

최 중  
연구보고서

632.3

L2933

v.2

참다래 궤양병 조기진단 및 무인방제 시스템 개발

Development of Rapid Diagnosis and Automatic Control System  
for Bacterial Canker of Kiwifruit

연구기관

순천대학교

농림부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “참다래 궤양병 조기진단 및 무인방제 시스템 개발” 과제의 최종  
보고서로 제출합니다.

1997. 11. 25.

주관연구기관명 : 순천대학교

총괄연구책임자 : 고 영 진

연 구 원 : 김 정 호

연 구 원 : 노 일 섭

협동연구기관명 : 해남난지과수시험장

협동연구책임자 : 김 승 화

연 구 원 : 마 경 철

여 백

# 요 약 문

## I. 제목

참다래 궤양병 조기진단 및 무인방제 시스템 개발

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

참다래 재배지에서 최근에 급속하게 확산되고 있는 궤양병은 일부 과수원을 폐원시킬 만큼 참다래 재배의 가장 큰 제한 요인으로 대두되고 있어 참다래 궤양병을 효과적으로 방제할 수 있는 방제전략의 수립이 중요하다.

따라서, 본 연구개발의 궁극적인 목적은 남해안 지역 특화 고소득 작목인 참다래의 안정적인 생산기반을 조성할 수 있는 참다래 궤양병에 대한 종합적 관리체계를 확립하는 것이다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

참다래 궤양병에 대한 종합적 관리 체계를 확립하기 위한 본 연구개발 내용 및 범위는 Biolog를 이용한 궤양병균 동정체계의 확립과 궤양병균 진단용 RAPD 및 RFLP marker를 선별하여 참다래 궤양병 조기 진단 시스템을 개발하고, 참다래 궤양병 약제저항성균의 년차별 발생 실태를 조사하며, 궤양병에 대한 우수약제를 선별하고 적정 살포시기 및 살포횟수를 조사하여 참다래 궤양병 화학적 방제 체계를 확립하는 것이다.

참다래 궤양병에 대한 종합적 관리 체계를 확립하기 위한 본 연구개발의 내용 및 범위를 년차별로 요약하면 다음과 같다.

수행년도	연구 개발 내용	연구 개발 범위
1차년도 (1995)	○참다래 궤양병 조기 진단 시스템 개발	- BIOLOG <sup>®</sup> system 도입 - 궤양병균 data base 확보
	○참다래 궤양병 약제저항성균 발생 실태 조사	- 궤양병균 균주 수집
	○참다래 궤양병 화학적 방제 체계 확립	- 궤양병 우수약제 선별 - 궤양병 무인 방제 장치 설치
2차년도 (1996)	○참다래 궤양병 조기 진단 시스템 개발	- Biolog data base의 완성 - 궤양병균 RAPD 분석용 primer의 선별 - 궤양병균 진단용 RAPD marker의 선별
	○참다래 궤양병 약제저항성균 발생 실태 조사	- 궤양병균 균주 수집 및 약제저항성균 발생수준 조사
	○참다래 궤양병 화학적 방제 체계 확립	- 무인방제 장치에 의한 궤양병 방제효과 검정 - 궤양병 우수약제에 대한 포장 검정
3차년도 (1997)	○참다래 궤양병 조기 진단 시스템 개발	- 궤양병균 RFLP 분석용 probe의 제조 - 궤양병균 진단용 RFLP marker의 선별
	○참다래 궤양병 약제저항성균 발생 실태 조사	- 궤양병균 균주 수집 및 약제저항성균 년차별 발생추이 조사
	○참다래 궤양병 화학적 방제 체계 확립	- 궤양병에 대한 우수약제의 약효 검정 - 궤양병에 대한 우수약제의 살포시기 및 살포횟수 확립

#### IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

##### ○ 연구개발결과

1. 참다래 궤양병균의 95개 탄소원 이용 성질 data base를 Biolog 시스템에 입력하여 “User data base”를 제작하여 Biolog를 이용한 참다래 궤양병균 동정체계를 완성하였다.
2. Primer C24(5'-CTT-TGG-CAT-CGG-3')에 의해 유사세균에서는 볼 수 없고 참다래 궤양병균에서 공통적으로 생성되는 668 bp 크기의 특이적인 RAPD 단편을 marker로 선발하였으며, 이 RAPD 단편을 cloning하여 참다래 궤양병균 특이적 probe로 개발하였다.
3. 우리 나라에서 수집한 참다래 궤양병균 균주들의 항생제 저항성 정도는 년차별로 증가하는 추세였으며, 일본균주들에 비하여 streptomycin 저항성은 비슷한 수준이었으나, oxytetracycline 저항성은 높은 수준이었으며, copper sulfate에 대한 저항성 발달 수준은 다소 낮은 것으로 밝혀졌다.
4. 가스신 액제, 농용신 수화제, 농용신·쿠퍼 수화제는 참다래 궤양병 방제에 활용할 수 있는 후보약제로 선발되었다.
5. 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제의 적정 약제 약제살포 간격 및 횟수는 15일 간격 3회 및 10일간격 4회로 확인되었다.

##### ○ 활용에 대한 건의

1. Biolog program과 RAPD 및 RFLP marker를 이용한 참다래 궤양병 조기 진단 시스템은 참다래 궤양병의 조기 방제 전략을 수립하는 데 활용할 것을 건의한다.
2. 참다래 궤양병에 대해 streptomycin, oxytetracycline 및 copper sulfate에 대한 높은 수준의 약제 저항성균의 출현이 확인되었으므로 약제

방제 프로그램이나 참다래 궤양병에 대한 약제 개발시 약제 저항성의 발생 억제 노력을 경주하여야 할 것이다.

3. 참다래 궤양병 방제 효과가 우수한 가스신 액제, 농용신 수화제, 농용신·쿠퍼 수화제는 참다래 궤양병 방제 약제로 개발할 것을 건의한다.

4. 참다래 궤양병 방제 약제의 살포 적기 및 약제 살포 간격 및 횟수는 약종에 따라 다르게 고시할 것을 건의한다.

5. 본 연구개발 결과 얻어진 참다래 궤양병 화학적 방제체계는 참다래 궤양병 방제를 체계화할 수 있는 지침으로 지도사업에 반영할 것을 건의한다.

# SUMMARY

## I. Title

Development of Rapid Diagnosis and Automatic Control System for Bacterial Canker of Kiwifruit

## II. The goal and importance of the research

The outbreaks of bacterial canker are rapidly increasing in major kiwifruit cultivation areas of Korea and some of the orchards have already been closed due to the severe damage caused by the disease. Therefore, it is becoming more and more important to establish a proper management strategy by which bacterial canker of kiwifruit can be effectively controlled.

The goal of this research is to develop a management system for controlling bacterial canker of kiwifruit in order to form the basis of stable production of the kiwifruit.

## III. Research contents

The following studies were performed in this research to develop a effective system for controlling bacterial canker of kiwifruit. A rapid diagnosis system for the causal agent of bacterial canker,



*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, using a rapid microbial identification system(Biolog system) and RAPD and RFLP markers. The occurrence of resistant strains of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* against commonly used antibiotics was investigated in major cultivation areas of Korea and Japan. Finally, effective control agents were screened and a chemical control system was proposed which included optimum spray schedule.

#### IV. Results and suggestions for the application of the results

##### ○ Results

1. A user data base which could be used for rapid identification of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* by Biolog system was constructed based on the abilities of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* strains to utilize to 95 carbon sources.
2. A RAPD marker specific to *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* strains was amplified by PCR using a random primer, C24(5'-CTT-TGG-CAT-CGG-3'). The cloned product of the 668 bp RAPD marker was developed as a specific probe for identification of the causal agent of bacterial canker of kiwifruit.
3. The level of antibiotic resistance of the *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolates increased year after year in Korea. The level of streptomycin resistance of the Korean isolates was similar to that of the Japanese isolates. The Korean isolates were more resistant to oxytetracycline, but less resistant to copper sulfate than the

Japanese isolates.

4. Kasugamycin, streptomycin, and streptomycin plus copper were effective in controlling the causal agent of bacterial canker of kiwifruit. These antibiotics could be used for controlling the disease.

5. Optimum spray schedule for streptomycin sulfate plus oxytetracycline was 3 times at an interval of 15 days or 4 times at an interval of 10 days.

○ Suggestions for the application of the results

1. It is necessary to identify the causal agents at an early stage of the onset of the disease to develop an effective control strategy. For this purpose, it is suggested to use the rapid diagnosis system which are based on the user data base for Biolog program and the RAPD and RFLP markers developed in this research.

2. It is suggested to consider the occurrence of antibiotic resistant strains of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in developing chemical control systems using antibiotics currently in use and in developing new antibiotics to be used for the control of bacterial canker of kiwifruit.

3. Kasugamycin, streptomycin, and streptomycin plus copper sulfate are candidate agents for controlling bacterial canker of kiwifruit. It is suggested to develop these agents as effective control measurements.

4. It is suggested to establish proper spray schedules (spray time,

frequency, and interval) for each controlling agent based on the type of antibiotic to be used.

5. The results obtained in this study could be used as an extension service guideline for systematic control of bacterial canker of kiwifruit.

# CONTENTS

Korean summary -----	3
English summary -----	7
Chap. 1. Introduction	
1. Research background -----	17
2. Research trends -----	19
3. Research goal -----	22
4. Research contents -----	23
5. The importance of the research -----	24
Chap. 2. Development of rapid diagnosis system for bacterial canker	
1. Introduction -----	27
2. Materials and methods -----	28
3. Results -----	34
Chap. 3. Investigation of antibiotics-resistant isolates	
1. Introduction -----	53
2. Materials and methods -----	54
3. Results -----	55
Chap. 4. Establishment of chemical control system for bacterial canker	

1. Introduction -----	61
2. Materials and methods -----	62
3. Results -----	64
Chap. 5. Discussion -----	75
Chap. 6. Conclusions -----	81
References -----	83
Appendix -----	87

# 목 차

요약문 -----	3
SUMMARY -----	7
제1장 서론	
제1절 연구 배경 -----	17
제2절 연구 동향 -----	19
제3절 연구개발의 목적 -----	22
제4절 연구개발의 내용 및 범위 -----	23
제5절 연구개발의 중요성 및 필요성 -----	24
제2장 참다래 귀양병 조기진단 시스템 개발	
제1절 서언 -----	27
제2절 연구 방법 -----	28
1. Biolog를 이용한 참다래 귀양병균 동정체계의 확립 -----	28
2. 참다래 귀양병균 진단용 RAPD marker 선발 -----	31
3. 참다래 귀양병균 진단용 RFLP marker 선발 -----	32
제3절 연구 결과 -----	34
1. Biolog를 이용한 참다래 귀양병균 동정체계의 확립 -----	34
2. 참다래 귀양병균 진단용 RAPD marker 선발 -----	45
3. 참다래 귀양병균 진단용 RFLP marker 선발 -----	45

### 제3장 참다래 궤양병 약제저항성균 발생실태 조사

제1절 서언 -----	53
제2절 연구 방법 -----	54
1. 참다래 궤양병 streptomycin 저항성균 발생실태 조사 -----	54
2. 참다래 궤양병 oxytetracycline 저항성균 발생실태 조사 -----	54
3. 참다래 궤양병 copper 저항성균 발생실태 조사 -----	55
제3절 연구 결과 -----	55
1. 참다래 궤양병 streptomycin 저항성균 발생실태 -----	55
2. 참다래 궤양병 oxytetracycline 저항성균 발생실태 -----	55
3. 참다래 궤양병 copper 저항성균 발생실태 -----	56
4. 참다래 궤양병균 균주들의 중복 약제저항성균 발생실태 -----	56

### 제4장 참다래 궤양병 화학적 방제체계 확립

제1절 서언 -----	61
제2절 연구 방법 -----	62
1. 참다래 궤양병 무인방제장치의 효과 검정 -----	62
2. 참다래 궤양병에 대한 우수 약제의 선발 -----	62
3. 참다래 궤양병에 대한 우수 약제의 포장 검정 -----	63
4. 참다래 궤양병에 대한 우수 약제의 살포 적기 검정 -----	63
5. 참다래 궤양병에 대한 우수 약제의 적정 살포 수준 검정 -----	64
제3절 연구 결과 -----	64
1. 참다래 궤양병 무인방제장치의 설치 -----	64
2. 무인방제장치에 의한 참다래 궤양병 방제효과 -----	67
3. 참다래 궤양병에 대한 우수 약제의 선발 -----	67
4. 참다래 궤양병에 대한 우수 약제의 방제효과 -----	70

5. 참다래 귀양병에 대한 우수 약제의 살포 적기 -----	70
6. 참다래 귀양병에 대한 우수 약제의 적정 살포 수준 -----	73
제5장 고찰 -----	75
제6장 결론 -----	81
참고문헌 -----	83
부록 -----	87



여 백

# 제 1 장 서 론

## 제1절 연구 배경

1980년대 초부터 우리 나라에서 본격적으로 재배되기 시작한 참다래(키위, 양다래, kiwifruit, Chinese gooseberry)는 대중화된 과일로서 정착함에 따라 재배 초기인 1984년 183 ha에 불과했던 참다래 재배면적이 1995년에는 1,471 ha로 8배 이상 급속하게 증가하였고 생산량도 12,184 M/T에 이르고 있다. 그러나 급속한 소비의 증가에 따른 생산량 부족으로 연간 3,000 M/T 정도를 수입하고 있는 실정이다.

우리 나라의 참다래 재배지는 월동이 가능한 제주도를 비롯하여 전라남도 및 경상남도의 남해안 지역에 주로 분포하고 있는데, WTO 체계의 출범으로 농산물의 수입 개방에도 불구하고 참다래는 품질면에서 우수할 뿐만 아니라 주생산국인 뉴질랜드와는 생산 시기가 달라 국제 경쟁력을 갖추고 있는 고소득 작목으로 평가됨에 따라 앞으로도 참다래 재배면적과 재배능가는 계속 증가할 전망이다(고, 1995).

암수딴그루인 참다래는 결실수로 Hayward 품종과 수분수로 Matua 품종이 거의 전 재배지에서 재배되고 있고 참다래의 덩굴들이 덩 위에서 서로 엉켜 자라기 때문에 일단 병이 발생하면 대규모로 급속하게 확산될 가능성이 매우 높다. 또한 참다래는 우리 나라에 보급 초기부터 병방제가 필요하지 않은 무병 과수로 농가에 인식되어 재배자들이 병관리를 소홀히 해 왔었다. 그러나 참다래 영농현장에서는 태풍에 의한 피해와 동해, 상해 등 자연적인 재해뿐만 아니라 여러 가지 병해가 발생하는 것으로 보고되었다(고 등, 1994a; 백

등, 1993). 특히 제주도와 전라남도 일부 재배지역에서 발생하기 시작하여 최근에 급속하게 확산되고 있는 궤양병(潰瘍病, bacterial canker)은 일부 과수원을 폐원시킬 만큼 참다래 재배의 가장 큰 제한요인으로 대두되고 있다.

이러한 궤양병균이 잎에서 생육에 적합한 온도는 10일 평균 기온이 12-18℃이고 잎의 길이가 2 cm정도일 때 가장 감수성을 나타내므로 병든 조직에서 월동한 궤양병균은 봄(4월 - 5월)에 비바람에 의해 잎으로 전반되어 상처, 수공 또는 기공을 통하여 잎속으로 침입한 후 잎에 병징을 일으키는데 잎이 성숙해가고 기온이 20℃ 이상인 여름의 고온기에 이르러수록 궤양병균의 밀도가 급격하게 감소하며 25℃ 이상일 때는 잎에 병징이 나타나지 않는다. 잎속의 궤양병균은 중륵 또는 엽병을 통해 줄기로 이동하여 낮은 밀도로 여름을 지내고 생육에 적합한 10일 평균 기온이 12-18℃가 되는 10월말부터 다시 세균의 밀도는 계속 증가하기 시작한다. 주로 가을부터 겨울 사이에 생긴 상처 또는 전정 부위를 통하여 침입한 세균은 2월부터 세균유출액과 균열 등 전형적인 병징을 나타내기 시작하면서 봄에 세균의 밀도가 최대에 도달하고 가지와 줄기에 많은 세균유출액을 보이고 상당 기간 그 흔적을 남기기는 하지만 5월이 지나 대기의 온도가 점차 올라감에 따라 증상이 사라지며 6월 하순경부터는 장마에 의해 병징이 씻겨 내려 그 흔적조차 찾기 힘들게 되지만 주간엔 병징이 남아있는 채로 월동하기도 한다. 줄기의 병징은 기온이 다시 내려가는 이듬해 늦겨울부터 이른봄에 걸쳐서 재발생하며 주간부위까지 심하게 감염된 성목은 1-2년내에 대부분 고사하며, 심하게 감염된 과수원은 폐원에 이르게 된다(고, 1995; 芹濤 등, 1993a; 1993b; 1993c; 1993d).

우리 나라에서 참다래 궤양병이 발생하기 시작한 것은 1980년대 중반으로 추정되고 있는데, 1987년경에 제주도에서 최초로 궤양병에 의해 폐원된 과수원이 나타나기 시작하였다. 1990년대 초반부터는 전남 완도군, 해남군, 고흥

군 등에서도 궤양병이 발생하기 시작하였고 지금은 남해안 일대에 위치한 참다래 재배지 전역에서 궤양병이 발생하고 있다(고 등, 1994). 특히 제주도 북제주군과 제주시, 전남 완도군(35 ha 재배면적 중 11.2 ha 폐원), 고흥군, 진도군, 해남군, 순천시 등에서는 폐원되었거나 폐원에 임박한 과수원들이 계속 증가하고 있다. 이러한 참다래 궤양병은 1980년대 중반 일본으로부터 감염된 묘목 등을 통해 제주도로 전염되어 정착한 후 제주도와 가장 근접한 육지부인 전라남도 해남 또는 완도 등으로 태풍 등의 전염수단에 의해 전파되고 그곳으로부터 계속 확산되고 있는 것으로 추정하고 있으나 기원이 명확치는 않으며, 우리 나라에서 참다래 궤양병 연구는 아직 미미한 실정이다.

따라서, 참다래 재배지에서 최근에 급속하게 확산되고 있는 궤양병은 일부 과수원을 폐원시킬 만큼 참다래 재배의 가장 큰 제한 요인으로 대두되고 있어 참다래의 재배 확대는 물론 현상유지조차도 어려운 위기에 봉착하고 있으므로 참다래 재배의 가장 큰 제한요인으로 대두되고 있는 궤양병을 효과적으로 방제할 수 있는 종합적 방제체계의 확립이 시급한 과제이다.

## 제2절 연구 동향

참다래 궤양병균(*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*)을 비롯하여 *Pseudomonas* 속에 속하는 식물병원 세균의 종 또는 병원형(pathovar)은 여러 가지 생리·생화학적 특성에 따라 동정하는데(Hildebrand 등, 1988), 이러한 전통적인 세균 동정방법은 까다로울 뿐만 아니라 많은 시간과 노력이 소요되기 때문에 단시간에 간편하게 세균을 동정할 수 있는 시스템이 개발되고 있다.

그 중에서 Biolog program(BiOLOG MicroLog™ 2, Biolog Inc., Hayward,

CA, USA)은 세균의 95개 탄소원 이용성질을 컴퓨터 프로그램에 의해 분석하여 세균을 분류할 수 있는 간편한 세균 동정시스템의 하나다. 이 Biolog program에는 *Pseudomonas* 속에 속하는 84개의 종, type 또는 병원형 (pathovar)들의 95개 탄소원 이용여부에 관한 data base가 수록되어 있어 *Pseudomonas* 속에 속하는 식물병원 세균들을 신속하게 동정할 수 있다. 그러나 일본에서 Takikawa 등(1989)에 의해 *P. syringae* 중에서 가장 최근인 1989년 처음으로 동정 보고된 *P. syringae* pv. *actinidiae*의 data base는 수록되어 있지 않아서 Biolog program을 이용한 *P. syringae* pv. *actinidiae* 동정이 불가능하다.

한편, 식물병원 세균의 병원형을 동정하기 위한 전통적인 세균 동정방법은 많은 시간과 노력이 소요되기 때문에 최근에는 분자생물학의 발달로 병원균 특이적인 molecular marker를 이용하여 DNA 수준에서 정확하게 진단하거나 동정할 수 있는 기술 개발에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 그 중에서 Williams 등(1990)이 개발한 molecular marker인 random amplified polymorphic DNA(RAPD)는 polymerase chain reaction(PCR)에서 합성된 10-mer 정도의 oligodeoxynucleotide를 arbitrary primer로 사용하고 최소량의 genomic sample DNA를 template로 하여 증폭된 DNA sequences의 유무 또는 pattern으로써 식물병원 세균의 동정 및 진단 연구에 활용되고 있다 (Hartung 등, 1993; Leite 등, 1995; Manulis 등, 1994). 또한 DNA restriction fragment length polymorphism(RFLP)는 DNA probe와 제한효소로 처리한 DNA 절편의 hybridization과 agarose gel 상에 분획된 절편 크기에 기초를 둔 molecular marker로서(Southern, 1975) RAPD와 함께 식물병원 세균의 동정 및 진단 연구에 활용되고 있다(Lazo 등, 1987; Leach 등, 1990; Pruvost 등, 1992).

궤양병은 참다래의 주산지인 뉴우질랜드에서는 발생하지 않고 있으나 일본

에서는 1980년경부터 발생하기 시작하여 큰 피해를 주고 있다(Serizawa 등, 1989). 일본에서 궤양병은 최초로 1984년 Shizuoka현(162 ha 재배면적 중 56 ha에 발생)에서 발생하여 일부 과수원이 폐원되었으며, 현재는 Kanagawa, Aichi, Tottori, Fukuoka, Tokushima, Miyazaki현에서도 발생하고 있다(Serizawa 등, 1989). 참다래 궤양병균의 기원에 대해서 Kanagawa현원예시험장의 Ushiyama(1993)는 야생다래에서 유래하는 것으로 추정하고 있지만, Shizuoka현감귤시험장의 Serizawa 등은 뉴질랜드에서 묘목을 통해 도입된 것으로 추정하고 있다.

일본에서 참다래 궤양병 연구는 1989년 Shizuoka 대학의 Takikawa 등(1989)에 의해 참다래 궤양병균이 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*로 동정되면서 시작되었다. Serizawa 등(1993a; 1993b; 1993c; 1993d)은 참다래 궤양병 발생생태에 대한 역학적 연구를 활발하게 수행하고 있으며, Ushiyama(1993)는 참다래 궤양병 방제와 monoclonal antibody를 이용한 궤양병균 동정에 관한 연구 등을 수행하였다.

한편, 우리 나라에서는 참다래 궤양병 약제로 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제(아그리마이신) 1개 약제만 등록되어 있으나, 일본에서는 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제, 가스신 액제, 가스란 수화제, 농용신 수화제, 농용신·쿠퍼 수화제, 쿠퍼 수화제 등이 참다래 궤양병 약제로 사용되고 있다. 1993년 Ushiyama(1993)에 의해 streptomycin 저항성균과 kasugamycin 저항성균이 검출되었지만, oxytetracycline 저항성균은 검출되지 않았다. copper 저항성균은 Shizuoka 대학의 Goto 등(1994)에 의해 1994년 처음 보고되었으며 copper 저항성균은 streptomycin 저항성균과 동시에 발생함을 보고하였다.

최근에 Tokyo대학의 Nakajima 등(1995)은 *P. syringae* pv. *actinidiae*의 streptomycin과 copper 저항성 유전자의 구조에 관한 분자유전적 연구를 수

행하여, *P. syringae* pv. *actinidiae*의 streptomycin과 copper 저항성 유전자는 80 kb 크기의 pPaCu1과 280 kb 크기의 pPaCu2 plasmid에 존재함을 밝혀냈다. 항생제에 대한 약제저항성균의 발생은 *P. syringae* pv. *syringae*와 *Erwinia amylovora* 등에서도 보고되고 있다(Loper 등, 1991; Spotts 등, 1995; Sundin 등, 1993).

우리 나라에서는 고와 이(1992)가 참다래 궤양병균을 *P. syringae* pv. *morsprunorum*으로 처음 분리 동정하여 보고하였으며, 고 등(1994a)은 우리나라에서 참다래 궤양병의 발생 및 확산 경로를 추적하여 궤양병균이 일본으로부터 제주도를 거쳐 남해안 전역으로 확산하고 있다고 추정하였다. 또한 고 등(1994b)은 설문조사를 통하여 전남지역 참다래 재배현황 및 문제점을 조사하였으며, 참다래 궤양병의 발생 특성 및 수간주입에 방제 연구를 수행하여 참다래 궤양병의 치료효과를 보고하였다(고 등, 1996).

### 제3절 연구개발의 목적

본 연구에서는 참다래 궤양병을 조기에 진단할 수 있는 조기진단 시스템을 개발하고, 참다래 궤양병 약제에 대한 저항성균의 발생실태를 파악하고, 참다래 궤양병에 대한 화학적 방제 체계를 확립함으로써 WTO 체제하에서도 농가 고소득 작목인 참다래의 안정적인 생산기반을 조성할 수 있는 참다래 궤양병에 대한 종합적 관리 체계를 확립하는 것이 본 연구개발의 목적이다.

