하기 시작했다.

경남지역에서 Psa2에 의한 궤양병은 남해군에서만 1990년대 후반에 발생하여 피해를 주다가 최근까지 발생 보고가 거의 없다가 2016년에 김해시 1개 과수원에서만 Psa2에 의한 궤양병이 확인되었다.

Psa3에 의한 궤양병은 2014년 사천시에서 처음 발생하기 시작하여 급속도로 확산되고 있으며 Psa3는 중국에서 수입한 인공수분용 꽃가루를 통하여 유입된 것으로 확인되었다. Psa3에 의한 궤양병이 주로 제시골드 품종과 홍양 품종에서 발생한 것으로 확인되었으며, 자가채취용 숫나무에서도 Psa3가 검출되었다.

따라서 경남지역에서는 키위 재배과수원을 비가림재배로 전환하여 Psa3에 의한 궤양병의 확산을 차단시키고, 점질토 과수원에서는 배수로 시설 또는 심토파쇄를 통한 배수와 통기성을 개선시키고, 수입산 꽃가루의 Psa3 오염 여부 확인과 자가채취 꽃가루의 Psa3 감염여부 확인을 통하여 건전한 꽃가루를 사용하고, Psa3에 가장 취약한 홍양과 제시골드 품종의 식재를 지양하는 것이 필요하다.

## (2) 전남지역

전남지역은 우리나라 전체 키위 재배면적의 45%를 차지하고 있을 만큼 키위 재배 면적이 가장 넓다. 주요 재배지는 보성군이 209 ha, 고흥군이 161 ha, 순천시가 65 ha, 장흥군이 42 ha, 해남군이 38 ha, 광양시가 29 ha 등으로 주로 전남 동부지역에 키위 재배가 많이 이루어지고 있다.

전남지역의 키위 재배 유형은 노지재배와 과풍망 재배가 대부분이며 비가림재배는 일부에 불과하며, 대다수의 과수원은 논에서 키위재배로 작목전환했거나 야산을 개간한 경우에도 점질토인 경우가 대부분이다. 재배품종은 헤이워드를 가장 많이 재배하고 다음으로 해금을 많이 재배하고 있으며, 홍양과 제시골드, 골드윈 등도 재배하고 있다.

전남지역에서 Psa2에 의한 궤양병은 1990년대 초반부터 해남군과 완도군에서 발생하기 시작하여 전남 동부지역으로 확산되면서 최근까지도 피해를 주고 있다.

Psa3에 의한 궤양병은 2011년 고흥군에 있는 1개 농장에서 처음 발생하였으나 2014년 9월 11일 공적방제에 의해 폐원되었다. 그러나, 2015년 광양시, 순천시, 보성군에 있는 일부 농장에서 중국에서 수입한 인공수분용 꽃가루를 통하여 유입된 것으로 추정되는 Psa3에 의한 궤양병이 발생했다. 그러나 전남지역에는 Psa3에 저항성인 헤이워드와 해금이 우점 품종이고 일부 신품종들에서 Psa3에 의한 궤양병이 발생했지만 초동대처가 잘 되어 Psa3에 의한 궤양병이 더 이상 확산되지 않는 것으로 보인다.

따라서 전남지역에서는 키위 재배과수원을 비가림재배로 전환하여 Psa2와 Psa3에 의한 궤양병의 전염과 확산을 예방하고, 점질토 과수원에서는 배수로 시설 또는 심토파쇄를 통한 배수와 통기성을 개선시키고, 수입산 꽃가루의 Psa3 오염 여부 확인과 자가채취 꽃가루의 Psa3 감염여부 확인을 통하여 건전한 꽃가루를 사용하는 것이 필요하다.

## (3) 제주지역

제주지역은 우리나라 전체 키위 재배면적의 24%를 차지하고 있으며, 서귀포시 197 ha, 제주시 115 ha에 키위 재배가 많이 이루어지고 있다.

제주지역의 키위 재배 유형은 비가림재배가 대부분이며 과풍망재배는 일부에 불과하고 노지재배는 거의 없다. 대다수의 과수원은 배수가 양호한 화산회토이고 감귤과수원을 키위재배로 작목전환한 경우가 많다.

재배품종은 헤이워드를 가장 많이 재배하고 다음으로 Hort16A를 많이 재배하고 있으며, 그밖에 제시골드, 한라골드, 홍양, 엔자레드 등 다양한 품종을 재배하고 있다. 뉴질랜드 제스프리사와 OEM방식으로 계약재배하고 Hort16A는 G3(썬골드)로 전환되고 있다.

제주지역에서 Psa2에 의한 궤양병은 1988년 제주시(당시 북제주군)에서 국내 최초로 발생하기 시작하여 제주 전지역으로 확산되면서 최근까지도 피해를 주고 있다. Psa3에 의한 궤양병은 2014년 Hort16A와 홍양, 제스골드 등에서 발생하기 시작하여 급속도로 확산되고 있는데, Psa3는 중국과 뉴질랜드에서 수입한 인공수분용 꽃가루를 통하여 유입된 것으로 확인되었다. 특히 Hort16A에는 제스프리사 재배매뉴얼에 따라 개화기 이후에는 항생제 사용이 금지되어 있어 궤양병 확산을 효과적으로 차단시키지 못하는 한계가 있다.

따라서 제주지역에서는 수입산 꽃가루의 Psa3 오염 여부 확인과 자가채취 꽃가루의 Psa3 감염여부 확인을 통하여 건전한 꽃가루를 사용하고, Psa3에 가장 취약한 홍양, Hort16A, 제시골드의 식재를 지양하는 것이 필요하다. 비가림시설에서 재배하는 키위는 늦겨울 또는 이른 봄 일찍 수액이 이동하기 때문에 늦서리 또는 봄철 이상저온에 의해 동해가 발생하여 궤양병 발병유인으로 작용하기 때문에 비가림시설내에 온풍기를 설치하여 기온을 영상으로 유지시키는 것이 필요하다.

## 나. 품종별 맞춤형 키위 궤양병 방제매뉴얼

### (1) 헤이워드

그린키위 대표품종인 헤이워드는 우리나라 전체 키위 재배면적의 65%를 차지하고 있다. 헤이워드에는 제주도에서 1988년부터 Psa2에 의한 궤양병이 발생하기 시작하여 많은 과수원이 폐원되었지만 Psa3에 의해서는 잎에만 궤양병 병징이 나타나고 주간부와 가지에는 병징이 나타나지 않아 헤이워드는 Psa2에 대해 감수성이지만 Psa3에 대해 다소 저항성인 것으로 판단된다.

따라서 헤이워드는 지금까지 Psa2가 거의 분포하지 않는 것으로 확인된 경남지역에서 시설재배를 하는 것이 바람직한데, 재배지는 논토양 또는 점질토양이 아닌 배수가 잘 되는 곳에 식재하는 것이 바람직하다. 기타 방제방법은 이미 제시한 ‘키위 궤양병 방제매뉴얼’을 따른다.

### (2) Hort16A

골드키위 대표품종인 Hort16A는 제주도에서 2014년부터 도입되어 뉴질랜드 제스프리사와 OEM방식으로 105 ha 재배되고 있다. Hort16A는 2006년 Psa2에 의한 궤양병이 발생하여 여러 과수원이 폐원될 만큼 Psa2에 대해 감수성인 것으로 확인되었으며, 뉴질랜드에서 2011년부터 Psa3에 의한 궤양병이 대발생하여 대부분의 Hort16A 과수원을 폐원시킴으로써 Hort16A 재배를 완전히 중단했을 만큼 Psa3에 대해 감수성인 것으로 확인되었다. 더구나 Hort16A에는 제스프리사 재배매뉴얼에 따라 개화기 이후에는 항생제 사용이 금지되어 있어 동제만으로 궤양병 발생을 억제해야 한다.

따라서 Hort16A는 제스프리사에 신품종인 G3(썬골드)로 전환되고 있는데, Hort16A를 계속 재배하는 경우에는 시설재배과수원으로 Psa2 또는 Psa3의 유입을 차단시키고 건전한 꽃가루를 사용하여 궤양병의 발생을 철저하게 예방해야 한다. 기타 방제방법은 이미 제시한 ‘키위 궤양병 방제매뉴얼’을 따른다.

**(3) 홍양**

레드키위 대표품종인 홍양은 Hort16A와 더불어 Psa3에 가장 감수성인 품종으로 확인되었다. 특히 경남 서부지역에서 2015년과 2016년 노지 또는 과풍망재배를 하는 홍양에는 Psa3에 의한 궤양병이 대발생하여 많은 피해를 주고 있다.

따라서 홍양은 비가림시설에서 재배를 하는 것이 바람직하고 논토양 또는 점질토양인 경우에는 명거배수 또는 심토파쇄를 통하여 배수와 통기성을 개선시켜 키위나무가 건강하게 자라도록 해야 한다. 홍양을 대규모 재배하지않고 다른 품종을 재배하는 과수원에 소규모로 재배하는 경우에 홍양이 Psa3 발병 진원지 역할을 하게 되므로 홍양 식재를 삼가는 것이 바람직하다. 기타 방제방법은 이미 제시한 ‘키위 궤양병 방제매뉴얼’을 따른다.

**(4) 제시골드**

국내육성 골드키위품종인 제시골드는 홍양과 Hort16A와 더불어 Psa3에 가장 감수성인 품종으로 확인되었다. 특히 경남 사천시와 고성군에서 제시골드를 집단으로 재배하는 지역에서는 2014년부터 노지 또는 과풍망재배를 하는 제시골드에 Psa3에 의한 궤양병이 대발생하여 여러 과수원이 폐원되었거나 폐원위기에 처할 만큼 피해를 주고 있다.

따라서 경남 사천시와 고성군에서 제시골드를 재배하는 것은 매우 위험하다고 판단되며 계속 재배를 할 경우에는 비가림시설에서 재배를 하는 것이 바람직하고 논토양 또는 점질토양인 경우에는 명거배수 또는 심토파쇄를 통하여 배수와 통기성을 개선시켜 키위나무가 건강하게 자라도록 해야 한다. 또한 제시골드에 피해를 주고 있는 Psa3가 중국산 꽃가루를 통하여 유입된 것이 확인되었으므로 건전한 꽃가루를 사용하여 궤양병의 발생을 철저히 예방해야 한다. 기타 방제방법은 이미 제시한 ‘키위 궤양병 방제매뉴얼’을 따른다.

**(5) 해금**

국내육성 골드키위품종 중에서 가장 많이 재배되고 있는 해금은 전남지역에서 200 ha 이상 재배되고 있다. 해금은 다른 골드키위와 레드키위 품종에 비해 Psa3에 대해 상대적으로 저항성인 것으로 확인되었다. 따라서 Psa3가 많이 분포하는 경남이나 제주지역에서 해금을 비가림시설로 재배할 경우에 Psa3의 확산에도 불구하고 궤양병에 의한 피해를 극복할 수 있을 것으로 기대된다. 그러나 해금이 Psa3에 대해 완전한 저항성을 가진 것은 아니기 때문에 기타 방제방법은 이미 제시한 ‘키위 궤양병 방제매뉴얼’을 따른다.

**(6) 한라골드**

국내육성 골드키위품종 중 하나인 한라골드는 국내에서 재배하고 있는 골드키위와 레드키위 품종 중에서 Psa3에 대해 가장 저항성인 것으로 확인되었다. 따라서 Psa3가 많이 분포하는 경남이나 제주지역에서 해금과 더불어 한라골드를 비가림시설로 재배할 경우에 Psa3의 확산에도 불구하고 궤양병에 의한 피해를 극복할 수 있을 것으로 기대된다. 그러나 해금처럼 한라골드도 Psa3에 대해 완전한 저항성을 가진 것은 아니기 때문에 기타 방제방법은 이미 제시한 ‘키위 궤양병 방제매뉴얼’을 따른다.

4. 궤양병에 의한 키위 재배농가의 경제적 피해 추정

2016년 본 연구팀이 조사한 자료에 따르면 우리나라에서 궤양병이 발생한 농가과수원은 202개였으며, 그 중에서 Psa2에 의해 궤양병이 발생한 과수원은 73개였고 Psa3에 의해 궤양병이 발생한 과수원은 129개였다(Kim 등, 2016a). 그런데 이러한 수치는 전수조사에 의해 확인된 것이 아니기 때문에 표본조사를 통하여 우리나라에서 궤양병이 발생한 전체 농가수를 추정하였다. 그 결과 2016년 조사에서 궤양병의 발생한 농가수는 우리나라에서 궤양병에 감염되었을 것으로 추정되는 전체 농가과수원의 약 69%에 해당하였다.

이 수치를 바탕으로 추정하면 우리나라에서 궤양병에 감염되었을 것으로 추정되는 전체 농가과수원은 294개로 추정되었으며, 그 중에서 Psa2와 Psa3에 의해 궤양병이 발생한 과수원은 각각 106개와 188개로 추정되었다(Table 8).

Table 8. Number of kiwifruit orchards infected by two kinds of biovars of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* surveyed in 2016 and putative total infected kiwifruit orchards

Scientific name	Fruit type	Cultivar	Number of kiwifruit orchards infected by bacterial canker in 2016					
			Surveyed orchards <sup>a</sup>			Putative total orchards <sup>b</sup>		
			Psa2	Psa3	Total	Psa2	Psa3	Total
<i>Actinidia chinensis</i>	Yellow-fleshed	Hort16A	11	26	37	16	39	55
		Jecy-gold	3	17	20	5	25	30
		Haegeum	4	6	10	6	9	15
		Yellow-king	0	3	3	0	3	3
		Golden-yellow	0	1	1	0	1	1
		Enza-gold	2	1	3	2	2	4
		Halla-gold	1	1	2	1	2	3
	Gold-one	0	1	1	0	1	1	
	Red-fleshed	Hongyang	10	21	31	15	31	46
		Enza-red	2	2	4	2	4	6
		Hongsim	0	1	1	0	1	1
Red-vita		0	1	1	0	1	1	
<i>Actinidia deliciosa</i>	Green-fleshed	Hayward	31	33	64	46	49	95
		Daeheung	6	2	8	10	3	13
		Mega-green	1	1	2	1	1	2
		Gamrok	0	1	1	0	1	1
<i>Actinidia arguta</i>	Kiwiberry	Chiak	0	1	1	0	1	1
		Mansu	1	0	1	1	0	1
		Unknown	1	0	1	1	0	1
		Skinny-green	0	1	1	0	1	1
		Unknown	0	9	9	0	13	13
Total			73	129	202	106	188	294

<sup>a</sup> Number of kiwifruit orchards infected by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* Psa2 and Psa3 in 2016 surveyed by Kim et al. (2016a).

<sup>b</sup> Number of total kiwifruit orchards putatively infected by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* Psa2 and Psa3 in 2016.

Psa2에 감염되어 궤양병이 발생한 것으로 추정되는 106개 과수원에서 궤양병에 의한 피해를 줄기에서 궤양병 증상이 나타난 정도를 기준으로 구분하여 4개 수준의 손실이 발생할 것으로 추정하였다. 즉, 90% 이상의 키위나무에 궤양병이 발생한 경우에는 폐원 수준이므로 100% 손실, 50-90%의 키위나무에 궤양병이 발생한 경우에는 70% 손실, 10-50%의 키위나무에 궤양병이 발생한 경우에는 30% 손실, 10% 이하의 키위나무에 궤양병이 발생한 경우에는 10% 손실이 발생할 것으로 평가하였다.

그런데 키위 재배농가당 재배규모, 연간소득, 평터를 설치하기 위한 시설투자비가 다르기 때문에 보다 정확한 손실액 추정을 위하여 레드키위를 포함한 골드키위 재배농가와 그린키위 재배농가로 세분하여 산출하였다. 골드키위 재배농가의 평균 재배면적은 약 60a였고, 연평균 소득은 약 4천만원이었으며, 시설투자비는 약 6천만원인 반면에 그린키위 재배농가의 평균 재배면적은 약 40a였고, 연평균 소득은 약 1천 3백만원이었으며, 시설투자비는 약 4천만원이었다. 골드키위 재배농가들이 Psa2에 의해 감염되어 발생한 궤양병에 의해 피해를 입은 2016년도 추정손실액은 Table 9에서 볼 수 있듯이 13억 1천만원으로 산출되었고, 그린키위 재배농가들의 추정손실액은 5억 1천만원으로 산출되었다.

Table 9. Loss of putative total infected kiwifruit orchards caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* Psa2 in 2016

Fruit type	Cultivar	Number of orchards	Bacterial canker severity <sup>a</sup>				Loss assessment	Loss
			Heavy	Severe	Moderate	Mild		
Yellow-fleshed	Hort16A	16	5	5	5	1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Average cultivation acreage per orchard: 60a</li> <li>• Annual income per orchard: ₩40 millions</li> <li>• Pergola installation cost: ₩60 millions</li> <li>• Loss of kiwifruit orchards infected by Psa2 (8 orchards x ₩40 millions x 100% x 5 years + 8 orchards x ₩60 millions) + (10 orchards x ₩40 millions x 70%) + (14 orchards x ₩40 millions x 30%) + (15 orchards x ₩40 millions x 10%)</li> </ul>	₩2.59 billions
	Jecy-gold	5	0	1	2	2		
	Haegum	6	0	0	0	6		
	Yellow-king	0	0	0	0	0		
	Golden-yellow	0	0	0	0	0		
	Enza-gold	2	0	0	1	1		
	Hallo-gold	1	0	0	0	1		
Gold-one	0	0	0	0	0			
Red-fleshed	Hongyang	15	3	4	5	3		
	Enza-red	2	0	0	1	1		
	Hongsim	0	0	0	0	0		
	Red-vita	0	0	0	0	0		
Green-fleshed	Hayward	46	5	10	26	5	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Average cultivation acreage per orchard: 40a</li> <li>• Annual income per orchard: ₩13 millions</li> <li>• Pergola installation cost: ₩40 millions</li> <li>• Loss of kiwifruit orchards infected by Psa2 (5 orchards x ₩13 millions x 100% x 5 years + 5 orchards x ₩40 millions) + (12 orchards x ₩13 millions x 70%) + (29 orchards x ₩13 millions x 30%) + (13 orchards x ₩13 millions x 10%)</li> </ul>	₩770 millions
	Daeheung	10	0	2	3	5		
	Mega-green	1	0	0	0	1		
	Gamrok	0	0	0	0	0		
Kiwiberries	Chiak	0	0	0	0	0		
	Mansu	1	0	0	0	1		
	Skinny-green	1	0	0	0	1		
	Unknown	0	0	0	0	0		
Total		106	13	23	45	25		₩3.36 billions

<sup>a</sup> Bacterial canker severity was investigated by the percentages of the diseased trees at an orchard. Heavy: ≥90%, severe: 90-50%, moderate: 50-10%, mild: ≤10%.

그런데 폐원된 과수원은 새로 묘목을 식재하여 정상적으로 수확할 때까지 약 5년이 소요되므로 실제 손실액은 연간손실액의 5배로 추정되며 키위 경작을 포기하고 다른 작목으로 전환할 경우에는 평덕을 제거해야 해서 시설투자비를 회수할 수 없기 때문에 골드키위와 그린키위 재배농가들에서 발생하는 5년 누적 추정손실액은 각각 25억 9천만원과 7억 7천만원으로 산출되었다. 따라서 우리나라에서 2016년 Psa2에 의해 감염되어 발생한 궤양병에 의해 피해를 입은 손실액은 최소 18억 2천만원에서 최대 33억 6천만원 범위인 것으로 추정된다.

Psa3에 의해 감염에 의해 발생한 2016년도 추정손실액을 같은 방식으로 산출하면 Table 10에서 볼 수 있듯이 골드키위 재배농가들에서는 28억 6천만원이고, 그린키위 재배농가들의 추정손실액은 1억 1천만원이었다. 마찬가지로 폐원된 과수원의 실제 피해를 고려하여 산출하면 골드키위 재배농가들에서 발생하는 5년 누적 추정손실액은 99억원에 달하기 때문에 결국 우리나라에서 2016년 Psa3에 의해 감염되어 발생한 7궤양병에 의해 피해를 입은 손실액은 최소 29억 7천만원에서 최대 100억 1천만원 범위인 것으로 추정된다.

Table 10. Loss of putative total infected kiwifruit orchards caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* Psa3 in 2016

Fruit type	Cultivar	Number of orchards	Bacterial canker severity <sup>a</sup>				Loss assessment	Loss
			Heavy	Severe	Moderate	Mild		
Yellow-fleshed	Hort16A	39	10	15	10	4	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Average cultivation acreage per orchard: 60a</li> <li>• Annual income per orchard: ₩40 millions</li> <li>• Pergola installation cost: ₩60 millions</li> <li>• Loss of kiwifruit orchards infected by Psa3</li> <li>(32 orchards x ₩40 millions x 100% x 5 years + 32 orchards x ₩60 millions) +</li> <li>(43 orchards x ₩40 millions x 70%) +</li> <li>(25 orchards x ₩40 millions x 30%) +</li> <li>(19 orchards x ₩40 millions x 10%)</li> </ul>	₩9.9 billions
	Jecy-gold	25	10	10	5	0		
	Haegeum	9	0	0	0	9		
	Yellow-king	3	1	1	1	0		
	Golden-yellow	1	0	0	0	1		
	Enza-gold	2	0	1	1	0		
	Hallo-gold	2	1	0	1	0		
	Gold-one	1	0	0	0	1		
Red-fleshed	Hongyang	31	10	15	5	1		
	Enza-red	4	0	1	2	1		
	Hongsim	1	0	0	0	1		
	Red-vita	1	0	0	0	1		
Green-fleshed	Hayward	49	0	0	10	39	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Average cultivation acreage per orchard: 40a</li> <li>• Annual income per orchard: ₩13 millions</li> <li>• Pergola installation cost: ₩40 millions</li> <li>• Loss of kiwifruit orchards infected by Psa3</li> <li>(1 orchard x ₩13 millions x 70%) +</li> <li>(11 orchards x ₩13 millions x 30%) +</li> <li>(44 orchards x ₩13 millions x 10%)</li> </ul>	₩110 millions
	Dacheung	3	0	1	1	1		
	Mega-green	1	0	0	0	1		
	Gamrok	1	0	0	0	1		
Kiwiberry	Chiak	1	0	0	0	1		
	Mansu	0	0	0	0	0		
	Skinny-green	1	0	0	0	1		
	Unknown	13	0	0	0	13		
Total		188	32	44	36	76		₩10.01 billions

<sup>a</sup> Bacterial canker severity was investigated by the percentages of the diseased trees at an orchard. Heavy: ≥90%, severe: 90–50%, moderate: 50–10%, mild: ≤10%.

따라서 우리나라 키위재배 농가에서 2016년 Psa2와 Psa3에 의해 감염되어 발생한 궤양병에 의해 피해를 입은 손실액은 최소 47억 9천만원에서 최대 133억 7천만원에 이를 것으로 추정할 수 있다.

이상의 결과에서 볼 수 있듯이 우리나라에서 2016년 Psa2에 의해 감염되어 발생한 궤양병에 의해 피해를 입은 손실액은 최대 33억6천만원으로 추정된 반면에 Psa3에 의한 손실액은 최대 100억1천만원으로 추정되기 때문에 Psa2에 비해 Psa3에 의해 발생하는 궤양병 피해가 3배 정도 더 큰 것으로 파악되었다. 또한 그린키위 재배농가의 손실액은 8억 8천만원인 반면에 골드키위 재배농가의 손실액은 124억 9천만원으로 추정되기 때문에 그린키위 재배농가에 비해 골드키위 재배농가에서 피해가 훨씬 더 큰 것으로 파악되었다.

그런데 우리나라에서 Psa3에 의한 궤양병의 발생으로 피해를 입은 농가수는 2014년부터 2016년까지 해마다 급속하게 증가하고 있는 추세여서 갈수록 궤양병의 발생과 피해는 심해질 것으로 전망된다(Kim 등, 2016a; 2017; Lee 등, 2017). 또한 1970년대부터 국내에서 재배되기 시작한 키위는 그린키위 품종인 Hayward 일색이었으나 골드키위 품종인 Hort16A가 2004년부터 제주도에 도입된 후 국내외에서 육성된 다양한 골드키위와 레드키위 품종들이 도입되면서 골드키위와 레드키위 재배면적이 급증하고 있는 추세여서 갈수록 궤양병에 의한 피해는 증가할 것으로 예상된다(Kim 등, 2017; Koh 등, 2010; 2012; 2017).

## 5. 장기적인 키위 궤양병 방제방안

식물병원균에 대한 유해한 화학 물질을 사용하는 약제 방제는 효과가 빠르게 나타나고 효과도 뚜렷하며 사용하기가 간편하게 제품화되어 있기 때문에 농가에서 가장 보편적으로 이용하고 있는 식물병 방제방법이다. 그러나 약제 방제는 화학약제의 연용에 따른 약제저항성 균의 출현, 약제잔류, 생태계 오염 및 파괴 등의 부작용 문제가 필연적으로 뒤따른다(Goto 등, 2004; Masami 등, 2014; Nakajima 등, 1995; 2002).

아직까지 국내에서 약제저항성 Psa는 검출되지 않았지만 일본의 사례를 보면 금명간 약제 저항성 Psa가 출현하지 않으리라 장담할 수 없기 때문에 키위 궤양병 방제용 약제인 동제와 항생제를 대체할 수 있는 새로운 방제제 개발이 필요하다(Cellini 등, 2014; Donati 등, 2014; Reglinski 등, 2013; Spinelli 등, 2013).

화학 약제의 단점을 보완할 수 있는 생물적 방제가 유력한 대안으로 제시되어 식물병 방제용으로 가장 활발하게 사용되는 미생물적 방제에 대한 연구가 심도있게 수행되고 있다(Compant 등, 2005; Lugtenberg와 Kamlikova, 2009). 여러 가지 식물병 방제에 활용되어 온 길항미생물 키위 궤양병 방제에 사용하려는 시도도 이루어져 *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pantoea agglomerans* 등의 세균들이 온실 내에서는 키위나무에서 Psa 감염을 효과적으로 예방하는 것으로 보고되었다(Stewart 등, 2011).

비록 온실 내에서는 Psa에 대해 효과를 나타내는 길항미생물일지라도 키위 재배 과수원에서 실용적으로 활용할 수 있으려면 다양한 환경조건에서 방제효과가 유지될 수 있도록 많은 보완연구가 수행되어야 할 것이다.

세균성 식물병 방제에 활용되고 있는 박테리오파지를 키위 궤양병 방제에 활용하는 연구들이 진행되고 있다(Frampton 등, 2012; 2014; Jones 등, 2007). 국내에서도 Psa에 특이적이면서 환경 스트레스에 강한 박테리오파지들이 선발되어 실용화를 위한 연구에 박차를 가하고 있다(Yu 등, 2016). 박테리오파지는 동제나 항생제에서 나타나는 부작용 문제가 없기 때문에 실용화될 경우에 이상적인 키위 궤양병 방제제로 기대된다. 그러나 선발된 박테리오파지의 제형화, 처리방법 등에 대한 연구가 선행되어야 할 것이다.

키위 궤양병을 일으키는 Psa는 이미 여러 개의 biovar가 보고되었을 만큼 매우 변이가 심한 세균이다(Chapman 등, 2012; Fujikawa and Sawada, 2016; Sawada 등, 2014). 최근 전세계적으로 급속하게 확산되면서 피해를 초래하고 있는 Psa3는 중국에서 기원하지만 다양한 유전적 분화가 계속 일어나고 있는 것으로 조사되고 있다(Butler 등, 2013; 2015; Mazzaglia 등, 2012; McCann 등, 2013).

본 연구의 제2세부과제에서 수행된 결과에 따르면 우리나라에 분포하는 Psa3 집단에는 6개의 세부그룹이 분포하는 것으로 조사되었다. 따라서 장기적으로 키위 궤양병에 대한 안정적인 대응책을 마련하기 위해서는 Psa의 유전적 변이와 병원성 기작 등에 대한 이해가 더 필요하다.

저항성 품종이 궤양병을 예방하는 장기적인 차원에서 가장 이상적인 방법의 하나일 수 있기 때문에 분자생물학의 발달에 힘입어 Psa의 전체 genome이 해독되고 키위의 draft genome이 보고되면서 Psa에 대한 저항성 품종 육성도 신기원을 맞을 수 있을 것으로 예상된다(Huang 등, 2013). 최근 뉴질랜드에서는 전세계적으로 유행하고 있는 Psa3에 의해 치명적인 피해를 입은 Hort16A를 대체할 골드키위 신품종인 G3를 육성하여 보급하고 있다(Donati 등, 2014; Ferguson, 2010).

그러나 G3가 Hort16A에 비해 Psa3에 대해 상대적으로 저항성이긴 하지만 지금까지 국내외에서 육성된 키위 품종 중에는 궤양병에 저항성인 품종은 보고되지 않았다(Kim 등, 2016a; 2016b; Vanneste 등, 2011b). 따라서 궤양병에 저항성이면서 상업적으로 유용한 신품종을 육성하기 위해서는 많은 시간과 노력이 소요되므로 여러 해가 소요될 것으로 전망된다.

키위 궤양병과 꽃썩음병 발생을 예찰하는 모델에 관한 연구도 국내외에서 시도되고 있다(Do 등, 2016a; 2016b; Kim과 Koh, 2015). 그러나 최근 기후변화에 따라 자주 발생하고 있는 기상이변에 능동적으로 대처할 수 있는 우리 실정에 맞는 키위 궤양병 발생 예찰 모델 개발도 궤양병을 예방하는 장기적인 차원에서 수행되어야 할 시급한 과제이다.

또한 기상이변에 능동적으로 대처하는 방법 중 하나가 비가림시설을 도입하는 것이다. 국내에서는 제주도에서부터 비가림시설을 도입하였지만 전남과 경남지역에서는 여전히 파풍망 또는 노지재배가 더 많다. 그러나 최근 전세계적으로 비가림시설이 궤양병 방제에 필요하다고 인식되면서 비가림시설에 대한 연구와 설치 붐을 일으키고 있는 점을 보더라도 비가림시설을 확대해나갈 필요가 있다.

최근 외래병해충의 국내유입과 확산이 급증하고 있는 실정이고 2011년부터 국내에서 발생하기 시작한 Psa3의 국내유입 및 2차감염에 의한 급속한 확산에 대한 현행 관계기관의 대응 사례를 보면 국경검역을 담당하는 농림축산검역본부와 국내방역을 담당하는 농촌진흥청으로 이원화되어 있는 방역업무체계의 일원화가 절실하다(Kim 등, 2016a; 2016b).

## 제2세부과제: 참다래 궤양병균 집단 분석용 분자마커 개발

### 가. 연구배경

참다래 궤양병균 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* 균주들은 유전적 특성에 따라 biovar 1, 2, 3 (또는 Psa1, 2, 3)로 분류하고 있는데, Psa1은 일본에서, Psa2는 우리나라에서만 분리되어 왔다. 그러나, 2010년 이래 새로운 균주 집단인 Psa3가 세계적으로 발생하여 키위 산업을 위협하고 있는데, Psa3는 Psa1이나 Psa2보다 전염성이 강해서 큰 피해를 주는 것으로 알려지고 있다. 우리나라에서도 2011년부터 Psa3가 분리되고 있기 때문에 우리나라에는 Psa2와 함께 Psa 3가 함께 발견되고 있는 상황이다.

Psa3의 기원 대하여 조사한 결과 모든 Psa 3가 중국에서 기원한 것으로 판단되고 있으며, 지금까지 Psa3는 지리적 기원에 따라 크게 New Zealand, Europe, Chile type으로 나누어지고 있다.

본 연구에서는 우리나라에서 분리된 궤양병균의 집단을 분석하고 각 집단에 특이적인 분자마커를 개발하고자 한다.

### 나. 우리나라 궤양병균 집단의 분석

우리나라에서 분리된 궤양병 균주 중에서 예비 실험을 통해 유전적으로 서로 다를 것으로 보여지는 균주를 선발하였다(Table 1).

Table 1. Bacterial strains used in RAPD analyses

<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>				
Lane in Fig. 1	Strain	Origin	Year	Biovar
1	KJB1451	Jeju, Korea	2014	3
2	KGC1451	Jeju, Korea	2014	3
3	HSG1461	Jeju, Korea	2014	3
4	HJJ1471	Jeonnam, Korea	2014	3
5	PSG15311	Gyeongnam, Korea	2015	3
6	KST1531	Jeju, Korea	2015	3
7	KKB1531	Jeju, Korea	2015	3
8	KDS1541	Gyeongnam, Korea	2015	3
9	14004	Jeju, Korea	2014	3
10	14016	Jeju, Korea	2014	3
11	P1	China	unknown	3
12	155	China	unknown	3
13	CFBP7286	Latium, Italy	2008	3
14	ICMP18708	Te Puke, New Zealand	2010	3
15	SYS1	Jeonnam, Korea	2011	3
16	KW11	Kanagawa, Japan	1984	1
17	CJW7	Jeju, Korea	1999	2

17개의 공시균주 중 1~15는 우리나라 및 외국에서 분리된 Psa3 균주이고, Psa1과 Psa2 균주를 한 균주씩 포함시켜서 총 17개 균주에 대한 RAPD 분석을 실시하였다.

Fig. 1은 무작위적인 10-mer primer를 사용하여 RAPD PCR을 수행한 결과의 일부이다.

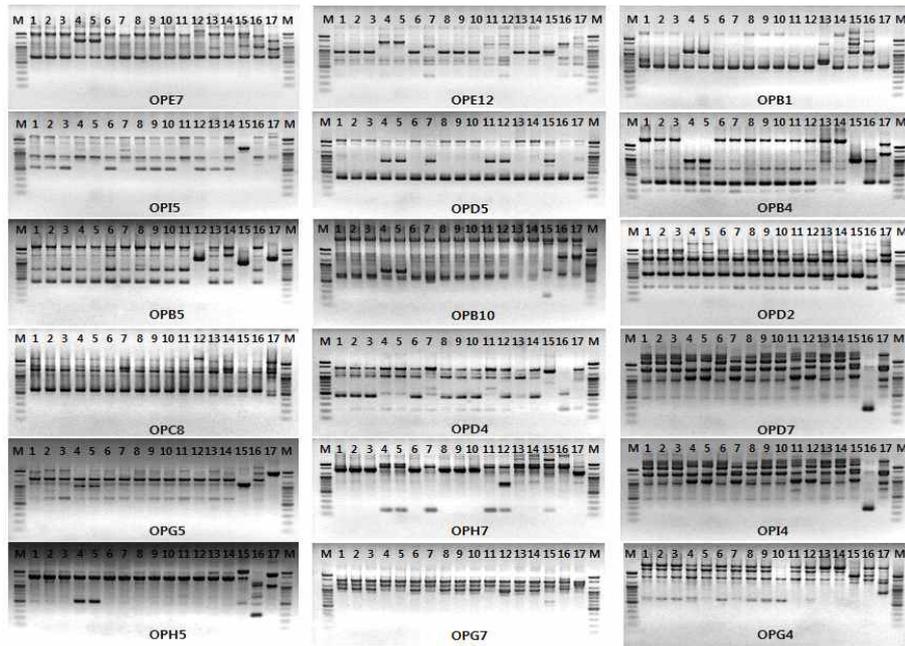


Fig. 1. Examples of RAPD polymorphism in strains of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* generated with random 10-mer primers.