- 궤양병 조기진단 시스템 개발
  - 궤양병 약제 저항성균 발생실태 파악
  - 궤양병 화학적 방제체계 확립
- } → 궤양병 종합적 관리체계 확립

## 제4절 연구개발의 내용 및 범위

참다래 궤양병에 대한 종합적 관리 체계를 확립하기 위한 본 연구개발의 내용 및 범위를 년차별로 요약하면 다음과 같다.

수행년도	연구 개발 내용	연구 개발 범위
1차년도 (1995)	○참다래 궤양병 조기 진단 시스템 개발	- BIOLÓG <sup>®</sup> system 도입 - 궤양병균 data base 확보
	○참다래 궤양병 약제저항성균 발생 실태 조사	- 궤양병균 균주 수집
	○참다래 궤양병 화학적 방제 체계 확립	- 궤양병 우수약제 선발 - 궤양병 무인 방제 장치 설치
2차년도 (1996)	○참다래 궤양병 조기 진단 시스템 개발	- Biolog data base의 완성 - 궤양병균 RAPD 분석용 primer의 선발 - 궤양병균 진단용 RAPD marker의 선발
	○참다래 궤양병 약제저항성균 발생 실태 조사	- 궤양병균 균주 수집 및 약제저항성균 발생수준 조사
	○참다래 궤양병 화학적 방제 체계 확립	- 무인방제 장치에 의한 궤양병 방제효과 검정 - 궤양병 우수약제에 대한 포장 검정
3차년도 (1997)	○참다래 궤양병 조기 진단 시스템 개발	- 궤양병균 RFLP 분석용 probe의 제조 - 궤양병균 진단용 RFLP marker의 선발
	○참다래 궤양병 약제저항성균 발생 실태 조사	- 궤양병균 균주 수집 및 약제저항성균 년차별 발생추이 조사
	○참다래 궤양병 화학적 방제 체계 확립	- 궤양병에 대한 우수약제의 약효 검정 - 궤양병에 대한 우수약제의 살포시기 및 살포횟수 확립



## 제5절 연구개발의 중요성 및 필요성

### 1. 기술적 측면

가. 궤양병은 감염 초기에 방제를 하지 않을 경우 과수원을 폐원시킬 만큼 치명적인 피해를 초래하므로 감염 초기 진단이 방제의 요점임에도 불구하고 감염 후 2-3년동안의 잠복기를 거쳐 병징이 나타나는 특수성 때문에 감염 초기 육안 진단이 불가능하고, 감염 초기에 참다래 조직으로부터 병원세균을 분리하였을지라도 형태학적 또는 생리생화적 동정에는 3-6개월이 소요됨으로써 방제시기를 놓치게 되므로 단시간에 궤양병균을 동정하고 궤양병의 발생을 진단할 수 있는 조기 진단 기술의 개발이 중요하다.

나. 참다래 궤양병의 방제 약제로 우리나라에서는 아그리마이신 수화제 1개 약제만 품목 고시되어 있어서 아그리마이신 수화제를 연간 5-10회 정도 살포함에 따라 약제 저항성균이 발생하고 있어 약제 방제의 효율성을 제고하고, 약제의 다변화를 통한 보다 효과적인 궤양병 방제를 위해서는 추가 약제 개발이 필요하다.

다. 궤양병 약제의 살포는 각종 분무기를 이용해 왔으나, 덕이 설치되어 있는 참다래 과수원의 특수성 때문에 시간과 인력이 많이 소모되는 문제점을 해결할 수 있도록 무인 방제 시스템을 통한 생력화 화학적 방제 체계의 확립이 필요하다.

### 2. 경제·산업적 측면

가. 궤양병은 수세를 악화시킴으로써 참다래의 품질을 저하시킬 뿐만 아니라 나무를 죽게 함으로써 수량을 감소시켜 참다래 재배 농가에 치명적인 피해를 주고 있으므로 농가 소득을 증대시킬 수 있는 참다래의 안정적인 생산 기반을 조성하기 위하여 궤양병에 대한 효율적인 방제체계의 확립이 필요하다

다.

나. 방제비용과 방제 노동력의 절감을 통해 생산비를 절감시킴으로써 참다래의 가격 및 국제 경쟁력을 제고시키기 위하여 궤양병의 조기 진단 및 궤양병의 생력화 화학적 방제 체계의 확립이 필요하다.

다. 참다래 궤양병 약제로 품목 고시되어 있는 아그리마이신 수화제에 대한 약제 저항성균의 출현으로 방제 비용이 증가하고 있어 궤양병 방제 약제를 다원화할 수 있는 새로운 후보약제 개발이 필요하다.

### 3. 사회·문화적 측면

가. 참다래 궤양병이 많은 참다래 과수원을 폐원시킴으로써 참다래 재배 농가에 경제적 피해뿐만 아니라 정신적 피해를 야기시킴으로써 영농의욕이 저하되고 실의에 빠진 참다래 재배자들에게 희망과 용기를 주고 영농의욕을 고취할 수 있는 궤양병 방제기술의 개발이 필요하다.

나. 참다래 궤양병에 의해 폐원되는 과수원이 속출함에 따라 많은 참다래 재배 농민들이 각 시군 농촌지도소, 도 농촌진흥원, 시험장, 연구소 등에 궤양병 방제법에 관한 민원을 제기하고 있으나 적절한 방제방법을 제시하지 못하여 농업 유관기관에 대한 농민들의 불신의 한 요인이 되고 있어 효과적인 방제법의 확립이 필요하다.

다. 참다래 궤양병의 조기 진단 및 생력화 방제로 농촌 인구 감소 및 고령화에 따른 노동력의 부족을 해소하고 농약사용을 최소화함으로써 국민의 안전 식품 요구 증대에 따른 저공해성 안전식품 생산 및 참다래 재배자의 보건 증진에 기여할 수 있는 궤양병 방제체계의 구축이 필요하다.

여 백

## 제 2 장 참다래 궤양병 조기진단 시스템 개발

### 제1절 서언

궤양병의 방제는 항생제 또는 동제의 살포나 항생제의 수간 주입에 의해 부분적으로 성과를 거두고 있으나 감염초기 방제에 실패할 경우 소기의 방제 효과를 거두기 어려운 한계점을 가지고 있다(고 등, 1996; Serizawa 등, 1989; Ushiyama, 1993). 따라서 궤양병의 방제효과를 극대화시킬 수 있도록 병징발현 이전에 궤양병 감염여부를 조기에 진단할 수 있는 방법의 개발이 시급하다. 그러나, 참다래 궤양병은 잠복감염 2~3년 후 병징을 나타내며 병징 발현 후에는 방제가 어렵고 과수원을 폐원시킬 만큼 피해를 주기 때문에 궤양병 잠복감염 여부를 조기에 진단하는 기술개발은 참다래 궤양병 방제의 관건이다.

최근에 세균을 단시간에 간편하게 진단할 수 있는 시스템이 개발되고 있는데 Biolog program은 세균의 95개 탄소원 이용성질을 컴퓨터 프로그램에 의해 세균을 분류할 수 있는 간편한 세균 동정시스템의 하나다. 또한 DNA 수준에서 세균을 정확하게 진단하거나 동정할 수 있는 molecular marker인 random amplified polymorphic DNA(RAPD)와 DNA restriction fragment length polymorphism(RFLP)도 식물병원 세균의 진단 및 동정 연구에 활용되고 있다(Hartung 등, 1993; Lazo 등, 1987; Leite 등, 1995; Manulis 등, 1994).

따라서, 참다래 궤양병균(*P. syringae* pv. *actinidiae*)을 신속 정확하게 동정할 수 있는 data base를 만들어 Biolog program(BiOLOG MicroLog™ 2,

Biolog Inc., Hayward, CA, USA)을 이용한 참다래 궤양병균 동정체계를 확립하고, 참다래 궤양병균 특이적인 RAPD marker와 RFLP marker를 선별하여 참다래에서 분리되는 궤양병균을 비롯한 여러 종의 유사세균들 중에서 궤양병균만을 신속 정확하게 간이적으로 진단하여 참다래 궤양병 잠복감염 여부를 진단할 수 있는 조기진단 시스템을 확립하는 것이 참다래 궤양병에 대한 효율적인 방제법을 구축하기 위하여 필요하다.

## 제2절 연구 방법

### 1. Biolog를 이용한 참다래 궤양병균 동정체계의 확립

컴퓨터를 이용한 미생물동정 시스템인 Biolog program(BiOLOG MicroLog™

2. Biolog Inc., Hayward, CA, USA)(부록 A)을 이용하여 참다래 궤양병균을 동정할 수 있는 data base를 확립하기 위하여 *P. syringae* pv. *actinidiae* 동정용 생리·생화학적 특성을 조사하였다.

또한, Biolog program을 이용한 참다래 궤양병균 동정체계를 완성하기 위하여 data base 작성을 위한 *P. syringae* pv. *actinidiae* 균주는 참다래 궤양병균을 처음 보고한 Shizuoka 감귤시험장에서 분양받은 10개 균주를 공시하였다. 공시한 균주들을 BiOLOG Universal Growth Medium(BUGM)에 24시간동안 배양하여 얻은 신선한 균총들을 cotton swab으로 채취하여 0.85% saline 용액속에  $3 \times 10^6$  cells/ml 농도로 현탁시킨 후 세균현탁액을 microplate(BiOLOG GN MicroPlate™)의 96 well에 multichannel micropipette으로 150  $\mu$ l씩 분주하여 25℃에서 24시간동안 각각 배양하였다. 각 균주를 배양한 microplate 상에서 탄소원 이용 여부는 Biolog program 사용설명서에 따라 각 탄소원이 함유된 well의 변색유무로 판명하였다. 즉 탄소원이 들어 있지 않은 대조구(A1 well)와 동일하게 변색되지 않은 well은 탄소원이 이용

되지 않은 것으로 판명하고 보라색으로 변색된 well은 탄소원이 이용된 것으로 판명하였다.

이러한 반응을 종합하여 *P. syringae* pv. *actinidiae* 균주들에 의해 이용된 탄소원은 +(positive)로, 이용되지 않은 탄소원은 -(negative)로 각각 판정하고, 반응이 명확치 않거나 균주간 변이가 있는 것은  $\pm$ (variable)로 판정한 data를 Biolog program에 입력하여 참다래 궤양병균 동정용 'User data base'를 완성하였으며, 미지의 세균을 BUGM에 24~48시간동안 배양시켜 BIOLOG<sup>®</sup> GN Microplate에서 95개 탄소원 이용여부를 24간 후에 조사하여 MICROLOG<sup>™</sup> 2 시스템에 입력시키면 컴퓨터 프로그램상에서 참다래 궤양병균 (병원균 학명 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*의 약자인 "ACTINIDIAE"로 출력) 여부를 자동으로 판정하여 출력되도록 MICROLOG<sup>™</sup> 2 시스템의 프로그램을 작성하였다. User data base 작성 과정을 나타내는 Flow chart는 그림 1과 같다.

한편, 우리 나라에서 재배되고 있는 외관상 건전해 보이는 참다래로부터 분리된 미지의 세균들을 대상으로 참다래 궤양병균 여부를 동정하기 위해서 분리균을 Peptone Sucrose Agar(peptone 10 g, sucrose 10 g, agar 14 g, distilled water 1,000 ml, pH 6.8)에서 배양하여 단일 균총을 얻은 후 그람 염색을 하였다. 선발된 그람음성 세균들을 위에 기술한 방법에 따라 microplate에서 배양하여 각 균주별 탄소원 이용여부에 관한 반응들을 조사하여 얻은 data를 MICROLOG<sup>™</sup> 2 시스템에 입력시켜 기존 data base와 새로 추가된 참다래 궤양병균 동정용 User data base와의 자동검색을 거쳐 미지의 세균들 중에서 참다래 궤양병균 균주 여부를 동정토록 함으로써 참다래 궤양병균 동정용 User data base의 효용성을 평가하였다.

참다래 궤양병균 동정 위한 MICROLOG<sup>™</sup> 2 시스템의 운용방법은 부록 B에 제시되어 있다.

CREATE A USER DATA BASE BY DIRECT ADDITION

1 : INPUT MENU  
↓ \_\_\_\_\_ press "4" for well-by-well  
2 : INPUT MENU  
↓ \_\_\_\_\_ press "Enter" for Output Menu  
3 : OUTPUT MENU  
↓ \_\_\_\_\_ press "1" for print on request  
4 : OUTPUT MENU  
↓ \_\_\_\_\_ press "3" for no ASCII file  
5 : OUTPUT MENU  
↓ \_\_\_\_\_ press "Enter" for Data Base Menu  
6 : DATA BASE MENU  
↓ \_\_\_\_\_ press "1" for direct addition  
7 : DATA BASE MENU  
↓ \_\_\_\_\_ press "3" for file name  
8 : FILE NAME PROMPT  
↓ \_\_\_\_\_ enter "ACTINIDIAE. id"  
9 : DATA BASE MENU  
↓ \_\_\_\_\_ press "Enter" for Data Menu  
10 : DATA MENU  
↓ \_\_\_\_\_ press "2" to enter data  
11 : INFORMATION PROMPTS  
↓ \_\_\_\_\_ enter GN plate, "rowa" strain name  
13 : MICROPLATE  
↓ \_\_\_\_\_ enter just row A positive (A1 neg)  
14 : DATA MENU  
↓ \_\_\_\_\_ press "7" to write user data base  
15 : DATA MENU  
↓ \_\_\_\_\_ press "Esc" for Data Base Menu  
16 : DATA BASE MENU  
↓ \_\_\_\_\_ press "6" for Microlog & User  
17 : DATA BASE MENU  
↓ \_\_\_\_\_ press "7" for file name  
18 : FILE NAME PROMPT  
↓ \_\_\_\_\_ enter "ACTINIDIAE. id"  
19 : DATA BASE MENU  
↓ \_\_\_\_\_ press "Enter" for Data Menu  
20 : DATA MENU  
↓ \_\_\_\_\_ press "3" for ID search  
21 : DATA MENU  
↓ \_\_\_\_\_ press "2" to enter data  
22 : INFORMATION PROMPTS  
↓ \_\_\_\_\_ enter GN plate, "rowb" strain name  
23 : MICROPLATE  
↓ \_\_\_\_\_ enter just row B positive  
24 : DATA MENU  
↓ \_\_\_\_\_ press "7" to write User data base  
25 : DATA MENU  
↓ \_\_\_\_\_ press "3" for ID search  
26 : DATA MENU

그림 1. User data base 작성 Flow chart

## 2. 참다래 궤양병균 진단용 RAPD marker의 선발

참다래 궤양병균의 genomic DNA와 참다래에서 궤양병균과 함께 주로 분리되지만 병원형(pathovar)이나 종(species) 또는 속(genus)이 다른 10종의 유사세균들의 genomic DNA를 alkaline lysis 방법으로 추출한 후 random primer를 사용하여 PCR에서 증폭시켜 생성된 RAPD pattern을 비교분석하였다.

Genomic DNA를 추출하기 위하여 각 세균들의 single colony를 nutrient broth에 접종하여 28℃에서 12시간 동안 진탕배양한 후에 50 ml용 oak ridge tube를 이용하여 3,500 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 세균 세포 pellet을 수집하였다. 수집한 세균 세포 pellet들은 6.6 ml의 solution I(50 mM glucose, 25 mM Tris (pH 8.0), 10 mM EDTA 및 2 mg/ml lysozyme)에 현탁하여 실온에서 20분 동안 보존하였다. Tube 당 334  $\mu$ l의 10% SDS를 첨가시켜 50℃에서 10분 동안 보존한 후 268  $\mu$ l의 RNase A(2.5 mg RNase A/ml 10 mM Tris, pH7.6)를 첨가하여 37℃에서 1시간 동안 RNA를 분해시키고 340  $\mu$ l의 0.5M EDTA를 첨가시켜 50℃에서 10분 동안 nuclease의 활성을 정지시킨 후 140  $\mu$ l의 Pronase (10 mg Protease/ml 10 mM Tris, pH7.6)를 첨가하여 37℃에서 6시간 동안 단백질을 분해시켰다.

이 용액으로부터 genomic DNA를 분리하기 위하여 동량의 TE-saturated phenol로 1회 추출한 후 실온에서 10분 동안 15,000 rpm에서 원심분리하였다. 분리된 상층액을 동량의 TE-saturated phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1, v/v/v)로 추출하고 나서 실온에서 10분 동안 15,000rpm에서 원심분리하여 상층액을 다시 수거하였다. 수거된 상층액은 동량의 chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1, v/v)로 2회 추출하여 상층액을 다시 수거한 후 1/10 volume의 3M Ammonium acetate와 2 volume의 99.9% ethyl alcohol을 첨가시켜 genomic DNA를 침전시켰다. 침전된 genomic DNA는 70% 냉 ethyl alcohol로 씻어 건조시킨 후 TE buffer(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 녹여 4℃에서 보관하였다.



Primer는 시판되고 있는 10 base oligonucleotide primer 40종(Operon kit A, B)과 12 base oligonucleotide primer 120종(Wako kit A, C) 등 160종의 random primer를 사용하였으며, 0.5  $\mu$ l primer와 3  $\mu$ l genomic DNA, 0.04  $\mu$ l Taq DNA polymerase, 1  $\mu$ l 10 $\times$ reaction buffer, 0.5  $\mu$ l 10 mM dNTP, 1  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub>의 조합에 4.96  $\mu$ l의 살균중류수를 첨가하여 10  $\mu$ l로 조제한 PCR Reaction mixture를 사용하였다.

PCR machine은 GeneAmp PCR System 9600(Perkin-Elmer Cetus)을 사용하였으며, DNA 증폭은 94 $^{\circ}$ C에서 15초간의 denaturation: 45 $^{\circ}$ C에서 30초간의 annealing: 72 $^{\circ}$ C에서 90초간의 extension을 45 cycles 반복하는 프로그램에 의해 수행하였으며, 처음 cycle에서 denaturation 단계는 2분간 마지막 cycle에서 extension 단계를 5분간 연장하였다.

PCR 산물은 TAE buffer(40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH8.2) 속에서 1.5% agarose gel에 전기영동하여 0.5  $\mu$ g/ml ethidium bromide에 40분간 염색한 후 UV transilluminator 상에서 type 55 Polaroid film으로 사진을 찍어 관찰하였다. Molecular standard로는 1 kb DNA ladder를 사용하였다.

### 3. 참다래 궤양병균 진단용 RFLP marker의 선발

#### 가. 참다래 궤양병균 특이적 단편의 Cloning 및 Sequencing

참다래 궤양병균 진단용 RAPD marker로 선발된 참다래 궤양병균(*P. syringae* pv. *actinidiae*) 병원형 특이적 단편(분자량 668 bp)을 병원형(pv. *actinidiae*) RFLP probe로 개발하기 위하여 특이적 단편을 Agarase kit(BM, Germany)를 이용하여 회수한 후 pGEM-T vector(Promega, USA)에 삽입시켰다.

재조합 plasmid DNA를 *E. coli*(HB 101)에 형질전환시켜 ampicillin을 포함한 agar 배지상에서 형질전환체를 선발하였다. 기대하는 크기의 형질전환체

로부터 plasmid DNA를 추출하여 T-vector 상의 primer(T7/SP6)를 이용하여 PCR 증폭후 5% polyacrylamide gel에 분획하였다. Gel은 은염하여 염기배열을 결정하였다.

#### 나. Southern hybridization

특이적 단편의 probe는 BM사(Germany)의 Non-radioactive DNA labeling and detection kit를 이용해서 아래와 같이 작제 하였다. plasmid를 *Sac*II 와 *Pst*I 으로 절단한 후 저용점 agarose gel 전기영동을 하여 목적의 DNA 단편을 절출하였다. agarose조각을 열로 용해시켜 phenol처리한 후 DNA를 추출하고 250 ng씩 정량하였다. 이 DNA를 100℃에서 5분간 열변성시켜서 얼음물속에서 냉각시킨 후 Digoxigenin이 표식된 dUTP를 포함하는 dNTP labeling mixture와 Hexanucleotide mixture를 첨가하여, 이것에 klenow enzyme(2 units)를 넣어 37℃, 2시간 이상 보온했다.

반응 후 EtOH 침전시켜 70% EtOH로 수세 후 진공 건조하여 50  $\mu$ l의 TE buffer에 용해했다. 이 probe를 사용할 때는 사용 직전에 다시 한번 열처리한 후 급냉하여 사용하였다. colony blotting한 nylon membrane을 hybridization용액 [5x SSC, 0.5%(w/v) blocking reagent, 0.1%(w/v)sodium N-lauroyl sarcosinate, 0.02%(w/v) SDS]를 넣은 hybri-bag에 밀봉하고 65℃에서 2시간이상 prehybridization을 하였다. 용액을 버리고 열처리한 probe 5  $\mu$ l를 포함하는 hybridization용액 2.5ml을 넣어서 65℃에 밤새 보온하였다. 50 ml의 수세액 A[2 x SSC, 0.1%(w/v)SDS]로 5분 2회, 50 ml의 수세액 B(0.1 x SSC, 0.1% SDS)로 65℃, 15분, 2회, buffer 1(100 mM Tris-HCL pH7.5, 150 mM NaCl)로 실온 1분간 수세한 후 100 ml의 butter 2(0.5% blocking reagent in buffer 1)로 30분간 실온에서 진탕하였다. 다시금 buffer 1로 1분간 수세하고 20 ml의 buffer 1 과 4  $\mu$ l의 항체결합 시약을 넣어 30분간 실온에서 진탕한 후, 100 ml

의 buffer 1로 15분간 2회 수세하였다. 그리고 20 ml의 buffer 3(100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>)로 2분간 진탕한후 형광 발색의 기질인 LumigenPPD를 이용하여 X-ray film상에 검출하였다.

## 제3절 연구 결과

### 1. Biolog를 이용한 참다래 궤양병균 동정체계의 확립

#### 가. 참다래 궤양병균의 생리생화학적 특성

참다래 궤양병균을 동정할 수 있는 data base를 확립하기 위하여 *P. syringae* pv. *actinidiae* 동정용 생리·생화학적 특성을 조사한 결과를 요약하면 표 1과 같다.

참다래 궤양병균은 그람 음성균이고, King's B 배지와에서 Uschinsky 용액 속에서 형광색소를 생성하지 못하였고, Gelatin을 액화시키지 못하였으며, Tyrosinase과 Urease를 분비하지 않았다. 약알칼리에서 Purple milk 반응을 일으켰고, NaCl 내성한계가 3%였으며, 한계성장최고온도가 30℃였다. 또한 Sucrose broth에서 흰색으로 성장하였고, NSA에서 8일이상 생존하였다. Catalase, Ammonia, Leven 등을 생성하였으며, sucrose로부터 환원당을 생성하였고, 담배에 과민성 반응을 일으켰다. Arginine dihydrolase, Oxidase 등의 효소활성이 없었으며, 40℃에서 성장하지 못했고, H<sub>2</sub>S, Indole, 2-Keto-gluconate를 생성하지 못했다. 또한 질산염을 환원시키지 못하였고, V.P. -M.R. test와 Potato rot test에 음성을 나타내었고, Coronatine 활성도 없었다. Casein과 Tween 80을 가수분해시켰으나, Esculin 등을 가수분해하지 못하였고, Acetate 등을 탄소원으로 이용하였으나, Adonitol 등을 탄소원으로 이용하지 못하였다.

표 1. 참다래 궤양병균(*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*)의 생리생화학적 특성

생리·생화학적 특성	반 응
Gram staining	— <sup>a</sup>
Fluorescent pigment production	
on King's medium B	—
in Uschinsky's solution	—
Gelatin liquefaction	—
Tyrosinase	—
Urease	—
Purple milk reaction	weak alkaline
Maximum NaCl tolerance	3%
Maximum growth temperature	30℃
Growth in sucrose broth	white
Longevity on NSA (days)	> 8
Oxidation/Fermentation(OF) test	0
Production of	
Catalase	+
Ammonia	+
Leven	+
Reducing substance from sucrose	+
Tobacco hypersensitive reaction	+
Activity of	
Arginine dihydrolase	—
Oxidase	—
Lecithinase	—
Phenylalanine deaminase	—
Tyrosinase	—
Urease	—
Growth at 40℃	—
Production of	
H <sub>2</sub> S	—
Indole	—
2-Keto-gluconate	—
Reduction of nitrate	—
Nitrate respiration	—

<sup>a</sup> — : negative ; + : positive

표 1. (계속)

V.P.-M.R. test	-
Potato rot test	-
Acid production in purple lactose agar	-
Coronatine activity	-
Hydrolysis of	
Esculin	-
Arbutin	-
Casein	+
Tween 80	+
Starch	-
Cotton-seed-oil	-
Utilization of	
Acetate	+
Adonitol	-
$\beta$ -Alanine	-
$\gamma$ -Amino butyrate	+
Anthranilate	-
D-Arabinose	-
L-Arabinose	+
Arbutin	-
Lactose	-
L-Leucine	+
Levulinate	-
L-Malate	+
Malonate	+
Maltose	-
Mannitol	+
D-Mannose	+
D-Melezitos	-
Melibiose	-
Mesaconate	-
$\alpha$ -Methyl-D-glucoside	-
Propionate	-
D-Quinate	+
Raffinose	+
L-Rhamnose	-

- : negative ; + : positive

표 1. (계속)

Utilization of	
D-Ribose	+ <sup>a</sup>
Saccharate	+
Salicin	-
Sebacate	-
L-Serine	+
Sorbitol	+
Starch	-
Succinate	+
Sucrose	+
DL-Tartrate	-
Trehalose	-
Triacetin	-
Trigonelline	-
L-Tyrosine	+
L-Valine	-
D-Xylose	-
L-Arginine	+
L-Asparagine	+
Betaine	+
n-Butyrate	-
n-Caprate	-
Cellobiose	-
Citrate	+
Dulcitol	-
Erythritol	-
Formate	-
Fructose	+
D-Galactose	+
Gluconate	+
Glucose	+
Glutarate	+
Glycerate	+
Glycerol	+
L-Histidine	-
Inositol	+
L-Isoleucin	-
DL-Lactate	-

<sup>a</sup> - : negative ; + : positive

#### 나. 참다래 궤양병균의 Biolog data base 완성

Biolog data base 작성을 위하여 공시한 *P. syringae* pv. *actinidiae* 10개 균주들의 BiOLOG® GN MicroPlate™ 상에서의 탄소원 이용 여부를 조사한 결과 *P. syringae* pv. *actinidiae* 균주들은 D-mannitol, sucrose, cis-aconitic acid, D-gluconic acid, D-saccharic acid, succinic acid, bromo succinic acid, L-aspartic acid, glycerol 등 9종의 탄소원을 잘 이용하였으나,  $\alpha$ -cyclodextrin, dextrin 등 62종의 탄소원을 이용하지 못하였고, tween 40, tween 80을 비롯한 24종의 탄소원에 대해서는 명확치 않거나 균주에 따라 다른 반응을 나타내었다(표 2)(그림 2).

이러한 95개 탄소원 이용 성질을 종합하여 Biolog를 이용한 참다래 궤양병균(*P. syringae* pv. *actinidiae*)의 동정체계를 위한 BiOLOG® GN 96-well microplate의 탄소원 배열도와 탄소원 이용 성질에 따라 작성한 참다래 궤양병균 동정용 data base는 표 3과 표 4와 같다.

또한, 참다래 궤양병균의 95개 탄소원 이용 성질 data base를 BiOLOG®의 MICROLOG™ 2 시스템에 입력하여 "User data base"를 제작하여 Biolog를 이용한 참다래 궤양병균 동정체계를 완성하였다. 완성된 User data base를 추가한 Biolog program에서 본 시험에 공시한 10개 균주들은 96.6~97.8%의 유사도를 나타내면서 참다래 궤양병균(병원균 학명 *P. syringae* pv. *actinidiae*의 약자인 "ACTINIDIAE"로 출력)으로 출력됨으로써 User data base의 효용성이 입증되었다.

미지의 세균을 BUGM에 48시간동안 배양시켜 BiOLOG® GN Microplate에서 95개 탄소원 이용여부를 24간 후에 조사하여 BiOLOG®의 MICROLOG™ 2 시스템을 이용한 참다래 궤양병균의 동정 결과와 유사세균의 동정 결과에 대한 컴퓨터 출력물을 예시하면 표 5와 표 6과 같다.

표 2. 참다래 궤양병균(*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*)의 95개 탄소원 이용 성질

Well	탄 소 원	이용 여부	Well	탄 소 원	이용 여부
A1	water	- <sup>a</sup>	E1	p-hydroxy phenylacetic acid	-
A2	$\alpha$ -cyclodextrin	-	E2	itaconic acid	-
A3	dextrin	-	E3	$\alpha$ -keto butyric acid	-
A4	glycogen	-	E4	$\alpha$ -keto glutaric acid	-
A5	tween 40	±	E5	$\alpha$ -keto valeric acid	-
A6	tween 80	±	E6	D,L-lactic acid	-
A7	N-acetyl-D-galactosamine	-	E7	malonic acid	±
A8	N-acetyl-D-glucosamine	-	E8	propionic acid	-
A9	adonitol	-	E9	quinic acid	±
A10	L-arabinose	±	E10	D-saccharic acid	+
A11	D-arabitol	±	E11	sebacic acid	-
A12	cellobiose	-	E12	succinic acid	+
B1	i-erythritol	-	F1	bromo succinic acid	+
B2	D-fructose	±	F2	succinamic acid	-
B3	L-fucose	-	F3	glucuronamide	-
B4	D-galactose	-	F4	alaninamide	-
B5	gentiobiose	-	F5	D-alanine	-
B6	$\alpha$ -D-glucose	±	F6	L-alanine	±
B7	m-inositol	±	F7	L-alanyl-glycine	-
B8	$\alpha$ -D-lactose	-	F8	L-asparagine	±
B9	lactulose	-	F9	L-aspartic acid	+
B10	maltose	-	F10	L-glutamic acid	±
B11	D-mannitol	+	F11	glycyl-L-aspartic acid	-
B12	D-mannose	±	F12	glycyl-L-glutamic acid	±
C1	D-melibiose	-	G1	L-histidine	-
C2	$\beta$ -methyl D-glucoside	-	G2	hydroxy L-proline	-
C3	D-psicose	-	G3	L-leucine	-
C4	D-raffinose	±	G4	L-ornithine	-
C5	L-rhamnose	-	G5	L-phenylalanine	-
C6	D-sorbitol	±	G6	L-proline	±
C7	sucrose	+	G7	L-pyroglutamic acid	-
C8	D-trehalose	-	G8	D-serine	-
C9	turanose	-	G9	L-serine	±
C10	xylitol	-	G10	L-threonine	-
C11	methyl pyruvate	±	G11	D,L-camitine	-
C12	mono-methyl succinate	±	G12	$\gamma$ -amino butyric acid	±
D1	acetic acid	±	H1	urocanic acid	-
D2	cis-aconitic acid	+	H2	inosine	-
D3	citric acid	±	H3	uridine	-
D4	formic acid	±	H4	thymidine	-
D5	D-galactonic acid lactone	-	H5	phenyl ethylamine	-
D6	D-galacturonic acid	-	H6	putrescine	-
D7	D-gluconic acid	+	H7	2-amino ethanol	-
D8	D-glucosaminic acid	-	H8	2,3-butanediol	-
D9	D-glucuronic acid	-	H9	glycerol	+
D10	$\alpha$ -hydroxybutyric acid	-	H10	D,L- $\alpha$ -glycerol phosphate	-
D11	$\beta$ -hydroxybutyric acid	-	H11	glucose-1-phosphate	-
D12	$\gamma$ -hydroxybutyric acid	-	H12	glucose-6-phosphate	-

<sup>a</sup>+ : 이용가능, - : 이용불가능, ± : 불규칙.



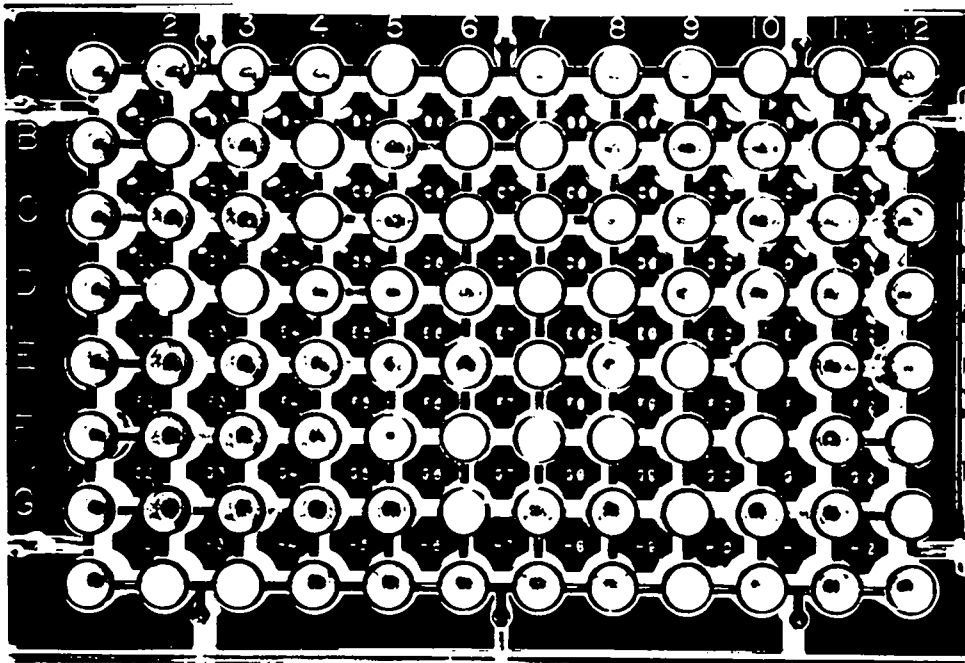


그림 2. BiOLOG<sup>®</sup> GN 96-well microplate 상에서 참다래 껌양균(*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*)의 탄소원 이용 반응

표 3. BiOLOG® GN 96-well microplate의 탄소원(carbon sources) 배열도

A1 water	A2 $\alpha$ -cyclo dextrin	A3 dextrin	A4 glycogen	A5 tween 40	A6 tween 80	A7 N-acetyl -D-galac tosamine	A8 N-acetyl -D-glucos amine	A9 adonitol	A10 L-arabino se	A11 D-arabito l	A12 cellobio se
B1 D-erythr itol	B2 D-fructo se	B3 L-fucose	B4 D-galact ose	B5 gentiobi ose	B6 $\alpha$ -D-glu cose	B7 D-inosit ol	B8 $\alpha$ -lacto se	B9 $\alpha$ -D-lac tose lactulos	B10 maltose	B11 D-mannito l	B12 D-mannos e
C1 D-melibio se	C2 $\beta$ -methy D-glucos ide	C3 psicose	C4 D-raffin ose	C5 L-rhamno s	C6 D-sorbit ol	C7 sucrose	C8 D-trehal ose	C9 turanose	C10 xylitol	C11 methyl pyruvate	C12 mono-met hyl succinat e
D1 acetic acid	D2 cis-acon itic acid	D3 citric acid	D4 formic acid	D5 D-galact onic aci d lacton e	D6 D-galact uronic acid	D7 D-glucon ic acid	D8 D-glucos aminic acid	D9 D-glucur onic acid	D10 $\alpha$ -hydrox yl butyric acid	D11 $\beta$ -hydrox yl butyric acid	D12 $\gamma$ -hydro xyl butyric acid
E1 p-hydrox yl phenylac etic acid	E2 itaconic acid	E3 $\alpha$ -keto butyric acid	E4 $\alpha$ -keto glutaric acid	E5 $\alpha$ -keto valeric acid	E6 D,L-lact ic acid	E7 malonic acid	E8 propioni c acid	E9 quinic acid	E10 D-sacchar ic acid	E11 sebacic acid	E12 succinic acid
F1 bromo succinic acid	F2 succinam ic acid	F3 glucuron amide	F4 alaninam ide	F5 D-alanin e	F6 L-alanin e	F7 L-alanyl -glycine	F8 L-aspara gine	F9 L-aspart ic acid	F10 L-glutami c acid	F11 glycyl- L-asparti c acid	F12 glycyl- L-glutam ic acid
G1 L-histid ine	G2 hydroxy L-prolin e	G3 L-leucin e	G4 L-ornith ine	G5 L-phenyl alanine	G6 L-prolin e	G7 L-pyro. glutamic acid	G8 D-serine	G9 L-serine	G10 L-threoni ne	G11 D,L-camit ine	G12 $\gamma$ -amino butyric acid
H1 urocanic acid	H2 inosine	H3 uridine	H4 thymidin e	H5 phenyl ethylami ne	H6 putresci ne	H7 2-amino ethanol	H8 2,3-buta nediol	H9 glycerol	H10 D,L- $\alpha$ - glycerol phosphate	H11 glucose-1 phosphate	H12 glucose- 6-phosph ate

표 4. 참다래 궤양병균(*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*) 동정용 BiOLOG® GN microplate data base

A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
-	-	-	-	±	±	-	-	-	±	±	-
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
-	±	-	-	-	±	±	-	-	-	+	±
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
-	-	-	±	-	±	+	-	-	-	±	±
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
±	+	±	±	-	-	+	-	-	-	-	-
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
-	-	-	-	-	-	±	-	±	+	-	+
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
+	-	-	-	-	±	-	±	+	±	-	±
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
-	-	-	-	-	±	-	-	±	-	-	±
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12
-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

+ : 이용가능, - : 이용불가능, ± : 불규칙.

표 5. BIOLOG<sup>®</sup>의 MICROLOG<sup>™</sup> 2 시스템을 이용한 참다래 궤양병균(*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*) 동정 결과 출력(output) 예시

MICROLOG (TM) 2 RELEASE 3.50

Date : 09/25/96  
 Hour : 24  
 Plate Type : GN  
 Media Type : TSA/BUGM  
 Plate # : 6  
 Strain Name : PAB1  
 Strain # : ?  
 Other Info : ?  
 Input Mode : Well-By-Well  
 Data Base : Microlog GN & User : ACTINIDI.ID

POSITIVE/NEGATIVE DATA

XXX = percent change in optical density versus A1 control well  
 <XXX> = positive, {XXX} = borderline, XXX = negative  
 -XXX = percent change negative  
 XXX+ = data negative or borderline, "=>" ID choice positive > 90% of time  
 XXX- = data positive or borderline, "=>" ID choice positive < 10% of time

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	0	0	{ 50+	{ 50+	0	0	0	{ 50+	<100>	0
B	0	<100>	0	0	0	<100>	0	0	0	0	<100>	{ 50}
C	0	0	{ 50-	{ 50}	0	<100>	<100>	0	0	0	{ 50}	{ 50}
D	{ 50}	<100>	<100>	0	0	0	<100>	0	0	0	0	0
E	0	0	0	0	0	0	{ 50}	0	{ 50}	<100>	0	<100>
F	<100>	0	0	0	{ 50-	{ 50}	{ 50-	{ 50}	<100>	<100>	0	{ 50}
G	0	0	0	0	0	<100>	0	{ 50-	<100>	0	0	{ 50}
H	0	0	{ 50-	0	0	0	0	0	<100>	0	0	0

BIO-NUMBER : 0306-2103-1543-7040-0055-4375-0131-1010

SPECIES IDENTIFICATION : ACTINIDIAE

	CLOSEST SPECIES	SIM	DIST	AVG	MAX
=>	1)* ACTINIDIAE	0.968	0.471	3.397	11.753
	2) PSEUDOMONAS SAVASTANOI PV NERII	0.000	3.181	0.531	1.631
	3) PSEUDOMONAS SYRINGAE PV PISI	0.000	5.196	0.521	2.119
	4) PSEUDOMONAS SAVASTANOI PV FRAXINI	0.000	6.290	0.406	1.644
	5) DELEYA MARINA	0.000	7.731	1.125	3.475
	6) PSEUDOMONAS SYRINGAE PV PHASEOLICOLA	0.000	7.898	1.109	7.256
	7) PSEUDOMONAS CICHORII	0.000	8.344	0.738	4.172
	8) BURKHOLDERIA SOLANACEARUM B	0.000	8.493	0.250	3.313
	9) PSEUDOMONAS SYRINGAE PV HIBISCI	0.000	8.630	1.188	2.219
	10) PSEUDOMONAS SYRINGAE PV SYRINGAE A	0.000	8.994	0.656	5.181
	other :				

\*Species Identification : ACTINIDIAE는 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*를 나타내는 약어이고, 참다래에서 분리된 미지의 세균은 유사계 수값 0.968로서 높은 유사도를 나타내며 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*로 동정되었다는 결과를 나타냄.

표 6. BiOLOG<sup>®</sup>의 MICROLOG<sup>™</sup> 2 시스템을 이용한 유사세균 동정 결과 출력  
(output) 예시

MICROLOG (TM) 2 RELEASE 3.50

Date : 09/25/96  
 Hour : 24  
 Plate Type : GN  
 Media Type : TSA/BUGM  
 Plate # : 6  
 Strain Name : W7  
 Strain # : ?  
 Other Info : ?  
 Input Mode : Well-By-Well  
 Data Base : Microlog GN & User : ACTINIDI.ID

POSITIVE/NEGATIVE DATA

XXX = percent change in optical density versus A1 control well  
 <XXX> = positive, {XXX} = borderline, XXX = negative  
 -XXX = percent change negative  
 XXX+ = data negative or borderline, "=>" ID choice positive > 90% of time  
 XXX- = data positive or borderline, "=>" ID choice positive < 10% of time

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	0	0	<100>	<100>	0	0	0	<100>	<100>	0
B	0	{ 50 }	0	<100>	0	<100>	<100>	0	0	0	<100>	<100>
C	0	0	0	0	0	<100>	<100>	0	0	0	<100>	0
D	0	<100>	<100>	0	<100>	<100>	<100>	<100>	<100>	0	{ 50 }	0
E	0	0	0	0+	0	<100>	{ 50 }	0	<100>	<100>	0	<100>
F	<100>	0	0	0	0	<100>	0	<100>	<100>	<100>	0	0
G	0	0	0	0	0	{ 50+ }	0	0	<100>	0	{ 50 }	<100>
H	0	<100>	{ 50 }	0	0	0	0	0	<100>	<100>	0	0

BIO-NUMBER : 0306-2543-0142-3372-0155-4134-0113-3014

SPECIES IDENTIFICATION : PSEUDOMONAS SYRINGAE PV SYRINGAE A

CLOSEST SPECIES	SIM	DIST	AVG	MAX
=> 1) PSEUDOMONAS SYRINGAE PV SYRINGAE A	0.731	4.008	0.656	5.181
2) PSEUDOMONAS SYRINGAE PV MORSPRUNO	0.004	5.746	0.083	1.225
3) PSEUDOMONAS SYRINGAE PV IMPATIENS	0.000	7.109	0.328	2.919
4) PSEUDOMONAS SYRINGAE PV HIBISCI	0.000	7.572	1.188	2.219
5) PSEUDOMONAS SYRINGAE PV PISI	0.000	7.611	0.521	2.119
6) PSEUDOMONAS CICHORII	0.000	7.858	0.738	4.172
7) PSEUDOMONAS SYRINGAE PV TABACI B	0.000	8.208	0.109	2.081
8) PSEUDOMONAS VIRIDIFLAVA B	0.000	8.796	0.406	2.202
9)* ACTINIDIAE	0.000	9.177	3.397	11.753
10) PSEUDOMONAS SYRINGAE PV ATROFACIENS A	0.000	10.974	0.088	1.663
other :				

\*Species Identification: 참다래에서 분리된 미지의 세균은 유사계수값 0.731로서 높은 유사도를 가지면서 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*로 동정되었다는 결과를 나타내며, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*와는 유사계수값이 0.000으로 거리가 멀다는 것을 나타냄.

## 2. 참다래 궤양병균 진단용 RAPD marker의 선발

참다래 궤양병균과 참다래 나무에서 흔히 분리되는 10종의 유사세균들의 genomic DNA를 추출한 후 200종의 random primer를 사용하여 PCR에서 증폭시켜 얻은 다양한 RAPD profiles 중에서 primer C24(5'-CTT-TGG-CAT-CGG-3', Wako Co.)에 의해 유사세균에서는 볼 수 없고 참다래 궤양병균에서 공통적으로 생성되는 668 bp 크기의 병원형(*P. syringae* pv. *actinidiae*) 특이적인 RAPD 단편을 marker로 선발하였다(그림 3).

이렇게 참다래 궤양병균의 병원형 특이적인 RAPD 단편은 수집된 참다래 궤양병균의 균주들에서는 모두 공통적으로 존재하므로 외관상 건전해 보이는 참다래에서 분리된 미지의 세균으로부터 추출한 genomic DNA의 RAPD profiles에서 참다래 궤양병균 병원형 특이적인 RAPD 단편 유무를 확인함으로써 신속 정확하게 참다래 궤양병균 여부를 동정할 수 있어서 외관상 건전해 보이는 참다래 나무일지라도 궤양병 감염여부를 조기에 진단할 수 있게 되었다.

## 3. 참다래 궤양병균 진단용 RFLP marker의 선발

형질전환체로부터 plasmid DNA를 추출하여 T-vector primer(T7 및 SP6)를 이용하여 염기배열을 결정한 결과 전 염기를 읽을 수가 없었다. 따라서, 염기배열의 reverse쪽으로부터 새로운 oligonucleotide (5'-ACATCGACACTTCTTCCTG-3')를 합성하여 668 bp의 전 염기배열을 결정하였다(그림 4). 염기배열은 database(BLAST search) 결과 상동성이 있는 sequence를 발견할 수 없었다.

참다래 궤양병균 19균주와 참다래 나무에서 분리한 10종의 유사세균들을 PCR 증폭후 cloning 산물(668 bp)을 이용하여 Southern blot 분석을 하였다.

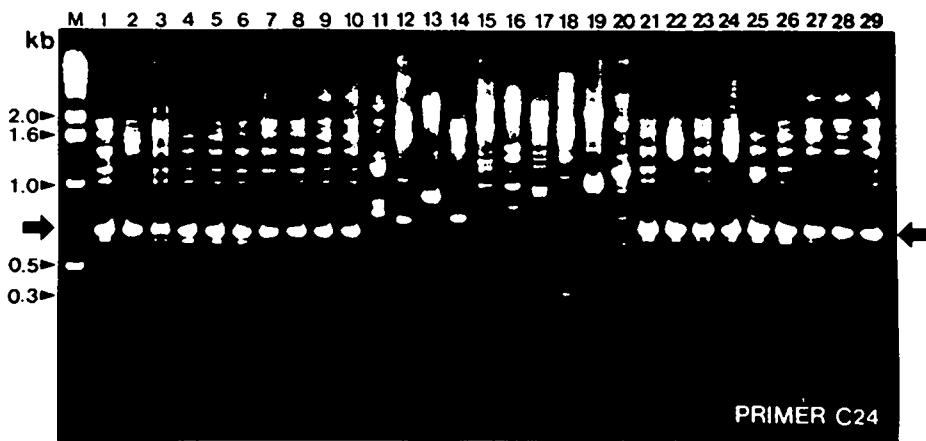


그림 3. Primer C24에 의한 참다래 궤양병균(*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*) 19 균주들과 참다래 나무에서 분리한 10종의 유사세균들의 Random Amplified Polymorphic DNA Profiles. Lane M; 1 kb DNA ladder, lane 1~10; *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, lane 11~20; 유사세균 (11번 lane부터 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *morsporunorum*, *P. solanacearum*, *P. cichorii*, *P. corrugata*, *P. mucidolens*, *P. tolaasii*, *Erwinia amylovora*, *E. carotovora*, *Xanthomonas oryzae*); lane 21~29; *P. syringae* pv. *actinidiae*.

☞ 화살표가 가리키는 band가 참다래 궤양병균에서만 검출되는 668 bp 크기의 참다래 궤양병균 병원형 특이적인 RAPD 단편.

**gtgattatcggcactgacggggtctattcaggaaggcctgaactg**  
**gcacgatacatgggcttatgccatcggcacagcctaccggctgga**  
**tcaacagtgggtactgCGTgcaggCGTgctgtttgatcagtcGCCG**  
**accagcaacactggtcgatcaccacgcacaccaacaggggatcg**  
**agaggtattcagcgtcgggggctggttatgaggtcaccCGcaact**  
**gactcttgatctggcttactcttatctt****caggaagaaagtgtcgat**  
**gtcagccgcaatgCGctgggcagctacagtgCGacgtatcagag**  
**ccatgcgaatttactcggcgttggcgcgacttatcgtttctgaccgtc**  
**agttgttatgtatgatgtttcGagcctctggagcagcgcgctgtagtg**  
**catctgtacgattgatgccgtttgCGcagtggttacgattttgtgcg**  
**aagtttttgcctccattatttcaacatagagggctgagcacataag**  
**taaccagccagcggagtgtgtggatgaaaagtgtagccttgttcc**  
**attgattctggctttgtcggggtgtgcaggctttgatcaggccatgtc**  
**aatgaccaatgggtgtgcttgaccagacaggtgatgtactaagcggga**  
**gattcaggggctgaccgatgccaaagg*****aatccc***

그림 4. 참다래 궤양병균(*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*) 특이적 염기배열.

☞ 이태릭체로 된 말단 부위는 vector의 부분임. 밑줄 부분은 새로 합성한 oligonucleotide임.



그 결과 참다래 궤양병균에서 668 bp 단편과 약 350 bp의 단편이 강한 signal을 보였다(그림 5). 그러나 10종의 유사세균들에서는 검출되는 단편이 없었다.

또한 cloning 단편의 pathovar 특이성을 조사하기 위하여 3종의 *P. syringae* pv. *actinidiae*와 2종의 *P. syringae* pv. *syringae*를 PCR 증폭후 교호로 배열하여 Southern blot 분석을 한 결과, 3종의 *P. syringae* pv. *actinidiae*는 상기와 같이 2개의 단편(668 bp, 약 350 bp)이 검출되었으나 2종의 *P. syringae* pv. *syringae*에서는 전혀 검출되는 단편이 없었다(그림 6). 이것은 *P. syringae* pv. *actinidiae* 특이적인 probe를 cloning한 것을 입증한다.

6종의 참다래 궤양병균 *P. syringae* pv. *actinidiae*와 4종의 유사세균으로부터 genomic DNA를 추출한 후 cloning 단편내에 제한효소 절단 위치가 없는 *Hind*III로 소화하여 Southern blot 분석을 하였다(표 7). 그 결과 *P. syringae* pv. *actinidiae*에서는 약 9 kb의 단일 단편이 검출되었으며, 유사세균들에서는 PCR산물의 Southern blot 분석의 결과와 마찬가지로 검출되는 단편이 없었다. 즉 참다래 궤양병균의 genomic sequence내에 cloning 단편은 단일 copy로 존재하는 것을 시사하였다.