RAPD 결과를 바탕으로 작성된 dendrogram은 Fig. 2와 같다.

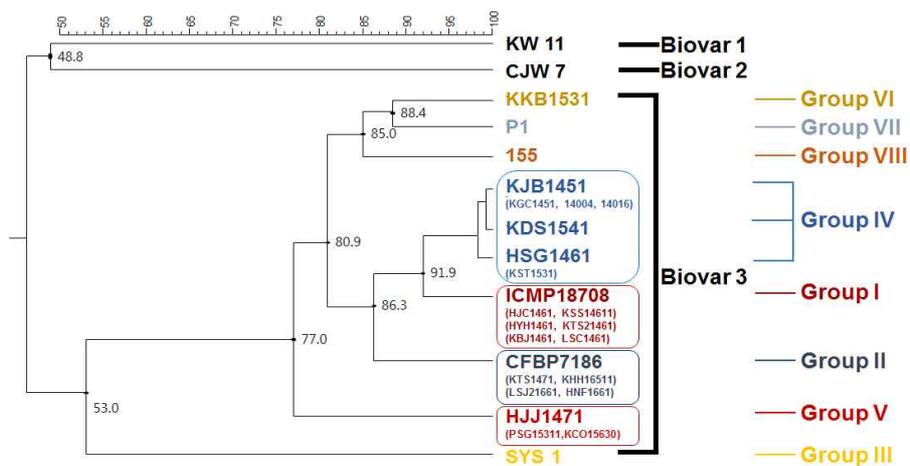


Fig. 2. Dendrogram generated by GelCompar II software showing the relationships of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* strains. The analysis of the bands generated was performed using the Dice coefficient and unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA).

Fig. 2에서처럼 biovar 1, 2, 3는 뚜렷하게 분리되는 clade를 형성하였다. Biovar 3는 적어도 8개 group으로 나뉘는 다양한 lineage로 구성되어 있었다. 다음 단계로 biovar 1, 2, 3의 분자마커를 RAPD 분석 결과를 바탕으로 개발하고, biovar 3의 각 group에 특이적인 분자마커를 같은 방법으로 탐색하고자 하였다.

다. Psa1 (biovar 1) 특이적 분자마커 개발

Psa1 (biovar 1)에 특이적인 분자마커를 탐색하기 위해 Psa1, 2, 3 균주들을 대상으로 RAPD를 수행하였다. 공시 균주들의 biovar는 phytotoxin의 생산여부와 종류를 통해 확인하였다. Random primer OPA-2를 사용한 RAPD에서 약 650 bp의 band가 Psa1 균주에서만 증폭되었다(Fig. 3).

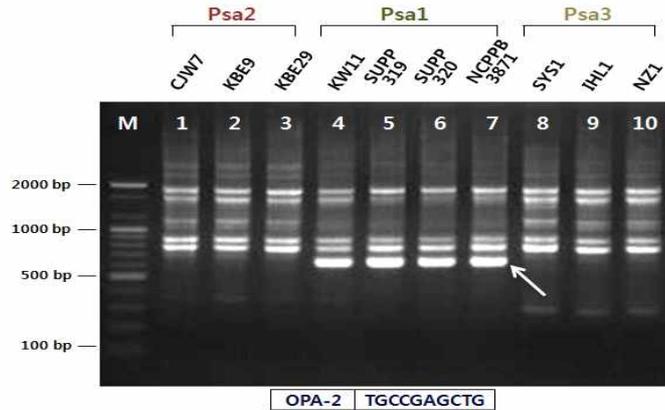


Fig. 3. RAPD polymorphism in strains of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* generated with primer OPA-2

Psa1 균주에서 특이적으로 증폭된 밴드를 gel로부터 용출시켜 pGEM-T 벡터에 클로닝한 뒤 염기서열을 결정하였다.

>Kw11-OPA2 (641 bp)

**TGCCGAGCTGG**ACGTCGACGACAAGGTGATCCTCTTCTGCGAGTATCAGG  
 AATCCGTGGCCACGTTACGTGAACACTGCCTCAAGATGGGCGTCCGGTGT  
 GTGACGTTGGTAGGCAGTGACTCGCCCAAGAAACGACAGAAGGCGATTGA  
 TGCCTTCCAGCAGGATCCGGACTGCAGGGTGTTTCATCGGGACCAGGTCGG  
 CCGCCGGCACAGGTTACAACCTGACAGCGGCGAACTATGTATTCTTTCTG  
 GGA<sup>CTTCCATGGACACCGGGGCTGCAAGACCAAGCTGAGGATCGAGCCTA</sup>  
 TCGCAACGGGCAGTTGCGCATGGTTGTCGTCAAAATCCCTCTAGCTGAGG  
 ACACCATCGACCAGCAGCTGTGGCAGATGCTCATGGACAAACGCGCGCTA  
 GCCCGCGATTTGATAGACCCCGAAGCAGAAGAAAAAAGTAAAATGGCTCT  
 CGCGAATCAGCTAAAAATTTGAGATGACGGCACGGTTTACTGTGGGCTGT  
 TCAGCAACATGATTGGCAACCCCTCTAAGTTACAAATCGCTTAGGCACGTG  
 CTTCCAATACGACGTCGAAATTGCGGACGGTTATCAACGGCGAGATCTTT  
 CAGGGTGGCGGTGATCCCTTTCACAACTCAA**CAGCTCGGCA**

Fig. 4. Nucleotide sequence of DNA band specifically amplified with the Psa1 strains. RAPD primer sequences are indicated in red color and the positions of SCAR primers are underlined with blue color.

Fig. 4에서처럼 10-mer primer를 포함한 641 bp의 염기서열이 결정되었다. 이 염기서열은 NCBI BLAST Search에서 *P. syringae* pv. *actinidiae* ICMP9863 (Japan)의 helicase와 100% 상동성이 있었다.

이 염기서열로부터 Psa 1에 특이적인 SCAR primer set PsJ-F/R를 설계하였다. Primer set PsJ-F/R은 Psa1 균주에서 특이적으로 481 bp의 밴드를 증폭시켰다 (Fig. 5).

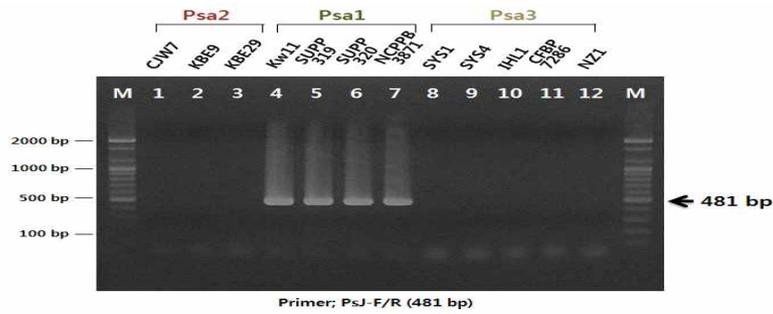


Fig. 5. Agarose gel electrophoresis of PCR product amplified with DNA of Psa strains using PsJ-F/R primer set.

Primer의 특이성 검증을 위한 결과는 Fig. 6와 같다. 15개 식물병원성 세균 균주에서 증폭이 일어나지 않아 Psa1에 특이적임을 확인하였다.

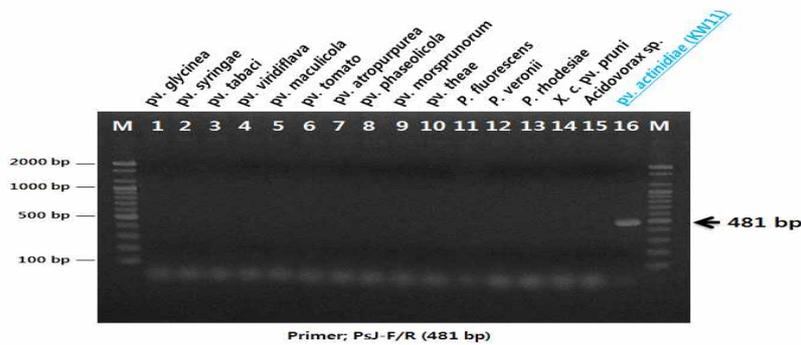


Fig. 6. Specificity test of PsJ-F/R primer set. The PCR product was not amplified with 15 plant pathogenic bacteria.

### 라. Psa 2 (biovar 2) 특이적 분자마커 개발

Psa 1 특이적 분자마커를 개발하는 과정과 동일하게 수행하였다. Random primer OPA-16에서 Psa2에서만 약 450 bp의 절편이 증폭되었다(Fig. 7).

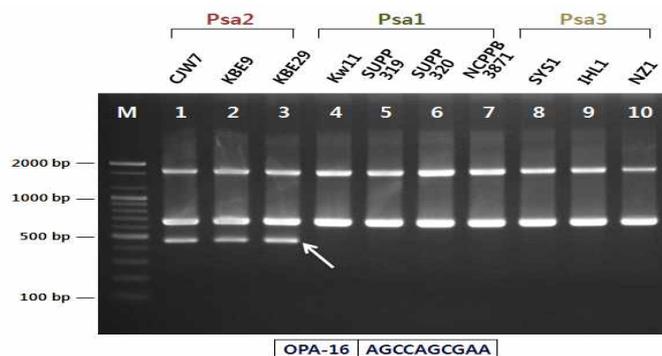


Fig. 7. RAPD polymorphism in strains of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* generated with primer OPA-16.

Psa2 균주에서 특이적으로 증폭된 밴드의 염기서열을 결정하였다(Fig. 8). 10-mer primer를 포함한 462 bp의 염기서열이 결정되었다.

>CJW7-OPA16 (462 bp)

AGCCAGCGAAGACAAAGCCAAAAAGGCGAGGAAGGACTTTGAAAAGCTCA  
 AGACAGATAGCAAGCCTGTTCGTGATTGGGCTGCTCAGCCTCTGCCTGAT  
 GGCCTGCGCGCAAAGCCGGTGCTGGTGACAAAGACATCAGCGGTAAGAA  
 TCGAGCCCCCTGAGCTGATCCCATGCGAGCGCATCAACGCTGATGAGGCC  
 GATCTGCGGTTGAACGGTGATGTGTGGGAGCTGAAAGATCAGGCCATCAA  
 ACTGCTGGATACGTGCGCTGACCAGGTTGACGCGCAGATCCTGCGCAGCC  
 AGAGCAAGTAGACAACCTCAATTCATTCACCCGCCATATATGGCGAGCAC  
 CGAGGCAACAACCATGGCATCGAAAACCAACTCATCGACAGCGGTATCCG  
CGTTGGATACTTGGGCTTGGCAGCCATTGTGGCCGCCGGCTTCCTGCTC  
 TATTCGCTGGCT

Fig. 8. Nucleotide sequence of DNA band specifically amplified with the Psa2 strains. RAPD primer sequences are indicated in red color and the positions of SCAR primers are underlined with blue color.

이 염기서열은 NCBI BLAST Search에서 유의미한 상동성을 찾을 수 없었다. 이 염기서열로부터 Psa2에 특이적인 SCAR primer set PsK-F/R를 설계하였다. Primer set PsK-F/R은 Psa2 균주에서 413 bp의 밴드를 증폭시켰다(Fig. 9).

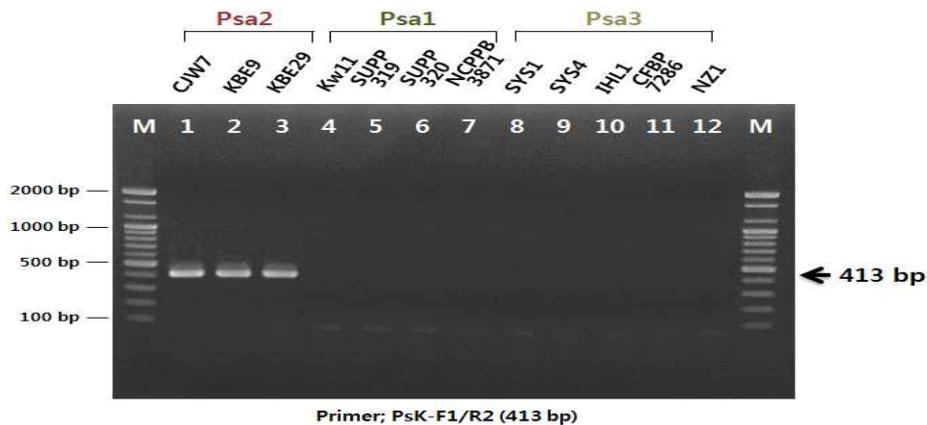


Fig. 9. Agarose gel electrophoresis of PCR product amplified with DNA of Psa strains using PsK-F/R primer set.

Primer의 특이성 검증을 위해 궤양병균이 아닌 15개 식물병원성 세균 균주에서는 증폭이 일어나지 않아 이 primer가 Psa2에 특이적임을 확인하였다(data not shown).

마. Psa 3 (biovar 3) 특이적 분자마커 개발

앞에 기술한 방법으로 Psa3에 특이적인 primer Tac-F/R를 개발하였다(Fig. 10).

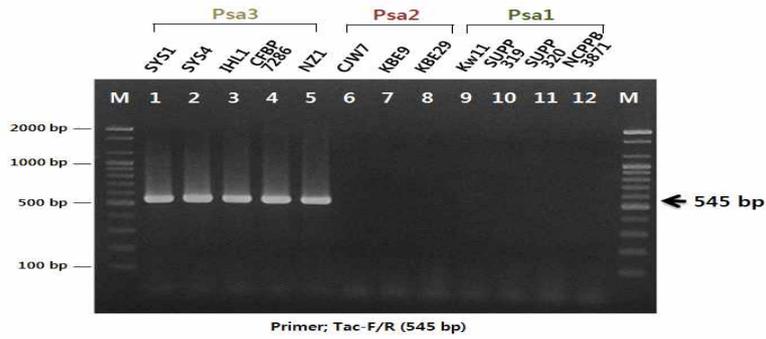


Fig. 10. Agarose gel electrophoresis of PCR product amplified with DNA of Psa strains using Tac-F/R primer set. A 545 bp fragments were amplified with Psa3 strains (lane 1-5).

바. 우리나라에서 분리된 균주들의 biovar

개발된 각 biovar 특이적 primers를 사용하여 우리나라에서 분리된 궤양병 균주를 대상으로 biovar를 조사하였다. 조사결과 중 2013년 균주 38개에 대하여 조사한 결과를 Fig. 11에 나타내었다.

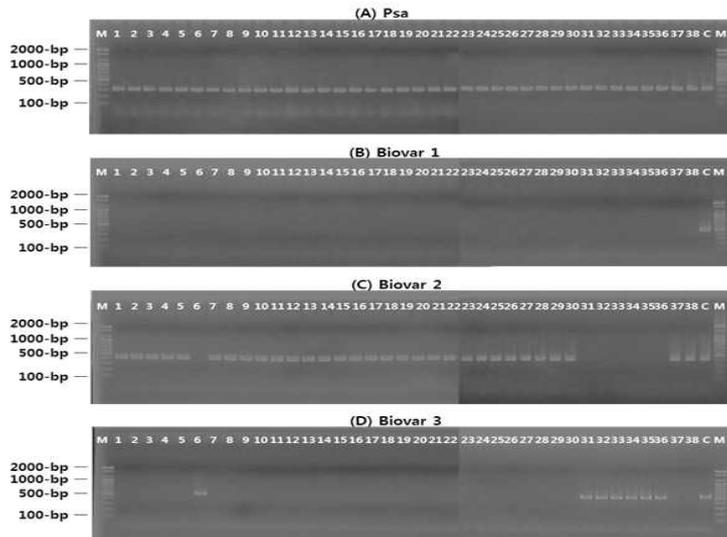


Fig. 11. Representative results showing the biovar identification of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* strains isolated in Korea. Thirty eight strains isolated in 2013 were used for amplification with four primer pairs; *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* F/R (A), PsaJ-F/R (B), PsaK-F/R, (C) and Tac-F/R (D). Lane M, 1-kb DNA marker; lane 1-38, *P. syringae* pv. *actinidiae* strains; lane C, positive control for each biovar.

Fig. 11 중 A는 모든 궤양병균을 검출할 수 있는 primer인 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*-F/R (Balestra et al., 2013)을 사용한 결과로 biovar에 상관없이 311 bp 절편이 증폭되었다.

B, C, D는 각각 biovar 1, 2, 3를 결정한 결과이다. 이러한 방법으로 본 연구팀이 보관하고 있는 682 균주에 대한 biovar를 조사하였다(Table 2).

Table 2. Identification of biovars of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* strains isolated in Korea

Year	Number of strains	Biovar 1	Biovar 2	Biovar 3
1997	5	-	5	-
1998	1	-	1	-
1999	18	-	18	-
2000-2007	-	-	-	-
2008	12	-	12	-
2009	5	-	5	-
2010	6	-	6	-
2011	9	-	5	4
2012	60	-	36	24
2013	38	-	31	7
2014	192	-	49	143
2015	204	-	82	122
2016	105	-	38	94
Total	682	0	288	394

1997년부터 분리된 682개 균주 중에서 일본 균주인 Psa1은 발견되지 않았다. 2011년 이후 Psa 3 균주가 분리되기 시작하여 빠르게 증가하고 있다. 전체 682개 균주 중 biovar 2에 속한 균주가 288개, biovar 3에 속한 균주가 394개였다.

사. Biovar 3, Group-I 특이적 분자마커

RAPD 분석결과 biovar 3에 속하는 population은 8개의 sub-group으로 나눌 수 있었다. Fig. 2에서 biovar 3에 속하는 8개 group에 특이적인 분자마커를 각각 개발하였다. Group-I은 뉴질랜드에서 분리된 균주가 속한 그룹이다. Random primer OPC-2에서 뉴질랜드 균주만 약 800 bp의 절편이 증폭되었다(Fig. 12).

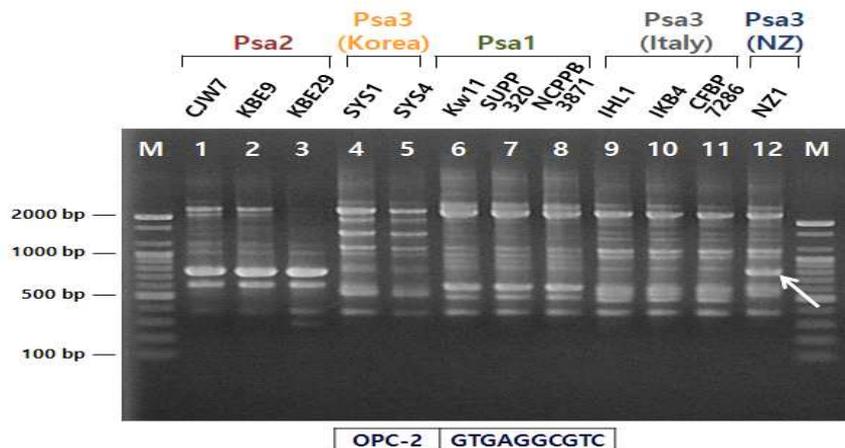


Fig. 12. RAPD polymorphism in strains of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* generated with primer OPC-2. Arrow indicates a band specifically amplified with Psa3 strain isolated in New Zealand.

OPC-2 primer를 사용한 RAPD에서 특이적으로 증폭된 밴드의 염기서열을 결정하였다(Fig. 13).

>NZ1-OPC2 (793 bp)

**GTGAGGCGTC**TGGGTA**CTTCTGAGC**ATTTATCGCGGCTGGGCAACCCGAA  
 ATCTCGACAGATCGGCTGCTGCCGCTTCTGCCGCTCGTTGGGCCGTGCTG  
 TTCATGATTATGACTTTCATGCTGTTGAGTTGATTTTTCCAAGGAGATAA  
 AGATGACGCTGTATTC**ACTGTTCACTCAGGCACGTGCTTTTT**TGAAACGC  
CGGCCTTTTTCGGTGCTGCTGACGGCTGCCACACCTGGCACTAGTTTCGC  
 GGCTCTACCGGGTGCACAAGCACCCACACGCGCACTGGGACCAGCTTCC  
 TGCAGACCTTCCAAA**ACTATGCCTTCGACGGCTTCACGCTGCTGGGTCTA**  
 TGCATGTGCGCGTTCGGCATCATTTTGGTGGGGCGACATGCGCTGGGCGT  
 CTACCACGAGATCCACATGGGCAAGGCCAAATGGGCTGACCTGGGCAGTA  
 CCGCGGTAGTCGGTGT**TTGCTTGATCGGCGTCACGATCTACCTGGTCACC**  
 ACCGCTACCAACATTCTTTGAGTCCTAGAGGCTTCCATGACTGAGCTCCA  
 GCAAGATCAGCATGAAGACGGCACCCCTGCGTTTTCTGCCAGTCGCTTGA  
 ACAATCAGCCCGTGGT**GATTGGTGGCCTTACGGCGGATGAGATGTGGGCG**  
 ACCGTATTCGGTTGCAGCGGCATAGGCTTTGTGATTGGTCTGCCGCTGGC  
 CTTCA**TCATCACACCATCAATGCCCG**TGGTATGCGCCTTGATAGGAGGAG  
 TATTGGGACTGCTCATCGCATCTCGGGTATTGCG**ACGCCTCAC**

Fig. 13. Nucleotide sequence of DNA band specifically amplified with the Group-I strains. RAPD primer sequences are indicated in red color and the positions of SCAR primers are underlined with blue color.

이 염기서열은 NCBI BLAST Search에서 *P. syringae* pv. *actinidiae* Pac\_ICE1\_nz과 상동성이 있는 것으로 나타났다. 이 염기서열로부터 Group-I에 특이적인 primer PaNZ-F3/R3를 설계하였다. PaNZ-F3/R3 primer는 뉴질랜드 균주를 포함하는 Group-1 균주에서 533 bp의 DNA를 증폭시켰다 (Fig. 14).

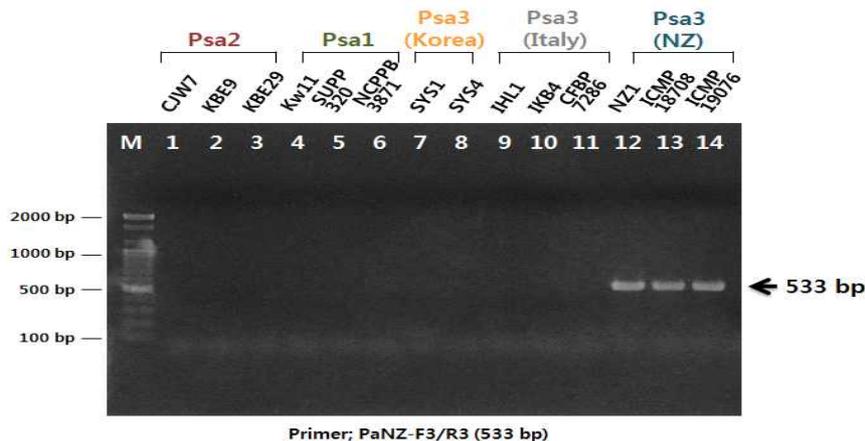


Fig. 14. Agarose gel electrophoresis of PCR product amplified with DNA of Psa strains using PaNZ-F3/R3 primer set. A 533 bp fragments were amplified with New Zealand strains (lane 12-14).

아. Biovar 3, Group-II 특이적 분자마커

Group-II은 유럽에서 분리된 균주가 속한 그룹이다. Random primer OPB-1에서 Group-II 균주만 약 800 bp의 절편이 증폭되었다(Fig. 15).

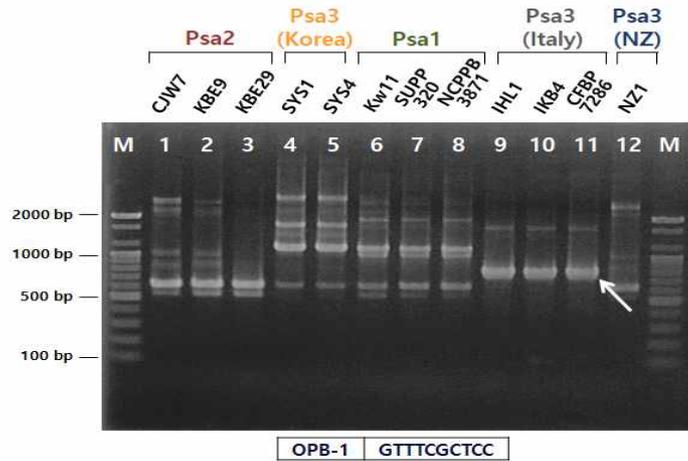


Fig. 15. RAPD polymorphism in strains of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* generated with primer OPB-1. Arrow indicates a band specifically amplified with Psa3 strain isolated in Italy.

OPB-1 primer를 사용한 RAPD에서 특이적으로 증폭된 밴드의 염기서열을 결정하였다(Fig. 16).

>IHL1-OPB1 (797 bp)

GTTTCGCTCCGTTTGTTCGGATCGTTAGGCCACTCATCAGCGAGCCCAGT  
 TGCATTCCGCTCCAGCCTAACGCTAGCACCCAAAAGCTGGGTAGTACTAT  
 GAACATCGCACCCATTACGAAGTCCAGCAGCAAGTCACCTTGAGCATTGC  
 TGGCACCGAACACCGGGTCAAAATTTGTATGCGGGACGTTGCTTCCTATC  
 CCATTTCCGTAAGTGCCTCGAGAATTGTGCTGTCAACCCACCTGGCCAG  
 CTGGAACCAGAAGTCGACAAAGATCAAAGCGAACGCAGCAAAGTTATGG  
 TCATAACGACCTTCAGGTCAAACATCCCGATCAAAGCACAAACGGTATG  
 CAGATGATGAGAGCCATCTTCAGGAAGGCCATCACCATGGGCGCTGCTTG  
 CCTGACGCTGTCCATCGCTGGGTACATGACGAGAGACCCTGCAGCCTGAC  
 CGATTTGTGGCTGTGAGACGAGTGACGTCATTTAGCACCGATCCTCCTACC  
 TGGCCACCGTAGTCGGAATACACCTGCCCTTGGGTCAGTTGCTGTTTCCT  
 GGGAGAGACCAGGTGCGGGATGACGGAGTCATTCACCTCTGTCTGGGTCA  
 TGAATTGTGCCCACTGAGCTAGCTTGCTCAGCAGATCTGGGCTGACTTGT  
 TCCAGTAGCCTGGCTCTCAGACCAACGCTCCCATCAGACCACCATTGTGT  
 ACATGTAGGAAATCCACCCCTCCGGTCGTTTGTGGCAAGCCAGCGTCCG  
 GTGTTGAGTCGTACGGCCATTTGGTCCGTGGAGTGTGGAGCGAAAC

Fig. 16. Nucleotide sequence of DNA band specifically amplified with the Group-II strains. RAPD primer sequences are indicated in red color and the positions of SCAR primers are underlined with blue color.

이 염기서열은 NCBI BLAST Search에서 *P. syringae* pv. *actinidiae* Pac\_ICE2\_it과 상동성이 있는 것으로 나타났다. 이 염기서열로부터 Group-II에 특이적인 primer PaI-F/R2를 설계하였다. PaI-F/R2 primer는 이탈리아 균주를 포함하는 Group-II 균주에서 473 bp의 DNA를 증폭시켰다(Fig. 17).

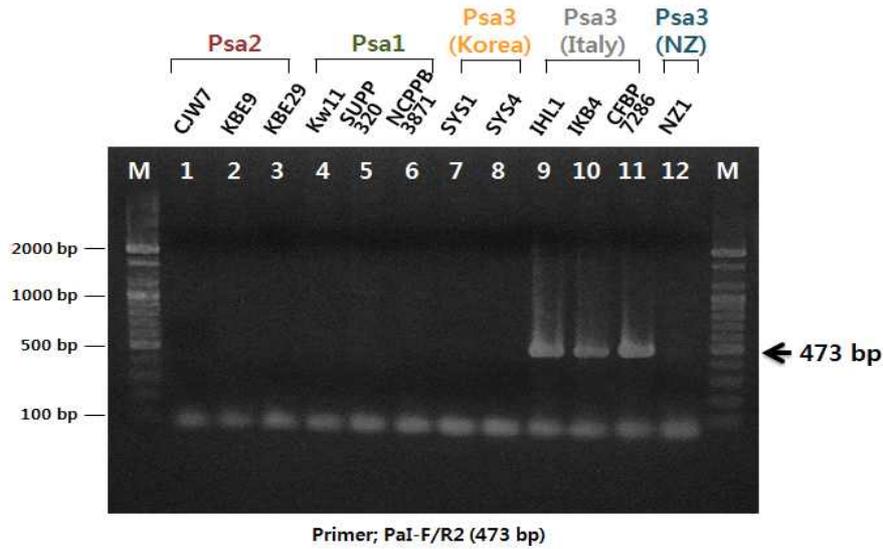


Fig. 17. Agarose gel electrophoresis of PCR product amplified with DNA of Psa strains using PaI-F/R2 primer set. The 473 bp fragments were amplified with Italian strains (lane 9-11).

#### 자. Biovar 3, Group-III 특이적 분자마커

Group-III은 2011년 고흥에서 우리나라에서 처음 분리된 Psa3 균주가 속한 그룹이다. 이 그룹의 균주는 2014년 9월 공적방제를 통해 제거된 그룹의 균주이다. Random primer OPA-15로 증폭했을 때 Group-III 균주에서만 약 1300 bp의 절편이 증폭되었다(Fig. 18).

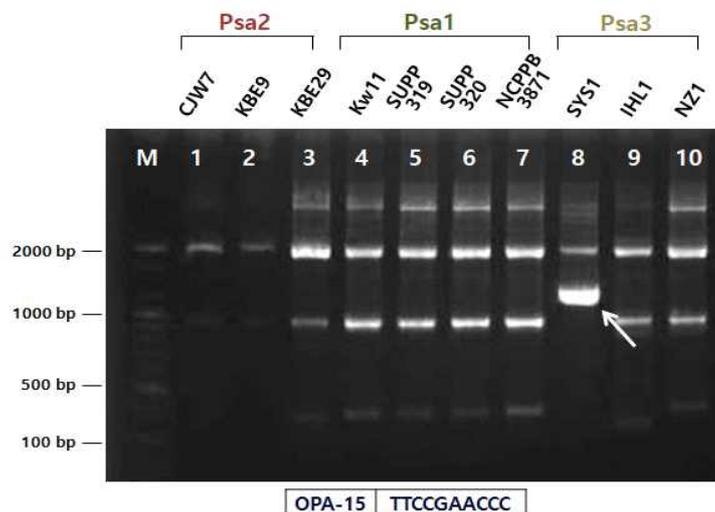


Fig.18. RAPD polymorphism in strains of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* generated with primer OPA-15.

OPA-15 primer를 사용한 RAPD에서 특이적으로 증폭된 밴드의 염기서열을 결정하였다(Fig. 19).

>SYS1-OPA15 (1272 bp)

**TTCCGAACCC**TCACTACTTCTGCAATGTGAGCGAGTCGCTGAATTGCGAA  
CACATTGACGAGCCCATCTGGGCCTCGATCCTCGATCCCGGCTTAAGCGC  
AGTGACGAGCGCGGACGGGTTTGACAAGAAGCTGGCCAGCATGGGCATAG  
CGCTGCCCTGGCATTGAAGTATGAATTGAGAAGAGACTGGTCAACGGGA  
ACGGTTAATCGCGAGGTCTATTGGAGGCCTGACGGCACCATCGAGCGAGG  
TGAACCCTGATGTCTCGGCATTGATTATTCTGCCGTCTACAACATCGCA  
AGGCCCGGGCCTAGTAGTGGTCGGCTATTCTGCGGGCTTCGCGGTCCGC  
ACTACTTCTGCTCAATCTCCGACGCTACAGGCCACATTGACTCCCACCTG  
TGGAACTCAGAATTCTCGCTGGAGCACATGCGCGCCAGAATGTCGATGA  
ATTCGATGCGATCCTGGCTCAATGGCGGGTCACTCTTCTGCGTTCATCA  
AGCGCGCCCTCGTGGAAGACTGGGCTAAGAACCTCAAACCCCGGTTGAA  
TACTGCTGGCAGGAAGACGGCAGCTTTGATCAGGTTGCGTAGCGTTTCAT  
GGCAGCCTTCGCGAGATTATCTGCCGACCGCCTCGCACCTTGAGTAAGTG  
CAACGGGTTGACGTGAAACCGGGAGCCTCTATGCGTAAATTCGTCATATA  
CGGCTCGCGGAGGACGCTTCCCTTGAAGAATCGGAACTGAGTTACATC  
GCCTTTGCCATTTGCGTTGGCGCTGCTTCATTGTGTGGTGTATCGAGCAT  
GCTCAGCGTGTTCGGAACAGCAGCAAGCTCGACACGTTGTCACAGCAAG  
TTCATGACCTAACTGAGCAAAACGCTCGCCTGATCACGCTGGTGGCAGAG  
AGCAGGATCAGGACCAACGAGTTGGATGTCGGTATGACAGCGCTGGCGAA  
CGTGTTGAAGATCGACCGCGGTGAATTGTCCAGGGCGTTCGCTGCTGTCA  
AAGCAGGGCAAGTAGAAGACGCCAAGGCAGCGGCCTCCAGCGCAAAGCG  
TCAGATGACGCTCAAAGATCAGCAAATGAGCGCTCAGACCAGCAGCCCAC  
TGTCGAGTCCGCTTCTCCGCAACGCCAGTCCGACACAGATGCTCAAGATT  
CTGCTGCAAAGCATGGCTTGGTAGGTTCTGGGGTCGGGTCAACAAAATCT  
GTACCGACGCAAGAGTCCGCACGGGTAGTAGCGGAACCGGCCAAACAACA  
GGCTCCCCTGCT**GGGTTCCGAA**

Fig. 19. Nucleotide sequence of DNA band specifically amplified with the Group-III strains. RAPD primer sequences are indicated in red color and the positions of SCAR primers are underlined with blue color.

이 염기서열은 NCBI BLAST Search에서 상동성이 있는 염기서열이 없는 것으로 나타났다. 이 염기서열로부터 Group-III에 특이적인 primer PKN-F2/R4를 설계하였다.

PKN-F2/R4 primers는 Group-III 균주에서 771 bp의 DNA를 특이적으로 증폭시켰다(Fig. 20).

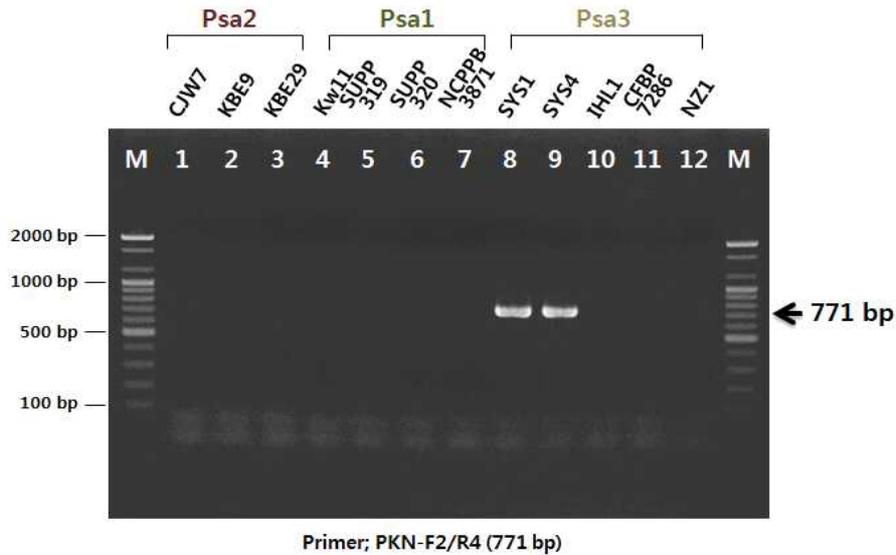


Fig. 20. Agarose gel electrophoresis of PCR product amplified with DNA of Psa strains using PKN-F2/R4 primer set. The 771 bp fragments were amplified with Group-III strains (lane 8-9).

**차. Biovar 3, Group-IV 특이적 분자마커**

Group-IV은 제주와 경남에서 분리된 Psa3 균주가 속한 그룹이다. Random primer OPH-7로 증폭했을 때 Group-IV 균주에서 만 약 1500 bp의 절편이 증폭되었다(Fig. 21).

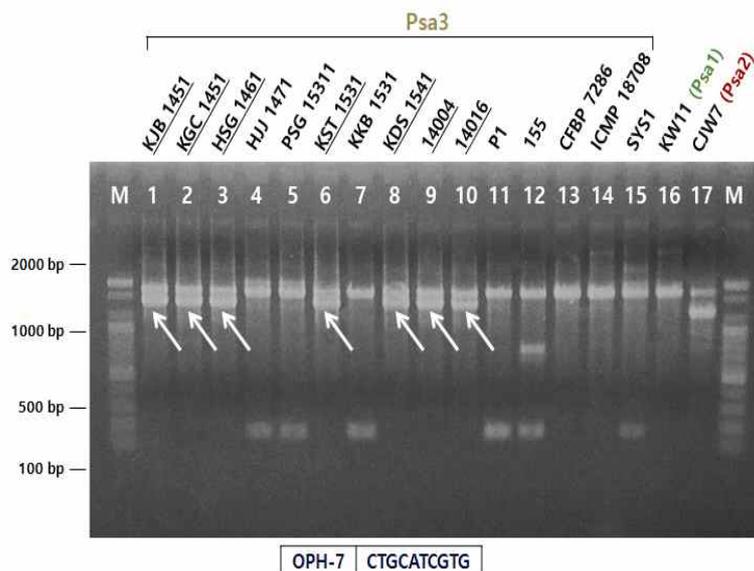


Fig. 21. RAPD polymorphism in strains of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* generated with primer OPH-7.

OPH-7 primer를 사용한 RAPD에서 특이적으로 증폭된 밴드의 염기서열을 결정하였다(Fig. 22).

>IV-H7-2-SP6(1220 bp)-partial sequence  
CTGCATCGTGCCGCGCCTTGATCGCGGGCCACTCGGGGAGGCCATCAGT  
 TCGCGTATCAGGCGTTCGTGTTTCAGGTTTCGGGACCAGGTGTTGCCAGCG  
 CTGCTGTTCCAGCTCCATCTGCTCAACGCCGCGCAGCTGCTGCTCGATCC  
 GTCCACCCGCTGCGCCAGGCGCTCCGCGCCTTGTACCAGAAAGTCATCA  
 GACGTGGCGTACTGGTACAGCGGCACGATAGGGATCCTGTGTGTTTGCCA  
 AAGGTGCCAGAGGACCGCCATGCCAATACCTTGCCGGTGCTGGTCGGGAC  
 TGACCTCGATCATGTTGATGTACAGGCGGTCGCGCAGTGGATTGATGCTG  
TAGTCGATGTGACCCACACGCTGGCCGTCGACCTGGATCTGATCGATGAA  
 GTCGGTACCGGGATACGAAAATGACCTGGTAGACATTTCGGTGCCTCGT  
 TGACCAGCGTCACGGGACGCGCTGCCACATAAATACCGTGCCGTCTACTG  
 AATAAGCCGCAAATCCTACTGAAAATCGTCATGTGCCCGCCTGAGGTGCA  
 ATTCGCCGCGGCCCATGGCGCCGGGAGCATGCGACGTCGGGCCCAATT  
 CGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCCTACTGGCCGTCGTTTTACAACGT  
 CGTGACTIONGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACA  
 TCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCC  
 CTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCG  
 GCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACA  
 CTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCT  
 CGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTT  
 TAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGAT  
 TAGGGTGATGGTTCACGTAATGGGCCATCGCCCTGATAAACGGTTTTTCG  
 CCCTTTGACGTTGGAATCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAA  
 CTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTATAAGGG  
 ATTTTGCCAATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGGACTTGATTTAACAAA  
 AATTTTACGGCGAATTTTAA

Fig. 22. Partial nucleotide sequence of DNA band specifically amplified with the Group-IV strains. RAPD primer sequence is indicated in red color and the positions of SCAR primers are underlined with blue color.

이 염기서열은 NCBI BLAST Search에서 *P. syringae* pv. *actinidiae* ICMP19455 clone Pac\_ICE3\_cl과 상동성이 있는 것으로 나타났다. ICMP19455 균주는 칠레 균주로 이 그룹의 균주는 칠레에서 분리된 균주로 생각된다. 이 염기서열로부터 Group-IV에 특이적인 primer IVH72-F1/R3를 설계하였다. IVH72-F1/R3 primers는 Group-IV 균주에서 507 bp의 DNA를 증폭시켰다(Fig. 23).

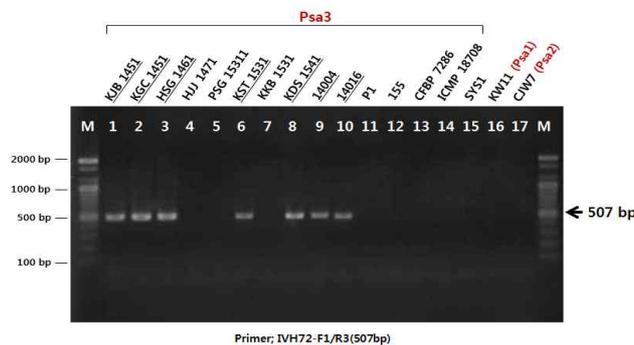


Fig. 23. Agarose gel electrophoresis of PCR product amplified with DNA of Psa strains using IVH72-F1/R3 primer set. The 507-bp fragments were amplified with Group-IV strains (lane 1-3, 6, 8-10).

카. Biovar 3, Group-V 특이적 분자마커

Group-V는 전남과 경남에서 분리된 Psa3 균주가 속한 그룹이다. Random primer OPH-5를 사용했을 때 Group-V와 Group-IV 균주에서 약 500 bp의 절편이 증폭되었다 (Fig. 24).

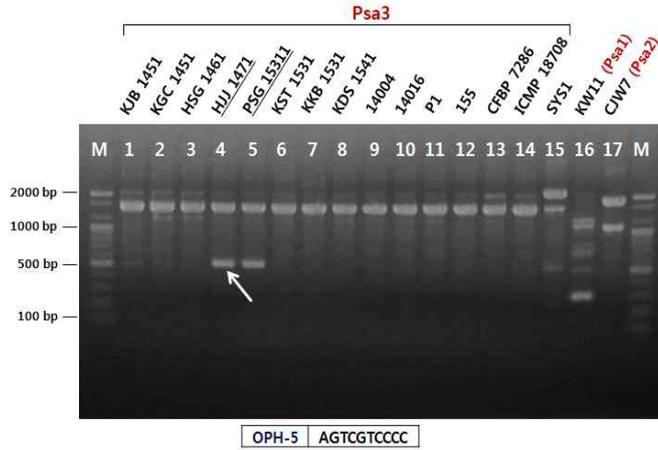


Fig. 24. RAPD polymorphism in strains of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* generated with primer OPH-5.

RAPD에서 특이적으로 증폭된 밴드의 염기서열을 결정하였다(Fig. 25).

>3H51(504bp)

AGTCGTCCCCCTTGATTAGGCCTCTATTTGCAACAGCGAAATGAACCGTT  
 TAATATCGAAAAATAAAAAATCAACTTCAAGCTATCAAATATCAGCCATG  
 GAGAAGAAAATTTATGCTGAAAATATTACCCGAAAATAATAATTTACAT  
 TATTTGCTACAATGGTATTCGGAATTTCTTTTTTCCGCTATATCAACG  
 TCAACCTACGCAGAAGATCTAGGGGCAGTTTCAGTGTTCCGGTGATGTA  
 GCCTGCAAATCCTACAAATCAGCAGGTGTGGAATTCGCACTGGAATCAAG  
 CTTACGATAACTGTAGAAAACAGTTCGGTAATGCTCACTCTGTAGTTTA  
 GACAGCTGGGAAGTCACTGCAGGGGAAGGCAGTCTGATCATTTGGCAAAT  
 TAATAGTGTCTGGCGTTGCAGAAGCTGACTTAAGAGGGTTTGGAGGAAAC  
 ATGTAGTGAGTCGGCGCGAGTGTATAGGGTCTGGTTCCGGCTGGGGAC  
 GACT

Fig. 25. Nucleotide sequence of DNA band specifically amplified with the Group-IV and Group-V strains. RAPD primer sequences are indicated in red color and the positions of SCAR primers are underlined with blue color.

이 염기서열은 NCBI BLAST Search에서 *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A large plasmid와 96%의 상동성을 가지고 있었다. 이 염기서열로부터 primer 3H5-F1/R를 설계하였다. 이 primer는 Group-V와 Group-IV 균주에서 380 bp의 DNA를 증폭시켰다.

Group-V를 Group-IV와 구별하기 위해서는 IV를 검출하는 primer인 PKN-F/R를 사용하여 717 bp가 증폭되지 않는 균주를 Group-V로 판정한다(Fig. 26).

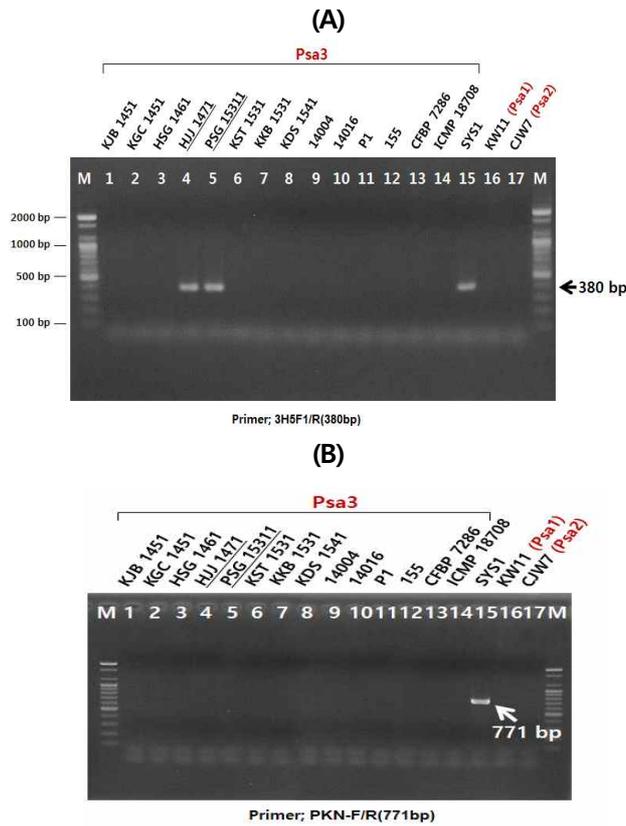


Fig. 26. Agarose gel electrophoresis of PCR product amplified with DNA of Psa strains using 3H5-F1/R (A) and PKN-F/R primers (B). A 771 bp fragment was amplified with Group-IV strains and PKN-F/R primers (lane 15 in B).

타. Biovar 3, Group-VI 특이적 분자마커

Group-VI는 제주의 한 농가에서 분리된 균주이다. 이 Group에 대해서는 RAPD에서 OPB-10에서 특이적으로 증폭되는 band를 확인하였다(Fig. 27).

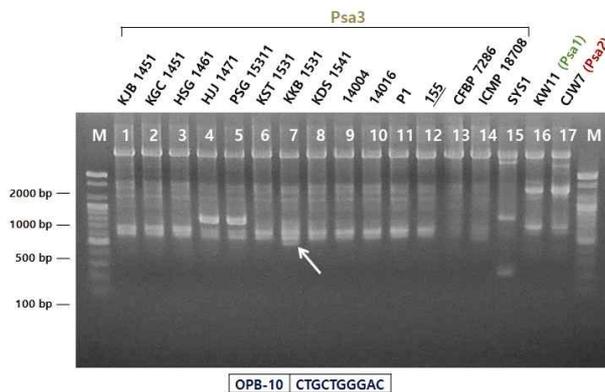


Fig. 27. RAPD polymorphism in strains of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* generated with primer OPB-10, Arrows indicate DNA bands specifically amplified with Group-VI strain.

RAPD에서 특이적으로 증폭된 밴드의 염기서열을 결정하였다(Fig. 28).

>7.VI-B10-1(527bp)  
CTGCTGGGACGTAAAGAGGAGCGGATATCGCCAGCGGCAAGGGCTTTTCG  
 CAGGCAACTACTGACACCTGAAGCAACCTCATGCGGTTGTATTGGGCGTG  
 GGTACGCGAAGGCAAGATCGACAGAACCATTTATTCGACACCCAAGAAAC  
 CCGGCGCTCAGCAGGCTTCTGACGGTAAGCGAACATGCTCGCGTCAAAC  
 CATAACGGTTGAGATCGTTGAAGGAGTATCCAACACCACAGGCCACGAAA  
 TACTGGGCAATCTGTCATCTATAACCGCTTTCGAAGCGATAGCGGCCGCT  
 GTAGGAAAGTTGATAACGAAGCTGCACAGAACTGCCAGTCCGGCAAGTGC  
 GATGGCGGCTTGAAAACGTCCGGCCTACCTTACGGGTAGCGCCGGCCTAT  
 ACTCGATGGGTTTCAACGCCGGCCATAGAGCTTGTGAGTTTCCGAAGTT  
 GTACTATGCATACAACCGCAAATACAGCGCAGATGGCCAAGAATACAAGC  
TCCGGGTCCCTGTATTGTCCAGCAG

Fig. 28. Nucleotide sequence of DNA band specifically amplified with the Group-VI strains. RAPD primer sequences are indicated in red color and the positions of SCAR primers are underlined with blue color.

이 염기서열은 NCBI BLAST Search에서 뉴질랜드 균주의 hypothetical protein인 DNA methyltransferase와 92%의 상동성을 가지고 있었다. 이 염기서열로부터 primer VI-B10-F/R를 설계하였다. 이 primer는 Group-VI 균주에서 507 bp의 DNA를 증폭시켰다(Fig. 29).

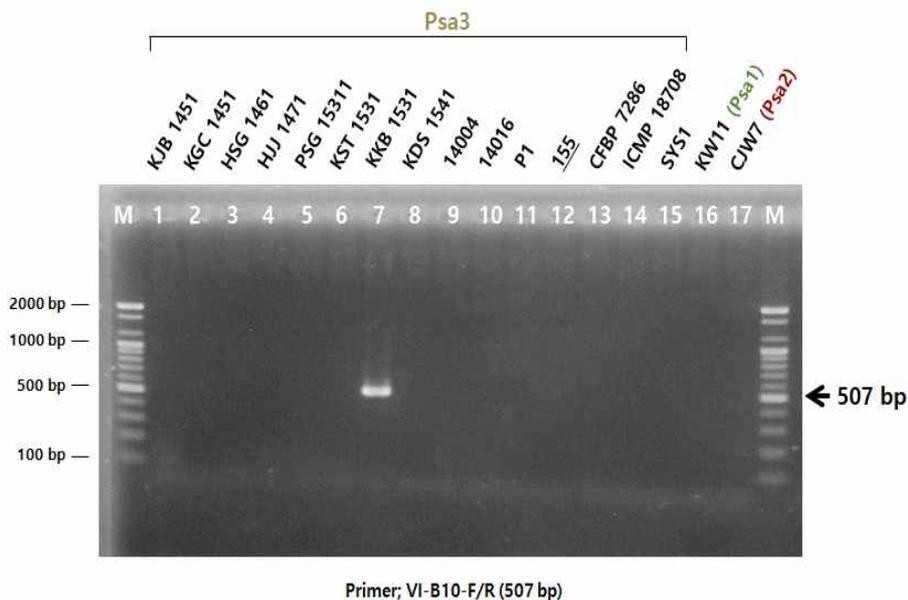


Fig. 29. Agarose gel electrophoresis of PCR product amplified with DNA of Psa strains using VI-B10-F/R primer set. A 507-bp fragment was amplified with Group-VI strain (lane 7).

파. Biovar 3, Group-VII 특이적 분자마커

Group-VII는 중국에서 분리된 균주로 국내에서는 분리된 바 없는 균주이다. 이 Group에 대해서는 RAPD에서 특이적으로 증폭되는 band를 확인하였다(Fig. 30).

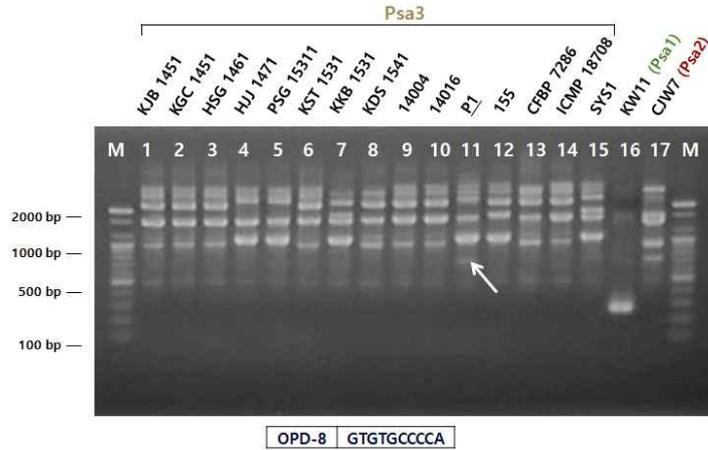


Fig. 30. RAPD polymorphism in strains of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* generated with primer OPD-8. Arrow indicates DNA band specifically amplified with Group-VII strain.

RAPD에서 특이적으로 증폭된 밴드의 염기서열을 결정하였다(Fig. 31).

>6.VII-D8-1(711bp)  
GTGTGCCCACACGTAGGGTGAGGAAAGGTTATGGCTTACGCAGAACAAC  
 TGCAGTCATCGTTGAGATACCTGATTGCAGCGGGAGAGGCTGGACGCCGT  
 AGTCTGGATGACATGCTCGGTCTTTGAATGGGGCCGTCGGTGATATGAC  
 GGGGGCTGCGTCGGAGCTGAAAACGTCCCGTTTATCGGTCCAGCCATTG  
 GCGAAAACTGCAACGTACTIONTATGCGAGGCACCAGTGTTCGCGAGTCGAAG  
 GTTGGGCAGGTAGCGGCATGTACGGGCAGGCGACCAGTGCAGCATCGCA  
 AGTGCAGGAGCGCATGGGGCACTACAAGAGCAGGCTTCCAAGGCTGGAG  
 CTGCGATCAATCGGGTTGCGGGAAGCATCAGTCCGACGCTGGGCAACATC  
 GTGCCAACGGGACAGTTTTGCGGCGCAGATGACACCGGCACCCGAGGCCGT  
 GAAGCCGTTCCCGCATTTACTGATCGTCCAGCCGCTCAAGCCTGAGGCGC  
 AGCCGTACTIONTCAACCTGGACACGGCTGCCTTCGATGAGCTTCGCAGG  
 CAGACCGGTTCCGCTGGGCCGGCAAGAGCGTTTGACGCGCAGCATTGC  
 GCAACAGGCAGTCGGTCTGGGCGACGACAACTGAGTTTAAAGGGCGCCA  
 TTTTCCCGGCTTCAAGGGCGGTCTCAAGCAACTGGACACCTTACGCAGT  
ATGGGGCACAC

Fig. 31. Nucleotide sequence of DNA band specifically amplified with the Group-VII strain. RAPD primer sequences are indicated in red color and the positions of SCAR primers are underlined with color.

이 염기서열은 NCBI BLAST Search에서 Psa ICMP9853(Japan) phage tail protein과 99%의 상동성을 가지고 있었다. 이 염기서열로부터 primer VII-D8-F1/R1을 설계하였다. 이 primer는 Group-VII 균주와 biovar 1, 2 균주에서 711 bp의 DNA를 증폭시켰다.

Group-VII를 biovar 1, 2 균주와 구별하기 위해서는 biovar 3를 검출하는 primer인 Tac-F/R를 함께 사용하여 545 bp와 771 bp가 동시에 증폭되는 균주를 Group-VII로 판정한다 (Fig. 32).

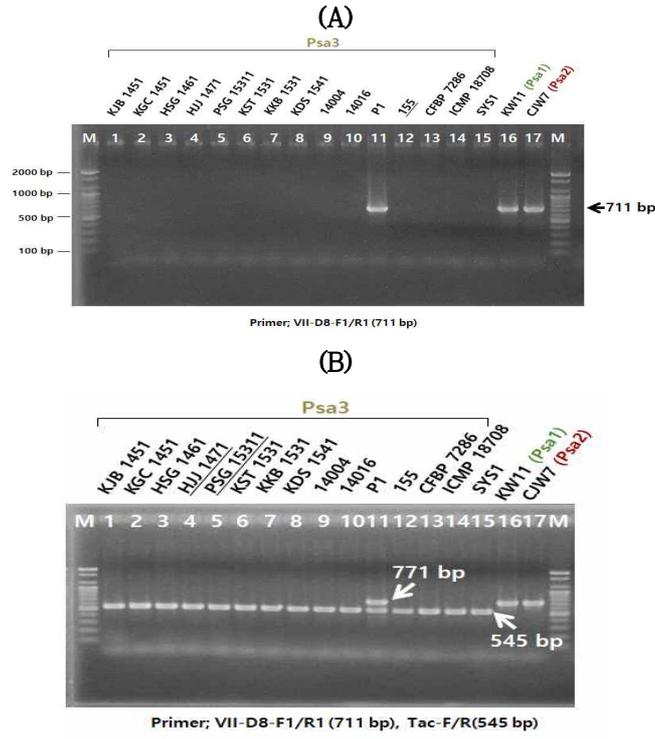


Fig. 32. Agarose gel electrophoresis of PCR product amplified with DNA of Psa strains using VII-D8-F1/R1 primer set. A 711-bp fragment was amplified with biovar 3 group-VII, biovar 1 and biovar 2 strains (A). Multiplex PCR products amplified with VII-D8-F1/R1 and Tac-F/R primer set. The 545 bp fragments were amplified with biovar 3 strains (B).

하. Biovar 3, Group-VIII 특이적 분자마커

Group-VIII는 중국에서 분리된 Psa3 균주가 속한 그룹으로 우리나라에서는 분리되지 않은 Group이다. Random primer OPH-7를 사용했을 때 Group-VIII 균주에서 약 800 bp의 절편이 증폭되었다(Fig. 33).

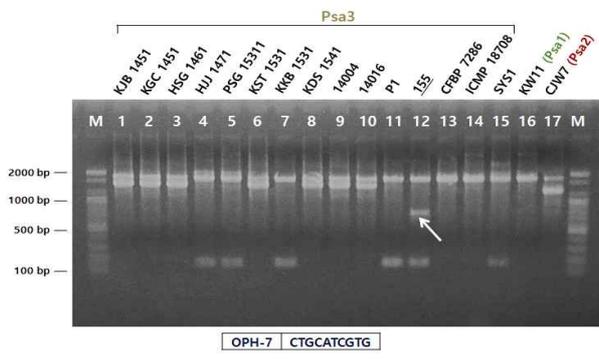


Fig. 33. RAPD polymorphism in strains of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* generated with primer OPH-7. Arrow indicates DNA band specifically amplified with Group-VIII strain.

Group-VIII에 특이적으로 증폭되는 밴드의 염기서열을 결정하였다(Fig. 34).

>6H71(773bp)

CTGCATCGTGCCCCAGTCATGTTGGAGAGCTTGGGTGGCCGCGTAGCAA  
 CGCTGCCTGCTGAGATCCGGACCTTCCAAGAAGACCTGATTGCTCGACTT  
 CAGTGGCTCAGAACTGGCGTTGCCAACGGAGAGTGGCTGGACCGGCCAGC  
 GTATCACGTTCGCAAATCCGAATGCTTCGCTCCGCCAGATCGCGGAGAGCC  
 TTCGCGCCGAAGCGGCCGATTACGCGCGAATCTCGATGCAGCAGCCTTA  
 ACGGCCAAGAGGCTTCGCCTAAAGGAGTTAGAAGCACGGCGGCTACTTTC  
 CGAGCATATCGAAAGTATCGCTCAGGTGATCGAGAATCTTGCCCACAGGG  
 CAAAGCTTCAGAACTGCCTTGATGACATCGGCAATACGCGCTCGATTAGC  
 GTTCTTGCAGGTCAGCTCGCCAGGACTTACGTCAGTGAAGCGTTGGCTGG  
 GCGGATGAACGATGAACTCAGTGGGCTGGATCTTTACCACATCAGGGCGA  
 GGGTTTGTTC AACCGGTGACGCGGGCTCAGTTCGCCTTGGAGTCCAGCTT  
 CACGAATCCCAGCTAGATCCGCATCTTGTTTTAAGTGAGGCGGAGCAACG  
 CATGTGTGCGCTCGCTATTTCTTCGCGGAACTCCACCAGTCAGGATCCA  
 CCTCCGGAATCGTATTCGACGATCCGGTTTCGAGCCTTGACCACAGCCAT  
 CGAACCGCTGTGCGCGACGGATCGTTGAGGAGTCCGCCAACCGGCAAGT  
CATTGTGTTACACACGATGCAG

Fig. 34. Nucleotide sequence of DNA band specifically amplified with the Group-VIII strain. RAPD primer sequences are indicated in red color and the positions of SCAR primers are underlined with blue color.

이 염기서열은 NCBI BLAST Search에서 상동성이 있는 염기서열이 없는 것으로 나타났다. 이 염기서열로부터 Group-VIII에 특이적인 primer VIII6H7-F/R를 설계하였다. VIII6H7-F/R primers는 Group-VIII 균주에서 769 bp의 DNA를 증폭시켰다(Fig. 35).

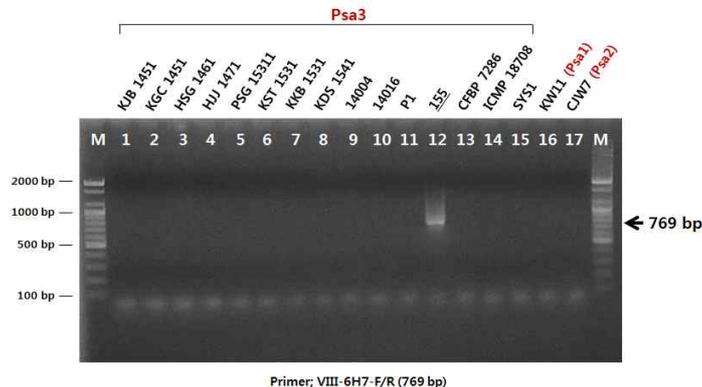


Fig. 35. Agarose gel electrophoresis of PCR product amplified with DNA of Psa strains using VIII6H7-F/R primer set. A 769-bp fragment was amplified with Group-VIII strain (lane 12).

### 가. 우리나라에서 분리된 Biovar 3 균주들의 다양성

우리나라에서 분리된 Psa3 균주를 대상으로 본 연구를 통해 개발된 분자마커를 이용하여 Group을 결정하였다(Table 3).

Table 3. Identification of group of Psa3 strains isolated in Korea

Group	Strains	Total
I	GDG12, HJC14061, KSS14611, HYH1461, KTS21461, KBJ1461, LSC1461, JKS1471, KDW1531, LCHG1549, KSR1531, JYG1561, YBH1561, KYH1561, CHS1561, MHS1561, ASR1561, SDK1561, LJH1621, KHS1621, LCH1645, KSS1641, JC1641, LYJ1661, SPD21661, KJS31661, KDS1664, LSJ1661, KSJ1721, KDN1731, HJH1741, KHO1741, KSHY1741, LYJ1741, JYM1741	35
II	KTS21471, KHH16511, LSJ21661, HNF1661	4
III	SYS1	1
IV	KJB1451, KGC1451, HSG1461, KST1531, KDS1541, HI-KH1651, YMS1721, 14004, 14016	9
V	HJJ1471, PSG1535, KCO15630	3
VI	KKB1531	1
Total		53

서로 다른 53개 과수원에서 분리된 Psa3 균주의 Group을 조사한 결과 뉴질랜드 균주가 속하는 Group-I이 약 66%를 차지하여 가장 많았다. 칠레 균주에 속하는 Group-IV가 약 17%, 유럽 균주가 속하는 Group-II가 약 8%를 차지하였다. 기타 Group은 그 기원을 알 수 없으나 중국에서 유래한 것으로 보여 진다.

**나. 본 연구에서 개발된 분자마커 목록**

본 연구에서 개발된 참다래 궤양병균 집단에 특이적인 분자마커는 Table 4와 같다.

Table 4. PCR primers developed in this study

Name	Target	Nucleotide sequence (5'→3')	Annealing Temp.(°C)	Size (bp)	Reference
P.s.a.-F	P. s. pv. actinidiae (all strains)	CAG AGG CGC TAA CGA GGA AA	65	311	Balestra et. al., (2013)
P.s.a.-R		CGA GCA TAC ATC AAC AGG TCA			
PsJ-F	Biovar 1	GAC GTC GAC GAC AAG GTG AT	65	481	this study
PsJ-R		AGT AAA CCG TGC CGT CAT CTC			
PsK-F	Biovar 2	GAC AAA GCC AAA AAG GCG A	65	413	this study
PsK-R		TGC CAA GCC CAA GTA TCC AAG C			
Tac-F	Biovar 3	CGG GCT AGA CAG TAC GCT GT	65	545	this study
Tac-R		CAG GCC CTT CTA CCG CTA C			
PaNZ-F3	group I	TGA AAC GCC GGC CTT TTT CGG TG	65	533	this study
PaNZ-R3		CGG GCA TTG ATG GTG TGA TGA			
PaI-F	group II	GTT TCG CTC CGT TTG TTC CGA T	65	473	this study
PaI-R2		CAC TCG TCT CAC AGC CAC AA			
PKN-F2	group III	AGC GAG TCG CTG AAT TGC GAA C	65	771	this study
PKN-R4		ATG CTC GAT ACA CCA CAC AAT G			
IVH72-F1	group IV	CCG CGC CTT GAT CGC GGG CC	68	507	this study
IVH72-R3		AGG ATT TGC GGC TTA TTC AG			
V3H5-F1	group V	CGA AAT GAA CCG TTT AAT ATC G	65	380	this study
V3H5-R		ACG CCA GAC ACT ATT AAT TTG C			
VI-B10-F	group VI	GTA AAG AGG AGC GCG ATA TC	68	507	this study
VI-B10-R		AAT ACA GGG ACC CCG GAG CT			
VII-D8-F1	group VII	GTG TGC CCC ACA CGT AGG GT	65	711	this study
VII-D8-R1		GTG TGC CCC ATA CTG CGT AA			
VIII6H7-F	group VIII	CTG CAT CGT GCC CCC AGT CA	65	769	this study
VIII6H7-R		ATC GTG TGT GAA CAC AAT GAC T			

# 제1협동과제: 참다래 궤양병균 유전체 비교 분석을 통한 맞춤형 방제기술 기반 구축

## 1. 연구 내용 및 방법

### (1) 참다래 궤양병균으로부터 genomic DNA 추출

본 연구에 사용된 15개의 참다래 궤양병균(이하, Psa) 균주는 Table 1에 정리하였다. 고체 평판배지에서 자란 콜로니를 Ppetone-sucrose-agar 배지(PSA media; peptone 20 g, sucrose 20 g, agar 15 g per 1,000 mL distilled water, pH 7.4)에 접종하여 20°C에서 2 일간 배양한 후 회수하여 genomic DNA (이하 gDNA) 추출에 사용하였다. gDNA는 Biomedic® gDNA Extraction Kit (www.ibiomedic.co.kr)를 이용하여 추출하였다. 추출한 gDNA의 양과 질은 각각 DeNovix DS-11+ Spectrophotometer (DeNovix, 미국)와 아가로스 겔 전기영동을 통해 결정하였다. 유전체 해독을 위한 DNA의 품질은 Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, 미국)을 이용하여 추가로 분석하였다.

**Table 1.** Psa strains used in genome and comparative genome analysis.

Biovar type	Group	Strain name	Origion of strain	Country	Year
Psa1		KW11	<i>Actinidia deliciosa</i> cv. Hayward	Japan	1984
Psa2		CJW7	<i>A. deliciosa</i> cv. Hayward	Korea	1999
		KBE9	<i>A. chinensis</i> cv. Hort16A	Korea	2008
Psa3	Group III	SYS1	<i>A. chinensis</i> cv. Yellow King	Korea (Goheung, Jeonnam)	2011
	Group IV	KJB 1451	<i>A. chinensis</i> cv. Jecy Gold	Korea (Namwon, Jeju)	2014
		HSG 1461	<i>A. chinensis</i> cv. Hort16A	Korea (Jocheon, Jeju)	2014
	Group V	HJJ 1471	<i>A. deliciosa</i> cv. Daeheung	Korea (Wando, Jeonnam)	2014
		PSG 15311	<i>A. chinensis</i> cv. Jecy Gold	Korea (Namhae, Gyeongnam)	2015
	Group VI	KKB 1531	<i>A. chinensis</i> cv. Enza Red	Korea (Bonggae, Jeju)	2015
	Group II	KTS 1471	<i>A. chinensis</i> cv. Hort16A	Korea (Jocheon, Jeju)	2014
		IHL 1	<i>A. deliciosa</i> cv. Hayward	Italy (Lazio)	2011
	Group I	HYH 1471	<i>A. chinensis</i> cv. Hort16A	Korea (Seongsan, Jeju)	2014
		YBH 1561	<i>A. deliciosa</i> cv. Hayward	Korea (Boseong, Jeonnam)	2015
Group VII		P1		China (Zhuang)	2014
Group VIII		155		China (Zhuang)	2014

## (2) Illumina HiSeq2500 플랫폼을 이용한 whole genome sequencing 및 mapping

유전체 해독을 위한 paired-end DNA 라이브러리는 TruSeq<sup>®</sup> DNA Library Prep Kits (Illumina, 미국)를 사용하여 제작하였다. Illumina HiSeq 2500 플랫폼을 이용하여 기존에 보고된 Psa의 유전체 크기(~ 6 Mb; Marcelletti et al., 2011)의 약 250 배를 커버하도록 각 균주당 1.5 Gb의 raw data를 생성하였다.