한편 668 bp 단편내에서 참다래 궤양병균을 단일 단편으로 동정할 수 있는 forward 및 reverse primer를 합성하였다. 이렇게 참다래 궤양병균의 병원형 특이적인 합성된 forward 및 reverse primer를 이용하여 증폭시킨 PCR 산물들을 Southern blot을 통하여 분석하면 참다래 궤양병균의 균주들에서는 모두 공통적으로 존재하는 약 9 kb 크기의 단일 단편들을 얻을 수 있다.

따라서, 참다래의 잎이나 줄기 조직에서 분리한 미지의 세균으로부터 추출한 genomic DNA를 forward 및 reverse primer를 이용하여 증폭시킨 후 얻은 RFLP profiles에서 참다래 궤양병균 병원형 특이적인 RFLP band 유무를 확인

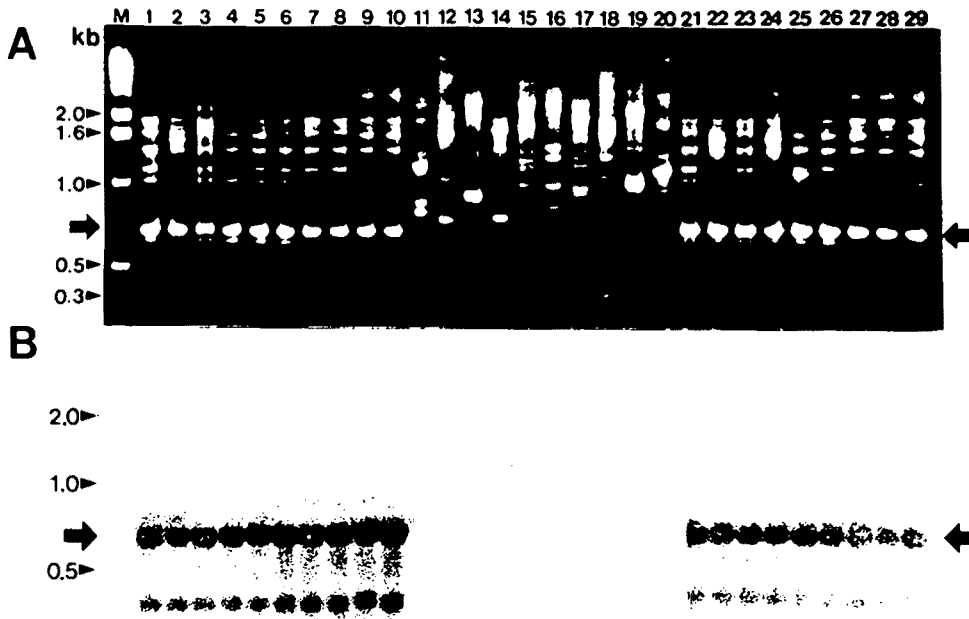


그림 5. Primer C24에 의한 RAPD profiles(A)과 cloning한 참다래 궤양병균 특이적 RAPD 산물(668 bp)을 probe로 Southern blot hybridization을 하여 얻은 궤양병균 특이적 RFLP profiles(B). Lane M; 1 kb DNA ladder, lane 1~10; *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, lane 11~20; 유사세균(11번 lane부터 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *morsporunorum*, *P. solanacearum*, *P. cichorii*, *P. corrugata*, *P. mucidolens*, *P. tolaasii*, *Erwinia amylovora*, *E. carotovora*, *Xanthomonas oryzae*); lane 21~29; *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*.

화살표가 가리키는 agarose gel 상의 band가 참다래 궤양병균에서만 검출되는 668 bp 크기의 참다래 궤양병균 병원형 특이적인 RAPD 단편(A)이며 화살표가 가리키는 Southern blot 상의 band가 668 bp 크기의 참다래 궤양병균 병원형 특이적인 RFLP 단편(B)으로 유사세균에서는 cloning 산물과 반응하는 signal이 전혀 없음을 알 수 있다.

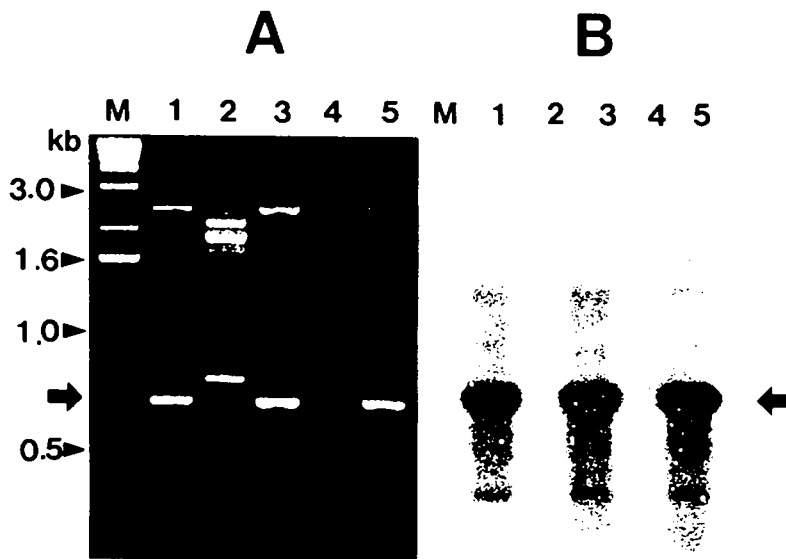


그림 6. 참다래 궤양병균 특이적 cloning 단편의 pathovar 특이성(A : Random Amplified Polymorphic DNA Profiles, B : Southern blot). Lane M ; 1 kb DNA ladder, lane 1, 3, 5 ; *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, lane 2, 4 ; *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

☞ 화살표가 가리키는 agarose gel 상의 band가 참다래 궤양병균에서만 검출되는 668 bp 크기의 참다래 궤양병균 병원형 특이적인 RAPD 단편(A)이며 화살표가 가리키는 Southern blot 상의 band가 668 bp 크기의 참다래 궤양병균 병원형 특이적인 RFLP 단편(B).

표 7. 제한효소 탐색(DNASIS) 결과

Enzyme	Sequence	Start Position	No. of cleavage site
AccII	CG!CG	340 400	2
AluI	AG!CT	293	1
BbvI	GCAGCNNNNNNN!	291 396	2
BclI	T!GATCA	124 587	2
BstEII	G!GTNACC	212	1
Cfr10I	R!CCGGY	81	1
DdeI	C!TNAG	495 639	2
DpnI	GA!TC	89 125 153 176 233 588	6
EcoPI	GGTCT	21 582	2
EcoRI'	RRA!TYY	322 647 674	3
EcoRI*	!AATT	323	1
EcoT14I	C!CWWGG	669	1
Fnu4HI	GC!NGC	276 291 396	3
FnuDII	CG!CG	340 400	2
FokI	GGATGNNNNNNNN!	529	1
HaeI	WGG!CCW	34 592	2
HaeIII	GG!CC	35 593	2
HapII	C!CGG	82	1
HgaI	!NNNNNNNNNGCGTC	182	1
HgiAI	GWGCW!C	497	1
HhaI	GCG!C	284 339 399 401 436	5
HinfI	G!ANTC	226 557 674	3
HpaII	C!CGG	82	1
HphI	GGTGANNNNNNN!	630	1
HphI	!NNNNNNNTCACC	148 207	2
MboI	!GATC	89 125 153 176 233 588	6
MboII	GAAGANNNNNNN!	257	1
MboII	!NNNNNNNTCTTC	243	1
MnlI	CCTCNNNNNN!	388 471	2
MnlI	!NNNNNNNGAGG	175 203 483	3
MstI	TGC!GCA	435	1
RsaI	GT!AC	101 417 636	3
SacIII	ACGT	305	1
Sau3AI	!GATC	89 125 153 176 233 588	6
SstIII	ACGT	305	1
StuI	AGG!CCT	34	1
TaqI	T!CGA	151 178 267 383	4
ThaI	CG!CG	340 400	2
Tth111I	GACN!NNGTC	16	1

함으로써 신속 정확하게 참다래 궤양병균 여부를 동정할 수 있게 되었다. 참다래 궤양병의 잠복기가 긴 특성을 감안하여 외관상 건전해 보이는 참다래 나무일지라도 조직을 채취하여 RAPD 또는 RFLP marker를 분석하면 궤양병 감염 여부를 잎과 줄기에서 병징 발현 이전에도 진단할 수 있다.

참다래 궤양병은 감염 초기에 방제를 하지 않을 경우 과수원을 폐원시킬 만큼 치명적인 피해를 초래하므로 감염 초기 진단이 중요하다. 그러나 궤양병은 감염 후 2-3년동안의 잠복기를 거쳐 병징이 나타나는 특수성 때문에 감염 초기 육안 진단이 불가능하고, 감염 초기에 참다래 조직으로 부터 병원세균을 분리하였을지라도 형태학적 또는 생리·생화적 동정에는 3-6개월이 소요됨으로써 방제시기를 놓치게 된다.

따라서, Biolog program과 RAPD 및 RFLP marker를 이용한 참다래 궤양병 조기진단 시스템은 참다래 궤양병을 조기에 진단 가능케 함으로써 효과적인 참다래 궤양병의 방제 전략을 수립하는 데 기여할 것을 전망된다.

그러나, Biolog를 이용한 참다래 궤양병균 동정과 RAPD 및 RFLP marker를 이용한 참다래 궤양병균 검출을 통한 참다래 궤양병 조기진단 시스템은 고가의 실험 기기 및 고도의 숙련된 실험 방법을 요구하므로 농촌진흥원, 지역 특화 시험장 또는 시군 농촌지도소에 기술을 이전하거나, 참다래 재배 농가의 진단의뢰에 대해 전산망을 통해 신속하게 진단 회신할 수 있도록 진단 전산망을 구축함으로써 참다래 궤양병의 조기 방제 체계를 확립시키는 데 활용할 수 있을 것이다.

## 제 3 장 참다래 궤양병 약제저항성균 발생실태 조사

### 제1절 서언

식물에 발생하는 세균병의 방제 약제는 항생제와 동제로 제한되어 있어서 동일한 약제의 연용에 따른 약제저항성균의 발생은 세균병의 방제에 가장 큰 제한 요인이 되고 있다. 참다래 궤양병도 세균에 의해 발생하는 병해이기 때문에 참다래 궤양병 방제 약제로 우리 나라에서는 현재 아그리마이신 수화제 한 가지만이 고시되어 있어서 농가에서는 최근 문제가 되고 있는 궤양병의 방제를 위하여 아그리마이신 수화제를 집중적으로 살포하고 있어 약제저항성균 발생이 우려되고 있는 실정이다(고, 1995; 고 등, 1996).

우리 나라보다 궤양병이 먼저 발생하기 시작했고 아그리마이신(스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제)을 비롯하여 가스신 액제, 가스란 수화제, 농용신 수화제, 농용신·쿠퍼 수화제, 쿠퍼 수화제 등 여러가지 약제가 참다래 궤양병 약제로 사용되고 있는 일본에서도 1992년부터 streptomycin, kasugamycin 및 copper 저항성균이 발생하는 것으로 보고되었으며, 약제저항성 정도도 점차 증가하는 것으로 보고되었다(Goto 등, 1994; Serizawa 등, 1989; Ushiyama, 1993).

따라서, 참다래 궤양병 방제 효율을 극대화시키기 위해서는 약제저항성균의 발생을 억제시키는 것이 바람직하며, 이를 위해서 궤양병 약제인 아그리마이신 수화제의 주성분인 streptomycin과 oxytetracycline 및 농가에서 관행적으로 사용하고 있는 동제의 주성분인 copper sulfate에 대한 약제저항성균 발생실태를 파악하고 이에 대책을 수립하는 것이 시급하다.

## 제2절 연구 방법

### 1. 참다래 궤양병 streptomycin 저항성균 발생실태 조사

1996년 우리 나라에서 수집한 참다래 궤양병균 215개 균주와 일본에서 수집한 61개 균주 및 1997년 우리 나라에서 수집한 79개 균주들을 대상으로 우리 나라에서 주로 사용되고 있는 참다래 궤양병균 약제인 아그리마이신 (streptomycin 황산염 + oxytetracycline) 수화제의 주성분인 streptomycin에 대한 약제저항성균 발생실태를 비교 조사하였다.

Peptone Sucrose Agar 배지 위에  $10^6$  cells/ml 농도의 궤양병균 현탁액을 도달한 후 약제별 streptomycin은 10, 100, 500, 1,000, 10,000 및 100,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도를 흡수시킨 직경 8 mm paper disk를 치상하여 24~72시간 후 저지환의 직경을 측정하여 세균생장 최소억제농도(Minimal inhibition concentration, MIC)를 조사하였다.

### 2. 참다래 궤양병 oxytetracycline 저항성균 발생실태 조사

1996년 우리 나라에서 수집한 참다래 궤양병균 215개 균주와 일본에서 수집한 61개 균주 및 1997년 우리 나라에서 수집한 79개 균주들을 대상으로 우리 나라에서 주로 사용되고 있는 참다래 궤양병균 약제인 아그리마이신 (streptomycin 황산염 + oxytetracycline) 수화제의 주성분인 oxytetracycline에 대한 약제저항성균 발생실태를 비교 조사하였다.

Oxytetracycline에 대한 저항성 정도는 Peptone Sucrose Agar 배지 위에  $10^6$  cells/ml 농도의 궤양병균 현탁액을 도달한 후 10, 25, 50, 100, 250, 500 및 1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도를 흡수시킨 직경 8 mm paper disk를 치상하여 24~72시간 후 저지환의 직경을 측정하여 세균생장 최소억제농도(Minimal inhibition concentration, MIC)를 조사하였다.

### 3. 참다래 궤양병 copper 저항성균 발생실태 조사

1996년 우리 나라에서 수집한 참다래 궤양병균 215개 균주와 일본에서 수집한 61개 균주 및 1997년 우리 나라에서 수집한 79개 균주들을 대상으로 동수화제의 주성분인 copper sulfate에 대한 억제저항성균 발생실태를 비교 조사하였다.

Copper sulfate에 대한 저항성 정도는 0.1, 0.5, 1, 2 및 4 millimole 농도의 copper sulfate를 첨가시킨 CYE-glycerol 배지위에 궤양병균을 streaking하여 세균생장 최소억제농도(MIC)를 조사하였다.

## 제3절 연구 결과

### 1. 참다래 궤양병 streptomycin 저항성균 발생실태

우리 나라와 일본에서 수집한 참다래 궤양병균 균주들의 streptomycin에 대한 저항성을 조사한 결과 1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 1996년 수집된 우리 나라 215개 균주들 중 46.5%가 저항성을 나타내었고, 1997년 수집된 79개 균주들 중 69.6%가 저항성을 나타내는 것으로 조사되어 년차별로 streptomycin에 대한 저항성 수준이 증가하고 있는 것으로 밝혀졌다. 반면에, 일본 균주들은 54.1%가 streptomycin에 대해 저항성을 나타내어 점차 일본 균주들보다 우리나라에 분포하는 균주들의 streptomycin에 대한 저항성 수준이 최근 더 높아진 것으로 밝혀졌다(표 8).

### 2. 참다래 궤양병 oxytetracycline 저항성균 발생실태

Oxytetracycline에 대한 저항성을 조사한 결과 일본 균주들은 모두 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 oxytetracycline에 대해 감수성을 나타내는 것으로 조사된 반면에, 1996년과 1997년 우리 나라에서 수집된 균주들은 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서도



표 8. Streptomycin, Oxytetracycline 및 Copper sulfate에 대한 참다래 귀양병원 저항성 균주의 발생 수준

국가	구분	Streptomycin				Oxytetracycline				Copper sulfate				합계
		최소 억제 농도 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )				최소 억제 농도 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )				최소 억제 농도 (millimole)				
		10	100	1,000	10,000 이상	10	25	50	100 이상	0.5	1	2	4 이상	
한국 (1996)	균주수	29	86	57	43	35	24	18	138	138	72	5	-	215
	%	13.5	40.0	26.5	20.0	16.3	11.2	8.4	64.2	64.2	33.5	2.3	-	
한국 (1997)	균주수	11	13	35	20	5	2	11	61	25	43	11	-	79
	%	13.9	16.5	44.3	25.3	6.3	2.5	13.9	77.2	31.7	54.3	13.9	-	
일본	균주수	12	16	31	2	60	1	-	-	17	40	4	-	61
	%	19.7	26.2	50.8	3.3	98.4	1.6	-	-	27.9	65.6	6.6	-	

각각 64.2%와 77.2%가 저항성을 나타내어 우리 나라 균주들이 일본 균주보다 oxytetracycline에 대해 대단히 높은 수준의 약제저항성을 나타내었으며, 년차별로 oxytetracycline에 대한 약제저항성이 다소 증가하고 있는 것으로 밝혀졌다(표 8).

### 3. 참다래 궤양병 copper sulfate 저항성균 발생실태

Copper sulfate에 대한 저항성을 조사한 결과 1996년과 1997년 우리 나라에서 수집된 균주들이 1 millimole 농도에서 각각 35.8%와 68.2%가 저항성을 나타내는 것으로 조사된 반면에, 일본 균주들은 75.5%가 저항성을 나타내는 것으로 조사되어 우리 나라 균주들이 일본 균주들보다 copper sulfate에 대한 저항성 발달 수준이 다소 낮은 것으로 밝혀졌다(표 8).

### 4. 참다래 궤양병균 균주들의 중복 약제저항성균 발생실태

조사한 각 약제들에 대한 저항성균의 발생율은 약제에 따라 차이가 있었는데, 1996년 우리 나라에서 수집된 균주들 중에서 단일 약제 또는 중복 약제 저항성균의 발생 실태를 분석한 결과, streptomycin에 대해서만 저항성을 나타내는 균주는 2.3%에 불과하였고, oxytetracycline에 대해서만 저항성을 나타내는 균주는 14.0%, copper sulfate에 대해서만 저항성을 나타내는 균주는 9.3%인 반면에, streptomycin과 oxytetracycline 두가지 약제에 대해 동시에 저항성을 나타내는 균주는 30.2%, oxytetracycline과 copper sulfate 두가지 약제에 대해 동시에 저항성을 나타내는 균주는 7.0%였고, streptomycin, oxytetracycline 및 copper sulfate 세가지 약제에 대해 모두 저항성을 나타내는 균주는 11.6%였다. 그러나, streptomycin과 copper sulfate 두가지 약제에 대하여 동시에 저항성을 나타내는 균주는 없었으며 세가지 약제에 대해 모두 감수성인 균주는 25.6%였다(그림 7).

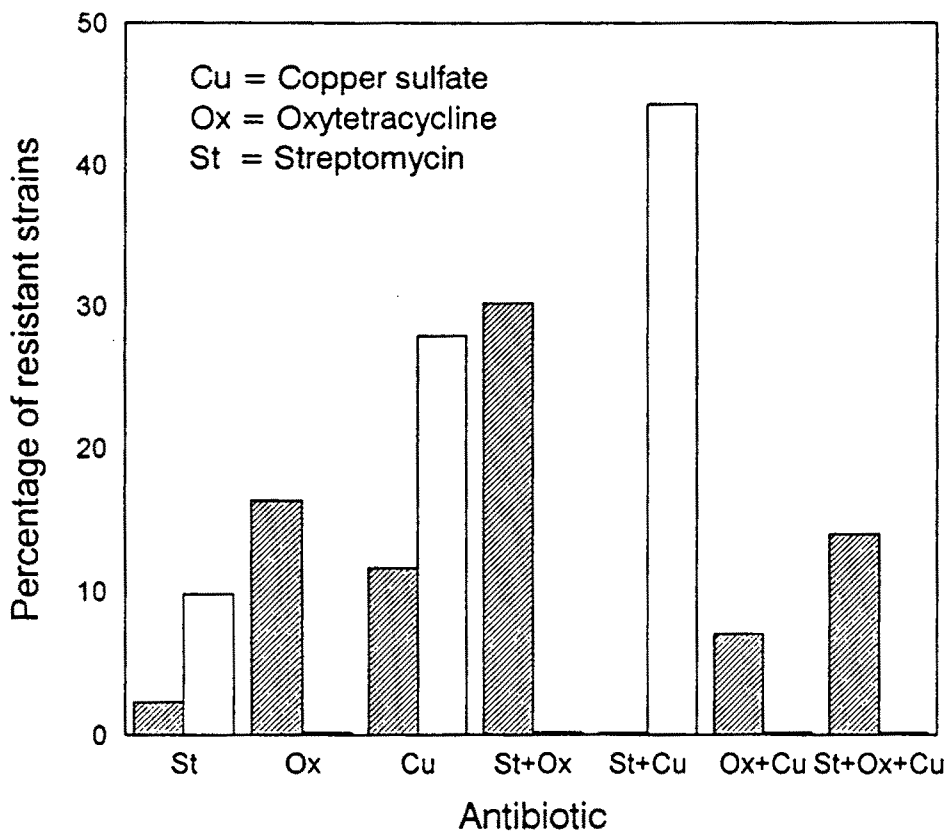


그림 7. 참다래 귀양병균 균주들의 streptomycin(1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), oxytetracycline(100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 및 copper sulfate( $\geq 1\text{mM}$ )에 대한 단일 약제 또는 중복 약제저항성 균주의 발생을(▨:우리 나라 균주, □:일본 균주)

반면에, 일본 균주들 중에서 streptomycin과 copper sulfate에 대해서만 저항성을 나타내는 균주는 각각 9.8%와 27.9%로 우리 나라보다 높게 검출되었으나, oxytetracycline에 대해서만 저항성을 나타내는 균주와 streptomycin과 oxytetracycline, oxytetracycline과 copper sulfate에 대해 동시에 저항성을 나타내는 균주는 전혀 검출되지 않았고, 우리 나라에서는 검출되지 않았던 streptomycin과 copper sulfate에 대하여 동시에 저항성을 나타내는 균주는 44.3%로 가장 높은 빈도로 검출되었으며, streptomycin, oxytetracycline 및 copper sulfate에 대해 모두 저항성을 나타내는 균주는 검출되지 않았다.

이러한 결과는 우리 나라와 일본에서 주로 사용되고 있는 약제의 종류와 밀접한 상관이 있었다. 즉, 우리 나라에서는 주로 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제(아그리마이신)가 사용되고 있기 때문에 streptomycin과 oxytetracycline에 대하여 동시에 중복 약제저항성을 나타내는 균주가 가장 높게 검출된 것으로 해석된다.

따라서, 우리 나라에서 이미 상당한 수준으로 발생하고 있는 streptomycin, oxytetracycline 및 copper sulfate에 대한 약제 저항성균의 발생을 제어하는 것이 시급한 실정인데, 우리 나라에서 단일 약제로 고시되어 있는 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제(아그리마이신)의 연용을 막기 위하여 참다래 귀양병 약제를 다원화할 수 있도록 새로운 약제의 개발이 절실하게 요구된다. 또한 적정 약제 살포 시기 및 살포 횟수 등을 고려하여 약제 사용을 최소화할 수 있는 화학적 방제 체계가 확립되어야 할 것이다.

한편, 참다래 귀양병에 대한 약제 저항성균의 발생 실태는 우리 나라에서 처음 조사되었으며, 조사결과 항생제인 streptomycin과 oxytetracycline 및 동제인 copper sulfate에 대한 높은 수준의 약제 저항성균의 출현이 확인되

있으므로 약제 방제 프로그램이나 관련 업계의 참다래 궤양병에 대한 약제 개발시 약제 저항성의 발생 억제 노력을 경주하여야 할 것이다.

## 제 4 장 참다래 궤양병 화학적방제체계 확립

### 제1절 서언

참다래 궤양병은 세균에 의해 발생하는 병이기 때문에 제한된 항생제와 동제에 의해서만 방제가 가능하다. 우리 나라보다 궤양병이 먼저 발생했던 일본에서는 아그리마이신을 비롯하여 여러가지 약제가 참다래 궤양병 약제로 개발되어 있지만(Serizawa 등, 1989; Ushiyama, 1993), 우리 나라에서는 현재 아그리마이신 수화제 한 가지만이 참다래 궤양병 방제 약제로 고시되어 있을 뿐이다. 그러나, 아그리마이신 수화제를 연간 5-10회 정도 살포함에 따라 약제 저항성균이 발생하고 있어 약제 방제의 효율성을 제고하고, 약제의 다변화를 통한 보다 효과적인 궤양병 방제를 위해서는 추가 약제 개발이 필요하다.

참다래 궤양병은 18℃ 이하의 저온에서 활성이 높고 주로 봄에 나온 새 잎의 기공, 상처, 수공 등을 통해 감염을 일으키므로 비교적 저온 시기인 4월 중순에 일찍 나오는 잎일수록 감염될 확율이 높다(芹澤 등, 1993a; 1993b). 또한 Serizawa 등(1993d)은 성숙되기 직전의 3~6엽이 궤양병에 대해 가장 감수성을 나타내고 보다 성숙한 잎이나 어린 잎일수록 엽당 병반수가 감소한다고 보고하였다. 새 순에 궤양병균의 비산 및 침입 감염 적온은 10~18℃이고 봄과 가을 중순부터 이른 겨울 사이가 감염적기라고 芹澤 등(1993b)은 보고하였으므로 궤양병의 예방을 위한 약제 살포는 궤양병균의 왕성하게 활동하고 침입 감염을 일으키기 쉬운 시기인 4월 중순경 새 잎이 나오는 시기 또

는 그 이전부터 이루어져야 소기의 성과를 거둘 수 있을 것으로 생각된다.