생성된 raw reads는 SolexaQA package (v.1.13; Cox et al. 2010)의 DynamicTrim 및 LengthSort 소프트웨어를 이용하여 trimming을 수행하였다. Trimming 후 얻어진 clean reads에 대해 ICMP 18884 균주의 유전체 정보(GenBank accession No. CP011972; McCann et al., 2013)를 표준 유전체로 선정하여 Burrows-Wheeler Aligner (BWA) 프로그램(0.6.1-r104)을 이용하여 맵핑을 수행하였다(Li and Durbin, 2009).

## (3) 유전체 정보로부터 SNP, In/Del 및 PAV 변이 발굴 및 마커 디자인

Clean reads를 표준 유전체에 맵핑하여 생성된 파일을 SAMtools (0.1.16) 프로그램을 사용하여 raw SNP (In/Del) 변이를 검출하고, consensus sequence를 추출하였다(Li et al., 2009). Calling된 SNP 위치를 표준 유전체의 위치 정보를 기반으로 intergenic/genic-region으로 분류하였으며, calling된 SNP 위치를 기준으로 특정 균주 혹은 모든 균주에서 공동으로 발생된 SNP를 선발하였다. 선발된 SNP의 위치를 타겟으로 하여 HRM (high resolution melting) 용 SNP 마커를 개발하였다. 다만 타겟 위치에 인접한 다양한 서열 변이가 존재할 경우, 프라이머 디자인의 문제로 인해 마커 개발 대상에서 제외하였다. 프라이머는 Primer 3 (v2.3.5) 프로그램을 사용하여 다음의 조건을 만족하는 프라이머를 디자인하였다(Untergrasser et al., 2012): SNP 변이의 경우 - product size 80-150 bp, primer size 20-24 bp, Tm value 55-65°C; In/Del의 경우 - product size 80-200 bp, primer size 20-24 bp, Tm 55-65°C.

Clean reads를 표준 유전체에 맵핑하여 생성된 파일을 SAMtools (0.1.16) 프로그램을 사용하여 gene 영역에 맵핑된 reads의 개수를 세었다. Gene 영역은 표준 유전체의 track 정보를 확인하여 확보하였다. 시퀀싱 된 균주의 데이터 양을 보정하기 위하여 가장 많은 양으로 시퀀싱된 균주를 기준으로 normalization을 수행하여 다음 조건에 따라 PAV gene을 선발하였다: ① 비교 조합 균주 중 한 균주에서 genome coverage 이상의 reads 개수가 나타나야 하고, 다른 균주에서는 genome coverage 이하의 reads 개수가 나타나야 함. ② 이 중에서 유전자에 맵핑된 reads 개수의 비율이 4배 이상 차이가 나는 경우 PAV로 선발.

## (4) PacBio 플랫폼을 이용한 complete genome sequencing

국내에서만 발견되며 Psa2 biovar에 속하는 2개 균주(CJW7, KBE9)에 대한 complete genome은 Chunlab (www.chunlab.com)에 의해 PacBio (Pacific Biosciences) 플랫폼을 사용하여 수행하였다.

PacBio sequencing data의 assembly는 HGAP2 프로토콜(Pacific Biosciences, USA)을 사용하여 SPAdes (v3.10.1; Algorithmic Biology Lab, St. Petersburg Academic University of the Russian Academy of Sciences)와 PacBio SMRT Analysis (v2.3.0)로 수행하였다. Assembled 컨티그들은 Circlator (v1.4.0; Sanger Institute)로 원형화시켰다.

## (5) Gene prediction과 annotation

Whole genome assemblies의 유전자 예측 및 functional annotation을 위한 파이프라인은 EzBioCloud genome DB를 사용하였다. 단백질 암호화 서열(CDS)은 Prodigal 프로그램(v2.6.2; Hyatt et al., 2010)을 이용하여 예측되었다. tRNA 유전자는 tRNAscan-SE (v1.3.1; Schattner et al., 2005)을 이용하여 검색하였으며, rRNA와 기타 non-coding RNA들은 covariance model 검색으로 Rfam 12.0 DB (Nawrocki and Eddy, 2013)에 대해 검색하였다. CRISPRs는 PilerCR (v1.06; Edgar, 2007)과 CRT (v1.2; Bland et al., 2007)로 검출하였다. CDS는 orthologous groups (EggNOG 4.5; <http://eggnogdb.embl.de>) (Powell et al., 2014)을 reference로 하여 기능에 따라 분류하였다. 보다 상세한 functional annotation을 위해 예측된 CDS들을 UBLAST 프로그램(Edgar, 2010)을 이용하여 Swissprot (UniProt Release 2015), KEGG (Kanehisa et al., 2014) 및 SEED (Overbeek et al., 2005) DB와 비교하였다.

## (6) 비교유전체 분석

Psa biovar에 대한 비교 유전체 분석에 사용된 균주 및 complete 또는 draft genome의 assembly ID 다음과 같다: Psa1 - ICMP 9855 (assembly ID: GCF\_000245435.1), ICMP 9617 (GCF\_000658965.1), PA459 (GCF\_000245455.1); Psa2 - ICMP 19071 (GCF\_000416485.1), ICMP 19073 (GCF\_000416505.1), CJW7 (this study), KBE9 (this study); Psa3 - CRAFRU8.43 (CRAFRU8.43), Psa NZ V-13 (GCF\_000648735.3 ), CFBP 7286 (GCF\_000245415.1), CH2010-6 (GCF\_000245475.1), ICMP 19455 (GCF\_000344515.2), ICMP 18801 (GCF\_000416945.1), ICMP 19097 (GCF\_000416725.1); Psa4 - ICMP 19099 (GCF\_000416805.1), ICMP 18883 (GCF\_000416785.2), ICMP 18807 (GCF\_000344535.1), ICMP 19094 (GCF\_000416745.1), ICMP 19100 (GCF\_000416825.2); Psa5 - MAFF 212056 (GCA\_001270005.1). 2개 균주(CJW7, KBE9)의 genome 정보를 제외한 나머지 18개의 Psa 균주에 대한 complete 또는 draft genome 정보는 EzGenome DB (<http://www.ezbiocloud.net/>)로부터 확보하였으며, Psa2 균주(CJW7/KBE9)와의 average nucleotide identity (ANI) 값을 계산하기 위하여 사용하였다. ANI 계산 후, query genome (CJW7/KBE9)을 작은 절편(1020 bp)으로 절단한 후, BLAST 알고리즘을 이용하여 두 유전체 서열 간에 가장 높은 수치를 보이는 쌍을 선발하였다. 계산된 ANI 수치를 이용하여 UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) dendrogram을 작성하였다. 18개의 유전체 서열과 두 개 Psa2 균주(CJW7, KBE9)에 대한 유전체 서열을 이전의 방법(Chun, 2009)에 따라 comparative genomic method를 이용하여 비교하였다. 간략히 서술하면, 타겟 유전체에서 query ORF와 상동성이 있는 구역을 BlastN 알고리즘을 이용하여 결정하고, pairwise global alignment를 이용하여 배열하였다. 해당 컨티그에서 일치하는 구역을 추출하고 homolog로 처리하여 저장하였다.

## (7) SNP 검출 마커의 제작

PCR을 통해 SNP 변이를 마커로 전환하기 위한 프라이머는 이전의 방법에 따라 디자인하여 제작하였다(Janssens et al., 1995). PCR 프라이머의 디자인 시에 정방향 프라이머의 3'-말단에 SNP가 위치하도록 하였으며, 프라이머의 특이성을 부여하기 위하여 SNP 위치에서 두 번째 상류부위의 염기에 transversion mutation (purine bases  $\rightleftharpoons$  pyrimidine bases)을 도입하였다.

## (8) Polymerase chain reaction (PCR)

SNP 또는 PAV 마커를 이용한 PCR 증폭은 다음과 같이 수행하였다. 최종부피 10  $\mu$ l의 PCR 반응 용액에 5 ng gDNA, 10  $\mu$ M의 정방향과 역방향 primer 각 0.2  $\mu$ l, 2x HS™ Taq mix (Dongsheng Biotech Co., Ltd., China) 5 $\mu$ l와 멸균 증류수를 첨가하여 혼합한 후, ABI 2720 thermal cycler (Applied Biosystems)를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응은 95°C 에서 5분간 열변성(heat denaturation)하고, 이어서 25~30회 사이클의 PCR 반응(95°C 30초, 55~60°C 30초, 72°C 45초의 온도 변화 사이클)을 연속하여 수행한 후 마지막으로 72°C 에서 7분간 최종 신장(final extension) 반응을 시켰다. 반응이 종료된 PCR 증폭 산물은 1.2% agarose gel에서 전기영동을 통해 확인하였다. PCR 반응은 동일 시료, 동일 마커에 대해 2회 이상 반복하여 수행하였다.

## 2. 연구 결과 및 고찰

가. 참다래 궤양병균 3개 Biovars (Psa1, Psa2, Psa3)에 대한 유전체 해독 및 비교 유전체 분석

참다래 궤양병균(*Pseudomonas syringae* pv. *acinidiae*, Psa)의 유전체 분석을 위하여 순천 대 고영진 교수 연구실로부터 15개의 균주를 분양 받아 사용하였다(Table 1). 3개 biovar (Psa1, Psa2, Psa3)를 포함하는 총 15개 균주로부터 genomic DNA를 추출한 후 유전체 분석에 사용하였다(Fig. 1).

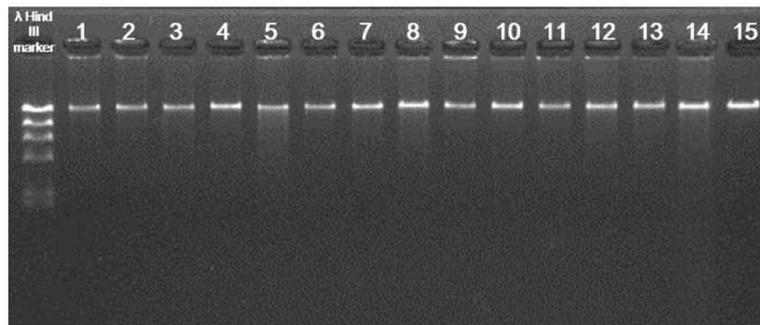


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of genomic DNA from 15 Psa strains cultured on PSA media. 1, KW11; 2, CJW7; 3, KBE9; 4, SYS1; 5, KJB 1451; 6, HSG 1461; 7, HJJ 1471; 8, PSG 15311; 9, KKB 1531; 10, KTS 1471; 11, IHL 1; 12, HYH 1471; 13, YBH 1561; 14, P1; 15, 155.

추출한 genomic DNA의 whole genome sequencing은 Illumina HiSeq2500 플랫폼을 이용하여 진행하였다. Marcelletti 등(2011)은 3가지 Psa 균주, 즉 1984년 일본에서 그린 키위 품종인 ‘Hayward’ 에서 분리한 기준 균주(type strain; J-Psa=Psa1), 일본에서와 동일한 키위 품종에서 1992년 이탈리아에서 분리한 균주(I-Psa=Psa1), 2008년 이탈리아에서 골드 키위 품종 ‘Hort16A’ 에서 분리한 균주(I2-Psa=Psa3)에 대한 유전체 해독을 수행하여 참다래 궤양병균 유전체의 크기가 약 ~6 Mbp 임을 보고하였다.

이 결과를 토대로 참다래 궤양병균 유전체의 200배 이상을 커버하도록 15개 참다래 궤양병균에 대한 유전체 raw data를 생성하였다(자료 미제시). Illumina HiSeq에서 얻어진 reads를 대상으로 quality를 조사하고 reads를 trimming한 결과(Table 2), 최소 129배(KJB)에서 최고 191배(IHK)의 유전체를 커버하였다. 본 유전체 분석 시점에 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)의 GenBank 데이터베이스에 2개 Psa 균주(Psa1, Psa3)에 대한 complete genome이 등록되어 있었으며, 분석에 사용할 reference genome을 선택하기 위하여 두 개의 reference genome을 다운로드하고, 이들 2개의 reference genome 각각에 분석할 4개 균주에서 유래한 reads를 mapping한 결과, 평균 mapping rate은 ICMP 18884와 92%, ICMP 9617과 86%를 보였다(Table 3).

**Table 2.** Results of raw data trimming using LengthSort software of SolexaQA package.

Sample name	No. of reads	Avg. length (bp)	Total length (bp)	Trimmed/raw	Genome coverage
YBH-1	6,131,832	87.82	538,524,223	81.63%	≈ 161X
	6,131,832	69.94	428,887,466	65.01%	
SYS-8	6,930,772	87.72	607,966,322	81.34%	≈ 182X
	6,930,772	69.61	482,428,663	64.54%	
KJB-9	5,013,976	86.93	435,858,725	80.04%	≈ 129X
	5,013,976	67.72	339,531,133	62.35%	
CJW-6	6,270,561	87.62	549,435,581	81.28%	≈ 164X
	6,270,561	69.48	435,668,849	64.45%	
HJJ-11	5,781,540	87.32	504,848,190	80.96%	≈ 151X
	5,781,540	69.52	401,954,971	64.46%	
IHK-14	7,305,965	87.49	639,231,103	81.01%	≈ 191X
	7,305,965	69.05	504,493,383	63.94%	
P1-4	5,942,342	87.96	522,687,840	80.98%	≈ 154X
	5,942,342	67.49	401,049,722	62.14%	
KBE-7	5,732,957	88.96	510,008,938	82.73%	≈ 155X
	5,732,957	73.44	421,051,663	68.30%	
KW-5	5,768,548	88.88	512,681,325	82.68%	≈ 156X
	5,768,548	72.99	421,021,982	67.90%	
KKB-3	5,760,487	88.83	511,697,844	82.75%	≈ 156X
	5,760,487	73.69	424,512,590	68.65%	
HSG-10	5,631,113	89.22	502,414,142	82.77%	≈ 151X
	5,631,113	72.14	406,237,221	66.92%	
HYH-2	5,609,205	88.09	494,123,833	81.66%	≈ 150X
	5,609,205	72.31	405,612,608	67.03%	
155-15	5,976,897	88.27	527,575,891	81.83%	≈ 160X
	5,976,897	72.44	432,988,335	67.16%	
PSG-12	5,915,525	88.60	524,122,471	82.43%	≈ 160X
	5,915,525	73.30	433,609,416	68.19%	
KTS-13	5,733,160	88.67	508,364,416	82.45%	≈ 155X
	5,733,160	73.45	421,108,817	68.30%	
15 ea	179,009,760	79.63	14,249,697,663	75.15%	

**Table 3.** Results of reads mapping of 4 strains to the reference genome.

GenBank assembly accession	GCA_000648735v2	GCA_000658965v1
Strain name	ICMP 18884	ICMP 9617
Biovar type	Psa3	Psa1
Data type	Complete genome	Complete genome
No. of sequence	1	1
Total length (bp)	6,580,291	6,466,847
Average mapping rate of samples	91.82%	85.68%
Reference	McCann et al., 2013	McCann et al., 2013

따라서 상대적으로 보다 높은 mapping rate을 보인 ICMP 18884 (GenBank accession No. CP011972; McCann et al., 2013)를 reference genome으로 선택하여 reads를 alignment하여 reference genome을 대상으로 각 균주별 consensus sequence를 작성하였다. 일차로 3개 biovar에 속하는 4개 균주(Psa1, KW11; Psa2, CJW7; Psa3, KTS 1471 & YBH 1561)에 대해 reference genome에 대한 reads mapping을 수행하였다. 선택한 reference genome에 대해 각 균주의 mapped reads는 약 87~99%이고, reference genome에 mapped region은 약 89~100%를 보였다(Table 4). Reference genome으로 사용된 ICMP 18884는 Psa3에 속한다. 본 실험에 사용한 4개 균주 중 Psa3인 YBH 1561, KTS 1471은 각각 100%, 97%의 region을 커버하는 반면, Psa1 (KW11)과 Psa2 (CJW7)는 두 균주 모두 약 89% region만을 커버하였다. 이러한 결과는 Psa3와 Psa1,2 사이에 유전체 수준에서 차이가 있음을 나타내는 결과라고 하겠다. 유전체 정보를 이용한 분자계통수 결과에서도 Psa3에 비해 Psa1과 Psa2가 유전체 수준에서 더 유사함을 보여주었다(Fujikawa and Sawada, 2016). YBH 1561의 경우, 100%의 mapping 비율을 보여주었는데, 이러한 결과는 YBH 1561과 ICMP 18884가 유전적으로 거의 동일한 균주일 수 있음을 제시한다. ICMP 18884의 경우, 뉴질랜드의 *Actinidia deliciosa* 'Hayward' 품종에서 분리되었으며, YBH 1561도 국내 전남 보성의 동일 품종에서 분리되었다. YBH 1561과 ICMP 18884가 동일 균주인지의 여부에 대해서는 추가 분석이 필요한 것으로 사료된다.

**Table 4.** Mapping summary of the reads from 4 selected strains to the reference genome.

Sample name	No. of total reads	No. of mapped reads	Mapped region* (percentage %)
YBH 1561	12,263,664	12,131,505 (98.92%)	6,580,154 (100.00%)
CJW7	12,541,122	10,863,464 (86.62%)	5,832,723 (88.64%)
KW11	11,537,096	10,227,479 (88.65%)	5,834,250 (88.66%)
KTS 1471	11,466,320	10,672,440 (93.08%)	6,383,187 (97.00%)

각 균주 사이의 변이를 탐색하기 위하여 SAMtools를 사용해 각 균주와 reference genome 사이의 raw SNP를 탐색하였다(Table 5). Reference genome에 mapping된 샘플의 reads의 90%가 동일한 SNP type은 homozygous SNP로 나타내었고, 40-60%만 동일한 SNP type은 heterozygous SNP로 나타내었다. Psa3 (YBH 1561, KTS 1471)에 비해 Psa1 (KW11)과 Psa2(CJW7)이 reference와 더 많은 SNP를 보임을 알 수 있다. 이러한 결과는 Table 4의 reads mapping 결과와도 일치한다. Table 6은 SNP의 위치를 CDS (coding sequence), genic region, intergenic region으로 나누어 분석한 결과이다.

Table 5. Summary of SNP detection.

Sample	No. of total SNP	No. of Homozygous	No. of Heterozygous	No. of others
YBH-1561	43	10	0	33
CJW7	19,066	18,597	107	362
KW11	13,342	13,001	97	244
KTS 1471	913	772	37	104

Table 6. Summary of SNP classification by gene structure.

Sample	No. of total SNP	Region*	Total	Homozygous	Heterozygous	Etc.
YBH-1	43	CDS	39	7	0	31
		Genic-region	39	7	0	31
		Intergenic-region	4	2	0	2
CJW-6	19,066	CDS	16,634	16,355	55	224
		Genic-region	16,634	16,355	55	224
		Intergenic-region	2,432	2,242	52	138
KW-5	13,342	CDS	11,429	11,300	36	93
		Genic-region	11,429	11,300	36	93
		Intergenic-region	1,913	1,701	61	151
KTS-13	913	CDS	744	641	22	81
		Genic-region	744	641	22	81
		Intergenic-region	169	131	15	23

Reference genome 대비 추출된 각 strain의 raw SNP position를 이용하여 strain 별 특이/공통 SNP를 선별하였다(Table 7). 표에서 보는바와 같이 Psa1 (C)와 Psa2 (B) 특이적 SNP는 각각 4,719개와 10,136개인 반면 Psa3인 YBH-1 (A) 특이적 SNP는 176개, KTS-13 (D) 특이적 SNP는 245개가 탐색됨. 이러한 결과는 reference genome으로 Psa3 균주를 사용하였기에 이러한 SNP의 차이를 보이는 것으로 판단된다. 이들 SNP는 각 strain 고유의 SNP로 실험적 검증 작업을 거쳐 각 strain을 탐색하기 위한 분자마커로 사용될 수 있다.

Table 7. Number of SNP positions between 4 strains against the reference genome.

구분	Strain 조합	SNP position 수	구분	Strain 조합	SNP position 수
A	YBH-1	176	BC	CJW-6, KW-5	6,944
B	CJW-6	10,136	BD	CJW-6, KTS-13	4
C	KW-5	4,719	CD	KW-5, KTS-13	1
D	KTS-13	245	ABC	YBH-1, CJW-6, KW-5	243
AB	YBH-1, CJW-6	1	ABD	YBH-1, CJW-6, KTS-13	4,696
AC	YBH-1, KW-5	3	ACD	YBH-1, KW-5, KTS-13	10,114
AD	YBH-1, KTS-13	6,964	BCD	CJW-6, KW-5, KTS-13	173
			ABCD	YBH-1, CJW-6, KW-5, KTS-13	0

균주 고유의 SNP 분자마커 개발이 가능하나 HRM (high-resolution melting)이나 sequencing을 해야 하는 실험적 번거로움을 고려하여 또 다른 서열 변이인 PAV (presence-absence variation)를 탐색하였다. PAV를 탐색하기 위하여 clean reads를 표준유전체에 mapping하여 생성된 BAM format의 파일을 SAMtools (0.1.16) 프로그램을 이용하여 유 gene 영역에 mapping 된 reads 개수를 count하였다. Gene 영역은 표준 유전체의 track 정보를 확인하였으며, sequencing 된 샘플의 데이터양을 보정하기 위해 가장 많은 양으로 시퀀싱된 샘플을 기준으로 normalization을 수행하여 PAV gene을 선별하였다. 2개 균주간 PAV의 탐색 수는 Table 8에 정리하였다. 균주별 특이적/공통적 PAV 수는 Table 9에 정리하였다. Table 9에서 보는 바와 같이 YBH-1에서만 있는 275개 유전자가 확인되었고, Psa1, Psa2 특이적 유전자는 탐색되지 않았다. 이러한 결과는 reference genome을 Psa3로 사용한 결과로서 Psa3와 Psa1, Psa2 간에는 유전체적인 차이가 있음을 의미한다. 이는 SNP 분석에서 나타난 와도 일치한다. 따라서 Psa1, Psa2 특이적 PAV를 탐색하기 위해선 reference genome을 다른 것을 사용해야 할 것으로 판단된다. 같은 Psa3에 속하지만 KTS-13 특이적 PAV는 2개로서 YBH-1에 비교하여 현저히 그 수가 적다. 이는 reference genome이 KTS-13 보다 YBH-1 유전체와 더 유사함을 의미하여, 또한 Psa3내 균주 간에도 유전체가 상당부분 다를 수 있음을 의미한다.

**Table 8.** Summary of PAV gene mining between 2 strains.

비교대상	PAV gene 수
YBH-1 vs. CJW-6	858
YBH-1 vs. KW-5	895
YBH-1 vs. KTS-13	310
CJW-6 vs. KW-5	336
CJW-6 vs. KTS-13	600
KW-5 vs. KTS-13	632

**Table 9.** Number of specific/common genes among Psa strains.

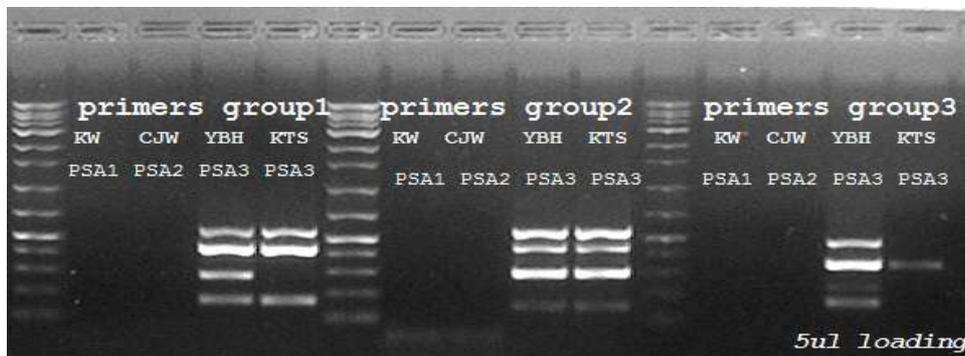
구분	Strain 조합	특이/공통 유전자 수	구분	Strain 조합	특이/공통 유전자 수
A	YBH-1	275	BC	CJW-6, KW-5	1
B	CJW-6	0	BD	CJW-6, KTS-13	1
C	KW-5	0	CD	KW-5, KTS-13	1
D	KTS-13	2	ABC	YBH-1, CJW-6, KW-5	2
AB	YBH-1, CJW-6	21	ABD	YBH-1, CJW-6, KTS-13	172
AC	YBH-1, KW-5	14	ACD	YBH-1, KW-5, KTS-13	133
AD	YBH-1, KTS-13	441	BCD	CJW-6, KW-5, KTS-13	3
			ABCD	YBH-1, CJW-6, KW-5, KTS-13	4647

비교 유전체 분석을 통해 균주별 특이적 PAV가 탐색되어 이를 실험적으로 검정하기 위하여 Psa3 (YBH, KTS)와 Psa1/Psa2 (KW/CJW)를 구분할 수 있는 8개 PAV를 무작위로 선발하였고, 또한 Psa3내 2개의 균주를 구분할 수 있는 4개 PAV를 무작위로 선발하였다(Table 10). IGV (Integrative Genomics Viewer) 상에서 균주별 read가 있는지의 여부를 확인하고 프라이머를 제작하였다.

**Table 10.** PAV markers selected for validation.

PAV marker name	YBH	CJW	KW	KTS	Gene description	Amplicon size (bp)
PAV15	1255	0	0	1234	type VI secretion system effector	164
PAV16	1405	0	0	1352	hypothetical protein	150
PAV17	1543	0	0	1343	XRE family transcriptional regulator	291
PAV18	1374	0	0	1207	hypothetical protein	274
PAV19	3208	0	0	2364	hypothetical protein	418
PAV20	3096	0	0	2203	hypothetical protein	437
PAV21	3605	0	0	2892	voltage-gated chloride channel	543
PAV22	2750	0	0	3227	hypothetical protein	551
PAV23	3162	0	0	0	hypothetical protein	470
PAV24	1718	0	0	0	hypothetical protein	339
PAV25	3213	0	0	0	prophage PSPPH05%2C site-specific recombinase phage integrase	231
PAV26	997	0	0	0	PbsX family transcriptional regulator	169

Inter-biovar 및 Intra-biovar 구분의 활용 등을 고려하여 다수의 유전자를 동시에 분석할 수 있는 multiplex PCR 기법을 정립하고자 하였다. Multiplex PCR을 위하여 유전자마다 PCR 산물의 사이즈에 차이를 주어 프라이머를 제작하고 4개 유전자를 함께 묶어 3개의 그룹으로 나누었다: 그룹 1(YBH, KTS specific) - PAV15(164 bp), PAV18(274 bp), PAV19(418 bp), PAV21(543 bp); 그룹 2(YBH, KTS specific) - PAV16(150 bp), PAV17(291 bp), PAV20(437 bp), PAV22(551 bp); 그룹 3(YBH specific) - PAV23(470 bp), PAV24(339 bp), PAV25(231 bp), PAV26(169 bp). 3개 그룹의 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행한 결과, 모든 프라이머 세트는 KW와 CJW에서는 PCR 증폭을 보이지 않았다(Fig. 2). 그룹 1 PAV18 마커의 경우, YBH 특이적으로 증폭되며, 그룹 3 PAV23, PAV24, PAV26 마커의 경우, YBH 특이적으로 증폭되었다(Fig. 2).



**Fig. 2.** Multiplex PCR results for validation of PAV primers.

확보된 PAV 프라이머 세트를 총 15개 균주 중 유전체 분석에 사용되지 않은 11개 균주 (Psa2 1개, Psa3 10개)에서도 Inter-biovar 및 Intra-biovar 구분 활용 구분이 가능한지 확대 적용하였다. Psa2의 KBE 균주 genomic DNA를 대조구로 PCR을 수행하였다. 이를 위하여 Fig. 2의 프라이머 그룹을 다음과 같이 재구성하였다: 그룹 1 - PAV15(164 bp), PAV19(418 bp), PAV21(543 bp); 그룹 2 - PAV17(291 bp), PAV20(437 bp), PAV22(551 bp); 그룹 3 - PAV26(169 bp), PAV25(231 bp), PAV18(274 bp), PAV23(470 bp). PCR 수행 결과, 그룹 1 프라이머 세트는 3가지 유형의 PCR 증폭 양상을 보였으며, 그룹 2 세트의 경우, intra-biovar간 모두 동일한 PCR 양상을 보였다(Fig. 3). 그룹 3 세트의 경우, 3가지 유형의 PCR 증폭 양상을 보였다(Fig. 4). 따라서 그룹 1과 3 프라이머 세트를 이용하여 Psa1/2와 Psa3간의 구분 및 제한적으로 intra-biovar간 구분이 가능한 것으로 판단된다.



Fig. 3. PCR results using groups 1 & 2 primer sets on 10 Psa3 strains. KBE strain belonging to PsaA2 was used as a negative control.

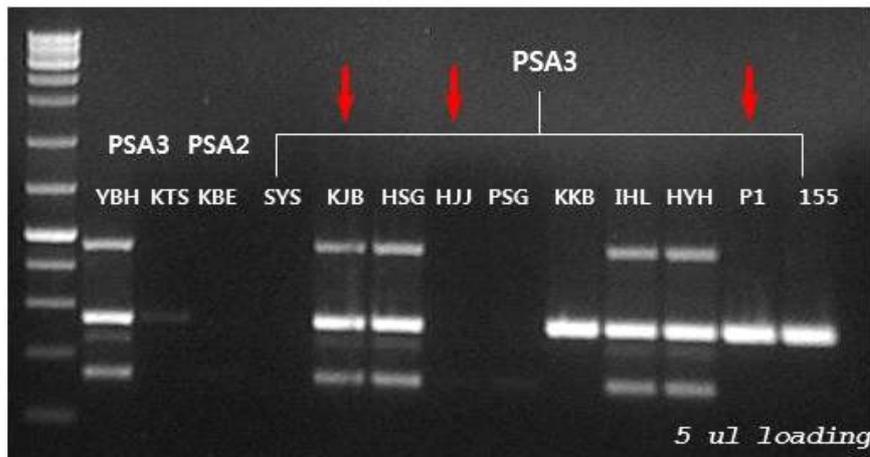


Fig. 4. PCR results using group 3 primer sets on 12 Psa3 strains. KBE strain belonging to Psa2 was used as a negative control.

앞에서 제시한 바와 같이 균주별 특이적 SNP가 탐색되었다(Tables 5, 6, 7). 이를 실험적으로 검정하고 각 균주별 유전형 결정에 활용하기 위하여 Psa3 (YBH, KTS)와 Psa1 (KW), Psa2 (CJW)를 구분할 수 있으며, IGV 상에서 균주별 read가 있는 것으로 확인된 35개 이상의 SNP를 선발하였다.

프라이머 디자인 시에 정방향 프라이머의 3'-말단에 SNP가 위치하도록 하였으며, 프라이머의 특이성을 부여하기 위하여 SNP 위치에서 두 번째 상류부위의 염기에 transversion mutation (purine bases ↔ pyrimidine bases)을 도입하였다. 역방향 프라이머의 경우도 SNP가 존재할 경우, 정방향 프라이머와 동일한 전략을 적용하였다(Table 11). 제작된 프라이머를 이용하여 서로 다른 biovar에 속하는 4개 균주의 genomic DNA에 대해 PCR을 수행하여 증폭 여부를 확인하였다(Fig. 5). 나머지 11개의 균주들에도 확보된 SNP 마커들을 적용하여 정리하였다(Table 12). PCR 결과, KW11 균주 특이 마커 8개, CJW/KBE 균주 특이 마커 9개, CJW 균주 특이 마커 1개, KJB/HSG/IHL/HYH/YBH/155 균주 특이 마커 2개, KJB/HSG/IHL/HYH/YBH 균주 특이 마커 5개, KW/CJW/IHL/HYH/P1/155 균주 특이 마커 1개, KW/CJW/IHL/YBH 균주 특이 마커 1개, KTS 균주 특이 마커 8개를 확보하였다.

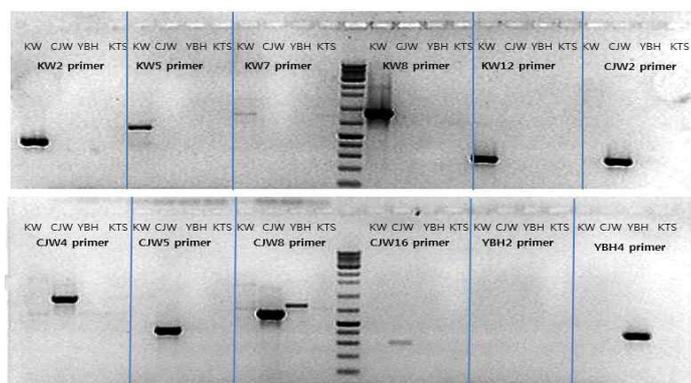
**Table 11.** List of strain-specific SNP markers used in this study. Red and blue letters indicate SNPs and artificial transversion SNPs, respectively.

Psa	Marker	Primer sequence (5'→3')	Amplicon size (bp)	Function prediction
KW	KW2	F GCAGGGCTTCGTTCA <b>ACA</b>	401	tryptophan synthase subunit beta
		R CAAGGAAATGGCCTACTT <b>CGATT</b>		
	KW4	F CAGCAGATCGCGCAG <b>ATG</b>	1039	glutathione ABC transporter ATP-binding protein
		R ACGTGCACATGGAGAA <b>CAT</b>		
	KW5	F TCCTGTTGCAGTTAGGG <b>GAG</b>	563	MATE family efflux transporter
		R GCCGATACGCATGGT <b>TCC</b>		
	KW6	F ATGCTGTGCATTCTCC <b>AGGG</b>	317	amino acid dehydrogenase
		R TCGATCTCTCGCTCA <b>ACTCG</b>		
	KW8	F GATTTTTCTCGCTGA <b>AGGA</b>	917	ABC transporter ATP-binding protein
		R ATTT <b>CGGA</b> ACGTT <b>CGGCCAC</b>		
	KW10	F GCCATCGTCGCTGCTT <b>ACAC</b>	566	permease
		R AGACATGCGCCAG <b>TAGG</b>		
KW11	F GCTCTGACCGAGCGGT <b>GC</b>	206	cyanate hydratase	
	R ATCTCGTGGAAGCGATAG <b>TTG</b>			
KW12	F AATAACGCACTTGAAGAG <b>ACT</b>	302	toxin	
	R AAACGGCAACATCTCAT <b>AGC</b>			
CJW	CJW2	F CAGCTCGTCCTTGAAG <b>CTAT</b>	319	proton glutamate symport protein
		R CTTCTCGGTGCTGTT <b>CGTCC</b>		
	CJW3	F TCATTGATCGCCGCTT <b>CAGTT</b>	219	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase
		R CGAAACAGCTGCCAG <b>TGATG</b>		
	CJW4	F GGCCTGAAGCTCGAC <b>CAAC</b>	903	two-component system sensor histidine kinase
		R TCCATAACCCTGCTG <b>CTCAC</b>		
	CJW5	F TTGCTTCTGGCAAGCAG <b>GGT</b>	414	pilus assembly protein
		R GATCGCCGTCAAG <b>CTCCC</b>		
	CJW6	F TGGCGCTGATGCGTGCC <b>AGC</b>	323	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase
		R TATTGCCCTTGCCG <b>CAAGT</b>		
	CJW7	F CGAAGTATTGCTGGT <b>CGTA</b>	209	restriction endonuclease
		R GGGTTACCGCGACAAG <b>TCGT</b>		
	CJW8	F CTGCAAATTCGCCA <b>ACACC</b>	635	acetyl-CoA synthetase
		R GCAGTGTGGT <b>CGGCCAATA</b>		
	CJW9	F CTCCAAGGAGCTGACC <b>GTT</b>	578	flagellar biosynthesis protein FliR
		R TCAGCAGTTTCTGT <b>CGCC</b>		
CJW10	F CCTTCATTCCGGCAG <b>TACGG</b>	791	peptidase	
	R GCCCAGTGGGGCCAT <b>AT</b>			
CJW16	F ACTGTCGGTATCG <b>CTCCGT</b>	502	cell envelope biogenesis protein TonB	
	R CCGAGTCATTTTGGT <b>GTCCG</b>			

Psa	Marker	Primer sequence (5'→3')	Amplicon size (bp)	Function prediction
YBH1	F	CTGACCAGCGAACGCGAGCGT	191	protein TadZ
	R	ATCGACAGCGCATTACCTCT		
YBH3	F	TGCTGGAGCGGGCGTTCTGG	400	pyoverdine sidechain peptide synthetase
	R	GCGTAATCGCGGTACTTCC		
YBH4	F	CTCGCGGACTTCATGTA	419	TonB-dependent receptor
	R	GGCCGATATCAATGGCGTCC		
YBH5	F	TCACCGACCTGCGCGACAAT	1103	type VI secretion system protein ImpG
	R	ACCGACGTGGCACAGGAGT		
YBH6	F	ACCTGGCCGCCACTGATACA	495	peptide ABC transporter ATP-binding protein
	R	CGCCGCTGATCGTGATAGA		
YBH7	F	ACATTCTGGCGCGTTGCT	1093	type III secretion protein
	R	CACTACCATCTGGGTTTCGAT		
YBH9	F	GCGGGAATAGGAATCGCAGC	695	membrane protein
	R	TGCTGCTCAAGGGGCTCGAT		
YBH10	F	ATTTACGGAAGTGC GCCAGA	848	type III effector
	R	GTTATCCACCGCGTGGAA		
YBH11	F	AAAGAAGTCGAAGTCGCAAGC	654	lon protease
	R	CGGGTTCATCACCTCGACATC		
KTS1	F	ATGAGGAAATCACTACTCGCC	635	peptidoglycan-binding protein
	R	CTCAGGGTCGAGACATGGA		
KTS3	F	GTAACCCGCCTGACGCTGA	510	MATE family efflux transporter
	R	GCCGACCTCGACTGCGTAA		
KTS7	F	CTTTATCCACATCAAACCTTACAG	924	toxin HipA
	R	AGCAAGCCCACGATTGTTTCAG		
KTS10	F	TCGATGCTGCCGAAGAACT	1152	xylose isomerase, AraC family transcriptional regulator
	R	ATTACCGATGCCGCTGAAGG		
KTS12	F	ACGTGGGCCACGGGCGTTCA	536	lipoyl synthase
	R	ATGGACGAAACGCTGCAGCC		
KTS14	F	TTGACCAGGCTGAACACGAG	388	MFS transporter
	R	TGCCGGTCGGGTTGCTACT		
KTS15	F	CTCAATGACGGGTTTCAGAA	795	aldo/keto reductase
	R	ATGTCTCGGACAGATCGCA		
KTS16	F	AGGCAGCGAGTGGGTAATCC	351	cobaltochelatae
	R	AGCCGGTCATTGCAGCAAT		

**Table 12.** PCR results using SNP markers from each 1 of Psa1 and Psa2, and Psa3 strains.

Psa	Psa1		Psa2		Psa3										
	KW 11	CJW 7	KBE 9	Group III	Group IV		Group V		Group VI	Group II		Group I		Group VII	Group VII
				SYS1	KJB 1451	HSG 1461	HJJ 11471	PSG 15311	KKB 1531	KTS 1471	IHL 1	HYH 1471	YBH 1561	P1	155
KW2	+														
KW4	+														
KW5	+														
KW6	+														
KW8	+														
KW10	+														
KW11	+														
KW12	+														
CJW2		+	+												
CJW3		+													
CJW4		+	+												
CJW5		+	+												
CJW6		+	+												
CJW7		+	+												
CJW8		+	+												
CJW9		+	+												
CJW10		+	+												
CJW16		+	+												
YBH1					+	+					+	+	+		+
YBH3					+	+					+	+	+		+
YHB4					+	+					+	+	+		
YBH5					+	+					+	+	+		
YBH6					+	+					+	+	+		
YBH7					+	+					+	+	+		
YBH9					+	+					+	+	+		
YBH10	+	+									+	+	+	+	+
YBH11	+	+									+	+	+		+
KTS1											+				
KTS3											+				
KTS10											+				
KTS15											+				
KTS16											+				
KTS7											+				
KTS12											+				
KTS14											+				



**Fig. 5.** An example of PCR results for validation of SNP primers applied to different biovars.

나. 5개의 Psa3 균주(SYS1, KJB 1451, HJJ 1471, KKB 1531, P1)에 대한 유전체 해독 및 비교 유전체 분석

총 15개의 참다래 궤양병균(Psa) 균주에 대한 유전체 raw data가 이미 확보되어 있었다 (Table 2). 이들 중에서 Psa3 biovar에 속하는 5개의 intrabiovar에 대한 분석을 수행하였다. Psa3에 속하는 ICMP 18884 균주에 대한 complete genome (GenBank accession No. CP011972; McCann et al., 2013)을 reference genome으로 사용하여 reads mapping을 수행한 결과, Table 4의 Psa1/Psa2 균주와 다르게 모든 균주에서 96% 이상의 mapping 비율을 보였다(Table 13). 이는 5개의 균주가 reference 균주와 동일한 Psa3 biovar에 속하는데 기인한 것으로 판단된다.

**Table 13.** Mapping summary of the reads from 5 Psa3 strains to the reference genome.

Sample name	No. of total reads	No. of mapped reads	Mapped region* (percentage %)
SYS-8	13,861,544	12,141,945 (87.59%)	6,301,345 (95.76%)
KJB-9	10,027,952	9,777,683 (97.50%)	6,466,703 (98.27%)
HJJ-11	11,563,080	10,564,001 (91.36%)	6,303,568 (95.79%)
KKB-3	11,520,974	11,093,456 (96.29%)	6,419,322 (97.55%)
P1-4	11,884,684	11,380,275 (95.76%)	6,330,933 (96.21%)

각 균주 사이의 변이를 탐색하기 위하여 SAMtools를 사용해 5개 Psa3 균주와 reference genome 사이의 raw SNP를 탐색하였다(Table 14). Reference genome에 mapping된 샘플의 reads의 90%가 동일한 SNP type은 homozygous SNP로 나타내었고, 40-60%만 동일한 SNP type은 heterozygous SNP로 나타내었다. KJB 균주가 reference 균주와 가장 적은 144개의 polymorphic SNP를 보였다. YBH 균주의 경우, reference와 100%의 mapping 비율을 보였으며(Table 4), 그룹 3의 PAV 마커를 이용한 PCR 증폭에서 YBH와 KJB가 동일한 양상을 보였다(Fig. 4). 따라서 YBH와 KJB 균주는 reference 균주와 유사도가 매우 높은 균주임을 알 수 있다. Table 15는 SNP의 위치를 CDS (coding sequence), genic region, intergenic region으로 나누어 분석한 결과이다.

**Table 14.** Statistics of polymorphic SNPs between reference and 5 Psa3 strains.

Sample	No. of total SNP	No. of homozygous	No. of Heterozygous	Etc.
SYS-8	2,062	1,803	33	199
KJB-9	144	105	0	39
HJJ-11	2,050	1,805	59	186
KKB-3	1,728	1,598	25	105
P1-4	738	603	37	98

**Table 15.** Statistics of polymorphic SNPs between reference and 5 Psa3 strains on gene structure.

Sample	No. of total SNP	Region*	Total	Homozygous	Heterozygous	Etc.
SYS-8	2,062	CDS	1,698	1,558	18	122
		Genic-region	1,698	1,558	18	122
		Intergenic-region	364	272	15	17
KJB-9	144	CDS	130	93	0	37
		Genic-region	130	93	0	37
		Intergenic-region	14	12	0	2
HJJ-11	2,050	CDS	1,666	1,529	28	109
		Genic-region	1,666	1,529	28	109
		Intergenic-region	384	276	31	77
KKB-3	1,728	CDS	1,426	1,347	14	65
		Genic-region	1,426	1,347	14	65
		Intergenic-region	302	251	11	40
P1-4	738	CDS	543	460	18	65
		Genic-region	543	460	18	65
		Intergenic-region	195	143	19	33

2개 Psa3 균주간 polymorphic SNP와 PAV를 분석한 결과, SYS와 HJJ 균주, KKB와 P1 균주간에 적은 수의 SNP 또는 PAV를 보였다(Tables 16 & 17). PAV 마커를 이용한 PCR 양상에서도 SYS와 HJJ 균주, KKB와 P1 균주간에 동일한 PCR 증폭 양상을 보였다(Fig. 3 & 4). 따라서 이러한 결과는 SYS와 HJJ 균주, KKB와 P1 균주간의 유전적 유연관계가 다른 균주들에 비해 매우 높다는 사실을 제시한다.

**Table 16.** Statistics of polymorphic SNPs between two Psa3 strains on gene structure.

No.	Combination	No. of polymorphic SNP	Region		
			CDS	genic-region	intergenic-region
1	SYS vs. KJB	1,547	1,303	1,303	244
2	SYS vs. HJJ	50	36	36	14
3	SYS vs. KKB	1,661	1,409	1,409	252
4	SYS vs. P1	1,359	1,126	1,126	233
5	KJB vs. HJJ	1,521	1,281	1,281	240
6	KJB vs. KKB	805	634	634	171
7	KJB vs. P1	604	461	461	143
8	HJJ vs. KKB	1,644	1,388	1,388	256
9	HJJ vs. P1	1,345	1,117	1,117	228
10	KKB vs. P1	110	85	85	25

**Table 17.** Statistics of PAV gene between 2 Psa3 strains.

No.	Comparison	No. of PAV gene
1	SYS vs. KJB	410
2	SYS vs. HJJ	1
3	SYS vs. KKB	274
4	SYS vs. P1	223
5	KJB vs. HJJ	407
6	KJB vs. KKB	322
7	KJB vs. P1	263
8	HJJ vs. KKB	271
9	HJJ vs. P1	221
10	KKB vs. P1	140

5개의 Psa3 균주들에 대한 비교 유전체 분석을 통해 서열변이(PAV, SNP)들이 탐색되었다 (Tables 14-17). 이를 바탕으로 12개의 Psa3 균주 외에 Psa1 (1 개 균주)과 Psa2 (2개 균주)를 포함하여 균주 간 구분 가능 여부를 분석하기 위하여 프라이머를 제작하였다(Table 18). 균주 특이 SNP 프라이머의 디자인은 앞부분에서 서술한 바와 같다. 제작된 프라이머들을 이용한 PCR 결과를 Table 20에 정리하였다. 전체 42개의 마커 중에서 9개의 마커는 특정 균주에서만 특이적으로 증폭되는 양상을 보였으며, 11개의 마커는 2개의 균주에서 증폭되는 양상을 보였다. 나머지 마커들은 3개 이상의 균주들에서 증폭됨을 볼 수 있었다. 일부 PAV 마커의 경우는 예상 증폭 크기와는 다른 증폭 크기를 보임으로써 균주의 구분이 가능하였다: KKB-PAV2, SYS-HJJ-PAV1, SYS-HJJ-PAV5. Table 10의 PAV 마커, Table 11의 SNP 마커, Table 18의 PAV/SNP 마커를 조합하면 현재 확보된 16개 균주들을 비롯하여 향후 새롭게 분리될 Psa 균주들에 대한 유전형 결정이 가능할 것으로 판단된다. PAV/SNP 마커가 개발된 해당 유전자의 기능은 Table 19에 정리하였다.

**Table 18.** PAV and SNP markers obtained from sequence variation among Psa3 strains. Red and blue letters indicate SNPs and artificial transversion SNPs, respectively.

PAV			SNP		
Marker name	Primer name	Prime sequences (5'→3')	Marker name	Primer name	Prime sequences (5'→3')
KJB-PAV1	KJB-PAV1-F	AATTTTCATACCGCCAAGCTG	SYS-SNP1	SYS-SNP1-F	CCAAACCCCTGGACCAGGTCT
	KJB-PAV1-R	TGCAGCAATACGGTCAATCAT		SYS-SNP1-R	CTTGTCCCAAAGGTAAGTGTGACC
KJB-PAV2	KJB-PAV2-F	AGGGCTCTGGCAAGTCACTA	SYS-SNP2	SYS-SNP2-F	CGCCAGCTGGGATTCAATCAT <b>AAG</b>
	KJB-PAV2-R	AAGCTCAATAATGCGCGACT		SYS-SNP2-R	CGAACGTTCTCGAACAGCACG
KJB-PAV3	KJB-PAV3-F	TGACAGTGATTTGCGGTGAGG	SYS-SNP3	SYS-SNP3-F	GTAGCGCTTCCAGCAATTCGAG <b>GT</b>
	KJB-PAV3-R	TCATCAAGCTGGTCACGAAT		SYS-SNP3-R	ACTGACGTGACGGGGCTGAGAG
KJB-PAV4	KJB-PAV4-F	CGGACTTAGGGACCGACATA	HJJ-SNP1	HJJ-SNP1-F	GAGCGACGTTTCAATTTGCA <b>CT</b>
	KJB-PAV4-R	CAGACCACAGAGCACCAGAA		HJJ-SNP1-R	TTGGCAGACTGCTGCGAATAGC
KJB-PAV5	KJB-PAV5-F	AGAACTTCTCGGCGAAATCA	HJJ-SNP2	HJJ-SNP2-F	GGACGTAAAACGGGCTCT <b>ATC</b>
	KJB-PAV5-R	CCCCATTTCTGACTGAGCAT		HJJ-SNP2-R	AAATGGCCGTGGCAGGCGGC
SYS_HJJ-PAV1	SYS_HJJ-PAV1-F	GTGATGCTGCAGGTCAAAGA	HJJ-SNP3	HJJ-SNP3-F	CGCGACCAGGTGGCAGCG <b>GA</b>
	SYS_HJJ-PAV1-R	GTTGCCGTAGACCAGGTTGT		HJJ-SNP3-R	ACGACACCCATGAGGCTCAAGACG
SYS_HJJ-PAV2	SYS_HJJ-PAV2-F	GTTGGCTGCTCTGGAAACTC	KJB-SNP1	KJB-SNP1-F	AAGGCGCTGAAGGGTTATCGG <b>TAT</b>
	SYS_HJJ-PAV2-R	CACAATGTTGCCTTCCATTG		KJB-SNP1-R	CGCCCGTCCGACCACTTCATC
SYS_HJJ-PAV3	SYS_HJJ-PAV3-F	AATCCCCGGCCATTATCTAC	KJB-SNP2	KJB-SNP2-F	TTCGATGGCGAGCAGAATCAT <b>GCG</b>
	SYS_HJJ-PAV3-R	TGTAGAATGCGAGTTGGAG		KJB-SNP2-R	CGCCAAGCAGGCGTGTGTTC
SYS_HJJ-PAV4	SYS_HJJ-PAV4-F	CAATGACTGGCATCACGTTTC	KJB-SNP3	KJB-SNP3-F	CGAGCTGGTCAAGCGTGTG <b>ACA</b>
	SYS_HJJ-PAV4-R	AGATAACCGTGGGCAAAGTG		KJB-SNP3-R	CCTTCGATGGCGCTGTCTCGTGA
SYS_HJJ-PAV5	SYS_HJJ-PAV5-F	TCACTTCGCTGGTGTTCAG	KKB-SNP2	KKB-SNP2-F	ACCTAAATAGTACAGCTCCT <b>CCGC</b>
	SYS_HJJ-PAV5-R	GTCAGGCCGATGATGAAAAT		KKB-SNP2-R	AGCCGCTCAGGACACTACAAG
KKB-PAV1	KKB-PAV1-F	CATTAGGCGCGTAGAGAAGG	PI-SNP1	PI-SNP1-F	TGAAGTGATCAAGCACTTCGCG <b>AGT</b>
	KKB-PAV1-R	CAACCACCGGAGAAATTGAGT		PI-SNP1-R	GTCGGCATCTCGTCAGTGGAC
KKB-PAV2	KKB-PAV2-F	TGCATGCTCAAGAACCACTG	PI-SNP2	PI-SNP2-F	CATTGGATACGCCGTTCTTT <b>CGGA</b>
	KKB-PAV2-R	TGTTGTTCCGGCTGAGTTGAG		PI-SNP2-R	TGACGTCGCTCAGGTCGAGCTT
KKB-PAV3	KKB-PAV3-F	TCCAGATTGGGAGATGAAGC	PI-SNP3	PI-SNP3-F	GGTGCTGATCGCCCTTGGCA <b>TTT</b>
	KKB-PAV3-R	TGCATCCTCCAACGACATT		PI-SNP3-R	GGCCAGCATCGTGGCATGCAAG
KKB-PAV4	KKB-PAV4-F	TGCAAAACACCACTCACTCC			
	KKB-PAV4-R	GTGTCACACAGGCATCTTGG			
KKB-PAV5	KKB-PAV5-F	CTTCTCCCGCTGTCGATTAC			
	KKB-PAV5-R	AGTTCACTACGCCCCAGATG			
PI(-)-PAV1	PI(-)-PAV1-F	GCTGATGGACAAAGCACTGA			
	PI(-)-PAV1-R	TTGTCGACGCTGTGGTAGAG			
PI(-)-PAV2	PI(-)-PAV2-F	CACGGCTATCTCCGGTTTTA			
	PI(-)-PAV2-R	CTTTACCGCGAGAAGACAGG			
PI(-)-PAV3	PI(-)-PAV3-F	CTGGCTTGCCTGTCTGTAAA			
	PI(-)-PAV3-R	AAACGGGGACAGTTGTTTCAG			
PI(-)-PAV5	PI(-)-PAV5-F	AACCCACCGAGTTCATCAAG			
	PI(-)-PAV5-R	CTGGCAAGCTTAAGGTGAG			
YBH-PAV1	YBH-PAV1-F	CGTGTGCATTGGCAAAATAC			
	YBH-PAV1-R	CGCATTCGCTACAGAAACAA			
YBH-PAV2	YBH-PAV2-F	AGGGCTCTGGCAAGTCACTA			
	YBH-PAV2-R	AAGCTCAATAATGCGCGACT			
YBH-PAV3	YBH-PAV3-F	GGAAGGTAAGAGCGTGCTTG			
	YBH-PAV3-R	ACGGCAGTATCTGGTTCAC			
YBH-PAV4	YBH-PAV4-F	ACTTTAGACGGGGTGCTTT			
	YBH-PAV4-R	GAACGTGTCGACAGAAATGA			
YBH-PAV5	YBH-PAV5-F	TGTTGAAGTGCCGCATAGAG			
	YBH-PAV5-R	CTCGCACGTGATAGCGAATA			
KTS-PAV1	KTS-PAV1-F	ACGGGGAGCGATAGGTAAGT			
	KTS-PAV1-R	ATCGGAGCGCAGTCCACTA			
KTS-PAV2	KTS-PAV2-F	AGTATCAAAGCCGCGAGAAA			
	KTS-PAV2-R	CTCTGCTCAACGTCCACAAA			
KTS-PAV3	KTS-PAV3-F	TGCGGACTCTAAAAACCTT			
	KTS-PAV3-R	ACGTCCTGTCCGAGCTTAAA			
KTS-PAV4	KTS-PAV4-F	TGCAGATTTGCAGCTATGG			
	KTS-PAV4-R	ATCCCCAGCATTTCACTGAG			
KTS-PAV5	KTS-PAV5-F	TGCAATGTCTGTGTGTTCA			
	KTS-PAV5-R	TAACGGTCGACCAGGAAATC			

**Table 19.** List of functional genes corresponding to PAV and SNP markers obtained from sequence variation among Psa3 strains.

Marker type	Marker name	Gene function
PAV	KJB-PAV1	hypothetical protein
	KJB-PAV2	type I restriction-modification system endonuclease
	KJB-PAV3	hypothetical protein
	KJB-PAV4	hypothetical protein
	KJB-PAV5	hypothetical protein
	SYS_HJJ-PAV1	D-ribose transporter ATP-binding protein
	SYS_HJJ-PAV2	glycerol kinase
	SYS_HJJ-PAV3	urea ABC transporter substrate-binding protein
	SYS_HJJ-PAV4	oxidoreductase
	SYS_HJJ-PAV5	urea ABC transporter permease subunit UrtB
	KKB-PAV1	hypothetical protein
	KKB-PAV2	DNA methyltransferase
	KKB-PAV3	hypothetical protein
	KKB-PAV4	pilus assembly protein PilX
	KKB-PAV5	peptidase S24
	PI(-)-PAV1	coenzyme F390 synthetase
	PI(-)-PAV2	fatty acid hydroxylase
	PI(-)-PAV3	MBL fold hydrolase
	PI(-)-PAV5	DEAD/DEAH box helicase
	YBH-PAV1	hypothetical protein
	YBH-PAV2	type I restriction-modification system endonuclease
	YBH-PAV3	hypothetical protein
	YBH-PAV4	hypothetical protein
	YBH-PAV5	hypothetical protein
	KTS-PAV1	hypothetical protein
	KTS-PAV2	hypothetical protein
	KTS-PAV3	hypothetical protein
	KTS-PAV4	hypothetical protein
KTS-PAV5	FMN reductase	
SNP	SYS-SNP1	DOPA 4%2C5-dioxygenase
	SYS-SNP2	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
	SYS-SNP3	urea ABC transporter permease
	HJJ-SNP1	peptidase
	HJJ-SNP2	polyketide synthase
	HJJ-SNP3	sigma factor AlgU negative regulatory protein
	KJB-SNP1	methyl-accepting chemotaxis protein
	KJB-SNP2	allantoate amidohydrolase
	KJB-SNP3	NAD-dependent dehydratase
	KKB-SNP2	hypothetical protein
	PI-SNP1	anthranilate synthase subunit II
	PI-SNP2	diaminohydroxyphosphoribosylaminopyrimidine deaminase
	PI-SNP3	lipid-A-disaccharide synthase

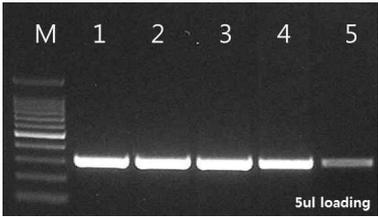
**Table 20.** PCR results using PAV and SNP markers obtained from sequence variation among Psa3 strains. +, positive PCR amplification; +(★), strain with larger PCR amplicon than expected amplicon size.

Marker type	Marker name	Psa1	Psa2		Psa3											
		KW	KBE	CJW	YBH	KJB	HSG	IHL	HYH	PI	155	KTS	KKB	SYS	HJJ	PSG
PAV	KJB-PAV1				+						+					
	KJB-PAV2				+											
	KJB-PAV3				+											
	KJB-PAV4				+											
	KJB-PAV5				+							+				
	KKB-PAV1				+					+				+		
	KKB-PAV2				+(★)	+				+				+		
	KKB-PAV3				+					+				+		
	KKB-PAV4				+							+	+	+		
	KKB-PAV5								+				+			
	YBH-PAV1					+	+	+	+	+						
	YBH-PAV2					+	+	+	+	+					+	
	YBH-PAV3					+	+	+	+	+					+	
	YBH-PAV4					+	+	+	+	+						
	YBH-PAV5					+					+			+		
	SYS-HJJ-PAV1	+			+(★)	+						+	+			
	SYS-HJJ-PAV2	+										+	+			
	SYS-HJJ-PAV3	+				+				+	+	+	+		+	+
	SYS-HJJ-PAV4	+				+				+	+	+	+		+	+
	SYS-HJJ-PAV5	+			+(★)	+	+(★)	+(★)	+	+	+(★)	+	+	+(★)	+	+
	KTS-PAV1												+			
	KTS-PAV2												+			
	KTS-PAV3									+			+			
	KTS-PAV4									+			+			
	KTS-PAV5									+			+			
PI(-)-PAV1											+					
PI(-)-PAV2	+				+					+	+	+	+			
PI(-)-PAV3	+	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	
PI(-)-PAV5					+	+	+	+	+			+	+	+	+	
SNP	SYS-SNP1		+	+	+					+	+	+	+			
	SYS-SNP2	+	+	+	+					+	+	+				
	SYS-SNP3													+		
	HJJ-SNP1														+	+
	HJJ-SNP2														+	+
	HJJ-SNP3														+	+
	KJB-SNP1						+	+								
	KJB-SNP2						+	+								
	KJB-SNP3	+	+	+	+	+	+	+								
	KKB-SNP2						+	+	+	+	+		+			
	PI-SNP1										+					
	PI-SNP2										+					
	PI-SNP3										+					

다. Psa 분자표지(PAV, SNP)를 이용한 참다래 재배농가의 키위 궤양병 유전형 분석

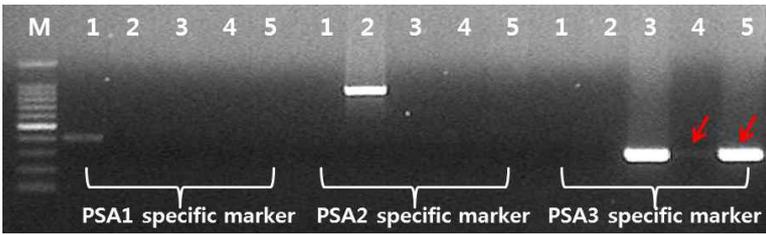
•경남 소재 참다래 재배 농가(박OO 농가)의 궤양병 유전형 비교 분석 사례: 해당 농가에 서 수입 꽃가루를 사용하여 수분시킨 결과, 궤양병이 발병한 것으로 판단하였다. 제1협동 과제에 수분 시 사용한 꽃가루 시료와 궤양병 증상을 보이는 개체목에서 채취한 세균 유출 액(면봉)을 제공하여 꽃가루 시료와 궤양병 발병 개체목에 존재하는 참다래 궤양병균(이하 Psa)이 동일 유전형을 갖는지 여부를 의뢰하였다.

제공된 2점의 시료에 대해 Psa 존재 유무를 판단하기 위하여 Psa universal primer (Kiwi-PSA-UNI-F, 5'-CAGAGGCGCTAACGAGGAAA-3'; Kiwi-PSA-UNI-R, 5'-CGAGCATACATCAACAGGTCA-3')를 이용하여 PCR을 수행한 결과, 꽃가루 및 면봉 추출 gDNA 모두에서 PCR 산물이 검출되어 꽃가루와 면봉 시료 모두에 참다래 궤양병균이 존재함을 확인할 수 있었다(Fig. 6).



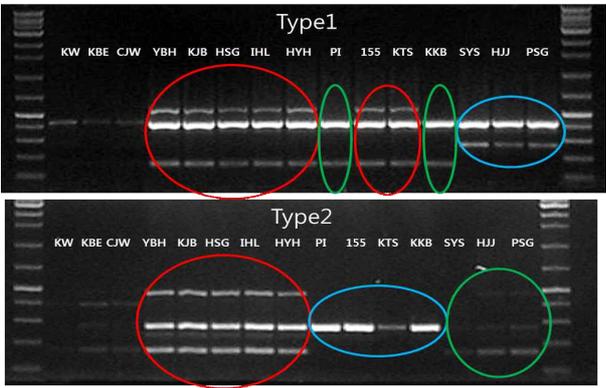
**Fig. 6.** PCR using universal primers for control gDNA and unknown samples. M: size marker. Lane 1, Biovar Psa1 positive contol; Lane 2, Biovar Psa2 positive contol; Lane 3, Biovar Psa3 positive contol; Lane 4, gDNA from cotton swab; Lane 5, gDNA from pollen grains.

꽃가루와 면봉에 존재하는 궤양병균이 Psa1, Psa2 혹은 Psa3인지의 여부를 확인하기 위해 각 biovar 특이 마커를 이용하여 PCR을 수행한 결과, Psa3 특이 마커에서 PCR 산물이 검출되어 두 시료에 존재하는 궤양병균은 Psa3임을 확인할 수 있었다(Fig. 7).



**Fig. 7.** PCR using markers for specific genotyping of Psa1, Psa2, and Psa3. M, size marker; Lane 1, Psa1 positive contol; Lane 2, Psa2 positive contol; Lane 3, Psa3 positive contol; Lane 4, gDNA from cotton swab; Lane 5, gDNA from pollen grains.

참다래 궤양병원균 type 1, type 2 multiplex 마커를 이용하여 본 연구진에서 보유중인 biovar Psa3를 3 개의 group으로 나눌 수 있다(Fig. 8).



**Fig. 8.** PCR amplicon patterns using type 1 and type 2 multiplex markers.

꽃가루와 면봉 추출 gDNA에 대해 type 1, type 2 mutiplex 마커를 적용한 결과, type 1에서 꽃가루와 면봉 모두에서 붉은색 group의 형태로 PCR 되었고, type 2에서도 꽃가루 및 면봉 모두에서 붉은색 group의 형태로 PCR 되었다. 이러한 PCR 양상으로 볼 때, 꽃가루와 면봉에 존재하는 키위 궤양병균은 Psa3의 YBH, KBJ, HSG, IHL, HYH와 같은 그룹에 속할 것으로 판단되었다(Fig. 9 & 10).

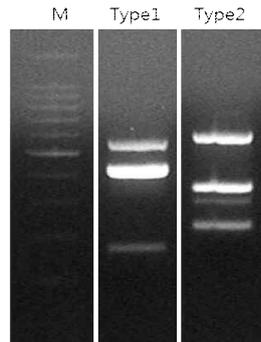


Fig. 9. Multiplex PCR results using type 1 and type 2 mutiplex markers for the gDNA from cotton swab. M, size marker.

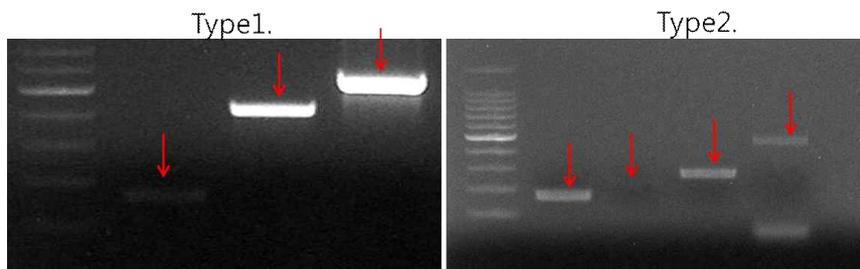


Fig. 10. Multiplex PCR results using type 1 and type 2 mutiplex markers for the gDNA from pollen grains. M, size marker.

Psa3에 속하는 YBH, KBJ, HSG, IHL, HYH 중 일부를 구분할 수 있는 SNP marker (A specific), PAV marker (B and C specific, B specific, A' specific) 마커를 이용하여 PCR을 수행한 결과, A specific 마커는 꽃가루와 면봉의 PCR 증폭 양상이 달랐고, B and C specific 마커에서는 꽃가루와 면봉 모두에서 검출되었으며, B specific 마커는 꽃가루에서만 PCR 되었고, A' specific 마커는 면봉에서만 PCR이 되었다(Fig. 11).

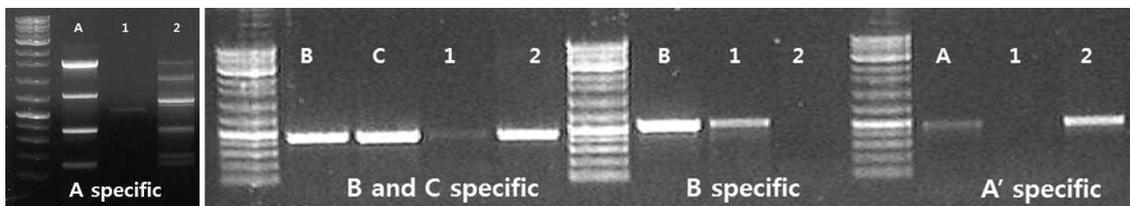


Fig. 11. PCR results using SNP and PAV markers for the gDNAs from cotton swab and pollen grains. M, size marker; Lane 1, gDNA from pollen grains; Lane 2, gDNA from pollen grains; Lane A, A marker positive control; Lane B, B marker positive control; Lane C, C marker positive control; A' , A' marker positive control.

이상의 PCR 결과로부터 ① 꽃가루와 면봉에 참다래 궤양병균이 존재하며, ② 꽃가루와 면봉에 존재하는 참다래 궤양병균은 biovar Psa3로 확인되며, ③ 꽃가루와 면봉에 존재하는 참다래 궤양병균은 각각 서로 다른 유전형질을 갖는 것으로 판단된다.