한편, 궤양병 약제의 살포는 각종 분무기를 이용해 왔으나, 덕이 설치되어 있는 참다래 과수원의 특수성 때문에 시간과 인력이 많이 소모되는 문제점을 해결할 수 있도록 무인 방제 시스템을 통한 생력화 화학적 방제 체계의 확립이 필요하다. 따라서, 참다래 궤양병 방제를 보다 효과적으로 수행할 수 있도록 동제 또는 동제와 항생제의 합제 등 보다 많은 약제의 개발이 시급한 실정이며, 이러한 약제의 살포적기와 적정살포 횟수에 대한 기초 연구가 필요하다.

## 제2절 연구 방법

### 1. 참다래 궤양병 무인방제장치의 효과 검정

순천시 해룡면 해창리 금오농장에 설치된 무인방제장치를 이용한 무인방제 효율과 동력분무기를 이용한 인력방제의 효율과 참다래 궤양병 방제효과를 난괴법 3반복으로 수행하여 비교 평가하였다.

1996년 4월 26일, 5월 6일, 5월 16일 참다래 헤이워드 품종에 참다래 궤양병 등록약제인 스트렙토마이신황산염·옥시테트라싸이클린 수화제(아그리마이신)를 3회 살포한 후 5월 25일 처리구당 10주를 임의로 선정하여 주당 200엽의 이병엽율을 조사함으로써 참다래 궤양병 방제효과를 비교하였고, 또한 650평 기준으로 방제소요 약제량, 소요물량, 소요시간, 소요인력 등의 방제 효율을 비교하였다.

### 2. 참다래 궤양병에 대한 우수 약제의 선발

스트렙토마이신황산염·옥시테트라싸이클린 수화제(아그리마이신), 농용신수화제(아그렙토), 가스신 액제(가스가민), 쿠파 수화제(코사이드), 농용

신·쿠퍼 수화제(타미나), 가스란 수화제(가스란), 트리베이직코퍼설페이트 액상수화제(새빈나)를 공시하여 Peptone sucrose agar 배지상에 참다래 궤양병균을 도말한 후 각 약제를 직경 8 mm paper disc에 적셔 배지 중앙에 치상한 후 생기는 궤양병균 균총 형성 저지환의 직경을 측정함으로써 배지상에서 참다래 궤양병균에 대한 생육저지효과를 검정하였다.

### 3. 참다래 궤양병 우수 약제의 포장 검정

해남군 옥천면 문촌리 참다래 포장에서 실내시험을 통해 참다래 궤양병균에 대해 약효가 우수한 것으로 선발된 농용신 액제(아그렙토), 가스신 액제(가스가민), 아다킹 수화제, 농용신·쿠퍼 수화제(타미나), 가스란 수화제(가스란) 등 5개 약제와 대조약제로 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제(아그리마이신)를 1996년 4월 30일, 5월 10일, 5월 20일, 5월 30일 참다래 헤이워드 품종에 4회 엽면 살포하여 6월 6일 각 처리구당 3주, 구당 200엽의 이병엽율과 약해 유무로 궤양병 방제효과를 비교 검정하여 우수 약제를 선발하였다.

### 4. 참다래 궤양병에 대한 우수 약제의 살포 적기 검정

해남군 옥천면 참다래 포장에서 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제(아그리마이신), 농용신 수화제(아그렙토), 가스신 액제(가스가민), 쿠퍼 수화제(코사이드), 농용신·쿠퍼 수화제(타미나), 가스란 수화제(가스란), 트리베이직코퍼설페이트 액상수화제(새빈나) 등 참다래 궤양병에 대한 7종의 약제들을 겨울철 전정직후부터 약제살포시기를 3 시기로 다원화하여 각 약제를 10일 간격으로 3회씩 살포하여 참다래 궤양병에 대한 우수 약제의 선발과 함께 참다래 궤양병 방제 약제의 살포 적기를 검정하였다.

참다래 헤이워드 품종을 공시하여 구당 1주씩 난괴법 5반복으로 수행하였



으며 1차 약제살포는 1997년 1월 20일, 1월 30일 및 2월 10일에, 2차 살포는 3월 21일, 3월 31일 및 4월 10일에, 3차 살포 시기는 4월 15일, 4월 25일 및 5월 6일에 각각 3회씩 살포하였으며, 약효 평가는 1997년 5월 15일에 구당 전체 가지에 대한 이병가지율로 평가하였다.

#### 5. 참다래 궤양병에 대한 우수 약제의 적정 살포 수준 검정

순천시 해룡면 참다래 포장에서 아그리마이신 수화제(13g/20L)를 공시하여 참다래 헤이워드 품종에 난괴법 3반복으로 1997년 1월 14일부터 10일간격 1회 살포구(1/14), 2회 살포구(1/14, 1/24), 3회 살포구(1/14, 1/24, 2/4), 4회 살포구(1/14, 1/24, 2/4, 2/14) 및 5회 살포구(1/14, 1/24, 2/4, 2/14, 2/24)와 15일 간격 1회 살포구(1/14), 2회 살포구(1/14, 1/29), 3회 살포구(1/14, 1/29, 2/14), 4회 살포구(1/14, 1/29, 2/14, 3/1), 5회 살포구(1/14, 1/29, 2/14, 3/1, 3/16)를 두어 약제를 살포하였다. 약효 평가는 4월 2일, 주간, 주지 및 가지에 따른 이병도로 평가하였다.

### 제3절 연구 결과

#### 1. 참다래 궤양병 무인방제장치의 설치

선교산업-원예연구소가 공동개발한 반자동식 방제나래를 이용한 과수무인 약제살포 장치를 덕이 설치되어 있는 참다래 과수원에 적합한 전자동 약제살포 장치로 선교산업(대표 이재창)에서 개량하여 순천시 해룡면 해창리 226 금오농장(대표 신준식)에 설치하였다(표 9).

1995년 4월 18일 금오농장에서 150여 참다래 재배자, 시군 농촌지도소, 시군 관계자들을 대상으로 무인방제 장치에 대한 연시회를 개최하였다(그림 8).

표 9. 참다래 궤양병 무인방제 장치의 주요 사양(650평형)

주요 사양	주요 규격	수량 및 단위
농약 Tank	3 ton	1식
Pump	YH5500	1식
Motor	삼상 7.5HP	1식
전자밸브	Ø50	1식
방제나래	KG800	6개
Nozzle	CAT900	117개
호스	8×12	117개
전기판넬(자동제어장치)	PLC & M/G Control	300M
동력	380V×10KW	1면



그림 8. 참다래 궤양병 무인방제장치 연시회 및 약제살포 전경

## 2. 무인방제장치에 의한 참다래 궤양병 방제효과

참다래 궤양병 등록약제인 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제(아그리마이신)를 3회 살포하여 인력방제에 대한 무인방제장치에 의한 참다래 궤양병 방제효과 검정 결과 무인방제구에서 이병엽율이 2.1%이고 인력방제구에서의 이병엽율이 2.3%로 궤양병 발생율의 유의차가 없게 나타나서 무인방제에 의해서도 인력방제와 대등한 방제효과를 얻을 수 있었다(표 10).

또한, 방제소요 약제량, 소요물량, 소요시간, 소요인력 등의 방제효율을 비교한 결과, 인력방제에 대한 무인방제의 방제효율은 650명 기준으로 산출하여 89분의 시간 절감효과와 함께 1인분의 노동력 절감효과를 나타내어 무인방제장치의 효용성이 입증되었다. 그러나 무인방제에서의 소요 물량과 소요 약량이 인력방제에 비하여 약 40% 이상 추가 소요되는 단점이 있었다.

## 3. 참다래 궤양병에 대한 우수 약제의 선발

스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제(아그리마이신), 농용신 수화제(아그렙토), 가스신 액제(가스가민), 쿠퍼 수화제(코사이드), 농용신·쿠퍼 수화제(타미나), 가스란 수화제(가스란), 트리베이직코퍼셀페이트 액상수화제(새빈나)를 공시하여 배지상에서 참다래 궤양병균에 대한 생육저지효과를 검정한 결과 동제인 쿠퍼 수화제(코사이드)와 트리베이직코퍼셀페이트 액상수화제(새빈나)를 제외하고 항생제 또는 항생제와 동제의 합제들은 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제(아그리마이신), 농용신 수화제(아그렙토), 농용신·쿠퍼 수화제(타미나), 가스신 액제(가스가민), 가스란 수화제(가스란) 순으로 높은 생육저지 효과를 나타내었다(표 11).

표 10. 무인방제와 인력방제에 의한 참다래 귀양병 방제효율(650평기준)

비 교 항 목	무인방제	인력방제	비 고
소 요 약 량 (스트렙토마이신황산염·옥시테트라싸이클린 수화제(13g/20L))	700 g	400 g	300 g 추가소요
소 요 물 량	1,000 ℓ	600 ℓ	400 ℓ 추가소요
소 요 시 간 (약제살포장치 이동 및 설치시간) (약제 및 희석용 물 준비시간) (약제 살포시간) (약제살포후 정리시간)	26 분 ( 0 분) (20 분) ( 4 분) ( 2 분)	115 분 (10 분) (15 분) (70 분) (20 분)	89분 절약 효과
소요 노동력	1 인	2 인	1인 절약 효과
이 병 율 (%)	2.1%	2.3%	유의차 없음

약제살포일 : 1996년 4월 26일, 5월 6일, 5월 16일

이병율(%)은 최종 약제 살포 10일 후 조사한 이병율.

표 11. 참다래 궤양병균에 대한 항생제 및 동제의 생육저지 효과

약 제 명	상 표 명	유 효 성 분	농도 (ppm)	저지환의 크기(mm)
스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제	아그리마이신	streptomycin sulfate 18.8% + oxytetracycline 1.5%	650	33.2 <sup>a</sup>
농용신 수화제	아그렙토	streptomycin 20%	1,000	22.6
농용신·쿠퍼 수화제	타미나	streptomycin 20% + copper hydroxide 50%	1,000	21.8
가스신 액제	가스가민	kasugamycin 2.3%	1,000	20.2
가스란 수화제	가스란	kasugamycin 2.3% + copper oxychloride 45%	1,000	19.6
쿠퍼 수화제	코사이드	copper hydroxide 50%	1,000	<sup>b</sup>
트리베이직코퍼설페이트 액상수화제	새빈나	tribasic copper sulfate 15%	1,000	-
무처리			-	0

<sup>a</sup> Peptone sucrose agar 배지상에 참다래 궤양병균을 도말한 후 각 약제를 직경 8 mm paper disc에 적셔 배지 중앙에 치상한 후 생기는 궤양병균 균총 형성 저지환의 직경.

<sup>b</sup> 뚜렷한 저지환이 형성되지 않음.

#### 4. 참다래 궤양병에 대한 우수 약제의 방제효과

해남군 옥천면 문촌리 참다래 궤양병 발생포장의 헤이워드 품종에 실내시험을 통해 약효가 우수한 것으로 선발된 농용신 수화제, 가스신 액제, 아다킹 수화제, 타미나 수화제, 가스란 수화제 등 5개 약제와 참다래 궤양병 등록약제인 아그리마이신 수화제를 4회 엽면살포하여 각 처리구의 이병엽율로 참다래 궤양병 방제효과를 비교 검정하였다.

참다래 궤양병 우수약제에 대한 포장 검정시험 결과 가스신 액제 처리구의 이병엽율이 7.3%이고 아다킹 수화제 처리구의 이병엽율이 4.3%로 대조약제인 아그리마이신 수화제 처리구의 이병엽율 4.3%와 대등하거나 보다 우수한 궤양병 방제효과를 나타내어 추후 아그라이신을 대체할 수 있는 약제로 선발되었다(표 12).

그러나, 항생제와 동제의 합제인 타미나 수화제와 가스란 수화제는 참다래 잎에 심한 약해 증상을 유발하여 약효 평가가 불가능하였다.

#### 5. 참다래 궤양병에 대한 우수 약제의 살포 적기

참다래 궤양병에 대한 7개 우수약제들을 전정 직후, 신초 소생기 및 전엽기부터 각각 10일 간격 3회 살포하여 약제 살포시기별 참다래 궤양병 방제효과를 검정한 결과 참다래 궤양병에 대하여 새빈나를 제외한 약제들이 대조약제인 아그리마이신보다 높거나 비등한 방제효과를 나타내었으며, 방제 적기는 각 약제에 따라 다른 것으로 확인되었다(표 13).

스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제와 농용신 수화제의 방제적기는 전엽기인 4월 중순부터 5월 초순, 가스신 액제의 방제적기는 신초 소생기인 3월 하순부터 4월 초순, 쿠퍼 수화제, 농용신·쿠퍼 수화제 및 가스란 수화제의 방제적기는 전정 직후인 1월 중순부터 2월 초순으로 각각 확인되었다.

표 12. 참다래 귀양병 우수약제에 대한 포장검정 시험 결과

공 시 약 제	이 병 업 울 (%)				비 고
	1반복	2반복	3반복	평 균	
아다킹 수화제	3.0	9.0	1.0	4.3± 4.2	대조약제보다 약 효가 우수함
가스신 액제	9.5	8.0	4.5	7.3± 2.6	대조약제와 약효 가 대등함
농용신 수화제	31.0	11.5	5.5	16.0±13.3	
농용신·쿠퍼 수화제	-	-	-	-	약해발생
가스란 수화제	-	-	-	-	약해발생
스트렙토마이신황산 염·옥시테트라싸이 클린 수화제	13.5	3.5	4.0	7.0± 5.6	대조약제

약제살포일 : 1996년 4월 30일, 5월 10일, 5월 20일, 5월 30일.

이병업율(%)은 최종약제 살포 7일 후 조사한 이병업율.



표 13. 참다래 궤양병 우수약제의 살포시기별 참다래 궤양병 방제효과

공 시 약 제	살포농도	약제살포 1차시기		약제살포 2차시기		약제살포 3차시기	
		이병율 (%)	방제가 (%)	이병율 (%)	방제가 (%)	이병율 (%)	방제가 (%)
스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제	13g/20L	10.6	36.9	5.5	17.9	9.8	70.5
농용신 수화제	20g/20L	9.4	44.0	5.5	17.9	8.3	75.0
가스신 액제	20ml/20L	6.8	59.5	1.3	80.6	13.9	58.1
쿠퍼 수화제	20g/20L	5.6	66.7	5.0	25.4	약해 발생	-
가스란 수화제	20g/20L	8.0	52.4	3.8	43.3	약해 발생	-
농용신·쿠퍼 수화제	20g/20L	4.6	72.6	9.8	-	약해 발생	-
트리베이직코퍼설페이트 액상수화제	40g/20L	18.1	-	14.6	-	약해 발생	-
무처리	-	16.8		6.7		33.2	

1차시기 약제살포일 : 1997년 1월 20일, 1월 30일, 2월 10일; 2차시기 약제살포일 : 3월 21일, 3월 31일, 4월 10일; 3차시기 약제살포일 : 4월 15일, 4월 25일, 5월 6일.

이병율(%)은 각 약제 최종살포 10일 후 조사한 이병율.

그러나, 동 수화제 또는 동 수화제와 항생제 합제는 앞서 나와 있는 3차시기에서 모두 약해를 나타내었으므로 이러한 약제들은 4월 중순부터는 사용이 불가능한 것으로 판정되었다. 따라서, 참다래 궤양병에 대하여 우리 나라에 공시된 약제는 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제(아그리마이신) 1종 뿐이지만 본 조사결과 가스신 액제, 농용신 수화제, 농용신·쿠퍼 수화제는 참다래 궤양병 방제 효과가 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제와 비등하거나 우수한 것으로 확인되어 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제를 대체할 수 있는 후보약제로 개발할 수 있을 것으로 전망된다.

#### 6. 참다래 궤양병에 대한 우수 약제의 적정 살포 수준

참다래 궤양병 품목 고시 약제인 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제(아그리마이신)를 공시하여 살포 간격을 10일 간격과 15일 간격으로 달리하고, 살포 횟수를 1회부터 5회까지 다양하게 처리하여 궤양병 방제 효과를 평가한 결과 가장 높은 방제효과를 나타낼 수 있는 적정 약제 약제살포 간격 및 횟수는 15일 간격 3회 및 10일간격 4회로 확인되었다(표 14).

따라서, 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제의 경우 가장 높은 방제효과를 나타낼 수 있는 적정 약제 약제살포 간격 및 횟수가 다른 것으로 확인되었고, 농용신 수화제, 가스신 액제, 농용신·쿠퍼 수화제 등 참다래 궤양병 후보약제들의 방제적기는 약제에 따라 다르게 조사되었으므로 참다래 궤양병 방제용 약제의 살포 적기 및 약제 살포 간격 및 횟수를 약종에 따라 다르게 고시해야 할 것을 판단된다.

표 14. 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제의 살포 간격 및 살포 횟수별 참다래 궤양병 방제효과

공시 약제	살포농도	살포 간격	살포횟수	방제 효과		비고
				이병도	방제가(%)	
스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제 (아그리마이신수화제)	13g/20L	10일 간격	1회	5.8	74.3	
			2회	7.3	67.7	
			3회	8.0	64.6	
			4회	4.1	81.9	적정횟수
			5회	4.4	80.5	
		15일 간격	1회	5.8	74.3	
			2회	7.1	68.6	
			3회	3.0	86.7	적정횟수
			4회	5.0	77.9	
			5회	5.4	76.1	
무 처리	-	-		22.6	-	

약제살포 개시일 : 1997년 1월 14일

방제효과는 4월 2일 주간, 주지 및 가지에 따른 이병도로 평가.

## 제 5 장 고 찰

우리 나라 참다래 재배 면적은 약 1,500 ha에 이르고, 재배 농가도 약 5,000 농가에 이르는 것으로 추정되고 있다. 1994년 전라남도 동부지역의 200여 참다래 재배농가를 대상으로 한 설문조사에서 참다래의 재배자들 중 80% 이상이 참다래를 소득 유망 작목으로 생각하고 있어 앞으로도 참다래 재배 면적과 재배 농가수는 계속 증가할 전망이다. 그러나, 이 설문조사를 통하여 참다래 재배 및 병 방제에서 대두되는 문제점을 조사 분석한 결과 참다래 재배자들 중 40대 이하의 청장년층이 24.7%에 불과하고 참다래 재배자들의 ⅔가 1,000평 이하의 과수원을 재배하고 있는 것으로 밝혀져 참다래 재배자들의 노령화와 경영규모의 영세화는 참다래 산업의 국제 경쟁력을 제고하기 위해 선결해야 할 시급한 과제로 판단된다(고 등, 1994b). 참다래 산업도 국제경쟁력이 있는 전업농으로 구조조정이 이루어져야 재배기술 연구나 재배시설에 대한 투자를 기대할 수 있기 때문이다.

참다래는 우리 나라에서 재배 역사가 그리 길지 않은 과일 중의 하나이므로 우리 나라에 적합한 재배방법이 완전하게 정착되어 있지는 않지만 제주도를 비롯하여 남해안 지역에서 재배되고 있는 참다래를 성공적으로 재배하기 위해서는 해마다 남부 해안지역을 위협하는 태풍에 의한 피해의 최소화와 궤양병을 비롯한 병 방제가 주요 현안으로 대두되고 있어 이에 대한 해결책이 참다래 재배의 성패를 좌우할 것으로 전망된다. 더구나 최근에 발생하기 시작한 궤양병은 수만평의 참다래 과원을 폐원시킬만큼 치명적인 피해를 주면서 참다래 생산기반을 위협하고 있으며 궤양병의 발생율은 년차적으로 계속 증가하고 있는 것으로 밝혀져(고, 1995, 고 등, 1994b), 궤양병에 대한 종합적 방제 대책의 수립이 시급한 실정이다.

식물병은 사람이나 동물병과는 달리 일단 발생하였을 경우 치료가 대단히 어렵기 때문에 보다 효율적인 방제를 위해서는 예방과 정확한 진단에 의한 발병초기의 방제에 치중해야 한다. 특히 궤양병은 감염 후 2-3년동안의 잠복기를 거쳐 병징이 나타나는 특수성 때문에 감염 초기 육안 진단이 불가능하고, 감염 초기에 참다래 조직으로 부터 병원세균을 분리하였을지라도 형태학적 또는 생리·생화적 동정에는 3-6개월이 소요됨으로써 방제시기를 놓치게 된다. 따라서, 이러한 참다래 궤양병의 방제시 발병초기에 정확한 병진단이 가장 큰 애로사항으로 지적되고 있어 조기진단방법의 개발이 시급한 과제로 대두되어 왔다.

본 연구 개발 결과 구축된 Biolog program과 RAPD 및 RFLP marker를 이용한 참다래 궤양병 조기진단 시스템은 참다래 궤양병을 조기에 진단 가능케 함으로써 효과적인 참다래 궤양병의 방제 전략을 수립하는 데 기여할 것으로 전망된다. 그러나, Biolog를 이용한 참다래 궤양병균 동정과 RAPD 및 RFLP marker를 이용한 참다래 궤양병균 검출을 통한 참다래 궤양병 조기진단 시스템은 고가의 실험 기기 및 고도의 숙련된 실험 방법을 요구하므로 농가에서 직접 이용할 수는 없다. 따라서, 농촌진흥원, 지역 특화 시험장 또는 시군 농촌지도소에 기술을 이전하거나, 참다래 재배 농가의 진단의뢰에 대해 전산망을 통해 신속하게 진단 회신할 수 있도록 진단 전산망을 구축함으로써 참다래 궤양병의 조기 방제 체계를 확립시키는 데 활용할 수 있을 것이다. 그러나, 궤양병의 진단에는 적지 않은 재료비와 인건비가 소요되기 때문에 수익자 부담에 의한 진단이 이루어져야 할 것이다.

참다래 궤양병은 세균병이기 때문에 약제에 의한 방제가 쉽지 않으며 더구나 방제약제가 항생제와 동제로 한정되어 있다. 특히, 우리 나라에서는 참다래 궤양병 약제로 현재 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린(아그리마이신) 수화제 한 가지만이 고시되어 있으며 최근 문제가 되고 있는 궤양병의 방제를 위하여 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제를 집중적으로

살포하고 있어 약제저항성균 발생이 우려되고 있는데(고, 1995; 고 등, 1996), 조사 결과 우리 나라에서 이미 상당한 수준으로 streptomycin, oxytetracycline 및 copper sulfate에 대한 약제 저항성균의 발생하고 있는 것으로 확인되었다.

우리 나라에 분포하고 있는 궤양병균 균주들 중에서 streptomycin과 oxytetracycline에 대하여 동시에 중복 약제저항성을 나타내는 균주가 가장 높게 검출된 것은 우리 나라에서는 주로 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제가 주로 사용되고 있기 때문으로 해석된다. 따라서, 이러한 약제저항성균의 발생을 제어하는 것이 시급한 실정인데, 우리 나라에서 단일 약제로 고시되어 있는 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제의 연용을 막기 위하여 참다래 궤양병 약제를 다원화할 수 있도록 새로운 약제의 개발이 절실하게 요구된다. 또한 적정 약제 살포 시기 및 살포 횟수 등을 고려하여 약제 사용을 최소화할 수 있는 화학적 방제 체계가 확립되어야 할 것이다.

참다래 궤양병에 대한 방제효과를 검정한 결과 가스신 액제, 농용신 수화제 및 농용신·쿠퍼 수화제는 참다래 궤양병 방제 효과가 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제와 비등하거나 우수한 것으로 확인되어 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제를 대체할 수 있는 후보약제로 개발할 수 있을 것으로 전망된다.

한편, 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제를 비롯하여 참다래 궤양병 후보 약제로 선발된 약제들의 방제 적기 시험을 수행한 결과 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제와 농용신 수화제의 방제적기는 전엽기인 4월 중순부터 5월 초순, 가스신 액제의 방제적기는 신초 소생기인 3월 하순부터 4월 초순, 농용신·쿠퍼 수화제의 방제적기는 전정 직후인 1월 중순부터 2월 초순으로 각각 확인되었다. 또한, 참다래 궤양병 품목 고

시 약제인 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제의 적정 약제 약제살포 간격 및 횟수를 조사한 검토한 결과 가장 높은 방제효과를 나타낼 수 있는 적정 약제 약제살포 간격 및 횟수는 15일 간격 3회 및 10일간격 4회로 확인되었다.

따라서, 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제의 경우 가장 높은 방제효과를 나타낼 수 있는 적정 약제 약제살포 간격 및 횟수가 다른 것으로 확인되었고, 농용신 수화제, 가스신 액제, 농용신·쿠퍼 수화제 등 참다래 궤양병 후보약제들의 방제적기는 약제에 따라 다르게 조사되었으므로 참다래 궤양병 방제용 약제의 살포 적기 및 약제 살포 간격 및 횟수를 약종에 따라 다르게 고시해야 할 것이다. 특히, 우리나라에서 streptomycin, oxytetracycline 및 copper sulfate에 대한 약제 저항성균이 이미 상당한 수준으로 발생하고 있는 것을 감안하면 아직 사용되고 있지 않은 가스신 액제 등을 궤양병 약제 약제로 고시하여 다른 약제와 교호적으로 사용함으로써 궤양병 방제 효과를 극대화시킬 수 있을 것이다.