라. 국내 고유 Psa2 균주(CJW7, KBE9)에 대한 complete genome 해독

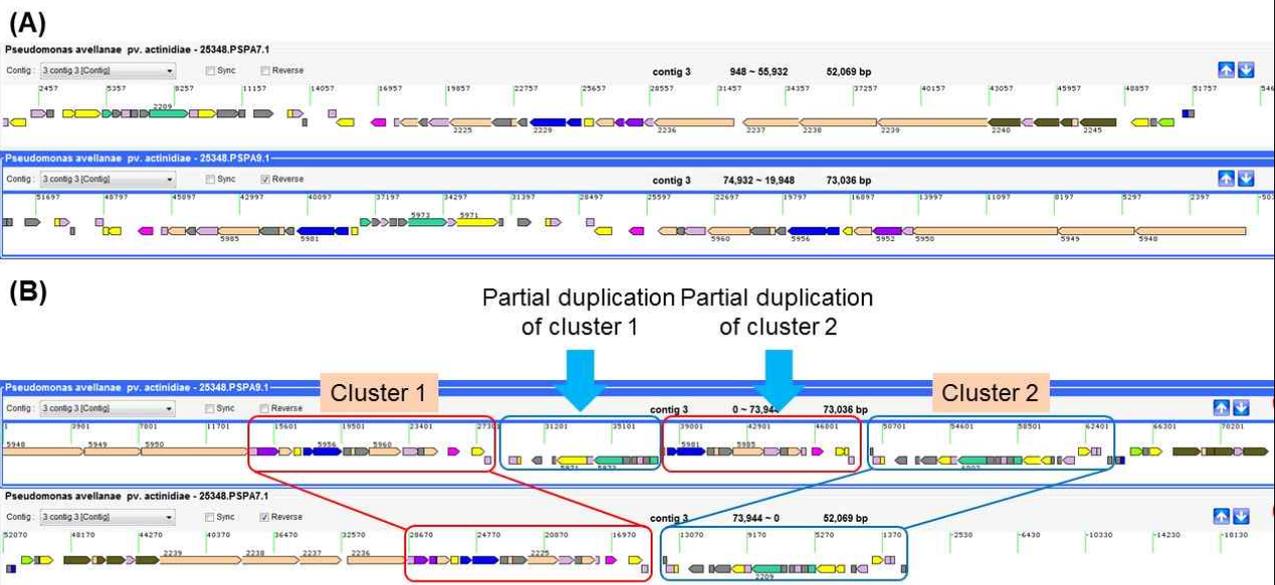
2011년 Marcelletti 등에 의해 3개의 Psa 균주(Psa1 2개, Psa3 1개)에 대한 draft genome 해독에 관한 보고가 이루어진 이래, 여러 biovar에 속하는 다양한 균주들에 대한 draft genome 해독이 이루어져 왔다(Mazzaglia et al., 2012; Butler et al., 2013; McCann et al., 2013; Cuntly et al., 2016). 현재까지 Psa에 대한 complete genome 해독은 Psa1 (KW11 균주; McCann et al., 2013), Psa3 (ICMP 18884 균주; McCann et al., 2013; Templeton et al., 2015), Psa5 (MAFF212056 균주; Fujikawa and Sawada, 2015). KW11 균주(Psa1)의 경우, 6,497,695 bp 크기의 유전체를 가지며(30,848 bp 크기의 플라스미드 포함), ICMP 18884 균주(Psa3)는 6,629,992 bp 크기의 유전체를 갖는다(74,423 bp 크기의 플라스미드 포함). 일본에서 분리된 MAFF212056 균주(Psa5)는 Psa2와 유전적으로 가깝고, 6,342,665 bp 크기의 유전체를 가지나 플라스미드는 존재하지 않는다. 우리나라에만 분포하는 Psa2는 중간 정도의 병원성을 나타내며, 파세올로톡신 생성 유전자가 존재하지 않는 대신에 플라스미드에 위치하는 유전자들에 의해 코로나틴(coronatine) 독소를 생성한다 (Han et al., 2003; Lee et al., 2005; Chapman et al. 2012; EPPO 2012; Koh et al. 2012). 현재까지 biovar Psa2에 대한 complete genome 해독이 이루어진 바가 없다.

따라서 본 연구진은 우리나라에만 분포하는 biovar Psa2의 complete genome을 완성하고자 하였다. 이를 위하여 각각 1999년과 2008년에 분리된 2개의 Psa2 균주(CJW7-1999년 *Actinidia deliciosa* 'Hayward'에서 분리; KBE9-2008년 *A. chinensis* 'Hort 16A'에서 분리)에 대하여 PacBio RS II 플랫폼(<http://www.pacificbiosciences.com/>)을 이용한 유전체 해독을 수행하였다. Table 21은 두 균주에 대한 complete genome 분석 결과의 요약이다. 유전체 해독 결과, CJW7과 KBE9에 대해 각각 6개와 4개의 contig가 확보되었고, 전체 유전체 크기는 각각 6,482,518 bp와 6,565,175 bp였다. CJW7과 KBE9에 대해 확보된 contig를 바탕으로 추정된 유전자의 수는 각각 5,914개와 6,000개였다. CJW7과 KBE9의 GC 비율은 다른 Psa 균주의 비율과 거의 유사하였다(Marcelletti et al., 2011; Fujikawa and Sawada, 2015; Cuntly et al., 2016). 기존에 해독된 Psa1, Psa3, Psa5 균주의 경우, 대략 5,600~6,000개의 protein-coding genes을 갖는 것으로 예측이 되었다(Marcelletti et al., 2011; McCann et al., 2013; Templeton et al., 2015). 현 단계에서 CJW7과 KBE9에 대해 1-2개의 contig로 이루어진 complete genome을 완성하지 못하였으나, 완성된 contig의 수, 유전체의 크기, 예측 유전자의 수로 미루어 본다면, 국내 고유 Psa2 균주에 대해 거의 완전한 형태의 genome 해독이 이루어진 것으로 판단된다. 다수의 Psa 균주들에 대한 draft genome의 경우, 수백에서 수천 개의 contig로 이루어진 genome 정보들이다(Marcelletti et al., 2011; Mazzaglia et al., 2012; Butler et al., 2013; McCann et al., 2013).

**Table 21.** Summary of genome information from two Psa2 strains, CJW7 and KBE9.

	CJW7	KBE9
Genome size (bp)	6,482,518	6,565,175
No. of contigs	6	4
Size of each contig (bp)	contig 1, 1,572,896; contig 2, 817,180; <b>contig 3, 52,069</b> ; contig 4, 47,483; contig 5, 3,565,805; contig 6, 427,085	contig 1, 6,343,136; contig 2, 101,554; <b>contig 3, 73,036</b> ; contig 4, 47,449
No. of ORFs	5,914	6,000
No. of rRNA genes	14	17
No. of tRNA genes	62	64
GC ratio (%)	58.62	58.45

CJW7의 경우 52,069 bp 크기의 contig가 circular form (즉, plasmid)으로 예측되었으며, 55 개의 유전자가 존재하는 것으로 예측되었다. CJW7가 plasmid 형태인지의 여부를 확인하기 위하여 contig의 양 말단에서 프라이머를 디자인하여 PCR을 수행한 결과, PCR 밴드의 증폭을 확인하였다(자료 미제시). CJW7의 contig 3과 KBE9의 contig 3은 gene organization에 있어서 매우 유사하다(Fig. 12A). 다만, KBE9은 2곳의 클러스터에서 tail-to-tail 형태로 partial gene duplication이 일어난 것으로 예측되었다(Fig. 12B).



**Fig. 12.** (A) Comparison of gene organization of contig 3 (plasmid) from CJW7 and KBE9 strains. Top, KBE9; Bottom, CJW7. (B) Detailed illustration of partial gene duplication in KBE9 strain.

본 연구를 통해 확보된 2개의 Psa2 complete genome과 18개의 draft 혹은 complete genome 정보를 활용하여 유전체 수준에서의 유사도를 분석하여 UPGMA dendrogram을 작성한 결과, biovar 그룹을 반영하여 5개의 그룹으로 나누어짐을 확인할 수 있었다. 또한 Psa5의 경우, 일본 고유의 biovar인 Psa1 보다는 우리나라 고유의 Psa2와 유연관계가 더 높음을 볼 수 있었다(Fig. 13). 이러한 결과들은 이전의 결과들과도 일치한다(Mazzaglia et al., 2012; McCann et al., 2013; Fujikawa and Sawada, 2016).

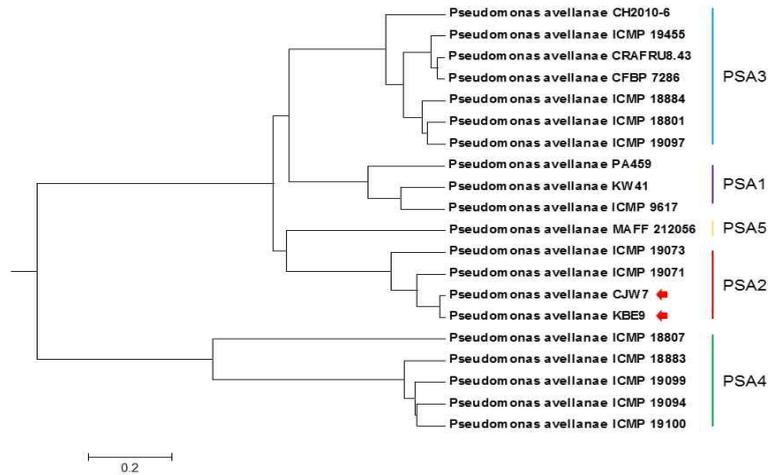


Fig. 13. A UPGMA dendrogram among 20 Psa strains using ANI (average nucleotide identity) values. ANI value for each combination between strains was calculated, and a UPGMA dendrogram was constructed using the values.

단백질을 암호화하는(CDS) 모든 orthologous gene (이종상동유전자)들에 대해 중복이 없는 유전자 세트를 만들어서 Pan-genome Orthologous Groups (POGs)을 만들었다. 이를 토대로 5개 biovar에 속하는 20개 균주에 대해 core-genome을 분석한 결과, 4,162개의 유전자가 20개 유전체 모두에서 발견되는 것을 볼 수 있었다(Fig. 14). Baltrus 등(2011)은 다양한 식물을 감염시키는 19개의 *P. syringae* 균주들에 대해 core genome 분석을 한 결과, 3,397개의 유전자가 모든 유전체에 존재함을 밝혔다. 본 연구에서는 *P. syringae* pv. *actinidiae*에 속하는 균주들만을 대상으로 비교하였기 때문에 훨씬 더 많은 수의 core gene이 확인된 것으로 판단된다.

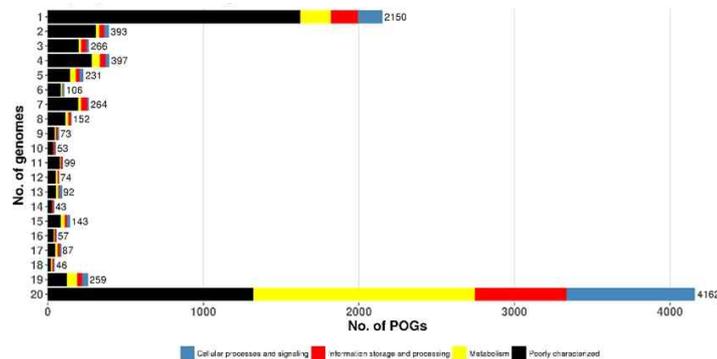


Fig. 14. Frequency of POGs among 20 Psa genomes. 4,162 of core gene sets were identified.

각 biovar 별로 유전체 완성도가 가장 높은 5개의 대표 균주를 선정해서 core genome 분석을 수행한 결과, 모든 균주에 존재하는 4,398개의 유전자가 core gene set으로 확인되었다(Fig. 15A). 본 연구에서 complete genome 수준으로 완성된 2개의 Psa2에 대해 분석한 결과, 5,352개의 유전자를 공유하는 반면, 각 균주 특이적인 유전자도 존재함이 확인되었다(Fig. 15B). 이러한 결과는 플라스미드 유전자 배열 구조에 있어서의 차이와 더불어(Fig. 12) 국내에 분포하는 Psa2 균주에서도 지속적인 진화가 진행되고 있음을 보여준다.

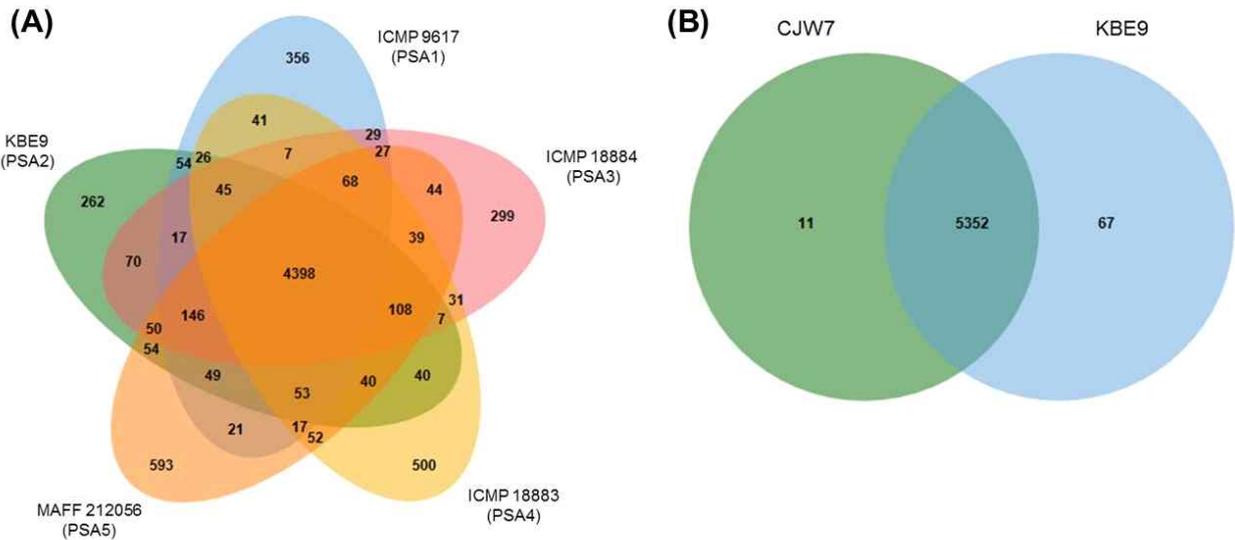


Fig. 15. Core-genome analysis among representative strains of 5 biovars (A) and between two Psa2 strains, CJW7 and KBE9 (B).

본 연구에서 2개의 국내 고유 Psa2 biovar 균주(CJW7, KBE9)에 대해 complete genome 수준의 유전체가 확보되었다(Table 21). 유전체 정보 결과들을 바탕으로 Psa 연구에서 가장 중요한 연구 주제들 중의 하나인 병원성 관련 인자들을 중심으로 5개 biovar 간에 비교 분석을 수행하였다.

■ 식물 독소(코로나틴) 생합성 관련

*Pseudomonas syringae*는 다양한 식물 독소(phytoxin)를 만들어 내는 것으로 알려져 있는데, 이들 식물 독소는 병원성(pathogenicity)을 위해서 반드시 필요하지는 않으나, 주요 독성 인자(virulence factor)로써 병의 중증도(disease severity) 증가시키는 것으로 알려져 있다(Bender et al., 1996; Bender et al., 1999). 참다래 궤양병균 biovar 중에서 Psa2는 코로나틴(coronatine) 독소를 생성하는 것으로 알려져 있는데, 코로나틴은 2가지 구성요소로 이루어진 화합물이다: coronafacic acid (CFA)와 CMA (coronamic acid). CFA는 acetyl-COA와 malonyl-COA를 전구물질로 사용하는 polyketide 경로에서 만들어지며, CMA는 아미노산인 isoleucine으로부터 만들어진다. 각각 합성된 CFA와 CMA는 ligase에 의한 coupling 반응을 통해 최종산물인 코로나틴으로 전환된다(Bender et al., 1999).

*P. syringae*에서 코로나틴 독소의 생합성 및 조절 관련 유전자는 주로 플라스미드에 위치하는 것으로 알려져 있다(Bender et al., 1996; Alarcón-Chaidez et al., 1999; Bender et al., 1999). CJW7의 contig 3 (plasmid)에는 55개의 유전자가 존재하는 것으로 예측되었는데(Table 22), 이 중에서 총 22개 유전자가 코로나틴 생합성 관여할 것으로 분석되었다(CMA 생합성 유전자 6개, CFA 생합성 유전자 14개, 조절 유전자 2개). 콩에 병증을 일으키는 *P. syringae* pv. *glycinea* PG4180에서는 생합성 조절 관련하여 2개의 response regulator 와 1개의 histidine kinase 유전자가 존재하는 것으로 보고되었으나(Alarcón-Chaidez et al., 1996), Psa2 CJW7 균주에서는 1 세트의 two component regulatory system으로 구성되어 있었다(Table 22 & Fig. 16). KBE9의 contig 3 (73,036 bp)도 일부 구역에서의 gene duplication을 제외하고, CJW7의 contig 3와 매우 유사한 유전자 구성 및 배열을 보여주었다. KBE9의 contig 3도 plasmid 형태로 존재하는지의 여부를 확인하기 위하여 contig의 양 말단에서 프라이머를 디자인하여 PCR을 수행한 결과, PCR 증폭을 확인하였다(자료 미제시). KBE9의 contig 3에서 2 곳의 gene duplication구역에서 1 곳은 CMA 생합성 및 조절 구역으로 확인되었다(Figure 13B). 여러 환경 요인들 중에서 특히 온도 조건은 코로나틴의 생성과 밀접한 관련을 갖는다. PG4180에서 코로나틴의 생성은 18도에서 최대로 생성되며, 30도에서는 거의 생성되지 않았다(Palmer and Bender, 1993). 코로나틴 생합성 유전자의 발현은 온도 조건에 의해 전사수준에서 조절되는 것으로 알려졌으나(Liyanage et al., 1995; Palmer et al., 1997), 조절인자 중에서 histidine kinase 유전자(*corS*)의 발현은 온도에 의해 조절을 받았으나, response regulator의 발현은 조절을 받지 않았다(Ullrich et al., 1995). 이러한 온도 조건에 의한 코로나틴의 생성량과 생합성 관련 유전자의 발현 양상은 초봄에 병증이 심하게 나타나는 참다래 궤양병균의 병환(disease cycle)과도 일치한다(Koh, 1995).

**Table 22.** Gene annotation of contig 3 (plasmid) from CJW7 strain and their functional roles. CMA, coronamic acid; CFA, coronafacic acid; Regulation, regulatory gene of coronatine biosynthesis.

No.	Locus name	Locus product	Function
1	PSPA7_02196	hypothetical protein	
2	PSPA7_02197	hypothetical protein	
3	PSPA7_02198	hypothetical protein	
4	PSPA7_02199	stability/partitioning determinant	
5	PSPA7_02200	DNA-binding protein	
6	PSPA7_02201	hypothetical protein	
7	PSPA7_02202	transposase	
8	PSPA7_02203	IS3 family transposase	
9	PSPA7_02204	hypothetical protein	
10	PSPA7_02205	hypothetical protein	
11	PSPA7_02206	hypothetical protein	
12	PSPA7_02207	hypothetical protein	
13	PSPA7_02208	hypothetical protein	
14	PSPA7_02209	conjugal transfer protein	
15	PSPA7_02210	Killer protein	
16	PSPA7_02211	DNA topoisomerase III	
17	PSPA7_02212	hypothetical protein	
18	PSPA7_02213	hypothetical protein	
19	PSPA7_02214	hypothetical protein	
20	PSPA7_02215	addiction module toxin, HicA family	
21	PSPA7_02216	typell toxin-antitoxin system HicB family antitoxin	
22	PSPA7_02217	hypothetical protein	
23	PSPA7_02218	hypothetical protein	
24	PSPA7_02219	transposase	
25	PSPA7_02220	threonine transporter RhtB	
26	PSPA7_02221	alanyl tRNA synthetase related protein (plasmid)	
27	PSPA7_02222	thioesterase	CMA biosynthesis
28	PSPA7_02223	Coronamic acid synthetase CmaC	CMA biosynthesis
29	PSPA7_02224	chlorinating enzyme	CMA biosynthesis
30	PSPA7_02225	coronamic acid synthetase CmaA	CMA biosynthesis
31	PSPA7_02226	coronamic acid synthetase CmaE, aminoacyl transferase	CMA biosynthesis
32	PSPA7_02227	coronamic acid synthetase CmaD	CMA biosynthesis
33	PSPA7_02228	hypothetical protein	
34	PSPA7_02229	sensor histidine kinase CorS	Regulation
35	PSPA7_02230	DNA-binding response regulator	Regulation
36	PSPA7_02231	hypothetical protein	
37	PSPA7_02232	thioesterase	CFA biosynthesis
38	PSPA7_02233	crotonyl-CoA carboxylase/reductase	CFA biosynthesis
39	PSPA7_02234	crotonyl-CoA carboxylase/reductase	CFA biosynthesis
40	PSPA7_02235	Paal family thioesterase	CFA biosynthesis
41	PSPA7_02236	coronafacic acid polyketide synthetase II	CFA biosynthesis
42	PSPA7_02237	coronafacic acid polyketide synthetase II, partial	CFA biosynthesis
43	PSPA7_02238	polyketide synthase	CFA biosynthesis
44	PSPA7_02239	coronafacic acid polyketide synthase I	CFA biosynthesis
45	PSPA7_02240	coronafacic acid synthetase	CFA biosynthesis
46	PSPA7_02241	Coronafacic acid beta-ketoacyl synthetase component	CFA biosynthesis
47	PSPA7_02242	coronafacic acid beta-ketoacyl synthetase component	CFA biosynthesis
48	PSPA7_02243	coronafacic acid dehydratase	CFA biosynthesis
49	PSPA7_02244	coronafacic acid synthetase	CFA biosynthesis
50	PSPA7_02245	Coronafacic acid synthetase, ligase component	CFA biosynthesis
51	PSPA7_02246	ISRSO5-transposase protein	
52	PSPA7_02247	hypothetical protein	
53	PSPA7_02248	chromosome partitioning protein ParA	
54	PSPA7_02249	RNA polymerase-binding protein DksA	
55	PSPA7_02250	hypothetical protein	

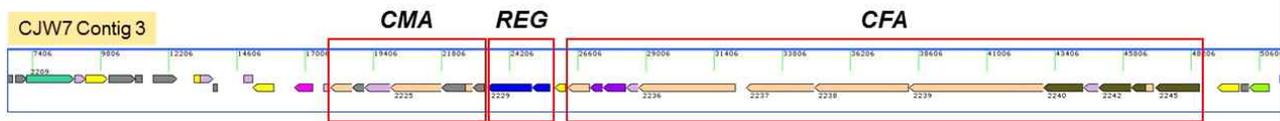


Fig. 16. Schematic representation of the phtyotoxin coronatine (COR) biosynthetic gene cluster in contig 3 of CJW7 strain. CMA, coronamic acid; REG, regulatory region; CFA, coronafacic acid (CFA).

■ 구리 저항성 관련

구리 화합물은 세균병과 곰팡이병의 방제를 위한 항미생물 제제로써 농업 분야에서 광범위하게 사용되고 있다. 그러나 농업 환경에서 고농도 구리 이온(Cu<sup>2+</sup>)에 노출된 일부 박테리아에서 구리 저항성이 나타난다. 고농도에서의 독성 효과 외에도 구리는 일부 효소의 핵심 구성요소로써 미량이 요구된다. 따라서 구리 저항성 박테리아는 저농도의 구리에 대한 요구도와 저항성 기작 사이에서 균형을 유지해야 한다(Trevors, 1987; Coosey, 1993). *P. syringae* pv. *tomato*에는 구리의 방출에 관여하는 4개의 구조 유전자(*copABCD*)와 조절에 관여하는 two component regulatory system의 2개 유전자(*copRS*)가 존재하는 것으로 알려졌다(Mellano and Coosey, 1988; Mills et al., 1993; Buel et al., 2003). *cop* 오페론의 2개 유전자(*copAB*)는 구리 저항성에 필수적인 유전자이며, 뒤쪽 2개의 유전자(*copCD*)는 최대 저항성을 위해 필요함이 밝혀졌다(Mellano and Cooksey, 1988). Psa1과 Psa3에도 구리 저항성에 관여하는 *copAB*와 높은 상동성을 보이는 유전자가 존재한다(Table 22; Marcelletti et al., 2011). 본 연구에서 분석된 Psa2 균주(CJW7)를 비롯하여 Psa4와 Psa5 유전체에 대한 본 연구자의 분석 결과, 참다래 썩음병균(Psa)에는 *copAB*만이 존재하며, *copCD* 혹은 *copRS*와 상동성을 보이는 유전자는 존재하지 않음을 확인하였다(Table 23). Psa2 KBE9 균주에서는 *copA* 유전자만 확인되었으나(Table 22), 이는 완전하지 않은 유전체 해독의 결과로 판단된다. Nakajima 등(2002)은 1984년에 분리된 균주(KW11)에서는 구리 저항성이 나타나지 않았으나, 썩음병 방제를 위해 구리제의 정기적 살포가 이루어진 1987년과 1988년에 분리된 일부 균주는 구리 저항성을 가짐을 보고하였다. 한 개의 구리 저항성 균주(Pa429R)에서는 구조 유전자인 *copAB*와 조절 유전자인 *copRS*와 높은 상동성을 보이는 유전자가 존재함이 확인되었다(Nakajima et al., 2002). 따라서 Psa에서 발견되는 *cop* 오페론은 환경 요인의 변화에 의한 유전자 수평 이동의 결과에 기인하는 것으로 판단된다.

Table 23. Copper resistance structural genes (*copAB*) found in 5 Psa biovars.

Biovars	Strain name	Collection ID	Copper resistance genes	References
Psa1	KW11	ICMP 9617	<i>copAB</i>	Marcelletti et al., 2011
Psa2	CJW7		<i>copAB</i>	This study
	KBE9		<i>copA</i>	This study
Psa3	Psa NZ V-13	ICMP 18884	<i>copAB</i>	McCann et al., 2013
Psa4	PsD	ICMP 18883	<i>copAB</i>	Cunty et al., 2016
Psa5		MAFF212056	<i>copAB</i>	Fujikawa & Sawada, 2016

### ■ Type III effector 관련

Type III secretion system (T3SS)은 여러 가지 병원성 인자들 중에서 숙주 범위와 독성의 정도를 결정하는 가장 중요한 요소이다. T3SS는 세포막에 천공을 일으켜 effector 단백질들을 숙주 세포로 직접 운반하기 위한 단백질 전달 기구이다. 대부분의 Type III effectors (T3Es)는 pathogen-associated molecular pattern (PAMP)-triggered immunity (MTI)와 effector-triggered immunity (ETI)를 포함하는 식물의 방어기작을 억제하는데 관여하는 것으로 알려져 있다(Lindeberg et al., 2012; Dudnik and Dudler, 2014). 또한 일부 effector 단백질들은 세포 독성 효과를 갖는다(Munkvold et al., 2008; Salomon et al., 2012). 일부의 경우를 제외하고, T3E의 정확한 작용 기작은 잘 알려져 있지 않다. 현재까지 잘 연구된 T3E의 기능을 살펴보면, 특정 단백질이 파괴될 수 있도록 표지를 하거나(AvrPtoB; Göhre et al., 2008), RNA-결합 단백질과 표적 mRNA의 결합을 방해하거나(HopU1; Nicaise et al., 2013), 활성산소(ROS)의 생성을 억제하기 위하여 광계 II를 방해하거나(HopN1; Rodríguez-Herva et al., 2012), 식물의 기본 방어 기작의 조절자를 표적으로 하거나(AvrRps4; Bhattacharjee et al., 2011), 미세소관 네트워크 형성과 자스몬산 신호전달을 방해한다(HopZ1a; Lee et al., 2012; Jiang et al., 2013). 현재까지 *P. syringae*의 pangenome에는 58개 family가 있는 것으로 확인되었으나(Baltrus et al., 2011; Lindeberg et al., 2012), 유전체 해독이 증가함에 따라 일부 새로운 family가 추가로 발굴되고 있다(Fujikawa and Sawada, 2016).

5개의 Psa biovar에 존재하는 T3E 유전자들을 분석한 결과, Psa1과 Psa3가 50개로 가장 많은 유전자를 가지며, Psa4가 38개로 가장 적은 수의 유전자를 가졌다. 본 연구에서 유전체 해독이 이루어진 두 개 Psa2 균주(CJW7/KBE9)는 44개의 유전자를 가졌다(Fig. 17). 21개의 T3E 유전자는 5개의 Psa biovar 모두에 존재하였다: *avrE*, *hopMI*, *hopAA1-1*, *hopN1*, *hopI1*, *hopS2*, *hopAF1-1*, *hopAS1*, *hopAEL*, *hopR1*, *hopAHL*, *hopAZ1*, *hopAH2-1*, *hopAH2-2*, *hopAJ2*, *hopAK1*, *hopAN1*, *hopJ1*, *hopP1*, *hopPma1*, *hopACL*. 이들 공통 T3E 유전자는 Psa의 병원성에 있어서 보존된 기능을 수행할 것으로 판단된다. Psa3는 biovar 중에서 가장 병원성이 강한 것으로 알려져 있으며, 2008-2009년 사이에 이탈리아 중부 지역에서 이병성의 골드 키위 품종(Hort16A)에서 처음 출현한 이래 급속히 전 세계의 주요 키위 생산지로 퍼져나갔으며, 현재 세계 키위 산업에 막대한 피해를 입히고 있다. 3개의 T3E 유전자(*hopZ5*, *hopH1*, *hopAMI-D*)가 Psa3 특이적으로 존재하는데(Fig. 17), 병원성의 정도와 이들 3개 유전자와의 관련성에 대해서는 추가 연구가 필요한 것으로 사료된다. Psa4는 가장 적은 수의 T3E 유전자를 가졌는데, Psa4는 앞에만 병반을 일으키는 저병원성으로 뉴질랜드에서 최초로 보고된 이래, 호주, 프랑스 등지에서 국지적으로 보고되었고, 현재는 pv. *actinidifoliorum*으로 분류되고 있다(Chapman et al., 2012; Vanneste et al., 2013). Psa5는 45개의 T3E 유전자를 가졌는데(Fig. 17), 이 biovar는 2012년에 일본에서 발견된 이래, 일본 내의 제한된 지역에서만 보고되고 있다(Sawada et al., 2014). Psa5는 식물 독소(파세올로톡신, 코로나틴)를 생성하지 않으며, 일본에서 주로 발견되는 Psa1 보다는 한국에 고유한 Psa2와 분자계통학적으로 더 가까우며, Psa5의 병원성에 대해서는 아직 보고된 바 없다(Fujikawa and Sawada, 2016). 따라서 현재까지는 T3E 유전자의 수와 병원성의 정도 사이에 밀접한 연관 관계가 있는지의 여부는 불분명한 것으로 사료된다.

	PSA1	CJW7/KBE9	PSA3	PSA4	PSA5
<i>avrRpm1</i>					
<i>avrE</i>					
<i>hopM1</i>					
<i>hopAA1-1</i>					
<i>hopN1</i>					
<i>hopI1</i>					
<i>hopS2</i>					
<i>hopBB1-1</i>					
<i>hopAO2</i>					
<i>hopAF1-1</i>					
<i>hopBB1-2</i>					
<i>hopAW1</i>					
<i>hopX3</i>					
<i>hopAY1</i>					
<i>avrB4</i>					
<i>avrD1</i>					
<i>hopD1</i>					
<i>hopQ1</i>					
<i>hopF2</i>					
<i>hopAR1</i>					
<i>hopF1</i>					
<i>hopAF1-2</i>					
<i>hopA1</i>					
<i>hopY1</i>					
<i>avrRpm2</i>					
<i>hopZ3</i>					
<i>hopAS1</i>					
<i>hopZ5</i>					
<i>hopH1</i>					
<i>hopAM1-1</i>					
<i>hopAE1</i>					
<i>hopW1</i>					
<i>hopR1</i>					
<i>hopAG1</i>					
<i>hopAH1</i>					
<i>hopAI1</i>					
<i>hopAM1-2</i>					
<i>avrPto5</i>					
<i>hopAZ1</i>					
<i>hopAV1</i>					
<i>hopAA1-2</i>					
<i>hopAU1</i>					
<i>hopX1</i>					
<i>hopX2</i>					
<i>hopBD2</i>					
<i>hopH3</i>					
<i>hopO1</i>					
<i>hopT1</i>					
<i>hopS1</i>					
<i>hopE1</i>					
<i>hopAB3</i>					
<i>eop3</i>					
<i>hopAH2-1</i>					
<i>hopAH2-2</i>					
<i>hopAJ2</i>					
<i>hopAK1</i>					
<i>hopAN1</i>					
<i>hopJ1</i>					
<i>hopL1</i>					
<i>hopP1</i>					
<i>hopPma1</i>					
<i>hopZ3</i>					
<i>hopAC1</i>					

Fig. 17. Effector genes identified from 5 Psa biovars including two Psa2 strains, CJW7 and KBE9. The genome information used for the analysis is as follows; Psa1, GCF\_000658965.1; Psa2, this study; Psa3, GCF\_000648735.3; Psa5, GCA\_001270005.1. Orange and yellow color boxes indicate common T3E genes among 5 Psa biovars and truncated/disrupted genes, respectively.

■ Elicitor 생합성 관련

Syringolides는 *P. syringae*에서 AvrD에 의해 만들어지는 glycolipid elicitors로 Rpg4 유전형 을 갖는 콩에서만 과민성 반응을 유도하는 것으로 알려져 있다(Ji et al., 1997; Keith et al., 1997). 과거에는 T3E로 분류되었으나 명명 규칙의 통합에 따라 T3E로 분류하지 않는다 (Lindeberg et al., 2005). *avrD* 유전자가 *P. syringae*에 광범위하게 존재하며, Psa1 biovar 균 주에도 존재함이 보고되었다(Baltrus et al., 2011). *avrD* 유전자가 다른 Psa biovar에도 존재 하는지 분석한 결과, Psa4를 제외한 모든 Psa biovar에 존재함을 확인하였다(Table 24). Psa4 의 경우, 6개 균주(ICMP 18807, ICMP 18804, ICMP 18883, ICMP 19094, ICMP 19095, ICMP 19098)에 대한 draft genome에서 발견되지 않는 것으로 미루어 Psa4에는 *avrD* 유전자가 존 재하지 않을 것으로 판단된다.

**Table 24.** Identification of *avrD* gene from 5 Psa biovars. +, presence; -, absence.

Biovar	Strain ID.	avrD
Psa1	MAFF 302091	+
Psa2	CJW7 & KBE9	+
Psa3	ICMP 18884	+
Psa4	ICMP 18883	-
Psa5	MAFF 212056	+

■ 식물 호르몬(오옥신) 생합성 관련

일부 *P. syringae* 균주들은 식물 호르몬(오옥신, 사이토키닌, 에틸렌)을 생산하는 것으로 알려져 있고, 이들은 독성 인자(virulence factor)로도 작용한다(Costacurta and Vanderleyden, 2008; Dudnik and Dudler, 2014). 사이토키닌은 *P. syringae* pv. *savastatonii*에서 특이적으로 생성되며, 에틸렌은 *pisi*, *cannabina*, *glycinea*, *phaseolicola*, *sesame* 병원형(pathovar)에서만 검출되었다(Akiyoshi et al., 1987; Weingart et al., 1999; Dudnik and Dudler, 2014). 반면에 오옥신 생합성에 관여하는 tryptophan 2-monooxygenase (*iaaM*), indoleacetamide hydrolase (*iaaH*) 유전자들은 광범위한 *P. syringae* 균주들에 존재하며(Glickmann et al., 1998; Baltrus et al., 2011), 오옥신 불활성화에 관여하는 N-ε-(indole-3-acetyl)-L-lysine synthetase (*iaaL*) 유전자는 *P. syringae* pv. *oryzae*와 *P. cannabina* pv. *alisalensis* 균주들에서 발견된다(Roberto et al., 1990). Psa2 biovar에 속하는 두 균주(CJW7, KBE9)의 유전체에서는 *iaaM*과 *iaaL* 유전자는 발견되었으나, *iaaH*와 상동성을 보이는 유전자는 발견되지 않았다. 이 외에도 auxin binding protein 유전자와 오옥신 수송에 관여하는 auxin efflux carrier 유전자가 발견되었다(Table 25). 반면에 에틸렌 생성 유전자(*efe*, ethylene forming enzyme)는 발견되지 않았다. *iaaM*과 *iaaL* 유전자는 Psa1 균주(MAFF 302091)에서도 보고된 바 있다(Baltrus et al., 2011).