한편, 참다래에서 궤양병균은 도관 부위 깊숙히 존재하기 때문에 보다 효과적인 약제 방제법은 참다래 나무의 도관부위로 약제를 주입시켜 병원세균을 죽이는 방법일 것이다. 참다래는 수액의 이동이 왕성하기 때문에 수간주입에 의한 치료방법을 사용하기가 용이하다. 일본에서는 참다래 궤양병 치료를 위한 수간주입 전용 약제인 아그렙토 액제가 개발되어 시판되고 있으나, 우리나라에서는 수간주입용 약제가 개발되어 있지 않기 때문에 우리나라에서도 수간주입 약제의 개발이 시급한 실정이다.

더불어 재배적 방법을 적극적으로 활용할 때 궤양병의 예방효과를 증대시켜 줄 것으로 기대된다. 특히 겨울철 찬 바람을 막아주고 비바람에 의한 궤양병균의 전반을 막아줄 수 있는 비가림 시설 또는 비닐 하우스와 방풍림의 조성 등 재배시설에 대한 보완이 시급하다. 또한 나무가 건강하게 크도록 재배관리를 충

실히 하여 나무의 저항성을 증진시키는 것이 바람직하다. 유기질 시비를 위주로 한 비배관리와 적정 전정관리를 통하여 건강하게 참다래를 재배하고 적정 수준의 착과만을 허용하여 수세를 건강하게 유지시키는 것이 궤양병 예방의 지름길이다.

따라서, 재배적 방법에 의해 궤양병의 발생을 사전에 차단하고, 궤양병의 발생이 우려되는 경우에도 본 연구에서 개발된 조기진단 시스템에 의해 잠복 감염 중인 궤양병균을 검출함으로써 감염초기에 참다래 궤양병을 진단하고, 약제저항성의 발생을 억제할 수 있도록 가스신 액제와 같은 새로운 궤양병 후보약제들을 참다래 궤양병 방제용으로 개발하고, 전정 직후부터 개화기 사이에 3~4개 약제를 각 약제의 살포 적기에 따라 살포하고, 수확후부터 낙엽 전에 수간주입을 병행할 경우 참다래 궤양병의 예방 및 치료효과를 극대화시킬 수 있는 이상적인 화학적 방제체계가 구축될 것이다.

본 연구 결과 얻어진 참다래 궤양병 조기진단 시스템과 참다래 궤양병 화학적 방제체계를 참다래 궤양병 방제를 체계화할 수 있는 지침으로 지도사업에 반영할 경우 현재 남해안 일원에 발생하고 있는 참다래 궤양병의 확산과 피해를 차단시키는 데 기여할 것으로 전망된다.



# 여 백

## 제 6 장 결 론

우리 나라 참다래 재배지에서 최근에 급속하게 확산되고 있는 궤양병은 일부 과수원을 폐원시킬 만큼 참다래 재배의 가장 큰 제한 요인으로 대두되고 있어서 남해안 지역 특화 고소득 작목인 참다래의 안정적인 생산기반을 조성할 수 있도록 참다래 궤양병에 대한 종합적 관리 체계의 확립이 시급히 요구되고 있다.

따라서, 본 연구는 참다래 궤양병에 대한 종합적 관리 체계를 확립하기 위하여 조기진단 시스템을 개발하고, 약제저항성균의 발생 실태를 조사하며, 화학적 방제 체계를 확립함으로써 참다래 궤양병에 대한 효율적인 방제 전략을 수립하기 위하여 수행되었으며, 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 참다래 궤양병균의 95개 탄소원 이용 성질 data base를 Biolog 시스템에 입력하여 "User data base"를 제작하여 Biolog를 이용한 참다래 궤양병균 동정체계를 완성하였다.

2. Primer C24(5'-CTT-TGG-CAT-CGG-3')에 의해 유사세균에서는 볼 수 없고 참다래 궤양병균에서 공통적으로 생성되는 668 bp 크기의 특이적인 RAPD 단편을 marker로 선발하였으며, 이 RAPD 단편을 cloning하여 참다래 궤양병균 특이적 probe로 개발하였다.

3. 참다래 궤양병 조기진단 시스템은 참다래 재배 농가의 진단의뢰에 대해 전산망을 통해 신속하게 진단 회신할 수 있도록 진단 전산망을 구축함으로써

참다래 궤양병의 조기 방제 체계를 확립시키는 데 활용할 수 있을 것이다.

4. 참다래 궤양병에 대한 약제 저항성균의 발생 실태가 우리 나라에서 처음 조사되었으며, 조사결과 항생제인 streptomycin과 oxytetracycline 및 동제인 copper sulfate에 대한 높은 수준의 약제 저항성균의 출현이 확인되었다.

5. 참다래 궤양병에 대하여 가스신 액제, 농용신 수화제, 농용신·쿠퍼 수화제는 참다래 궤양병 방제 효과가 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제(아그리마이신)와 비등하거나 우수한 것으로 확인되어 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제를 대체할 수 있는 후보약제로 선발되었다.

6. 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제(아그리마이신)와 농용신 수화제의 방제적기는 4월 중순부터 5월 초순, 가스신 액제의 방제적기는 3월 하순부터 4월 초순, 농용신·쿠퍼 수화제의 방제적기는 1월 중순부터 2월 초순으로 확인되었고, 스트렙토마이신황산염·옥시테트라사이클린 수화제의 경우 가장 높은 방제효과를 나타낼 수 있는 적정 약제 약제살포 간격 및 횟수는 15일 간격 3회 및 10일간격 4회로 확인되었다.

7. 본 연구개발 결과 얻어진 참다래 궤양병 화학적 방제체계는 참다래 재배자들이 재배 현장에서 겪고 있는 가장 큰 애로사항인 궤양병 방제를 체계화할 수 있는 지침으로 지도사업에 반영하여 현재 남해안 일원에 발생하고 있는 참다래 궤양병의 확산과 피해를 차단시키는 데 기여할 수 있을 것이다.

## 참고문헌

1. Goto, M., Hikota, T., Nakajima, M., Takikawa, Y. and Tsuyumu, S. 1994. Occurrence and properties of copper-resistance in plant pathogenic bacteria. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 60:147-153.
2. Hartung, J. S., Daniel, J. F., and Pruvost, O. P. 1993. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* by the Polymerase Chain Reaction Method. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1143-1148.
3. Hildebrand, D. C., Schroth, M. N., and Sands, D. C. 1988. *Pseudomonas*. In: *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*, 2nd ed, ed. by N. W. Schaad, pp.60-80. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA. 164pp.
4. 고영진. 1995. 참다래 주요 병. *식물병과 농업* 1(1): 3-13.
5. 고영진, 이동현. 1992. *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*에 의한 키위 궤양병. *한국식물병리학회지* 8(2):119-122.
6. 고영진, 차병진, 정희정, 이동현. 1994a. 참다래 궤양병의 격발 및 확산. *한식병지* 10(1):68-72.
7. 고영진, 오상준, 정희정. 1994b. 전남지역 참다래 재배현황 및 문제점에 관한 조사연구. *순천대학교 논문집* 13:93-106.
8. 고영진, 박숙영, 이동현. 1996. 우리 나라 참다래 궤양병 발생 특성 및 수간 주입에 의한 방제. *한식병지* 12(3):324-330.
9. Lazo, G. R., Roffey, R., and Gabriel, D. W. 1987. Pathovars of *Xanthomonas campestris* are distinguishable by restriction fragment

- length polymorphisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37:214-221.
10. Leach, J. E., White, F. F., Rhoads, M. L., and Leung, H. 1990. A repetitive DNA sequence differentiates *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* from other pathovars of *X. campestris*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 3:238-246.
11. Leite, R. P. JR., Jones, J. B., Somodi, G. C., Minsavage, G. V., and Stall, R. E. 1995. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* associated with pepper and tomato seed by DNA amplification. *Plant Dis.* 79:917-922.
12. Loper, J. E., Henkels, M. D., Roberts, R. G., Grove, G. G., Willett, M. J., and Smith, T. K. 1991. Evaluation of streptomycin, oxytetracycline, and copper resistance of *Erwinia amylovora* isolated from pear orchards in Washington State. *Plant Disease* 75:287-290.
13. Manulis, S., Valinsky, L., Lichter, A., and Gabriel, D. W. 1994. Sensitive and specific detection of *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* with DNA primers and probes identified by random amplified polymorphic DNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(11):4094-4099.
14. Nakajima, M., Yamashita, S., Takikawa, Y., Tsuyumu, S., Hibi, T. and Goto, M. 1995. Similarity of streptomycin resistance gene(s) in *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* with *strA* and *strB* of plasmid RSF1010. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 61:489-492.
15. 백종철, 차병진, 고영진. 1993. 참다래 주요 병해충 발생 생태 조사. I. 참다래 재배 및 병해충 발생 현황. 순천대학교 논문집 12:75-82.
16. Pruvost, O., Hartung, J. S., Civerolo, E. L., Dubois, C., and Perrier, X. 1992. Plasmid DNA fingerprints distinguish pathotypes of

- Xanthomonas campestris* pv. *citri*, the causal agent of citrus bacterial canker disease. *Phytopathology* 82:485-490.
17. 芹澤拙夫, 市川健. 1993a. キウイフル-ツかいよう病の發生生態. 1. 新梢への感染方法および病原細菌の組織内移行. 日植病報 59:452-459.
  18. 芹澤拙夫, 市川健. 1993b. キウイフル-ツかいよう病の發生生態. 2. 新梢における主要感染時期と發病環境. 日植病報 59:460-468.
  19. 芹澤拙夫, 市川健. 1993c. キウイフル-ツかいよう病の發生生態. 3. 新梢の病斑における細菌密度および飛散の時期的變化. 日植病報 59:469-476.
  20. 芹澤拙夫, 市川健. 1993d. キウイフル-ツかいよう病の發生生態. 4. 新梢における發病適温. 日植病報 59:694-701.
  21. Serizawa, S., Ichikawa, T., Takikawa, Y., Tsuyumu, S., 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.
  22. Spotts, R. A. and Cervantes, L. A. 1995. Copper, oxytetracycline, and streptomycin resistance of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains from pear orchards in Oregon and Washington. *Plant Disease* 79:1132-1135.
  23. Sundin, G. W. and Bender, C. L. 1993. Ecological and genetic analysis of copper and streptomycin resistance in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1018-1024.
  24. Takikawa, Y., Serizawa, S., Ichikawa, T., Tsuyumu, S., and Goto, M. 1989. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* pv. nov.: The causal bacterium of canker of kiwifruit in Japan. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 55:437-444.

25. Ushiyama, K. 1993. Studies on the epidemics and control of bacterial canker of kiwifruit caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Bulletin of the Kanagawa Horticultural Experiment Station* 43:1-76.
26. Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., and Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531-6535.

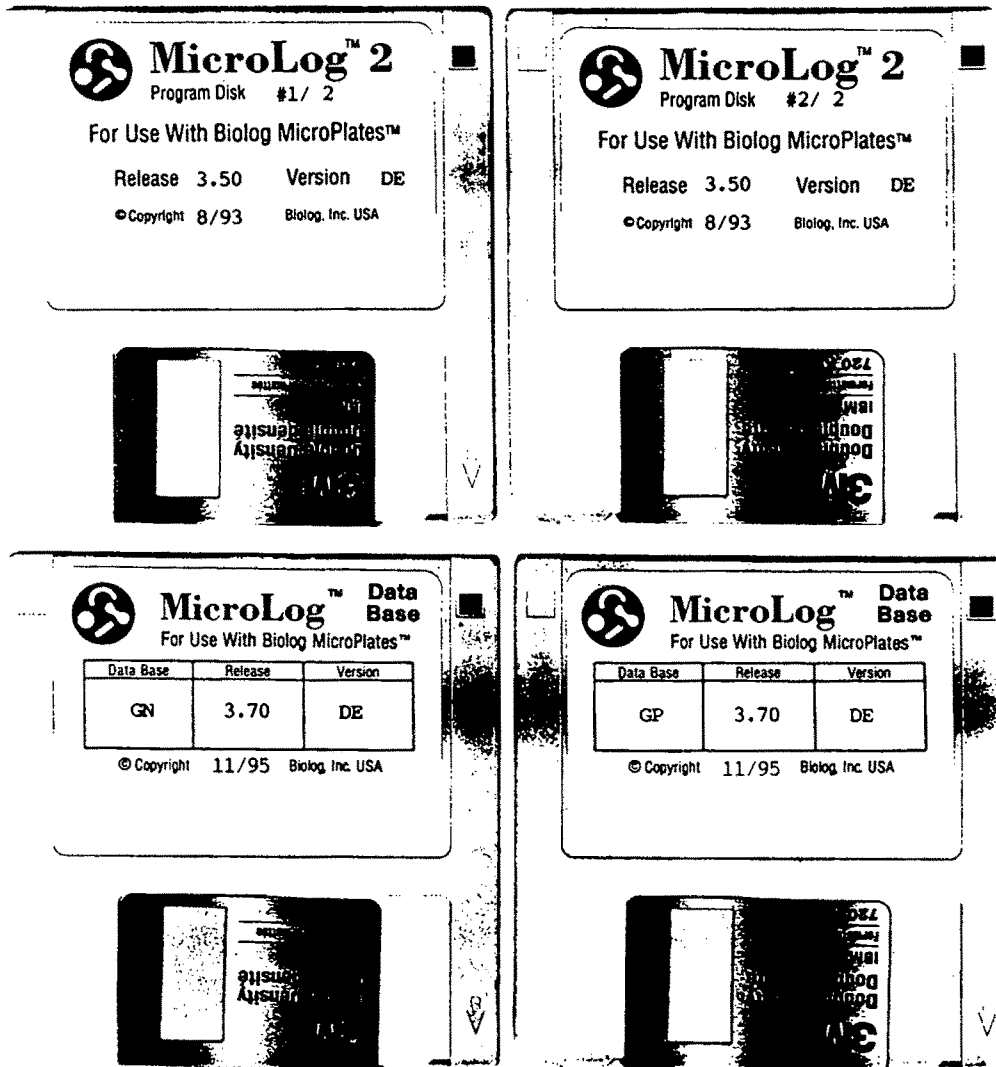
## 부 록

- A. Biolog MicroLog™ 2(Biolog Inc., Hayward, CA, USA)의 Program과 Data Base Disk
- B. MicroLog™ 2의 사용법
- C. 우리나라 참다래 궤양병 발생 특성 및 수간주입에 의한 방제  
(한국식물병리학회지 12(3) : 324~330, 1996. 9)
- D. Biolog Program을 이용한 참다래 궤양병균 동정용 Data Base  
(한국식물병리학회지 13(2) : 125~128, 1997. 4)
- E. 참다래 궤양병 격발 원인 분석 및 대책을 위한 제언  
(한국참다래 동호회지 제4호, 1997. 12)



# 여 백

부록 A. BiOLOG MicroLog™ 2(Biolog Inc., Hayward, CA, USA)의  
Program과 Data Base Disk



# 여 백

B. MicroLog™ 2의 사용법

Figure 1

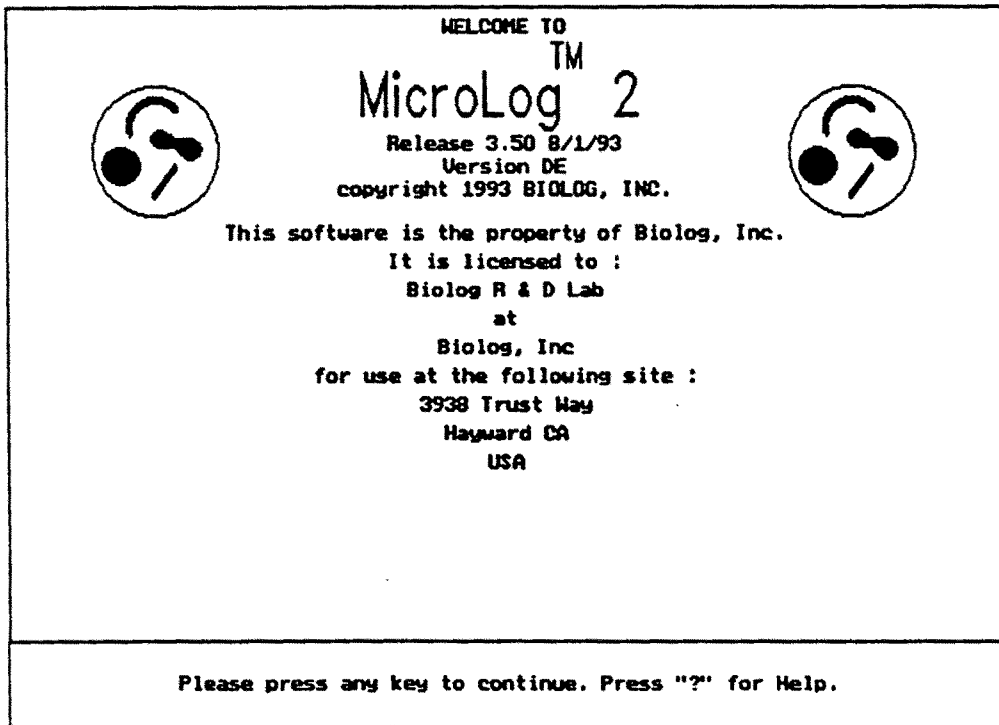




Figure 2



**MicroLog<sup>TM</sup> 2**

Release 3.50 8/1/93  
Version DE  
copyright 1993 BIOLOG, INC.



**SOFTWARE SUPPORT**

- BIOLOG will notify authorized licensees of this software of upgrades and additions to the data base as they occur.
- Please **BE SURE** to fill out and return the registration form, so we can contact you at your laboratory regarding updates.

**LIMITATIONS ON USE**

- This software is licensed to you for use in a **SINGLE** microbiology laboratory at **ONE** physical location.
- You may make copies as outlined in the license agreement only for use within that laboratory.

**OWNERSHIP OF SOFTWARE**

- BIOLOG retains ownership of this copy of software.
- Use, duplication, or sale of this product, except as described in the BIOLOG license agreement, is strictly prohibited.
- This licence and the right to use the software automatically terminates if you fail to comply with any provision of the license agreement.
- Violators may be prosecuted.

Please press any key to continue. Press "?" for Help.

Figure 3

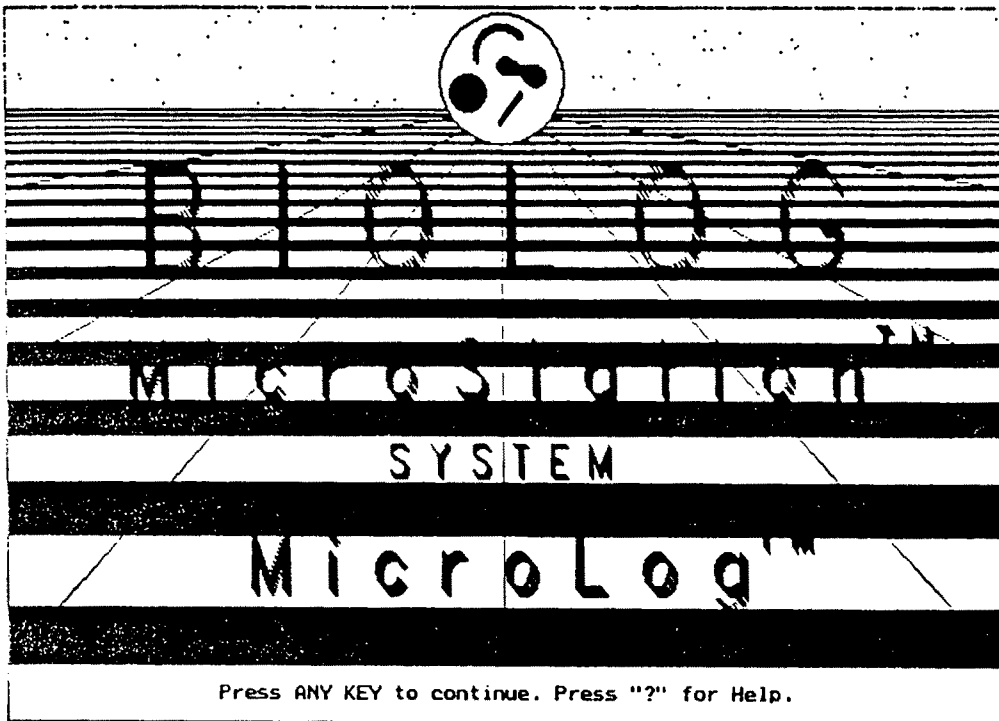


Figure 4


<h1>INPUT MENU</h1>		
TYPE 1...6 TO SELECT OR CHANGE OPTIONS BELOW :		
DATA SET-UP INFORMATION		
1	:	CLINICAL/VETERINARY LABORATORY
2	:	NON-CLINICAL LABORATORY
3	:	Date of Data : 07/31/93
---> PRESS "1" OR "2" TO INDICATE TYPE OF LAB		
METHOD OF DATA INPUT		
4	:	Enter Data Well-by-Well
5	:	Enter Data by Bio-Number
6	:	Enter Data from ASCII File
YOUR SELECTION :        ( PRESS "ENTER" TO CONTINUE, "?" FOR HELP )		
F1 INPUT	F2 OUTPUT	F3 DATA BASE
ESC PREVIOUS MENU	ENTER NEXT MENU	? HELP
F4 DATA	F5 CLUSTER	F6 QUIT
		ML2 release 3.50

Figure 5


<h1>INPUT MENU</h1>		
TYPE 1...6 TO SELECT OR CHANGE OPTIONS BELOW :		
DATA SET-UP INFORMATION		
1 :	CLINICAL/VETERINARY LABORATORY	
2 :	NON-CLINICAL LABORATORY	
3 :	Date of Data : 07/31/93	
METHOD OF DATA INPUT		
4 :	Enter Data Well-by-Well	
5 :	Enter Data by Bio-Number	
6 :	Enter Data from ASCII File	
YOUR SELECTION :      ( PRESS "ENTER" TO CONTINUE, "?" FOR HELP )		
F1 INPUT	F2 OUTPUT	F3 DATA BASE
ESC PREVIOUS MENU	ENTER NEXT MENU	? HELP
F4 DATA	F5 CLUSTER	F6 QUIT
ML2 release 3.50		



Figure 6


<h1>INPUT MENU</h1> <p>TYPE 1...8 TO SELECT OR CHANGE OPTIONS BELOW :</p> <p>DATA SET-UP INFORMATION</p> <p>1 : CLINICAL/VETERINARY LABORATORY</p> <p><u>2 : NON-CLINICAL LABORATORY</u></p> <p>3 : Date of Data : 07/31/93</p> <p>METHOD OF DATA INPUT</p> <p>4 : Enter Data Well-by-Well</p> <p>5 : Enter Data by Bio-Number</p> <p><u>6 : Enter Data from ASCII File</u></p> <p>ASCII FILE SET UP OPTIONS</p> <p>7 : ASCII File Format Menu</p> <p>8 : ASCII File Set-up Menu</p> <p>YOUR SELECTION : ( PRESS "ENTER" TO CONTINUE, "?" FOR HELP )</p> <p>F1 INPUT F2 OUTPUT F3 DATA BASE F4 DATA F5 CLUSTER F6 QUIT ESC PREVIOUS MENU ENTER NEXT MENU ? HELP ML2 release 3.50</p>	
--	---

Figure 7


<h1>OUTPUT MENU</h1>					
TYPE 1...5 TO SELECT OR CHANGE OPTIONS BELOW :					
PRINT REACTION DATA					
<input type="checkbox"/>	1 : Only on Request				
<input type="checkbox"/>	2 : Automatically After Entry				
WRITE ASCII DATA FILE					
<input type="checkbox"/>	3 : Do Not Write				
<input type="checkbox"/>	4 : Write Only on Request				
<input type="checkbox"/>	5 : Write Automatically After Entry				
YOUR SELECTION :      ( PRESS "ENTER" TO CONTINUE, "?" FOR HELP )					
F1 INPUT	F2 OUTPUT	F3 DATA BASE	F4 DATA	F5 CLUSTER	F6 QUIT
ESC PREVIOUS MENU	ENTER NEXT MENU	? HELP	ML2 release 3.50		

Figure 8


<h1>OUTPUT MENU</h1>	
TYPE 1...7 TO SELECT OR CHANGE OPTIONS BELOW :	
PRINT REACTION DATA	
<input type="text" value="1 : Only on Request"/>	
2 : Automatically After Entry	
WRITE ASCII DATA FILE	
3 : Do Not Write	
<input type="text" value="4 : Write Only on Request"/>	
5 : Write Automatically After Entry	
DEFINE ASCII DATA FILE FOR OUTPUT	
6 : ASCII Data File Output Format	
7 : Name of ASCII File : DEMO1.PRN	
YOUR SELECTION :      < PRESS "ENTER" TO CONTINUE, "?" FOR HELP >	
F1 INPUT    F2 OUTPUT    F3 DATA BASE    F4 DATA    F5 CLUSTER    F6 QUIT	
ESC PREVIOUS MENU    ENTER NEXT MENU    ? HELP	ML2 release 3.50