**Table 25.** Auxin-related genes found in two Psa2 strains, CJW7 and KBE9.

Strain	Locus Name	Protein (Gene)
CJW9	PSPA7_02703:5406	Tryptophan 2-monooxygenase ( <i>iaaM</i> )
	PSPA7_04250:8500	N-ε-(indole-3-acetyl)-L-lysine synthetase ( <i>iaaL</i> )
	PSPA7_01492:2984	Auxin binding protein
	PSPA7_04722:9444	Auxin efflux carrier
KBE9	PSPA9_03475:6950	Tryptophan 2-monooxygenase ( <i>iaaM</i> )
	PSPA9_05017:10034	N-ε-(indole-3-acetyl)-L-lysine synthetase ( <i>iaaL</i> )
	PSPA9_02368:4736	Auxin binding protein
	PSPA9_05488:10976	Auxin efflux carrier

■ Quorum sensing 시스템 관련

Quorum sensing (QS)은 신호물질의 생성과 탐지를 통해서 박테리아의 세포 밀도와 유전자 발현을 연결시키는 세포간 의사소통 체계로써 성장, 분화, 병원성과 같은 다양한 과정에 관여한다. 박테리아는 QS를 통해서 항생제 생산, 바이오필름 형성, 플라스미드 접합 (conjugation), 생물발광, 분비 효소와 독성 인자의 생산 등을 조절한다(Dudnik and Dudler, 2014; Patel et al., 2014). 그람 음성 박테리아에서의 전형적인 QS 시스템은 서로 인접한 유전자에 의해 만들어지는 2개의 단백질 즉, 신호물질인 acyl-homoserine lactones (AHLs)을 만드는 LuxI 생합성 효소와 LuxR 전사조절자로 이루어진다. LuxR은 2개의 도메인 즉, N-말단의 AHL-결합 도메인과 C-말단의 DNA-결합 helix-turn-helix (HTH)으로 이루어진다(Fuqua et al., 1994). AHL이 결합하면 LuxR은 *luxI* 유전자를 비롯하여 보존된 *lux*-타입 박스를 갖는 유전자 프로모터에 결합하여 *luxI*의 전사를 활성화시킨다(Stevens and Greenberg, 1997). 참다래 케양병균(Psa)의 경우, 3개의 *luxR* 유전자(PsaR1, PsaR2, PsaR3)가 발견되었는데, PsaR1과 PsaR3는 AHL과 결합하며 전형적인 LuxI/R AHL QS 시스템의 일부인 LuxR과 구조가 매우 유사하였으며, PsaR2는 미지의 식물 유래 신호물질과 결합하며 반응하는 plant-associated bacteria (PAB)에 존재하는 LuxR 그룹에 속하는 것으로 밝혀졌다(Patel et al., 2014). 반면, Psa는 AHL을 생산하지 않았으며, 일부 biovar (Psa1, Psa3)의 유전체 정보에서도 *luxI* 유전자는 발견되지 않았다. 3개의 *luxR* 유전자에 대한 기능상실 돌연변이체는 *in planta* 상태에서 생존율이 감소함을 보여주었다(Patel et al., 2014). 본 연구에서 complete genome 수준으로 해독된 2개의 Psa2 균주(CJW7, KBE9)에 대한 유전체 분석 결과를 활용하여 5개 biovar에서 전형적인 LuxI/LuxR QS 시스템을 암호화하는 유전자들에 대해 비교 분석을 수행하였다 (Table 26). 비교 분석 결과, *luxR1*과 *luxR2* 유전자는 모든 biovar에서 발견되었으나, *luxR3* 유전자는 Psa3 균주에서만 발견되었다. 반면, *luxI* 유전자는 모든 biovar에서 발견되지 않았다. 이러한 결과는 Psa에는 전형적인 LuxI/LuxR QS 시스템이 존재하지 않으며, *luxR* 유전자 구성에 있어서도 biovar간 진화가 일어나고 있음을 보여준다. 265개의 프로테오박테리아에 대한 유전체 정보 분석 결과, 상당수의 유전체에서 LuxR 만이 확인되었으며, 이들을 “LuxR Solos“로 부른다(Case et al., 2008). Psa에서처럼 QS LuxR 시스템만을 가질 경우, 다른 박테리아에서 분비하는 AHL을 이용하여 QS 시스템을 가동시키거나 식물 유래의 다른 신호 물질을 이용하여 QS 시스템을 가동시킬 것으로 추정된다. 주변의 박테리아에서 분비하는 AHL을 이용하여 QS 시스템을 가동시키는 경우는 *Salmonella enterica*와 대장균에서 보고된 바 있다 (Michael et al., 2001; Ahmer, 2004; Yao et al., 2006).

**Table 26.** Genes related to a typical LuxI/LuxR QS system identified from 5 Psa biovars. +, presence; -, absence.

Biovar	Strain ID	<i>luxR1</i>	<i>luxR2</i>	<i>luxR3</i>	<i>luxI</i>
Psa1	MAFF 302091	+	+	-	-
Psa2	CJW7 & KBE9	+	+	-	-
Psa3	ICMP 18884	+	+	+	-
Psa4	ICMP 18883	+	+	-	-
Psa5	MAFF 212056	+	+	-	-

■ 주요 병원성 인자 비교 분석의 종합 정리 및 향후 전망

본 과제를 통해 확보된 완전 유전체 수준의 Psa2 정보와 유전체 완성도가 높은 유전체 정보들을 활용하여 5개 biovar (Psa1~Psa5)에 대해 식물 독소 생합성, 구리 저항성, type III effector (T3E), elicitor 생합성, 식물 호르몬 생합성, quorum sensing 시스템에 대해 비교 분석을 수행하였다. 본 연구를 통해 Psa2 biovar가 생성하는 것으로 알려진 식물 독소인 코로나틴 생합성 및 조절 경로에 관여하는 완전한 오피론 구조가 파악되었다. 특히, 현재 전 세계 키위 산업에 심각한 위협을 가하고 있는 고병원성 Psa3 biovar의 경우, 가장 많은 T3E 유전자를 가질 뿐만 아니라 다른 biovar에 존재하지 않는 3개의 고유 T3E 유전자(*hopZ5*, *hopH1*, *hopAMI-1*)를 가짐을 확인하였다. 또한 독소 생성 조절 등에 관여하는 quorum sensing 시스템에서 고유의 LuxR3 조절자를 Psa3에 존재함을 확인하였다. 향후 Psa3 biovar 고유의 병원성 인자들의 기능을 파악하는 것이 고병원성 기작을 이해하기 위한 중요한 단계가 될 것으로 사료된다. 아울러 Psa2 고유의 코로나틴 생합성 효소/조절인자 및 Psa3 고유의 병원성 단백질들은 향후 이를 표적으로 하는 방제 기술의 개발을 위한 중요한 기초 자료가 될 것으로 전망된다.

### ○ 연구개발성과

- 논문게재 성과(게재연도, 논문명, 저자명, 학술지명, Vol.(No.), 국내외 구분, SCI구분, 등록·기탁 번호)

게재 년도	논문명	저자명	학술지명	Vol.	SCI구 분
2017	Occurrence and epidemics of bacterial canker of kiwifruit in Korea	G. H. Kim, J. S. Jung, Y. J. Koh	Plant Pathol. J	33(4): 351-361	SCIE
2017	우리나라에서 분리한 참다래 궤양병균 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> 균주들의 Biovar	이영선 김진 김경희 최으뜸 고영진 정재성	식물병 연구	23(1): 35-41	
2017	키위 궤양병 효율적 관리를 위한 매뉴얼	고영진, 김경희, 정재성	식물병 연구	23(1): 1-18	
2016	Outbreak and spread of bacterial canker of kiwifruit caused by <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> biovar 3 in Korea	G. H. Kim, K.-H. Kim, K. I. Son, E. D. Choi, Y. S. Lee, J. S. Jung, Y. J. Koh	Plant Pathol, J.	32(6): 545-551	SCIE
2016	Development of specific markers for identification of biovars 1 and 2 strains of <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>	Y. S. Lee, G. H. Kim, Y. J. Koh, Q. Zhang, J. S. Jung	Plant Pathol, J.	32(2): 162-167	SCIE
2016	2016년 경남지역 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> Biovar 3의 2차 감염에 의한 키위 궤양병의 확산	김경희, 최으뜸, 이영선, 정재성, 고영진	식물병 연구	22(4): 276-283	

### - 특허성과(특허 출원)

출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2017. 2. 20	참다래 궤양병균 검출용 키트	고영진, 정재성, 이영선, 김경희	대한민국	제10-2017-0022542호
2017. 2. 20	Psa2 그룹에 속하는 참다래 궤양병균 검출용 키트	고영진, 정재성, 이영선, 김경희	대한민국	제10-2017-0022540호
2015. 9. 16	Psa1 그룹에 속하는 참다래 궤양병균 검출용 키트	고영진, 정재성, 이영선, 김경희	대한민국	제10-2015-0131119호

**- 특허성과(특허 등록)**

등록연도	특허명	등록인	출원국	등록번호
2017. 3. 20	Psa1 그룹에 속하는 참다래 궤양병균 검출용 키트	고영진, 정재성, 이영선, 김경희	대한민국	제 10-1719719호
2017. 3. 20	Psa2 그룹에 속하는 참다래 궤양병균 검출용 키트	고영진, 정재성, 이영선, 김경희	대한민국	제 10-1719720호
2017. 3. 20	참다래 궤양병균 검출용 키트	고영진, 정재성, 이영선, 김경희	대한민국	제 10-1719721호

**○ 연구결과**

**- 기술적 성과**

- \* 우리나라 참다래 궤양병균의 집단 구조 파악
- \* 지역 및 품종별 맞춤형 참다래 궤양병 방제매뉴얼 도출
- \* 우리나라에서 분리되는 궤양병 균주 중 Psa3에 속하는 균주 집단의 구조 구명
- \* Psa3 균주의 아집단에 특이적인 분자마커의 개발
- \* 참다래 궤양병균의 아집단 특이적 검출 체계 확립을 통한 궤양병 확산 경로 파악
- \* 참다래 궤양병 확산 예상 지역에서의 조기 진단
- \* 꽃가루 등의 수입 시 분자마커를 검역체계 강화에 활용
- \* 주요 Psa biovar (Psa1, 2, 3)에 속하는 15개 균주에 대한 draft genome 정보 확보 및 비교 유전체 분석을 통한 분자표지(SNP, PAV) 발굴
- \* 발굴된 분자표지를 활용한 biovar genotyping용 분자표지 개발 및 농가 발생 궤양병 기원 추적에의 활용
- \* 국내 고유이며 Psa2 biovar에 속하는 2개 균주에 대한 최초의 완전 유전체 수준의 해독 및 core/pangenome 최초 분석
- \* 5가지 biovar 유전체를 대상으로 병원성 관련 유전자들의 심층 비교 분석으로부터 고병원성 Psa3 biovar 특이 인자 확인을 통한 맞춤형 방제 기술 개발 기반 마련

**- 경제적 성과**

- \* 참다래 궤양병에 대한 검역강화, 확산방지, 조기진단 등의 분야에 활용함으로써 연간 궤양병에 의해 피해 예상액 최소 47억 9천만원에서 최대 133억 7천만원의 손실액을 절감해주는 경제적 효과 예상

#### 4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

		코드번호	D-06	
<b>4-1. 목표달성도</b>				
구분		연구목표	연구개발의 내용 및 범위	달성도(%)
제1 세부 과제	1차 년도	참다래 궤양병균 집단 비교분석 및 발병특성 조사	<ul style="list-style-type: none"> <li>지역별 참다래 궤양병균 집단 비교분석 및 발병특성 조사</li> <li>품종별 참다래 궤양병균 집단 비교분석 및 발병특성 조사</li> </ul>	100
	2차 년도	맞춤형 참다래 궤양병 방제매뉴얼 도출 및 방제 컨설팅	<ul style="list-style-type: none"> <li>지역별 맞춤형 참다래 궤양병 방제매뉴얼 도출</li> <li>품종별 맞춤형 참다래 궤양병 방제매뉴얼 도출</li> <li>참다래 궤양병 방제 컨설팅</li> </ul>	100
제2 세부 과제	1차 년도	참다래 궤양병균 Biovar 진단용 특이적 분자마커 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>RAPD 분석을 통한 Psa1과 Psa2 특이적 primer 선발</li> <li>본 연구팀이 기 개발한 Psa3 특이적 primer의 성능 재검증</li> </ul>	100
	2차 년도	Psa3 집단의 지리적 기원 추적용 분자마커 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>RAPD 분석을 통한 지리적 기원이 다른 Psa3 특이적 primer 선발</li> <li>중국, 뉴질랜드, 이탈리아 등 주요 참다래 생산 국가에서 유래하는 Psa3 균주 식별</li> </ul>	100
제1 협동 과제	1차 년도	참다래 궤양병균 Biovar별 유전체 비교 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>3개 biovar (Psa1, 2, 3), 4개 균주에 대해 Illumina 플랫폼을 이용한 reference-guided whole genome sequencing 수행 및 초안 수준의 유전체 정보 확보.</li> <li>3개 biovar, 4개 균주 유전체간의 비교유전체 분석을 통해 서열변이(SNP, InDel) 및 구조변이(PAV, Presence/Absence) 분석.</li> <li>구조 및 서열 변이를 이용한 분자표지 개발 및 활용.</li> </ul>	100
	2차 년도	지리적 기원이 다른 집단별 유전체 비교 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>11개 Psa3 균주에 대해 Illumina 플랫폼을 이용한 reference-guided whole genome sequencing 수행 및 초안 수준의 유전체 정보 확보.</li> <li>지리적 기원과 분리 숙주 품종이 다른 Psa3 5개 균주(제주 2점, 전남 2점, 중국 1점)에 대한 비교유전체 분석을 통해 서열변이(SNP, InDel) 및 구조변이(PAV) 분석.</li> <li>구조 및 서열변이를 이용한 분자표지 개발 및 활용.</li> <li>국내 고유이며 Psa2 biovar에 속하는 2개 균주에 대해 PacBio NGS 플랫폼을 이용한 complete genome 수준의 유전체 정보 확보(국내외 최초), pan genome과 core genome 분석 및 주요 병원성 관련 유전자들에 대해 5개 biovar 간의 비교 분석.</li> </ul>	100

코드번호	D-06
------	------

<p><b>4-2. 관련분야 기여도</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 우리나라 참다래 재배 지역 및 품종별 궤양병 맞춤형 방제매뉴얼 작성으로 농가손실 절감</li> <li>○ 참다래 궤양병 방제매뉴얼 보급 및 영농현장 컨설팅으로 농가소득 향상</li> <li>○ Psa 아집단 특이적 분자마커의 개발로 전 세계적으로 문제가 되고 있는 Psa3의 전파 경로를 이해하는데 기여</li> <li>○ 참다래 궤양병균 biovar 아집단의 구분을 통해 Psa의 기원과 진화를 이해하는데 기여</li> <li>○ 국내 고유의 참다래 궤양병균 biovar에 대한 complete genome 수준의 유전체 정보를 국내외 처음으로 확보하고 분석하고 이를 활용하여 5가지 biovar에 대한 core genome 및 pan genome을 처음으로 분석함으로써, 참다래 궤양병균의 학술적 이해에 크게 기여</li> <li>○ 병원성과 밀접한 연관을 갖는 주요 인자들에 대한 비교 유전체 분석을 통해 고병원성 biovar 특이적인 유전자들을 파악함으로써 맞춤형 방제 기술 개발의 기반 구축에 기여</li> <li>○ 확보된 15점의 유전체 정보를 비교 분석하여 주요 biovar 및 균주들의 유전형 결정을 위한 분자표지들을 대량으로 발굴하여 농업 현장에 활용</li> <li>○ 이를 통해 국내 참다래 궤양병균 발생의 모니터링과 새로운 균주의 출현/진화에 대한 예보를 위한 시스템의 기반 구축에도 기여</li> </ul>
--

**5. 연구결과의 활용계획**

코드번호	D-07
------	------

<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 참다래 궤양병 방제매뉴얼을 참다래 재배 농가 컨설팅에 활용</li> <li>○ Psa1, Psa2, Psa3 진단용 분자마커는 수입하는 묘목이나 꽃가루에 대한 국경검역에 활용</li> <li>○ Psa3 진단마커는 국내유입 경로 및 확산 경로 역학조사에 활용</li> <li>○ 국내 고유 Psa2 biovar에 속하는 2개 균주(CJW7, KBE9)에 대해서 PacBio NGS 플랫폼을 이용하여 국내외 처음으로 완전 유전체에 매우 근접한 성과를 거두었다. 현재 2개의 균주들에 대하여 Illumina 플랫폼을 이용하여 확보한 초안 수준의 유전체 정보도 보유하고 있다. 따라서 컨티그가 1-2개로 이루어진 완전 유전체를 확보하기 위하여 두 가지 NGS 방식에 의해 생성된 유전체 정보를 병합하여 완전 유전체를 확보하여 이를 국내외 유전체 DB에 기탁하고, 국제 학술지 논문도 투고할 예정이다.</li> <li>○ 특정 biovar에 고유한 병원성 인자의 유전자 정보(T3E effector protein, LuxR QS system 등)는 향후 유전자 기능 연구, 숙주인 참다래에 존재하는 상응하는 R gene과의 상호작용 연구와 이를 통한 궤양병 내병성 품종 육성 등에 응용</li> <li>○ biovar 및 균주 간 서열변이(SNP, In/Del, PAV 등) 정보를 대량으로 확보하고, 이를 활용한 분자표지를 개발하고 농가의 애로사항 해결에도 활용</li> <li>○ 본 과제를 통해 확보한 분자표지 정보들에 대해서는 지적재산권을 확보할 예정이며, 가칭 “PSA Genotype ID™ Platform“을 구축하여 화분(꽃가루) 수입 업체, 묘목 업체, 참다래 재배 농가 등을 대상으로 균주 동정을 위한 상업적 분석 서비스 시스템 운영에 활용</li> </ul>
--

## 6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

	코드번호	D-08
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 일본에서도 우리나라처럼 Psa 집단이 유전적으로 다양한 것으로 나타남</li> <li>○ 일본에서는 Psa1과 Psa3가 전국에 걸친 참다래 재배지에서 분리되고 있음</li> <li>○ 2014년 큐슈지방 사가현에서 Psa2와 유전적으로 가까운 새로운 타입의 Psa5가 발견된 바 있음(Fujikawa and Sawada, 2016; Sawada et al., 2014).</li> <li>○ 최근 나가노현에서 표현형적 특성이 기존의 biovar와 다른 Psa6가 보고되었음(Sawada et al., 2016).</li> <li>○ 일본의 경우 현재까지 Psa1, Psa3, Psa5, Psa6가 분리되고 있음</li> <li>○ 우리나라와 일본의 Psa 균주에 대한 비교 연구는 궤양병의 기원에 대한 실마리를 제공할 수 있을 것임</li> <li>○ 아울러 Psa의 분화가 식물 병원성 세균의 진화를 이해하는 모델이 될 수 있을 것으로 기대됨</li> <li>○ 본 과제 수행 중에 뉴질랜드와 일본의 연구 그룹에 의해 각각 Psa3와 Psa5에 대한 완전 유전체 해독이 보고되었으며(Templeton et al., 2015; Fujikawa and Sawada, 2015), 본 과제에서 Psa2 biovar의 완전 유전체 수준 해독 및 5가지 Psa biovar의 core genome과 pangenome 분석에 효율적으로 활용함</li> </ul>		

## 7. 연구개발결과의 보안등급

	코드번호	D-09
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 본 과제의 수행을 위하여 2016년 1월부터 박사연구원(선임급)을 채용하여 유전체 정보의 확보와 해석 등에 관한 연구를 수행하고 있다. 협동과제 책임자와 자료 수집, 공동 논문 작성, 지적 재산권 확보 등에 관한 업무를 분담하여 수행하고 있다. 협동기관인 (주)바이오메딕에서는 입사시 보안서약서를 기본적으로 작성하여 기술 개발에 있어서의 보안 관리(퇴사시 일정기간 동종 업종 취업제한 등)를 하고 있다.</li> </ul>		

## 8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

					코드번호	D-10		
구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호

## 9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

	코드번호	D-11
○ 협동 연구기관인 (주)바이오메딕의 경우, 외부업체에 의뢰하여 연 1회 연구실 안전점검을 실시하고 있다. 참여연구원 전원 산재보험에 가입되어 있으며, 연 1회 정기 건강검진을 받고 있다. 연구 과정에서 발생하는 생물 유래 폐기물에 대해서는 고온고압 멸균 후 폐기를 원칙으로 하고 있다.		

## 10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/특허/기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	논문	Development of specific markers for identification of biovars 1 and 2 strains of <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>	순천대학교	교신저자	Plant Pathology Journal	1.255	2016.04.01	단독	SCIE/ 11회 인용
2	논문	Occurrence and epidemics of bacterial canker of kiwifruit in Korea	순천대학교	교신저자	Plant Pathology Journal	1.255	2017.08.01	단독	SCIE
3	특허	Psa1 그룹에 속하는 참다래 궤양병균 검출용 키트	순천대학교		한국		2017.03.20	단독	
4	특허	Psa2 그룹에 속하는 참다래 궤양병균 검출용 키트	순천대학교		한국		2017.03.20	단독	
5	특허	참다래 궤양병균 검출용 키트	순천대학교		한국		2017.03.20	단독	

## 11. 기타사항

	코드번호	D-13
○		

## 12. 참고문헌

코드번호	D-14
Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. Elsevier Academic Press. 922 pp.	
Ahmer, B. M. 2004. Cell-to-cell signalling in <i>Escherichia coli</i> and <i>Salmonella enterica</i> . <i>Mol. Microbiol.</i> 52:933-945.	
Akiyoshi, D. E., Regier, D. A., Gordon, M. P. 1987. Cytokinin production by <i>Agrobacterium</i> and <i>Pseudomonas</i> spp. <i>J. Bacteriol.</i> 169:4242-4248.	
Alarcón-Chaidez, F. J., Peñaloza-Vázquez, A., Ullrich, M., and Bender, C. L. 1999. Characterization of plasmids encoding the phytotoxin coronatine in <i>Pseudomonas syringae</i> . <i>Plasmid</i> 42:210-220.	
Balestra, G. M., Mazzaglia, A., Quattrucci, A., Renzi, M. and Rossetti, A. 2009. Current status of bacterial canker spread on kiwifruit in Italy. <i>Aus. Plant Dis. Notes</i> 4:34-36.	
Balestra, G. M., Taratufolo, M. C., Vinatzer, B. A. and Mazzaglia, A. 2013. A multiplex PCR assay for detection of <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> and differentiation of populations with different geographic origin. <i>Plant Dis.</i> 97:472-478.	
Baltrus, D. A., Nishimura, M. T., Romanchuk, A., Chang, J. H., Shahid Mukhtar, M., Cherkis, K., Roach, J., Grant, S. R., Jones, C. D., Dangl, J. L. 2011. Dynamic evolution of pathogenicity revealed by sequencing and comparative genomics of 19 <i>Pseudomonas syringae</i> isolates. <i>PLoS Pathog.</i> 7(7):e1002132.	
Bender, C., Palmer, D., Peñaloza-Vázquez, A., Rangaswamy, V. and Ullrich, M. 1996. Biosynthesis of coronatine, a thermoregulated phytotoxin produced by the phytopathogen <i>Pseudomonas syringae</i> Arch. <i>Microbiol.</i> 166:71-75.	
Bender, C. L., Alarcón-Chaidez, F. and Gross, D. C. 1999. <i>Pseudomonas syringae</i> phytotoxins: Mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. <i>Microbiol. Mol. Biol. Rev.</i> 63:266-292.	
Bhattacharjee, S., Halane, M. K., Kim, S. H. and Gassmann, W. 2011. Pathogen effectors target <i>Arabidopsis</i> EDS1 and alter its interactions with immune regulators. <i>Science</i> 334:1405-1408.	
Biondi, E., Galeone, A., Kuzmanovic, N., Ardizzi, S., Lucchese, C. and Bertaccini, A. 2013. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> detection in kiwifruit plant tissue and bleeding sap. <i>Ann. Appl. Biol.</i> 162:60-70.	
Bland, C. 2007. CRISPR Recognition Tool (CRT): a tool for automatic detection of clustered regularly interspaced palindromic repeats. <i>BMC Bioinformatics</i> 8:209.	
Butler, M. I., Jung, J. S., Kim, G. H., Lamont, I. L., Stockwell, P. A., Koh, Y. J. and Poulter, R. T. M. 2015. Genome features of <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> recently isolated in Korea. <i>Acta Hort.</i> 1095:75-79.	
Butler, M. I., Stockwell, P. A., Black, M. A., Day, R. C., Lamont, I. L., Poulter, R. T. 2013. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> from recent outbreaks of kiwifruit bacterial canker belong to different clones that originated in China. <i>PloSone</i> 8(2):e57464.	

- Carmen, A. and Sarojini, V. 2014. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: chemical control, resistance mechanisms and possible alternatives. *Plant Pathol.* 63:1-11.
- Case, R. J., Labbate, M. and Kjelleberg, S. 2008. AHL-driven quorum-sensing circuits: their frequency and function among the Proteobacteria. *ISME J.* 2:345-349.
- Cellini, A., Fiorentini, L., Buriani, G., Yu, J., Donati, I., Cornish, D. A., Novak, B., Costa, G., Vanneste, J. L. and Spinelli, F. 2014. Elicitors of the salicylic acid pathway reduce incidence of bacterial canker of kiwifruit caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Ann. Appl. Biol.* 165:441-453.
- Chapman, J. R., Taylor, R. K., Weir, B. S., Romberg, M. K., Vanneste, J. L., Luck, J. and Alexander, B.J. 2012. Phylogenetic relationships among global populations of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Phytopathol.* 102:1034-1044.
- Choi, E. J., Lee, Y. S., Kim, G. H., Koh, Y. J. and Jung, J. S. 2014. Phenotypic characteristics of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* strains from different geographic origins. *Korean J. Microbiol.* 50:245-248. (In Korean)
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clement, C. and Barka, E. A. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:4951-4959.
- Cooksey, D. A. 1993. Molecular mechanism of copper resistance and accumulation in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 14:381-386.
- Costacurta, A. and Vanderleyden, J. 2008. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 21:1-18.
- Costonis, A. C. 1981. Tree injection: Perspective macro-injection/micro-injection. *J. Arboric.* 7:275-278.
- Cox, M. P., Peterson, D. A. and Biggs, P. J. 2010. SolexaQA: At-a-glance quality assessment of Illumina second-generation sequencing data. *BMC Bioinformatics* 11:485
- Cunty, A., Cesbron, S., Briand, M., Carrère, S., Poliakoff, F., Jacques, M. A. and Manceau, C. 2016. Draft genome sequences of five *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum* strains isolated in France. *Brazilian J. Microbiol.* 47:529-530.
- Cunty, A., Poliakoff, F., Rivoal, C., Cesbron, S., Fischer-Le Saux, M., Lemaire, C., Jacques, M.-A., Manceau, C. and Vanneste, J. L. 2015. Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) isolated from France and assignment of Psa biovar 4 to a de novo pathovar: *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum* pv. nov. *Plant Pathol.* 64:582-596.
- Do, K. S., Chung, B. N. and Joa, J. H. 2016b. D-PSA-K: A model for estimating the accumulated potential damage on kiwifruit canes caused by bacterial canker during the growing and overwintering seasons. *Plant Pathol. J.* 32:537-544.
- Do, K. S., Chung, B. N., Choi, K. S., Ahn, J. J. and Joa, J. H. 2016a. Impact of climate change on yield loss caused by bacterial canker on kiwifruit in Korea. *Korean J. Agric. Forest Meteorol.* 18:65-73. (In Korean)

- Donati, I., Buriani, G., Cellini, A., Mauri, S., Costa, G. and Spinelli, F. 2014. New insights on the bacterial canker of kiwifruit (*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*). *J. Berry Res.* 4:53-67.
- Dudnik, A. and Dudler, R. 2014. Genomics-based exploration of virulence determinants and host-specific adaptations of *Pseudomonas syringae* strains isolated from grasses. *Pathogens* 3:121-148.
- Edgar, R. C. 2007. PILER-CR: Fast and accurate identification of CRISPR repeats. *BMC Bioinformatics* 8:18.
- Edgar, R. C. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26:2460-2461.
- EPPO. 2012. Final pest risk analysis for *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. EPPO, Paris
- Everett, K. R., Cohen, D., Pushparajah, I. P. S., Vergara, M. J., Curtis, C. J., Larsen, N. J. and Jia, Y. 2012. Heat treatments to kill *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on contaminated pollen. *N. Z. Plant Prot.* 65:8-18.
- Everett, K. R., Taylor, R. K., Romberg, M. K., Rees-George, J., Fullerton, R. A., Vanneste, J. L. and Manning, M. A. 2011. First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* causing kiwifruit bacterial canker in New Zealand. *Australas. Plant Dis. Notes* 6: 67-71.
- Ferguson, A. 2010. Kiwifruit: Evolution of a crop. *Acta Hort.* 913:31-42.
- Ferrante, P. and Scortichini, M. 2009. Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* as causal agent of bacterial canker of yellow kiwifruit (*Actinidia chinensis* Planchon) in central Italy. *J. Phytopathol.* 157:768-770.
- Ferrante, P. and Scortichini, M. 2010. Molecular and phenotypic features of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolated during recent epidemics of bacterial canker on yellow kiwifruit (*Actinidia chinensis*) in central Italy. *Plant Pathol.* 69: 954-962.
- Ferrante, P. and Scortichini, M. 2014. Frost promotes the pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in *Actinidia chinensis* and *A. deliciosa* plants. *Plant Pathol.* 63:12-19.
- Ferrante, P., Fiorillo, E., Marcelletti, S., Marocchi, F., Mastroleo, M., Simeoni, S. and Scortichini, M. 2012. The importance of the main colonization and penetration sites of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and prevailing weather conditions in the development of epidemics in yellow kiwifruit, recently observed in central Italy. *J. Pl. Pathol.* 94:455-461.
- Frampton, R. A., Pitman, A. R. and Fineran, P. C. 2012. Advances in bacteriophage-mediated control of plant pathogens. *Int. J. Microbiol.* 1:326452.
- Frampton, R. A., Taylor, C., Moreno, A. V. H., Visnovsky, S. B., Petty, N. K., Pitman, A. R. and Fineran, P. C. 2014. Identification of bacteriophages for the biocontrol of the kiwifruit canker phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 80: 2216-2228.

- Froud, K.J., Everett, K. R., Tyson, J. L., Beresford, R. M. and Cogger, N. 2015. Review of the risk factors associated with kiwifruit bacterial canker caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *N. Z. Plant Prot.* 68:313-327.
- Fujikawa T. and Sawada, H. 2016. Genome analysis of the kiwifruit canker pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* biovar 5. *Sci Rep.* 6:21399.
- Fuqua, W. C., Winans, S. C. and Greenberg, E. P. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* 176:269-275.
- Gallelli, A., Talocci, S., L' Aurora, A. and Lorete, S. 2011. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, causal agent of bacterial canker of kiwifruitfruit, from symptomless fruits, and twigs, and from pollen. *Phytopathol. Medit.* 50:473-483.
- Gao, X., Huang, Q., Zhao, Z. Han, X., Qin, H. and Huang, L. 2016. Studies on the infection, colonization and movement of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in kiwifruit tissues using a GFPuv-labeled strain. *PLoSOne* 11(3):e0151169.
- Glickmann, E., Gardan, L., Jacquet, S., Hussain, S., Elasri, M., Petit, A. and Dessaux, Y. 1998. Auxin production is a common feature of most pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 11:156-162.
- Göhre, V., Spallek, T., Häweker, H., Mersmann, S., Mentzel, T., Boller, T., de Torres, M., Mansfield, J. W. and Robatzek, S. 2008. Plant pattern-recognition receptor FLS2 is directed for degradation by the bacterial ubiquitin ligase AvrPtoB. *Curr. Biol.* 18:1824-1832.
- Goto, M., Hikota, T., Nakajima, M., Takikawa, Y. and Tsuyumu, S. 2004. Occurrence and properties of copper-resistance in plant pathogenic bacteria. *Ann. Phytopathol Soc. Japan* 60:147-153.
- 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.
- Huang, H. 2014. The Genus Actinidia a World Monograph. Science Press, Beijing, China. 317 pp.
- Huang S, Ding J, Deng D, Tang W, Sun H, Liu D, Zhang, L., Niu, X., Zhang, X., Meng, M., Yu, J., Liu, J., Han, Y., Shi, W., Zhang, D., Cao, S., Wei, Z., Cui, Y., Xia, Y., Zeng, H., Bao, K., Lin, L., Min, Y., Zhang, H., Miao, M., Tang, X., Zhu, Y., Sui, Y., Li, G., Sun, H., Yue, J., Sun, J., Liu, F., Zhou, L., Lei, L., Zheng, X., Liu, M., Hung, L., Song, J., Xu, C., Li, J., Ye, K., Zhong, S., Lu, B.-R., He, G., Xiao, F., Wang, H.-L., Zheng, H., Fei, Z. and Liu, Y. 2013. Draft genome of the kiwifruit *Actinidia chinensis*. *Nat. Commun.* 4:2640.
- Hyatt, D., Chen, G. L., LoCascio, P. F., Land, M. L., Larimer, F. W. and Hauser, L. J. 2010. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics* 11:119.