Figure 9



<h1>DATA BASE MENU</h1>		
TYPE 1...9 TO SELECT OR CHANGE OPTIONS BELOW :		
<b>BUILD USER DATA BASE</b>		
1 : Add Data Directly (Not Editable)		
2 : Compile ASCII Data File	<input type="text"/>	
3 : Data Base Compilation Menu		
<b>IDENTIFICATION DATA BASE(S) TO SEARCH</b>		
4 : MicroLog Data Base	<input type="text"/>	
5 : User Data Base		
6 : MicroLog and User Data Base		
<b>SEARCH IDENTIFICATION DATA BASE</b>		
8 : Only on Request		
9 : Automatically After Data Entry	<input type="text"/>	
YOUR SELECTION : ( PRESS "ENTER" TO CONTINUE, "?" FOR HELP )		
F1 INPUT	F2 OUTPUT	F3 DATA BASE
ESC PREVIOUS MENU	ENTER NEXT MENU	? HELP
F4 DATA	F5 CLUSTER	F6 QUIT
		ML2 release 3.50

Figure 10

**DATA BASE MENU** 

TYPE 1...9 TO SELECT OR CHANGE OPTIONS BELOW :

**BUILD USER DATA BASE**

- 1 : Add Data Directly (Not Editable)
- 2 : Compile ASCII Data File
- 3 : Name of File to Use : DEMO1.ID

**IDENTIFICATION DATA BASE(S) TO SEARCH**

- 4 : MicroLog Data Base
- 5 : User Data Base
- 6 : MicroLog and User Data Base

**SEARCH IDENTIFICATION DATA BASE**

- 8 : Only on Request
- 9 : Automatically After Data Entry

YOUR SELECTION : ( PRESS "ENTER" TO CONTINUE, "?" FOR HELP )

F1 INPUT   F2 OUTPUT   F3 DATA BASE   F4 DATA   F5 CLUSTER   F6 QUIT  
ESC PREVIOUS MENU   ENTER NEXT MENU   ? HELP   ML2 release 3.50

Figure 11


<h2 style="text-align: center; margin: 0;">DATA MENU</h2> <p>1 : Change Hour                  2 : Read Next Plate                  Plate Type :                  Media Type :                  Plate Number : 0                  Strain Name : ?                  Strain Number : ?                  Other Info : ?                  Enter Well Reactions (Y/N)</p> <p>3 : Search MicroLog Data Base    AUTO                  4 : Compare to Other Species                  5 : Display Species Information                  6 : Write to ASCII Data File    OFF                  7 : Write to Data Base File    OFF                  8 : Write to Printer</p>	<div style="text-align: right;"> <h2 style="margin: 0;">MicroLog™ 2</h2> <p style="margin: 0;">Date : 07/31/93 Hour : 24</p>  </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 10px 0;"> <table style="width: 100%; text-align: center; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 20px;"></td> <td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>6</td><td>7</td><td>8</td><td>9</td><td>10</td><td>11</td><td>12</td> </tr> <tr> <td>A</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td> </tr> <tr> <td>B</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td> </tr> <tr> <td>C</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td> </tr> <tr> <td>D</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td> </tr> <tr> <td>E</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td> </tr> <tr> <td>F</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td> </tr> <tr> <td>G</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td> </tr> <tr> <td>H</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td> </tr> </table> </div> <p style="text-align: right; font-size: small;">BIOLOG</p>		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12																																																																																																										
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○																																																																																																										
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○																																																																																																										
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○																																																																																																										
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○																																																																																																										
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○																																																																																																										
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○																																																																																																										
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○																																																																																																										
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○																																																																																																										
<p>YOUR SELECTION :                      Bio-Number : 0000-0000-0000-0000-0000-0000-0000-0000</p>																																																																																																																						
<p>PLEASE INDICATE PLATE TYPE :</p> <table style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr><td>1 = GN</td><td></td></tr> <tr><td>2 = GP</td><td></td></tr> <tr><td>3 = YT</td><td>?</td></tr> <tr><td>4 = ES</td><td></td></tr> <tr><td>5 = MT</td><td></td></tr> </table>		1 = GN		2 = GP		3 = YT	?	4 = ES		5 = MT																																																																																																												
1 = GN																																																																																																																						
2 = GP																																																																																																																						
3 = YT	?																																																																																																																					
4 = ES																																																																																																																						
5 = MT																																																																																																																						
<p>F1 INPUT    F2 OUTPUT    F3 DATA BASE    F4 DATA    F5 CLUSTER    F6 QUIT                  ESC PREVIOUS MENU    ? HELP</p>																																																																																																																						
<p>ML2 release 3.50</p>																																																																																																																						

Figure 12


<h2 style="text-align: center;">DATA MENU</h2> <p>1 : Change Hour                  2 : Read Next Plate                  Plate Type : <input type="checkbox"/>GN <input type="checkbox"/>GP <input type="checkbox"/>VT <input type="checkbox"/>ES <input type="checkbox"/>NT                  Media Type : <input type="checkbox"/>TSA/BUGH <input type="checkbox"/>CHOC <input type="checkbox"/>R2A                  Plate Number : 0                  Strain Name : ?                  Strain Number : ?                  Other Info : ?                  Enter Well Reactions (Y/N)</p> <p>3 : Search MicroLog Data Base      AUTO                  4 : Compare to Other Species                  5 : Display Species Information                  6 : Write to ASCII Data File      OFF                  7 : Write to Data Base File      OFF                  8 : Write to Printer</p>	<h2 style="text-align: center;">MicroLog™ 2</h2> <p style="text-align: center;">Date : 07/31/93                  Hour : 24</p> <div style="text-align: right;">  </div> <div style="text-align: center; margin-top: 10px;"> <table border="1" style="border-collapse: collapse; width: 100%;"> <tr> <td></td> <td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>6</td><td>7</td><td>8</td><td>9</td><td>10</td><td>11</td><td>12</td> </tr> <tr> <td>A</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td> </tr> <tr> <td>B</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td> </tr> <tr> <td>C</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td> </tr> <tr> <td>D</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td> </tr> <tr> <td>E</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td> </tr> <tr> <td>F</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td> </tr> <tr> <td>G</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td> </tr> <tr> <td>H</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td> </tr> </table> </div>		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12																																																																																																										
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○																																																																																																										
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○																																																																																																										
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○																																																																																																										
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○																																																																																																										
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○																																																																																																										
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○																																																																																																										
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○																																																																																																										
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○																																																																																																										
<p>YOUR SELECTION :                      Bio-Number : 0000-0000-0000-0000-0000-0000-0000-0000</p>																																																																																																																						
<p>PLEASE INDICATE 04, 24 INCUBATION :    1 = 04 HR                                      ?                  2 = 24 HR                  3 = OTHER</p>																																																																																																																						
<p>F1 INPUT    F2 OUTPUT    F3 DATA BASE    F4 DATA    F5 CLUSTER    F6 QUIT                  ESC PREVIOUS MENU ? HELP                                      ML2 release 3.50</p>																																																																																																																						

Figure 13


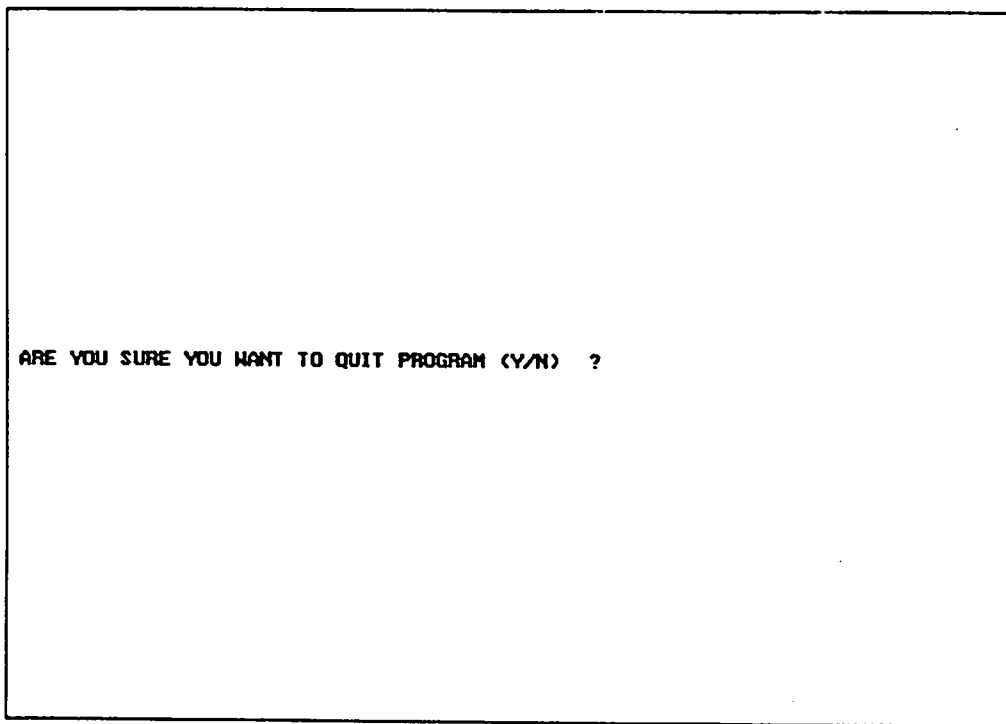
DATA MENU		MicroLog™ 2																																																																																																																						
1 : Change Hour		Date : 07/31/93																																																																																																																						
2 : Read Next Plate		Hour : 24																																																																																																																						
Plate Type : <input type="text" value="GN"/> GP YT ES MT																																																																																																																								
Media Type : <input type="text" value="TSA/BUGH"/> CHOC R2A																																																																																																																								
Plate Number : 0																																																																																																																								
Strain Name : ?																																																																																																																								
Strain Number : ?																																																																																																																								
Other Info : ?																																																																																																																								
Enter Well Reactions (Y/N)																																																																																																																								
3 : Search MicroLog Data Base	AUTO																																																																																																																							
4 : Compare to Other Species																																																																																																																								
5 : Display Species Information																																																																																																																								
6 : Write to ASCII Data File	OFF																																																																																																																							
7 : Write to Data Base File	OFF																																																																																																																							
8 : Write to Printer																																																																																																																								
YOUR SELECTION : ?		Bio-Number : 0000-0000-0000-0000-0000-0000-0000-0000																																																																																																																						
<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> <th>4</th> <th>5</th> <th>6</th> <th>7</th> <th>8</th> <th>9</th> <th>10</th> <th>11</th> <th>12</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <th>A</th> <td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> <tr> <th>B</th> <td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> <tr> <th>C</th> <td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> <tr> <th>D</th> <td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> <tr> <th>E</th> <td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> <tr> <th>F</th> <td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> <tr> <th>G</th> <td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> <tr> <th>H</th> <td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> </tbody> </table>					1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	A													B													C													D													E													F													G													H												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12																																																																																																												
A																																																																																																																								
B																																																																																																																								
C																																																																																																																								
D																																																																																																																								
E																																																																																																																								
F																																																																																																																								
G																																																																																																																								
H																																																																																																																								
F1 INPUT   F2 OUTPUT   F3 DATA BASE   F4 DATA   F5 CLUSTER   F6 QUIT ESC PREVIOUS MENU ? HELP <span style="float: right;">ML2 release 3.50</span>																																																																																																																								



Figure 14



부록 C.

**우리나라 참다래 궤양병 발생 특성 및  
수간주입에 의한 방제**

고영진\* · 박숙영 · 이동현<sup>1</sup>  
순천대학교 농과대학 농생물학과  
<sup>1</sup>순천대학교 농업과학연구소

**Characteristics of Bacterial Canker of Kiwifruit Occurring in  
Korea and Its Control by Trunk Injection**

Young Jin Koh\*, Suk Young Park and Dong Hyun Lee<sup>1</sup>  
*Department of Agricultural Biology, Suncheon National University, Sunchon 540-742, Korea*  
*Research Institute of Agricultural Science, Suncheon National University, Sunchon 540-742, Korea*

한국식물병리학회지  
제 12권 제 3호 별책

Reprinted from the Korean Journal of Plant Pathology  
Volume 12, Number 3, September 1996

## 우리나라 참다래 궤양병 발생 특성 및 수간주입에 의한 방제

고영진\* · 박숙영 · 이동현<sup>1</sup>  
순천대학교 농과대학 농생물학과  
<sup>1</sup>순천대학교 농업과학연구소

### Characteristics of Bacterial Canker of Kiwifruit Occurring in Korea and Its Control by Trunk Injection

Young Jin Koh\*, Suk Young Park and Dong Hyun Lee<sup>1</sup>

Department of Agricultural Biology, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

<sup>1</sup>Research Institute of Agricultural Science, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

**ABSTRACT :** Disease severities of the bacterial canker of kiwifruit and populations of the causal agent, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, in the infected leaves were investigated to compare the differences of occurrence of bacterial canker between two representative kiwifruit cultivars Hayward and Matua in Korea. Disease severity of Hayward was 18.0%, but that of Matua was 2.4%. Bacterial populations in diseased leaf tissues of Hayward and Matua were  $1.8 \times 10^7$  and  $2.1 \times 10^6$ , respectively. More bacterial populations were detected in lower leaves than upper leaves on the same cane. Curative effect of bacterial canker was 50.7~53.7% by injection of streptomycin into the trunk of diseased kiwifruit. Curative effect of streptomycin increased with amounts of injection into the diseased tree.

**Key words :** kiwifruit, bacterial canker, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*.

1980년대 초부터 우리나라에서 재배되기 시작한 참다래(키위, 양다래, kiwifruit, Chinese gooseberry, *Actinidia chinensis* Planch)는 대중화된 과일로서 정착함에 따라 1984년 183 ha에 불과했던 참다래 재배면적이 1994년에는 1,400여 ha로 증가하였고 생산량도 8,700 M/T에 이르렀다. WTO 체제의 출범으로 농산물의 수입 개방에도 불구하고 참다래는 국제 경쟁력을 갖추고 있는 고소득 작목으로 평가됨에 따라 앞으로 참다래 재배면적과 재배농가는 계속 증가할 전망이다(1). 그러나 급속한 소비의 증가에 따른 생산량 부족으로 3,200 M/T을 수입하고 있는 실정이다.

아열대 과수인 참다래의 재배적지는 연평균 기온이 15°C 이상 되는 곳으로 동해 및 상해에 의한 피해 우려가 적은 곳이어야 한다(1, 7, 10). 우리나라의 참다래 재배지는 월동이 가능한 제주도를 비롯하여 전라남도 및 경상남도의 남해안 지역에 주로 분포하고 있는데,

암수딴그루인 참다래는 결실수(암나무)로 Hayward 품종과 수분수(수나무)로 Matua 품종이 거의 전 재배지에서 재배되고 있고 참다래의 덩굴들이 덕 위에서 서로 엉켜 자라는 참다래 재배방법의 특수성 때문에 일단 병이 발생하면 대규모로 급속하게 확산될 가능성이 매우 높다. 또한 참다래는 우리나라에 보급 초기부터 병방제가 필요하지 않은 무병 과수로 농가에 인식되어 재배가들이 병관리를 소홀히 해 왔었다. 그러나 참다래 영농현장에서는 태풍에 의한 피해와 동해, 상해 등 자연적인 재해뿐만 아니라 여러 가지 병해가 발생하는 것으로 보고되었다(1, 5, 8). 특히 제주도와 전라남도 일부 재배지역에서 발생하기 시작하여 급속하게 확산되고 있는 궤양병은 일부 과수원을 폐원시킬 만큼 참다래 재배의 가장 큰 제한 요인으로 대두되고 있어 궤양병에 대한 방제대책이 시급한 실정이다(1~3).

본 연구에서는 참다래 결실수인 Hayward와 수분수인 Matua의 자연 감염에 의한 이병염율과 병원세균의

\*Corresponding author.

밀도 차이 및 자연 감염된 Hayward의 가지와 엽위별 병원세균의 밀도 차이 등을 조사함으로써 참다래 케양병의 발생 특성을 조사하였다. 또한 참다래 케양병에 대한 방제법을 구명하기 위하여 스트렙토마이신의 수간주입에 의한 치료효과를 조사하였다.

## 재료 및 방법

**참다래 품종별 케양병 병징 및 발병율 조사.** 전남 순천시 해룡면 구상리에 위치한 참다래 과수원에 식재되어 있는 10~15년생 참다래 결실수 Hayward 품종과 수분수 Matua 품종을 공시하였다. 1995년 1월부터 5월까지 나무의 가지, 주지, 주간 및 잎에 생기는 병징을 경시적으로 조사하였으며, 1995년 5월 25일 각 품종당 임의로 선발된 결실수 10주와 수분수 3주에서 부작위로 200개의 잎을 선발하여 자연감염에 의한 케양병의 발병율을 이병엽율로 조사하여 품종별 케양병 발생 차이를 비교하였다.

**참다래 품종별 케양병균 밀도 조사.** 공시한 참다래 결실수 Hayward와 수분수 Matua에서 케양병균의 밀도 차이를 조사하기 위하여 1995년 5월 19일 각 품종당 3주에서 건전엽과 이병엽 생체중 1g씩을 채집하여 마쇄한 후 peptone sucrose agar(PSA, peptone 20 g, sucrose 20 g, 한천 15 g, 중류수 1 L, pH 7.4)배지에 도말하여 25°C 항온기에서 배양하였다. 배양 2일 후 PSA 배지상에 특징적으로 나타나는 등글고 반짝이는 흰색 균총수를 조사하여 품종별 케양병균의 밀도를 비교하였다(15). 조사중 불명확한 균총에 대해서는 MicroLog™ 2 system(Release 3.50, Biolog Inc., USA)을 이용하여 케양병균 여부를 동정하여 확인하였다.

**참다래 가지 및 엽위별 케양병균 밀도 조사.** 공시한 참다래 결실수 Hayward의 가지 및 엽위별 병원세균의 밀도 차이를 조사하기 위하여 1995년 5월 23일 케양병에 감염된 5주에서 1년생 가지를 채집하여 가지와 분지 부위에서 가지의 끝 방향으로 하엽(3엽), 중엽(8엽) 및 상엽(11엽)의 생체중 1g씩을 채취하여 마쇄한 후 PSA배지에 도말하여 위에 기술한 방법으로 병원세균의 균총수를 조사하였다.

**스트렙토마이신 수간주입 효과.** 전남 순천시 해룡면 구상리 참다래 재배포장과 순천시 해룡면 해창리 참다래 재배포장에서 스트렙토마이신의 수간주입에 의한 케양병 치료 효과를 조사하였다. 구상리 참다래 재배포장에서는 케양병에 감염된 참다래 결실수 Hayward 85주(처리구 : 20주, 무처리구 : 65주)와 해창리 참다래 재배포장에서는 케양병에 감염된 Hayward

361주(처리구 : 209주, 무처리구 : 152주)를 공시하였다. 수간주입은 참다래의 지상 5cm의 주간 부위에 스트렙토마이신(의약품 황산스트렙토마이신, 종근당) 200 ppm씩 첨가시킨 수간주입액을 주당 3 L씩 중력식 수간주입 방식으로 주입하였다(4, 6). 구상리 참다래 재배포장에는 1994년 11월 26일, 해창리 참다래 재배포장에는 11월 30일~12월 1일에 수간주입하였으며, 스트렙토마이신의 수간주입 효과를 구상리 참다래 재배포장은 1995년 4월 8일, 해창리 참다래 재배포장은 4월 11일 케양병의 발병도를 조사하여 평가하였다. 참다래 케양병의 발병도는 주간에서 세균유출액이 관찰되면 A, 주지의 한 가지 이상에서 세균유출액이 관찰되면 B, 작은 가지들에서만 세균유출액이 관찰되면 C, 세균유출액을 식물체 상에서 관찰할 수 없으면 D로 케양병의 진전정도를 구분하고 Ushiyama(15)의 방법에 따라 다음과 같은 수식으로 발병도를 계산하였다:  $[(5nA + 3nB + nC) / 5(nA + nB + nC + nD)] \times 100$ . 이때 nA, nB, nC와 nD는 각 A, B, C와 D 병징을 나타내는 참다래의 조사 주수를 나타낸다.

또한 수간주입 약량의 증가에 따른 케양병 치료효과를 조사하기 위하여 해창리 참다래 재배포장에서 케양병에 감염된 Hayward 20주(처리구 : 15주, 무처리구 : 5주)를 공시하였다. 수간주입 처리구에는 처리구당 5주의 주간부위에 200 ppm씩 첨가시킨 스트렙토마이신 주사액을 주당 2 L에서 3 L와 4 L로 늘려 중력식 수간주입 방식으로 주입한 후 케양병의 발병도를 위에 기술한 방법으로 조사하여 케양병 치료효과를 비교하였다.

## 결 과

**참다래 케양병의 병징.** 케양병에 감염된 참다래 나무에서는 1월 하순~2월 중순부터 어린 가지(cane)의 전정부위, 상처부위 또는 분지부위에서 맑은 수액이 흘러 나오는 것을 관찰할 수 있었다. 3월경에는 우유 빛 수액이 주지(leader)에서도 흘러나오고 케양병에 심하게 감염된 나무에서는 3~4월 사이에 주지만만 아니라 주간(trunk)에서도 붉은 색소가 함유된 수액이 많이 흘러 나왔다. 이러한 수액은 세균유출액(bacterial ooze)으로 확인되었으며 기온이 상승함에 따라 피층부위의 색소가 많이 용해되어 검붉은 색으로 변하였다. 참다래 결실수(암나무)인 Hayward 품종에 비해 수분수(수나무)인 Matua 품종에서는 이러한 세균유출액을 관찰할 수 없거나 경미한 세균유출액만 어린 가지 부위에서 간혹 관찰되었다.

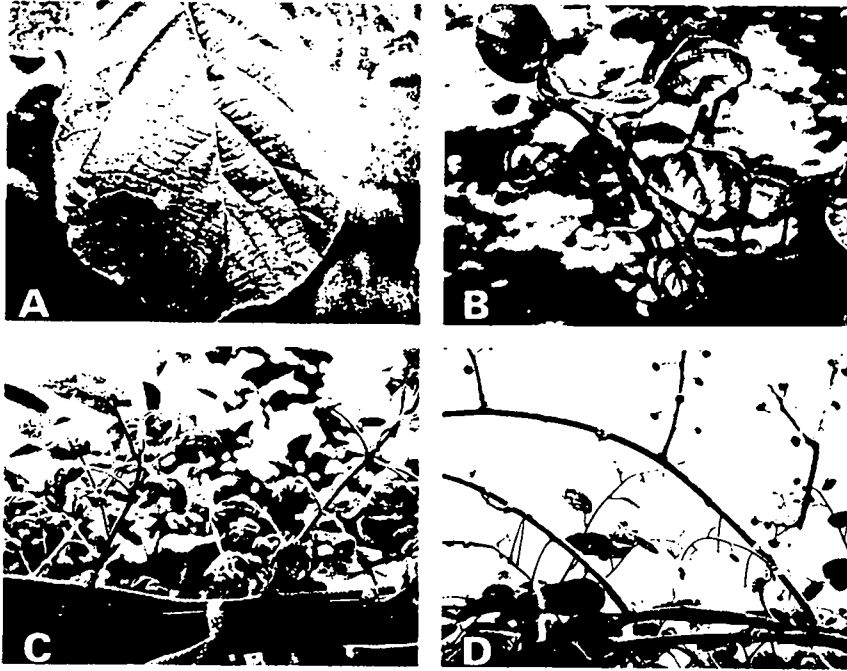


Fig. 1. Symptoms on leaves of kiwifruit. A: Typical leaf spots surrounded by small halos. B: Halo lesions developed mainly on the margins of cup-shaped leaves. C: Blighted leaves on severely infected canes. D: View of flower buds on defoliated cane by severe infection of bacterial canker.

Table 1. Disease severity of bacterial canker on the leaves of cultivars Matua and Hayward of kiwifruit

Cultivar	No. of trees investigated	Diseased leaves* (%)
Matua	3	2.4 A
Hayward	10	18.0 B

\* Two hundred leaves were investigated in each tree on May 25, 1995. Values followed by the same letter are not significantly different according to Duncan's multiple range test ( $p=0.05$ ).

4월 중순에 나오기 시작하는 새 잎에는 4월말~5월 초순부터 연두색 내지 노란색의 halo 증상이 나타나고 점차 병이 진전됨에 따라 halo의 중앙부위에 갈색의 부정형 병반이 나타나는데(Fig. 1A) 봄에 새순이 나올 때 새 순의 생육에는 부적합하고 궤양병균의 증식에 적합한 저온이 계속되면 잎 조직내부에서 궤양병균의 급격한 증식으로 잎의 가장자리에서부터 연두색의 halo 증상을 심하게 나타내기 시작하였다(Fig. 1B). 점

차 기온의 상승으로 잎의 생육이 촉진되게 되면 잎의 중앙부위의 생육은 활발하게 일어나는 반면에 잎의 가장자리의 halo 증상부위는 생장을 멈추거나 조직의 괴사가 일어나기 때문에 잎이 아래쪽으로 휩모양으로 둥글게 말리기 시작하고 잎 전체의 생육이 위축되고 잎의 가장자리로부터 고사하는 급성형 병징을 나타내었다(Fig. 1C). 참다래 잎에 급성형 병징은 주로 Hayward에서 관찰되었으며 Matua에서는 급성형 병징을 관찰할 수 없거나 경미한 증상만 관찰되었다. 심한 경우는 잎이 모두 떨어지거나 새 잎이 전개되지 못하여 꽃봉오리만 남게 되기도 하였다(Fig. 1D).