- Janssens, G. A., Goderis, I. J., Broekaert, W. F. and Broothaerts, W. 1995 A molecular method for S-allele identification in apple based on allele-specific PCR. *Theor. Appl. Genet.* 91:691-698.
- Ji, C., Okinaka, Y., Takeuchi, Y., Tsurushima, T., Buzzell, R. I., Sims, J. J., Midland, S. L., Slaymaker, D., Yoshikawa, M., Yamaoka, N. and Keen, N. T. 1997. Specific binding of the syringolide elicitors to a soluble protein fraction from soybean leaves. *Plant Cell* 9:1425-1433.
- Jiang, S., Yao, J., Ma, K. W., Zhou, H., Song, J., He, S. Y. and Ma, W. 2013. Bacterial effector activates jasmonate signaling by directly targeting JAZ transcriptional repressors. *PLoS Pathog.* 9:e1003715.
- Jones, J. B., Jackson, L. E., Balogh, B., Obradovic, A., Iriarte, F. B. and Momol, M. T. 2007. Bacteriophages for plant disease control. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45: 245-262.
- Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M. and Tanabe, M. 2014. Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Res.* 42:D199-D205.
- Keith, L. W., Boyd, C., Keen, N. T. and Partridge, J. E. 1997. Comparison of *avrD* alleles from *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 10:416-422.
- Kim, G. H., Choi, E. D., Lee, Y. S., Jung, J. S. and Koh, Y. J. 2016a. Spread of bacterial canker of kiwifruit by secondary infection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* biovar 3 in Gyeongnam in 2016. *Res. Plant Dis.* 22:276-283. (In Korean)
- Kim, G. H., Kim, K. H., Son, K. I., Choi, E. D., Lee, Y. S., Jung, J. S. and Koh, Y. J. 2016b. Outbreak and spread of bacterial canker of kiwifruit caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* biovar 3 in Korea. *Plant Pathol. J.* 32:545-551.
- Kim, G. H., Jung, J. S. and Koh, Y. J. 2017. Occurrence and epidemics of bacterial canker of kiwifruit in Korea. *Plant Pathol. J.* 33: 434-439.
- Kim, G. H., Lee, Y. S., Jung, J. S., Hur, J. S. and Koh, Y. J. 2013. Optimal spray time, interval and number of preventive fungicides for the control of fruit rots of green and gold kiwifruit cultivars. *Res. Plant Dis.* 19: 1-6. (In Korean)
- Kim, K.-H. and Koh, Y. J. 2015. Development of a Maryblyt-based forecasting model for kiwifruit bacterial blossom blight. *Res. Plant Dis.* 21:67-73.
- Ko, S. J., Kang, B. R., Cha, K. H., Kim, Y. H., and Kim, K. C. 2000a. Effects of freezing-thawing on bacterial canker development in dormant cane of kiwifruit. *Res. Plant Dis.* 6:82-87. (In Korean)
- Ko, S. J., Kang, B. R., Lee, Y. H., Kim, Y. H., and Kim, K. C. 2000b. Effects of freezing temperatures, freezing durations and cane diameters on bacterial canker development in kiwifruit vines and on migration of bacterial pathogen in cortical tissue. *Res. Plant Dis.* 6:76-81. (In Korean)
- Ko, S. J., Lee, Y. H., Cha, K. H., Lee, S. D., and Kim, K. C. 2002. Occurrence of kiwifruit bacterial canker disease and control by cultivation type. *Res. Plant Dis.* 8:179-183. (In Korean)

- Koh, H. S., Kim, G. H., Lee, Y. S., Koh, Y. J. and Jung, J. S. 2014. Molecular characteristics of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* strains isolated in Korea and a multiplex PCR assay for haplotype differentiation. *Plant Pathol. J* 30:96-101.
- Koh, Y. J. 1995. Economically important diseases of kiwifruit. *Plant Dis. Agric.* 1:3-13. (In Korean)
- Koh, Y. J., Cha, B. J., Chung, H. J. and Lee, D. H. 1994. Outbreak and spread of bacterial canker in kiwifruit. *Korean J. Plant Pathol.* 10:68-72. (In Korean)
- Koh, Y. J., Kim, B. H., Ma, G. C., Shin, J. S., Park, Y. S. and Bang, G. P. 2008. Easy Understandable Kiwifruit Diseases, Insects and Physiological Disorders. Joongang Life Publishing Co. 149 pp. (In Korean)
- Koh, Y. J., Kim, G. H. and Jung, J. S. 2017. A proposed manual for the efficient management of kiwifruit bacterial canker in Korea. *Res. Plant Dis.* 23:1-18. (In Korean)
- Koh, Y. J., Kim, G. H., Jung, J. S., Lee, Y. S., and Hur, J. S. 2010. Outbreak of bacterial canker on Hort16A (*Actinidia chinensis* Planchon) caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Korea. *N. Z. J. Crop Hortic. Sci.* 38:275-282.
- Koh, Y. J., Kim, G. H., Koh, H. S., Lee, Y. S., Kim, S. C., and Jung, J. S. 2012a. Occurrence of a new type of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* strain of bacterial canker on kiwifruit in Korea. *Plant Pathol. J* 28:423-427.
- Koh, Y. J., Kim, G. H., Lee, Y. S., Sohn, S. H., Koh, H. S., Kwon, S., Heu, S. and Jung, J. S. 2012b. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *actinidiae* subsp. nov., a new bacterial pathogen causing canker-like symptoms in yellow kiwifruit, *Actinidia chinensis*. *New Zealand J. Crop Hort. Sci.* 40:269-279.
- Koh, Y. J., Park, S. Y., and Lee, D. H. 1996. Characteristics of bacterial canker of kiwifruit occurring in Korea and its control by trunk injection. *Korean J. Plant Pathol.* 12: 324-330. (In Korean)
- Koh, Y. J., Seo, J. K., Lee, D. H., Shin, J. S., and Kim, S. H. 1999. Chemical control of bacterial canker of kiwifruit. *Plant Dis. Agric.* 5:95-99. (In Korean)
- Koh, Y. J. and Lee, D. H. 1992. Canker of kiwifruit by *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*. *Kor. J. Plant Pathol.* 8:119-122. (In Korean)
- Lee, A. H. Y., Hurley, B., Felsensteiner, C., Yea, C., Ckurshumova, W., Bartetzko, V., Wang, P. W., Quach, V., Lewis, J. D., Liu, Y. C., Bornke, F., Angers, S., Wilde, A. and Guttman, D. S. 2012. A bacterial acetyltransferase destroys plant microtubule networks and blocks secretion. *PLoS Pathog.* 8:e1002523.
- Lee, J. H., Kim, J. H., Kim, G. H., Jung, J. S., Hur, J. S. and Koh, Y. J. 2005. Comparative analysis of Korean and Japanese strains of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* causing bacterial canker of kiwifruit. *Plant Pathol. J.* 21:119-126.
- Lee, K. J. 2015. Arbormedicine. Seoul National University Press. 446pp. (In Korean)
- Lee, Y. S., Kim, G. H., Koh, Y. J., Zhuang, Q. and Jung, J. S. 2016. Development of specific markers for identification of biovars 1 and 2 strains of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Plant Pathol. J.* 32:162-167.

- Lee, Y. S., Kim, J., Kim, G. H., Choi, E. D., Koh, Y. J. and Jung, J. S. 2017. Biovars of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* strains, the causal agent of bacterial canker of kiwifruit, isolated in Korea. *Res. Plant Dis.* 23:35-41. (In Korean)
- Li, H. and Durbin, R. 2009 Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25:1754-1760.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Avescasis, G. and Durbin, R. 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25:2078-2079.
- Lindeberg, M., Cunnac, S. and Collmer, A. 2012. *Pseudomonas syringae* type III effector repertoires: last words in endless arguments. *Trends Microbiol.* 20:199-208.
- Lindeberg, M., Stavrinos, J., Chang, J. H., Alfano, J. R., Collmer, A., Dangl, J. L., Greenberg, J. T., Mansfield, J. M. and Guttman, D. S. 2005. Proposed guidelines for a unified nomenclature and phylogenetic analysis of type III Hop effector proteins in the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18:275-282.
- Liyanage, H., Palmer, D. A., Ullrich, M. and Bender, C. L. 1995. Characterization and transcriptional analysis of the gene cluster for coronafacic acid, the polyketide component of the phytotoxin coronatine. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3843-3848.
- Lugtenberg, B. and Kamlikova, F. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 63: 541-556.
- Marcelletti, S., Ferrante, P., Petriccione, M., Firrao, G. and Scortichini, M. 2011. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* draft genomes comparison reveal strain-specific features involved in adaptation and virulence to *Actinidia* species. *PLoS ONE* 6(11):e27297.
- Masami, N., Masao, G., Katsumi, A., and Tadaaki, H. 2004. Nucleotide sequence and organization of copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *European J. Pl. Pathol.* 110:223-226.
- Mazzaglia, A., Studholme, D. J., Taratufolo, M. C., Cai, R., Almeida, N. F., Goodman, T., Guttman, D. S., Vinatzer, B. A. and Balestra, G. M. 2012. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (PSA) isolates from recent bacterial canker of kiwifruit outbreaks belong to the same genetic lineage. *PLoSOne* 7(5):e36518.
- McCann, H. C., Rikkerink, E. H. A, Bertels F., Fiers, M., Lu, A., ReesGeorge, J., Andersen, M. T., Gleave, A. P., Haubold, B., Wohlers, M. W., Guttman, D. S., Wang, P. W., Straub, C., Vanneste, J., Rainey, P. B., and Templeton, M. D. 2013. Genomic analysis of the kiwifruit pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* provides insight into the origins of an emergent plant disease. *PLoS Pathog.* 9(7):e1003503.
- Mellano, M. A. and Cooksey, D. A. 1988. Nucleotide sequence and organization of copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *J. Bacteriol.* 170:2879-2883.
- Michael, B., Smith, J. N., Swift, S., Heffron, F. and Ahmer, B. M. 2001. SdiA of *Salmonella enterica* is a LuxR homolog that detects mixed microbial communities. *J. Bacteriol.* 183:5733-5742.

- Mills, S. D., Claudia, A., Jasalavich, C. A. and Cooksey, D. A. 1993. A two-component regulatory system required for copper-inducible expression of the copper resistance operon of *Pseudomonas syringae*. *J. Bacteriol.* 175:1656-1664.
- Munkvold, K. R., Martin, M. E., Bronstein, P. A. and Collmer, A. 2008. A survey of the *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 type III secretion system effector repertoire reveals several effectors that are deleterious when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21:490-502.
- Nakajima, M., Goto, M. and Hibi, T. 2002. Similarity between copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and *P. syringae* pv. *tomato*. *J. Gen. Plant Pathol.* 68:68-74.
- 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* 55:427-436.
- Nawrocki, E. P. and Eddy, R. 2013. Computational identification of functional RNA homologs in metagenomic data. *RNA Biol.* 10:1170-1179.
- Nicaise, V., Joe, A., Jeong, B. R., Korneli, C., Boutrot, F., Westedt, I., Staiger, D., Alfano, J. R. and Zipfel, C. 2013. *Pseudomonas* HopU1 modulates plant immune receptor levels by blocking the interaction of their mRNAs with GRP7. *EMBO J.* 32:701-712.
- Overbeek, R., Begley, T., Butler, R. M., Choudhuri, J. V., Chuang, H. Y., Cohoon, M., de Crécy-Lagard, V., et al. 2005. The subsystems approach to genome annotation and its use in the project to annotate 1000 genomes. *Nucleic Acids Res.* 33:5691-702.
- Palmer, D. A., Bender, C. L. and Sharma, S. B. 1997. Use of Tn5-gusA5 to investigate environmental and nutritional effects on gene expression in the coronatine biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *Can. J. Microbiol.* 43:517-525.
- Powell, S. L., Forslund, K., Szklarczyk, D., Trachana, K., Roth, A. and Huerta-Cepas, J. 2014. eggNOG v4.0: nested orthology inference across 3686 organisms. *Nucleic Acids Res.* 42:D231-239.
- Reglinski, T., Vanneste, J., Wurms, K., Gould, E., Spinelli, F. and Rikkerink, E. 2013. Using fundamental knowledge of induced resistance to develop control strategies for bacterial canker of kiwifruit caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Frontiers in Plant Sci.* 4:1-4.
- Roberto, F. F., Klee, H., White, F., Nordeen, R. and Kosuge, T. 1990. Expression and fine structure of the gene encoding N epsilon-(indole-3-acetyl)-L-lysine synthetase from *Pseudomonas savastanoi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:5797-5801.
- Rodríguez-Herva, J. J., González-Melendi, P., Cuartas-Lanza, R., Antúnez-Lamas, M., Río-Alvarez, I., Li, Z., López-Torrejón, G., Díaz, I., del Pozo, J. C., Chakravarthy, S., Collmer, A., Rodríguez-Palenzuela, P. and López-Solanilla, E. 2012. A bacterial cysteine protease effector protein interferes with photosynthesis to suppress plant innate immune responses. *Cell. Microbiol.* 14:669-681.

- Ruinelli, M., Schneeberger, P. H. H., Ferrante, P., Buhlmann, A., Scortichini, M., Vanneste, J. L., Duffy, B. and Pothi, J. F. 2017. Comparative genomics-informed design of two LAMP assays for detection of the kiwifruit pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and discrimination of isolates belonging to the pandemic biovar 3. *Plant Pathol.* 66:140-149.
- Salomon D, Bosis E, Dar D, Nachman I, Sessa G (2012) Expression of *Pseudomonas syringae* type III effectors in yeast under stress conditions reveals that HopX1 attenuates activation of the high osmolarity glycerol MAP kinase pathway. *Microbiol.* 158:2859-2869.
- Sawada, H., Kanaya, S., Tsuda, M., Suzuki, F., Azegami, K. and Saitou, N. 2002. A phylogenomic study of the OCTase gene in *Pseudomonas syringae* pathovars: the horizontal transfer of the *argK-tox* cluster and the evolutionary history of OCTase gene on their genomes. *J. Mol. Evol.* 54:437-457.
- Sawada, H. Kondo, K. and Nakaune, R. 2016. Novel biovar (biovar 6) of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* causing bacterial canker of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) in Japan. *Jpn. J. Phytopathol.* 82:101-115.
- Sawada, H., Miyoshi, T. and Ide, Y.. 2014. Novel MLSA group (Psa5) of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* causing bacterial canker of kiwifruit (*Actinidia chinensis*) in Japan. *Jpn. J. Phytopathol.* 80:171-184. (In Japanese)
- Sawada, H., Shimizu, S., Miyoshi, T., Shinozaki, T., Kusumoto, S., Nogushi, M., Naridomi, T., Kikuhara, K., Kansako, M., Fujikawa, T. and Nakaune, R. 2015. Characterization of biovar 3 strains of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolated in Japan. *Jpn. J. Phytopathol.* 81:111-126. (In Japanese)
- Schattner, P., Brooks, A. N. and Lowe, T. M. 2005. The tRNAscan-SE, snoscan and snoGPS web servers for the detection of tRNAs and snoRNAs. *Nucleic Acids Res.* 33:W686-W689.
- Scortichini, M., Marcelletti, S., Ferrante, P., Petriccione, M., and Firrao, G. 2012. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: a re-emerging, multi-faceted, pandemic pathogen. *Mol. Plant Pathol.* 13:631-640.
- Serizawa, S. and Ichikawa, T. 1993a. Epidemiology of bacterial canker of kiwifruit. 1. Infection and bacterial movement in tissue of new canes. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan.* 55:452-459. (In Japanese)
- Serizawa, S. and Ichikawa, T. 1993b. Epidemiology of bacterial canker of kiwifruit. 2. The most suitable times and environments for infection on new canes. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan.* 59:460-468. (In Japanese)
- Serizawa, S. and Ichikawa, T. 1993c. Epidemiology of bacterial canker of kiwifruit. 3. The seasonal changes of bacterial population in lesions and of its exudation from lesion. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan.* 59:469-476. (In Japanese)

- Serizawa, S. and Ichikawa, T. 1993d. Epidemiology of bacterial canker of kiwifruit. 4. Optimum temperature for disease development on new cane. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*. 59:694-701. (In Japanese)
- Serizawa, S. and Ichikawa, T. 1994. Epidemiology of bacterial canker of kiwifruit. 5. Effect of infection in fall to early winter on the disease development in branches and trunk after winter. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*. 60:237-244. (In Japanese)
- Serizawa, S., Ichikawa, T. and Suzuki, H. 1994. Epidemiology of Research in Plant Disease Vol. 23 No. 1 17 bacterial canker of kiwifruit. 5. Effect of infection in fall to early winter on the disease development in branches and trunk after winter. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn*. 60: 237-244. (In Japanese)
- Serizawa, S., Takikawa, Y., Ichikawa, T., and Goto, M. 1989. Occurrence of bacterial canker of kiwifruit in Japan: description of symptoms, isolation of the pathogen and screening of bactericides. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 55:427-436.
- Shigo, A. H., Money, W. E. and Dodds, D. I. 1977. Some internal effects of Mauguet tree injections. *J. Arboric.* 3:213-220.
- Son, K. I., Kim, G. H., Choi, E. D., Kim, K.-H., Lee, Y. S., Jung, J. S. and Koh, Y. J. 2016. Seasonal prevalence of bacterial canker of kiwifruit in Boseong in 2014 and 2015. *Res. Plant Dis.* 22:217-226. (In Korean)
- Spinelli, F., Donati, I., Cellini, A., Buriani, G., Mauri, S., Rocchi, L., Giacomuzzi, V., Ortugno, C., Costa, G. and Vanneste, J. 2013. Optimization of the use of AMS to control bacterial canker of kiwifruit (*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*). Proceedings of 1st International Symposium on Bacterial Canker of Kiwifruit (Psa). Mt Maunganui, New Zealand.
- Spinelli, F., Donati, I., Vanneste, J. L., Costa, M. and Costa, G. 2011. Real time monitoring of the interactions between *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and *Actinidia* species. *Acta Hort.* 913:461-465.
- Stefani, E. and Giovanardi, D. 2012. Dissemination of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* through pollen and its epiphytic life on leaves and fruits. *Phytopathol. Medit.* 50:473-483.
- Stevens, A. M. and Greenberg, E. P. 1997. Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: essential elements for activation of the luminescence genes. *J. Bacteriol.* 179:557-562.
- Stewart, A., Hill, R. and Stark, C. 2011. Desktop evaluation on commercially available microbial-based products for control or suppression of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Bio-Prot. Res. Rep.* 1.
- Takikawa, Y., Serizawa, S., Ichikawa, T., Tsuyumu, S., and Goto, M. 1989. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* pv. nov.: the causal bacterium of kiwifruit canker in Japan. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 55:437-444.
- Tanbara, K. 1988. Kiwifruit Dictionary. Japan Ehime Agricultural Cooperatives. 374 pp. (In Japanese)

- Templeton, M. D., Warren, B. A., Andersen, M. T., Erik, H. A. Rikkerink, E. H. A., Peter, C. and Fineran, P. C. 2015. Complete DNA sequence of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, the causal agent of kiwifruit canker disease. *Genome Announc.* 3:e01054-15.
- Trevors, J. T. 1987. Copper resistance in bacteria. *Microbiol. Sci.* 4:29-31.
- Ullrich, M., Peñaloza-Vázquez, A., Bailey, A. M. and Bender, C. L. 1995. A modified two-component regulatory system is involved in temperature dependent biosynthesis of the *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine. *J. Bacteriol.* 177:6160-6169.
- Untergrasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M. and Rozen, S. G. 2012. Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 40:e115.
- Ushiyama, K. 1993. Studies of the epidemics and control of bacterial canker of kiwifruit caused by *Pseudomonas syringae*pv. *actinidiae*. *Bull. Kanagawa Hort. Exp. Station* 43:1-76. (In Japanese)
- Vanneste, J. L., Yu, J., Cornish, D. A., Tanner, D. J., Windner, R., Chapman, J. R., Taylor, R. K. Mackay, J. F. and Dowlut, S. 2013. Identification, virulence and distribution of two biovars of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in New Zealand. *Plant Dis.* 97:708-719.
- Vanneste, J. L. 2013. Recent progress on detecting, understanding and controlling *Pseudomonas syringae*pv. *actinidiae*: a short review. *N. Z. Plant Prot.* 66:170-177.
- Vanneste, J. L., Poliakoff, F., Audusseau, C., Cornish, D. A., Paillard, S., Rivoal, C. and Yu, J. 2011. First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, the causal agent of bacterial canker of kiwifruit in France. *Plant Dis.* 95:1311-1312.
- Weingart H., Völksch, B. and Ullrich, M. S. 1999. Comparison of ethylene production by *Pseudomonas syringae* and *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathol.* 89:360-365.
- Yao, Y., Martinez-Yamout, M. A., Dickerson, T. J., Brogan, A. P. and Wright, P. E. 2006. Structure of the *Escherichia coli* quorum sensing protein SdiA: activation of the folding switch by acyl homoserine lactones. *J. Mol. Biol.* 355:262-273.
- Yu, J. G., Lim, J. A., Song, Y. R., Heu, S., Kim, G. H., Koh, Y. J. and Oh, C. S. 2016. Isolation and characterization of bacteriophages against *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* causing bacterial canker disease in kiwifruit. *J. Microbiol. Biotechnol.* 26:385-393.

<별첨작성 양식>

[별첨 1]

### 연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 참다래 궤양병균 집단 분석용 분자마커 개발 및 유전적 특성 구명					
	(영문) Development of molecular markers for analyzing populations of kiwifruit canker pathogens and characterization of their genetic backgrounds					
주관연구기관	순천대학교		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 순천대학교		
참 여 기 업	(주)바이오메딕			(성명) 고 영 진		
총연구개발비 (434,000천원)	계	434,000,000	총 연 구 기 간  총 참 여 연 구 원 수	2015. 08. 14~2017. 08. 13(2년 월)		
	정부출연 연구개발비	400,000,000		총 인 원	14명	
	기업부담금	34,000,000		내부인원	8명	
	연구기관부담금			외부인원	6명	

**○ 연구개발 목표 및 성과**

- 참다래 궤양병균 집단 비교분석 및 발병특성 조사
- 지역 및 품종별 맞춤형 참다래 궤양병 방제매뉴얼 도출 및 방제 컨설팅
- 참다래 궤양병균 Biovar 진단용 특이적 분자마커 개발
- Psa3 집단의 지리적 기원 추적용 분자마커 개발
- 참다래 궤양병균 Biovar별 유전체 비교 분석
- 지리적 기원이 다른 집단별 유전체 비교 분석

**○ 연구내용 및 결과**

- 지역 및 품종별 참다래 궤양병균 집단 비교분석 및 발병특성 조사
- 지역 및 품종별 맞춤형 참다래 궤양병 방제매뉴얼 도출
- 참다래 궤양병 방제매뉴얼을 활용한 농가 현장 컨설팅
- RAPD 분석을 통한 Psa1과 Psa2 특이적 primer 선발
- 본 연구팀이 개발한 Psa3 특이적 primer의 성능 재검증
- RAPD 분석을 통한 지리적 기원이 다른 Psa3 특이적 primer 선발
- 중국, 뉴질랜드, 이탈리아 등 주요 참다래 생산 국가에서 유래하는 Psa3 균주 식별
- 3개 biovar (Psa1, Psa2, Psa3), 4개 균주에 대해 Illumina 플랫폼을 이용한 reference-guided whole genome sequencing 수행 및 초안 수준의 유전체 정보 확보.
- 3개 biovar, 4개 균주 유전체간의 비교유전체 분석을 통해 서열변이(SNP, InDel) 및 구조변이(PAV, Presence/Absence) 분석.
- 구조 및 서열 변이를 이용한 분자표지 개발 및 활용.
- 11개 Psa3 균주에 대해 Illumina 플랫폼을 이용한 reference-guided whole genome sequencing 수행 및 초안 수준의 유전체 정보 확보.

- 지리적 기원과 분리 숙주 품종이 다른 Psa3 5개 균주(제주 2점, 전남 2점, 중국 1점)에 대한 비교 유전체 분석을 통해 서열변이(SNP, InDel) 및 구조변이(PAV) 분석.
- 구조 및 서열변이를 이용한 분자표지 개발 및 활용.
- 국내 고유이며 Psa2 biovar에 속하는 2개 균주에 대해 PacBio NGS 플랫폼을 이용한 complete genome 수준의 유전체 정보 확보(국내외 최초), pan genome과 core genome 분석 및 주요 병원성 관련 유전자들에 대해 5개 biovar 간의 비교 분석.

#### ○ 연구성과 활용실적 및 계획

- 참다래 궤양병 방제매뉴얼을 참다래 재배 농가 컨설팅에 활용
- Psa1, Psa2, Psa3 진단용 분자마커는 수입하는 묘목이나 꽃가루에 대한 국경검역에 활용
- Psa3 진단마커는 국내유입 경로 및 확산 경로 역학조사에 활용
- 국내 고유 Psa2 biovar에 속하는 2개 균주(CJW7, KBE9)에 대해서 PacBio NGS 플랫폼을 이용하여 국내외 처음으로 완전 유전체에 매우 근접한 성과를 거두었다. 현재 2개의 균주들에 대하여 Illumina 플랫폼을 이용하여 확보한 초안 수준의 유전체 정보도 보유하고 있다. 따라서 컨티그가 1-2개로 이루어진 완전 유전체를 확보하기 위하여 두 가지 NGS 방식에 의해 생성된 유전체 정보를 병합하여 완전 유전체를 확보하여 이를 국내외 유전체 DB에 기탁하고, 국제 학술지 논문도 투고할 예정이다.
- 특정 biovar에 고유한 병원성 인자의 유전자 정보(T3E effector protein, LuxR QS system 등)는 향후 유전자 기능 연구, 숙주인 참다래에 존재하는 상응하는 *R* gene과의 상호작용 연구와 이를 통한 궤양병 내병성 품종 육성 등에 응용
- biovar 및 균주 간 서열변이(SNP, In/Del, PAV 등) 정보를 다량으로 확보하고, 이를 활용한 분자표지를 개발하고 농가의 애로사항 해결에도 활용
- 본 과제를 통해 확보한 분자표지 정보들에 대해서는 지적재산권을 확보할 예정이며, 가칭“PSA Genotype ID™ Platform”을 구축하여 화분(꽃가루) 수입 업체, 묘목 업체, 참다래 재배 농가 등을 대상으로 균주 동정을 위한 상업적 분석 서비스 시스템 운영에 활용

[별첨 2]

## 자체평가의견서

### 1. 과제현황

			코드번호	D-15	
			과제번호	315019-2	
사업구분	농생명산업기술개발사업				
연구분야	원예작물과학			과제구분	단위
사업명	농생명산업기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	참다래 케양병균 집단 분석용 분자마커 개발 및 유전적 특성 구명			과제유형	(기초,응용,개발)
연구기관	순천대학교			연구책임자	고영진
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2015.8.14. ~ 2016.8.13.	200,000	17,000	217,000
	2차년도	2016.8.14. ~ 2017.8.13.	200,000	17,000	217,000
	3차년도				
	4차년도				
	5차년도				
	계	2015.8.14. ~ 2017.8.13.	400,000	34,000	434,000
참여기업	(주)바이오메딕				
상대국	상대국연구기관				

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2017. 9. 25.(월)

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
순천대학교 식물학과	교수	고영진

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확 약	고영진
-----	-----

## I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

### 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 지역 및 품종별 맞춤형 참다래 궤양병 방제매뉴얼 개발
- 참다래 궤양병균 biovar 진단용 분자마커 개발 및 Psa3 집단의 지리적 기원 추적용 분자마커 개발
- 국내 고유의 참다래 궤양병균 Psa2에 대한 complete genome 수준의 유전체 최초 해독 및 5가지 biovar에 대한 최초의 core genome 파악을 통한 맞춤형 방제 기반 구축

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 참다래에 발생하는 다른 세균성병뿐만 아니라 다른 과수 세균성병 방제용 매뉴얼로 응용
- Psa1, Psa2, Psa3 진단용 분자마커는 수입하는 묘목이나 꽃가루에 대한 국경검역에 활용
- 비교 유전체 분석을 통하여 개발한 분자표지를 활용하여 농가 애로사항(참다래 재배 농가와 꽃가루 수입 업체간의 분쟁) 해결에 활용

### 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 지역 및 품종별 맞춤형 참다래 궤양병 방제매뉴얼을 참다래 재배 농가 컨설팅에 활용
- 개발된 균주 특이적 분자마커는 참다래 궤양병의 역학조사에 강력한 도구로 활용 가능
- 비교 유전체 분석을 통하여 개발한 분자표지를 활용하여 “PSA Genotype ID™ Platform” 를 구축함으로써 병의 모니터링, 검역, 기원 추적, 분쟁 해결, 신규 biovar 출현에 대한 예보 시스템 기반 구축

### 4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 지난 20여년동안 축적한 연구결과와 컨설팅 경험을 모두 취합하여 맞춤형 방제매뉴얼 작성에 활용
- 국내에서 발생한 궤양병의 균주를 전수 조사하여 분자적 특성을 구명
- 국내 고유의 참다래 궤양병균 Psa2에 대한 complete genome 수준의 유전체 해독, core genome 분석 및 biovar간 주요 병원성 인자 심층 비교 분석. 참다래 궤양병균 3가지 주요 biovar의 15개 균주에 대한 draft genome 확보 및 비교 유전체 분석

### 5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 2017년 9월 6일 포르투갈 포르투에서 개최된 국제키위심포지엄에서 ‘Current status of bacterial canker occurrence in Korea’ 포스터발표
- 2017년 9월 13일 제주도 서귀포시에서 개최된 아시아식물병리학회에서 ‘Translational research on bacterial canker of kiwifruits in Korea’ Plenary lecture
- Psa 전체 균주에 대한 특이적 분자마커의 개발은 세계적으로 최초임
- 2016년 6월 29일 한국 육종학회-차세대BG21사업단-GSP 사업단 공동 심포지엄에서 ‘Genome-wide identification of sequence and structural variations from the bacterial canker of kiwifruit *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (PSA) pathovars and their application to pathovar genotyping’ 포스터 발표
- 2016년 11월 10일 한국감귤아열대과수학회 주최 기후변화에 따른 감귤·아열대 과수산업 전망 심포지엄에서 ‘SNP and PAV markers for genotyping of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (PSA) pathovars, the bacterial canker of kiwifruit’ 포스터 발표

## II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
지역 및 품종별 참다래 궤양병균 집단 비교분석 및 발병특성 조사	10	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>우리나라 참다래 재배 지역 및 품종별 궤양병 발생 특성 파악</li> </ul>
지역 및 품종별 맞춤형 참다래 궤양병 방제매뉴얼 도출	15	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>2017년 ‘식물병연구’에 “키위 궤양병 효율적 관리를 위한 매뉴얼”의 논문게재 후 농가에 보급</li> </ul>
참다래 궤양병 방제 컨설팅	15	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>지역 및 품종별 맞춤형 참다래 궤양병 방제매뉴얼에 따라 재배농가 교육 및 궤양병 발생농가 현장방문 컨설팅</li> </ul>
참다래 궤양병균을 진단할 수 있는 분자마커의 검증	5	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>참다래 궤양병 진단, Psa biovar 동정, Psa3 기원 추적 가능</li> </ul>
참다래 궤양병균의 biovar 동정용 특이적 분자마커 개발	15	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>Psa1, Psa2, Psa3를 검출할 수 있는 분자적 방법의 확립</li> </ul>
Psa3 집단의 지리적 기원 추적용 분자마커 개발	20	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>Psa3에 속하는 균주의 기원을 밝힐 수 있는 분자마커 개발</li> <li>궤양병균 집단의 진단, 동정 및 전파경로 추적 가능</li> </ul>
주요 참다래 궤양병균에 대한 유전체 해독 및 비교유전체 분석	10	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>Psa2 2개 균주에 대한 complete genome 수준의 유전체 확보와 참다래 궤양병균 core genome의 최초 분석</li> <li>5개 biovar 간의 병원성 인자(Type III effector protein 등) 심층 비교 분석</li> <li>Psa1(1개 균주), Psa2(2개 균주)에 대한 draft genome 확보, 비교 유전체 분석 및 분자표지 개발</li> </ul>
지리적 기원이 다른 참다래 궤양병균 Psa3 균주의 유전체 해독 및 비교 유전체 분석	10	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>12개 Psa3 균주에 대한 draft genome 확보, 비교 유전체 분석 및 분자표지 개발.</li> <li>고병원성 Psa3 특이 유전자 파악을 통한 맞춤형 방제 기반구축</li> <li>개발된 분자표지를 활용한 농업 현장에의 활용(참다래 재배농가-꽃가루 수입업체간 궤양병 기원에 관한 분쟁)</li> <li>개발한 분자표지를 활용하여 “PSA Genotype ID™ Platform”를 구축함으로써 병의 모니터링, 검역, 기원 추적, 분쟁 해결, 신규 biovar 출현에 대한 예보 시스템 기반 구축</li> </ul>
합계	100점		

### III. 종합의견

#### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

○ 우리나라 참다래 궤양병 발생 및 확산 현황을 파악하였고, 우리나라에 분포하는 참다래 궤양병균의 유전적 특성을 구명하였고, 국경검역, 국내방역이나 방제현장에서 적용할 수 있는 분자마커를 개발하였으며, 참다래 궤양병에 대한 맞춤형 방제매뉴얼을 도출하여 종합적 방제대책을 제시한 연구로서 의미가 있음

#### 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

○ 연구목표 대비 성과에서 대부분 초과달성했으나 연구기반지표 중에서 정책활용분야에 제안은 이루어졌으나 심의중이어서 채택이 아직 되지 않았고 홍보는 연구종료 후 이루어졌는데, 광범위한 연구 범위에 비추어 연구기간이 2년으로 제한되어 있었다는 점을 평가시 고려되어야 할 것임

#### 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

○ Psa3에 의한 참다래 궤양병은 최근 10년 이내에 발생하여 전 세계적으로 키위 산업에 커다란 영향을 미치고 있는 세균성 식물병임. 따라서 식물세균병의 발생과 확산, 변이 등의 연구의 좋은 모델이 될 수 있음  
○ 본 연구팀의 결과는 다른 나라에 견주에 상당히 앞서고 있으므로 향후 관련 연구기관이나 학계의 지속적 추가 연구가 진행되기를 희망함

### IV. 보안성 검토

○ 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

#### 1. 연구책임자의 의견

#### 2. 연구기관 자체의 검토결과



### 3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용-홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특 허 출원	특 허 등록	품 종 등록	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표	정 책 활 용			홍 보 전 시		
												SC I	비 SC I						논 문 평 균 IF	
단위	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치																				
최종목표	2	2		1							3	1		6	30		1	1	5	
연구기간 내 달성실적	3	3		3							3	3	0.7 53	13	75		1	26	5	
달성율(%)	150	150		300							100	300		217	250		100	2600	100	

### 4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	참다래 퀘양병 방제매뉴얼
②	참다래 퀘양병균의 biovar 동정용 특이적 분자마커
③	Psa3 집단의 아집단(group) 특이적 분자마커
④	Biovar Psa2에 대한 complete genome 수준의 유전체와 참다래 퀘양병균의 core genome
⑤	참다래 퀘양병균 biovar 및 intrabiovar의 genotyping을 위한 분자표지 기술

### 5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장에로 해결	정책 자료	기타
①의 기술		√						√		
②의 기술	√					√		√	√	
③의 기술	√									
④의 기술	√									
⑤의 기술		√						√		

\* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	참다래 궤양병 발생농가 현장컨설팅으로 농가소득 증대
②의 기술	참다래 궤양병의 조기 진단 및 전파 차단에 활용
③의 기술	지리적 기원을 추적할 수 있으므로 국경검역에 활용
④의 기술	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Biovar Psa2의 complete genome 해독과 core genome 분석을 바탕으로 참다래 궤양병균 5가지 biovar의 병원성 관련 유전자들에 대한 심층 비교 분석이 최초로 이루어졌으므로 우수 학술 논문 발표에 활용 가능.</li> <li>•고병원성 Psa3 biovar 특이적이며, 병원성과 밀접하게 연관된 유전자가 파악 되었으므로 유전자 기능과 조절에 관한 추가 연구를 통해 맞춤형 방제 기술 개발에 활용 가능할 것으로 기대. 아울러 숙주와의 상호 작용에 관한 추가 연구를 통해 궤양병 저항성 품종 개발에 활용 가능할 것으로 기대.</li> </ul>
⑤의 기술	<ul style="list-style-type: none"> <li>•개발된 참다래 궤양병균 biovar 및 intrabiovar의 genotyping을 위한 분자표지를 활용하여 “PSA Genotype ID™ Platform” 를 구축함으로써 병의 모니터링, 검역, 기원 추적, 분쟁 해결, 신규 biovar 출현에 대한 예보 시스템 기반 구축 기대.</li> </ul>

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보전시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명				
가중치																			
최종목표																			
연구기간내 달성실적																			
연구종료후 성과창출 계획	1					1					1	1	≥1	1			1		



## 8. 뒷면지

### 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농식품기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.