참다래 품종간 궤양병 발생 및 병원균 밀도 차이. 참다래 결실수(암나무)인 Hayward 품종과 수분수(수나무)인 Matua 품종에서 궤양병의 발생 차이를 조사한 결과 자연발병에 의한 Hayward의 이병엽율은 18.0%인 반면에 Matua의 이병엽율은 2.4%에 불과하였다(Table 1). 또한 Hayward와 Matua의 전진엽에서는 병원세균이 전혀 검출되지 않았으나 궤양병에 감염된 잎에 형성된 병반 부위에서는 각 품종에서 생체중 1

g당 각각  $1.8 \times 10^7$ 개와  $2.1 \times 10^6$ 개의 궤양병균의 균총이 분리되어 균총수는 Hayward에서 Matua보다 약 10배 가량 많은 병원세균이 검출되었다(Table 2).

궤양병에 감염된 Hayward의 새순에는 새로 난 잎에서는 궤양병의 병징이 나타나지 않았고 오래된 잎일수록 궤양병의 병징을 뚜렷하게 볼 수 있었다. 또한 새순에 존재하는 궤양병균의 밀도는 1년생 가지 조직

에서 생체중 1 g당  $1.4 \times 10^6$ 개의 병원세균이 검출된 반면에, 1년생 가지의 분지 부위로부터 하엽(3엽), 중엽(8엽) 및 상엽(11엽)에서는 각각  $1.4 \times 10^7$ ,  $1.5 \times 10^7$  및  $2.0 \times 10^5$ 개의 병원세균이 검출되었다(Table 3).

**Table 2.** Bacterial population isolated from healthy and diseased leaves on cultivars Matua and Hayward of kiwifruit

Cultivar	No. of trees investigated	Bacterial population (CFU/g) <sup>a</sup>	
		Healthy leaf	Diseased leaf
Matua	3	0	$2.1 \times 10^6$
Hayward	3	0	$1.8 \times 10^7$

<sup>a</sup> Bacterial population represents number of colonies isolated from 1 g fresh weight of leaf tissues in each tree on May 19, 1995.

**Table 3.** Bacterial population isolated from various tissues of diseased trees on cultivar Hayward of kiwifruit

Tissues isolated	Position <sup>a</sup>	No. of canes investigated	Symptom <sup>b</sup>	Bacterial population (CFU/g) <sup>c</sup>
Leaf	3	5	+	$1.4 \times 10^7$
	8	5	±	$1.5 \times 10^6$
	11	5	-	$2.0 \times 10^5$
Stem	-	5	-	$1.4 \times 10^6$

<sup>a</sup> Leaf position represents the order of new leaves appearing according to the elongation of new cane.

<sup>b</sup> + : severe symptom developed; ± : faint symptom developed; - : no symptom developed;

<sup>c</sup> Bacterial population represents number of colonies isolated from 1 g fresh weight of tissues in each cane on May 23, 1995.

**Table 4.** Injection effect of Streptomycin for control of bacterial canker of kiwifruit

Field	Untreated			Treated <sup>a</sup>			Control value (%)
	No. of trees injected	Infected trees (%)	Disease severity <sup>b</sup>	No. of trees injected	Infected trees (%)	Disease severity	
Gusang	65	44.6	10.8	20	15.0	5.0	53.7
Haechang	152	72.4	30.0	209	46.4	14.8	50.7

<sup>a</sup> Streptomycin (200 ppm, 3 L) was injected into each tree on November 26, 1994 for field 'Gusang' and November 30 to December 1, 1994 for field 'Haechang'.

<sup>b</sup> Disease severity was investigated on April 11, 1995 for field 'Gusang' and April 8, 1995 for field 'Haechang'. Disease severity of each tree was assigned to one of 4 categories; A: Exudation of bacterial ooze was observed at a trunk, B: Oozing was observed at more than one leader but not trunk. C: Oozing was observed at a cane but not leader, D: Oozing was not observed. Disease severity was calculated as follows:  $[5n_A + 3n_B + n_C] / 5(n_A + n_B + n_C + n_D) \times 100$ .  $n_A$  to  $n_D$  represents the number of trees of category A to D, respectively (16).

**Table 5.** Injection effect of streptomycin with various amounts for control of bacterial canker of kiwifruit

Treatment <sup>a</sup>	Amount of injection	No. of trees	Disease severity <sup>b</sup>	Control value (%)	Phytotoxicity <sup>c</sup>
Untreated	-	5	88.6	-	-
Streptomycin	2 L	5	60.0	32.3	ND
	3 L	5	37.1	58.1	ND
	4 L	5	25.7	71.0	ND

<sup>a</sup> Streptomycin (200 ppm) was injected on November 26, 1994.

<sup>b</sup> Disease severity was investigated on April 11, 1995. Disease severity of each tree was assigned to one of 4 categories; A: Exudation of bacterial ooze was observed at a trunk, B: Oozing was observed at more than one leader but not trunk, C: Oozing was observed at a cane but not leader, and D: Oozing was not observed. Disease severity was calculated as follow:  $[(5n_A + 3n_B + n_C) / 5(n_A + n_B + n_C + n_D)] \times 100$ .  $n_A$  to  $n_D$  represents the number of trees of category A to D, respectively (16).

<sup>c</sup> ND : not detected.

수간주입에 의한 참다래 궤양병 방제 효과. 스트렙토마이신의 수간주입 효과는 구상리 참다래 재배포장에서 무처리구의 이병주율이 44.6%인 반면에, 처리구는 15.0%로 조사되어 무처리구와 처리구의 발병도가 각각 10.8 및 5.0으로 나타나 53.7%의 치료효과를 나타내었다. 해창리 참다래 재배포장에서 무처리구의 이병주율이 72.4%, 처리구의 이병주율은 46.4%였으며, 발병도로 환산한 결과 무처리구가 30.0, 처리구가 14.8로 나타나 50.7%의 치료효과를 나타내었다(Table 4). 수간주입시 스트렙토마이신 약량을 주당 2 L에서 3 L와 4 L로 증가시키에 따라 치료효과도 32.3%에서 58.1%와 71.0%로 각각 증대되었으나 각 처리구에서 모두 약해 증상은 관찰되지 않았다(Table 5).

## 고 찰

본 연구에서는 참다래 나무의 새순이 자라기 시작하는 4월 24일 구상리 참다래 재배포장에서 궤양병의 발병정도를 조사하였을 때 잎에 나타나는 전형적인 병반보다는 급성형의 병징이 심하게 나타난 것을 볼 수 있었는데 과수원의 가장자리에 위치한 나무에서 발병이 심하게 나타났으며 심한 경우 잎이 나지 않는 등 생육에 큰 지장을 일으켰다. 이처럼 1995년 봄에 다른 해보다도 궤양병의 발병이 심하게 나타난 이유는 아마도 늦서리가 내려 급격한 저온조건에 의해 급성형의 병반이 나타난 것으로 생각되며 과수원의 안쪽보다는 바깥쪽 부분에 위치한 나무들이 차가운 바람에 쉽게 노출되어 저온조건에 직접적으로 영향을 많이 받게 되므로 급성형 병징이 많이 발생한 것으로 생각된다. 이렇게 겨울철 강풍이 와 닿는 지점에서 궤양병이 격발하는 현상은 일본에서도 Serizawa 등(15)에 의해 관찰된 바 있다. 또한 참다래 잎에서 급성형 병징이 나타난 나무는 새 잎이 나오기 전인 2-4월 초에 참다래의 주간이나 주지에서 심하게 세균유출액이 보였던 나무와 거의 일치했다. 따라서 월동기의 나무에서 세균유출액의 유무와 생육초기인 봄에 나타나는 참다래 잎에서의 급성형 병반의 유무는 재배자들이 궤양병균에 심하게 감염된 상태를 알아낼 수 있는 지표가 될 수 있으리라 생각된다. 이러한 병징이 나타나기 시작한 포장에서는 궤양병균의 밀도가 대단히 높은 상태이기 때문에 적극적으로 궤양병에 대한 방제 대책을 세우지 않을 경우 과수원 전체로 궤양병의 확산되어 폐원에 이를 수도 있기 때문에 신중한 관리를 요한다.

궤양병에 감염된 참다래 결실수 Hayward와 수분수

Matua에서의 병징 발현 정도를 비교해 보았을 때 Hayward에서 훨씬 심한 병징을 관찰할 수 있었는데 두 품종에서의 발병도 및 병원세균의 밀도 차이를 조사한 결과 Hayward가 Matua에 비해 높은 이병율을 나타내었고 병원세균의 밀도도 높았다. 이것은 두 품종간의 유전적 소인의 차이에서 기인할 수도 있으나 결실수인 암나무가 영양분 및 여러 대사물질의 손실이 수분수보다 훨씬 심할 뿐만 아니라 수분수 Matua는 연중 거의 전정을 하지 않고 방치해 두는 반면에 궤양병균의 침입 감염시기인 겨울철에 결실수 Hayward는 강한 전정을 함으로써 궤양병균의 침입과 감염에 유리한 발병유인(predisposition)을 제공해 주는 재배방법에도 기인하는 것으로 추정된다.

참다래 궤양병은 18°C 이하의 저온에서 활성이 높고 주로 봄에 나온 새 잎의 기공, 상처, 수공 등을 통해 감염을 일으키므로 비교적 저온 시기인 4월 중순에 일찍 나오는 잎일수록 감염될 확률이 높다(11, 12). 또한 Serizawa 등(15)은 성숙되기 직전의 3-6엽이 궤양병에 대해 가장 감수성을 나타내고 보다 성숙한 잎이나 어린 잎일수록 엽당 병반수가 감소한다고 보고하였다. 본 시험에서도 감염된 어린 가지의 하엽, 중엽 및 상엽의 엽위별 존재하는 궤양병균의 밀도를 조사하였을 때 새로 나온 상위엽일수록 궤양병균의 밀도가 낮게 조사되었다. 이것은 참다래 엽수가 증가하고 성숙해 가는 5월부터는 기온이 급격하게 상승함에 따라 저온 활성을 가진 궤양병균의 활성이 점차 감소하기 때문일 것으로 추정된다. 새순에 궤양병균의 비산 및 침입 감염 적온은 10-18°C이고 봄과 가을 중순부터 이른 겨울 사이가 감염적기라는 Serizawa 등(12-14)의 보고가 이러한 추론을 뒷받침해 준다. 따라서 궤양병의 예방을 위한 약제 살포는 궤양병균의 왕성하게 활동하고 침입 감염을 일으키기 쉬운 시기인 4월 중순경 새 잎이 나오는 시기 또는 그 이전부터 이루어져야 소기의 성과를 거둘 수 있을 것으로 생각된다.

한편 참다래에서 궤양병균은 도관 부위 깊숙히 존재하기 때문에 보다 효과적인 약제 방제법은 참다래 나무의 도관부위로 약제를 주입시켜 병원세균을 죽이는 방법일 것이다. 수간주입에 의한 식물병의 치료법은 대추나무 빗자루병의 방제에 이용되어 큰 효과를 거두고 있는데(4, 6), 특히 참다래는 수액의 이동이 왕성하기 때문에 수간주입에 의한 치료방법을 응용하기가 용이하다. 일본에서는 참다래 궤양병을 치료하기 위하여 수확 후 낙엽 전인 11월 경에 약해가 없이 방제효과를 나타내는 200 ppm 농도의 streptomycin을 참다래 수관면적 당 200-300 ml/m<sup>2</sup>을 주입시켜 높은 치

료효과를 얻은 것으로 보고되었다(9, 16). 본 실험에서는 공시한 참다래의 수령이 10~15년생으로 수관면적이 약 10~20 m<sup>2</sup> 정도였는데 200 ppm 농도의 streptomycin을 3 L 수간주입했을 때 50% 이상의 치료효과를 나타내었으며 약량의 증가에 따라 치료효과도 증대되어 수간주입 방법이 궤양병의 치료를 위한 유망한 방법으로 기대된다.

수간주입 시험을 위하여 구상리 참다래 재배포장에서는 낙엽 전인 11월 26일에 수간주입을 했을 때 수간주입액 3 L가 대부분 수시간내에 주입되었으나 해창리 참다래 재배포장의 경우 낙엽이 진행중인 11월 30일~2월 1일에 수간주입하였는데 2일이 지나도 완전히 주입되지 않은 나무도 있었다. 수액의 이동이 왕성하고 증산작용이 활발하게 일어나는 5~6월에는 1 L의 주입액이 1시간 이내에 주입되지만 약제 잔류성이 문제가 될 수 있으므로 참다래 나무의 수간주입은 수확 직후인 11월 초순~중순이 바람직하리라 생각된다. 또한 수간 주입약량이 증대됨에 따라 방제효과도 증대되지만 참다래 수관면적 당 300 ml/m<sup>2</sup> 이상의 streptomycin을 주입하였을 경우는 약해가 발생한다고 보고되었으므로(16) 수간 주입약량은 참다래의 수령과 수관면적 및 궤양병의 발생기간과 발병도에 따라 결정되어야 할 것이다. 한편 일본에서는 참다래 궤양병 치료를 위한 수간주입 전용 약제인 아그립토 액제가 개발되어 시판되고 있으나, 우리나라에서는 수간주입용 약제가 개발되어 있지 않기 때문에 본 시험에는 의약품 streptomycin을 수간주입 약제로 사용하였다. 차 등(6)은 대추나무 빗자루병에 대하여 몇 가지 시판 항생제들의 유용성을 보고하였으나, 지금까지 우리나라에서 유일하게 참다래 궤양병 약제로 시판되고 있는 아그리마이신 수화제는 물에 완전히 용해되지 않기 때문에 수간주입을 할 경우 용해되지 않은 채 수간주입용기 바닥에 남아 있거나 수간주입구를 막아 버려 수간주입 약제로는 부적합하다. 따라서 우리나라에서도 수간주입 약제의 개발이 시급한 실정이며 수간주입 방법의 개선을 통하여 궤양병 치료효과를 더욱 증대시킬 수 있을 것으로 기대된다.

## 요 약

암수 만그루인 참다래 품종 중에서 우리나라에서 재배되고 있는 대표적인 결실수(암나무)인 Hayward와 수분수(수나무)인 Matua에서 궤양병의 발생 차이를 조사한 결과 Hayward의 이병엽율은 18.0%인 반면에 Matua의 이병엽율은 2.4%였다. 또한 Hayward와 Ma-

tua의 일에 형성된 병반에서 분리된 궤양병균의 균총 수는 생체중 1 g당 각각  $1.8 \times 10^7$ 개와  $2.1 \times 10^6$ 개로 Hayward에서 Matua보다 약 10배 가량 많은 궤양병균이 검출되었다. Hayward 신초에 존재하는 궤양병균의 밀도를 조사한 결과 줄기 조직보다는 잎 조직에서 많은 궤양병균이 검출되었으며 새로 나온 잎일수록 궤양병균의 밀도는 낮게 검출되었다. 궤양병 방제를 위하여 스트렙토마이신 수간주입에 의한 궤양병 치료효과는 50.7~53.7%였다. 수간주입시 약량을 주당 2 L에서 3 L와 4 L로 증가시킴에 따라 치료효과도 32.3%에서 58.1%와 71.0%로 각각 증대되었는데, 수간주입 약제와 수간주입 방법의 개선을 통하여 궤양병 치료효과를 더욱 증대시킬 수 있을 것으로 기대된다.

## 감사의 말씀

이 연구의 일부는 농림수산부 현장애로기술개발사업 연구비에 의해 수행되었으며, 포장실험에 도움을 주신 신준식, 이강호씨께 감사드립니다.

## 참고문헌

1. 고영진. 1995. 참다래 주요 병. 식물병과 농업 1(1): 3-13.
2. 고영진, 차병진, 정희정. 1994. 참다래 궤양병의 격발 및 확산. 한국식물병리학회지 10(1): 68-72.
3. 고영진, 오상준, 정희정. 1994. 전남지역 참다래 재배현황 및 문제점에 관한 조사연구. 순천대학교 논문집 13: 93-106.
4. 라용준, 안경구. 1990. 빗자루병 마이코플라스마에 감염된 대추나무 체내에서의 Oxytetracycline의 이진 및 지속에 관한 연구. 한국마이코플라스마학회지 1(1): 4-12.
5. 백종철, 차병진, 고영진. 1993. 참다래 주요 병해충 발생 생태 조사. I. 참다래 재배 및 병해충 발생 현황. 순천대학교 논문집 12: 75-82.
6. 박철하, 이세표, 차병진. 1994. 시판 항생제들의 대추나무 빗자루병 치료약제 가능성 비교. 충북대학교 농업과학연구 11(2): 41-49.
7. 박홍섭 등. 1991. 농산물 수입개방에 대응한 전남원예농업의 개발전략에 관한 연구. 전남대학교 농과대학 원예학과. 727pp.
8. 柳華榮 等. 1993. 果樹病害 原色圖鑑. 農村振興廳 農業技術研究所. 286pp.
9. 鈴木宏史. 1989. キウイフルーツかいよう病の新防除について. 今月の農業 33(5): 72-78.
10. 丹原克則. 1988. キウイフルーツ百科. 愛媛青果連. 374pp.
11. Serizawa, S. and Ichikawa, T. 1993. Epidemiology



- of bacterial canker of kiwifruit. 1. Infection and bacterial movement in tissue of new canes. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 59 : 452-459.
12. Serizawa, S. and Ichikawa, T. 1993. Epidemiology of bacterial canker of kiwifruit. 2. The most suitable times and environments for infection on new canes. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 59 : 460-468.
13. Serizawa, S. and Ichikawa, T. 1993. Epidemiology of bacterial canker of kiwifruit. 3. The seasonal changes of bacterial population in lesions and of its exudation from lesion. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 59 : 469-476.
14. Serizawa, S. and Ichikawa, T. 1993. Epidemiology of bacterial canker of kiwifruit. 4. Optimum temperature for disease development on new canes. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 59 : 694-701.
15. Serizawa, S., Ichikawa, T., Takikawa, Y., Tsuyumu, S. 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.
16. Ushiyama, K. 1993. Studies on the epidemics and control of bacterial canker of kiwifruit caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Bulletin of the Kanagawa Horticultural Experiment Station* 43 : 1-76.

부록 D.

**Biolog Program을 이용한 참다래 궤양병균 동정용 Data Base**

고 영 진\*  
순천대학교 응용생물원예학부

**A Data Base for Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*,  
the Pathogen of Kiwifruit Bacterial Canker, Using Biolog Program**

Young Jin Koh\*  
*Faculty of Applied Biology and Horticulture, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea*

한국식물병리학회지

제 13권 제 2호 별책

Reprinted from the Korean Journal of Plant Pathology

Volume 13, Number 2, April 1997

## Biolog Program을 이용한 참다래 궤양병균 동정용 Data Base

고 영 진\*  
순천대학교 응용생물원에학부

### A Data Base for Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, the Pathogen of Kiwifruit Bacterial Canker, Using Biolog Program

Young Jin Koh\*

Faculty of Applied Biology and Horticulture, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

**ABSTRACT:** Reactions of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* to 95 carbon sources in a 96-well microplate (BiOLOG GN MicroPlate™) were investigated. The bacterium used 9 carbon sources such as D-mannitol, sucrose, etc., but did not use 62 carbon sources such as  $\alpha$ -cyclodextrin, dextrin, etc. Based on the reactions, a user data base for identification of *P. syringae* pv. *actinidiae* was constructed in Biolog program (BiOLOG MicroLog™ 2 system). *P. syringae* pv. *actinidiae* isolates collected from kiwifruits could be identified automatically with high similarity using the user data base, which could diagnose rapidly and easily whether the tree was infected with bacterial canker or not.

**Key words:** *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, identification, Biolog program, kiwifruit, bacterial canker

우리나라에서 재배되고 있는 참다래(키위, 양다래, kiwifruit, Chinese gooseberry, *Actinidia chinensis* Planch)에는 1980년대 후반부터 궤양병이 발생하여 급속하게 확산되고 있으며, 제주도와 전라남도 일부 재배지역에서는 과수원을 폐원시킬 만큼 참다래 재배의 가장 큰 제한 요인으로 대두되고 있어 궤양병에 대한 방제대책이 시급한 실정이다(2-4). 궤양병의 방제는 항생제 또는 동제의 살포나 항생제의 수간 주입에 의해 부분적으로 성과를 거두고 있으나 감염초기 방제에 실패할 경우 소기의 방제효과를 거두기 어려운 한계를 가지고 있다(3, 6, 8). 따라서 궤양병의 방제효과를 극대화시킬 수 있도록 병징발현 이전에 궤양병 감염여부를 조기에 진단할 수 있는 방법의 개발이 시급하다. 그러나 참다래 궤양병은 감염 후 1-2년 정도의 잠복기간을 거친 후에 잎이나 줄기에서 육안으로 병징이 관찰되기 때문에 외관상 건전해 보이는 줄기나 잎에 존재하는 궤양병균을 신속하게 동정하는 것이 궤양병 조기 진단의 관건이다(2).

참다래 궤양병균(*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*)을 비롯하여 *Pseudomonas* 속에 속하는 식물

병원 세균의 종 또는 병원형(pathovar)은 여러가지 생리·생화학적 특성에 따라 동정하는데(1,5), 이러한 전통적인 세균 동정방법은 까다로운 뿐만아니라 많은 시간과 노력이 소요되기 때문에 단시간에 간편하게 세균을 동정할 수 있는 시스템이 개발되고 있다. 그 중에서 Biolog program(BiOLOG MicroLog™ 2, Biolog Inc., Hayward, CA, USA)은 세균의 95개 탄소원 이용성질을 컴퓨터 프로그램에 의해 분석하여 세균을 분류할 수 있는 간편한 세균 동정시스템의 하나이다. 이 Biolog program에는 *Pseudomonas* 속에 속하는 84개의 종, type 또는 병원형들의 95개 탄소원 이용여부에 관한 data base가 수록되어 있어 *Pseudomonas* 속에 속하는 식물병원 세균들을 신속하게 동정할 수 있다. 그러나 일본에서 Takikawa 등(7)에 의해 *P. syringae* 중에서 가장 최근인 1989년 처음으로 동정 보고된 *P. syringae* pv. *actinidiae*의 data base는 수록되어 있지 않아서 Biolog program을 이용한 *P. syringae* pv. *actinidiae* 동정이 불가능하다. 따라서 Biolog program을 이용하여 *P. syringae* pv. *actinidiae*를 동정할 수 있는 data base를 만들기 위하여 *P. syringae* pv. *actinidiae*의 95개 탄소원 이용성질을 조사하였다.

data base 작성을 위한 *P. syringae* pv. *actinidiae* 균

\*Corresponding author.

Table 1. The reactions of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* to 95 carbon sources of the 96-well microplate (BiOLOG GN MicroPlate™)

Well code	Carbon sources	Reactions	Well code	Carbon sources	Reactions
A1	water	- <sup>a</sup>	E1	p-hydroxy phenylacetic acid	-
A2	$\alpha$ -cyclodextrin	-	E2	itaconic acid	-
A3	dextrin	-	E3	$\alpha$ -keto butyric acid	-
A4	glycogen	-	E4	$\alpha$ -keto glutaric acid	-
A5	tween 40	±	E5	$\alpha$ -keto valeric acid	-
A6	tween 80	±	E6	D,L-lactic acid	-
A7	N-acetyl-D-galactosamine	-	E7	malonic acid	±
A8	N-acetyl-D-glucosamine	-	E8	propionic acid	-
A9	adonitol	-	E9	quinic acid	±
A10	L-arabinose	±	E10	D-saccharic acid	+
A11	D-arabitol	±	E11	sebacic acid	-
A12	cellobiose	-	E12	succinic acid	+
B1	i-erythritol	-	F1	bromo succinic acid	+
B2	D-fructose	±	F2	succinamic acid	-
B3	L-fucose	-	F3	glucuronamide	-
B4	D-galactose	-	F4	alaninamide	-
B5	gentiobiose	-	F5	D-alanine	-
B6	$\alpha$ -D-glucose	±	F6	L-alanine	±
B7	m-inositol	±	F7	L-alanyl-glycine	-
B8	$\alpha$ -D-lactose	-	F8	L-asparagine	±
B9	lactulose	-	F9	L-aspartic acid	+
B10	maltose	-	F10	L-glutamic acid	±
B11	D-mannitol	+	F11	glycyl-L-aspartic acid	-
B12	D-mannose	±	F12	glycyl-L-glutamic acid	±
C1	D-melibiose	-	G1	L-histidine	-
C2	$\beta$ -methyl D-glucoside	-	G2	hydroxy L-proline	-
C3	D-psicose	-	G3	L-leucine	-
C4	D-raffinose	±	G4	L-ornithine	-
C5	L-rhamnose	-	G5	L-phenylalanine	-
C6	D-sorbitol	±	G6	L-proline	±
C7	sucrose	+	G7	L-pyroglutamic acid	-
C8	D-trehalose	-	G8	D-serine	-
C9	turanose	-	G9	L-serine	±
C10	xylitol	-	G10	L-threonine	-
C11	methyl pyruvate	±	G11	D,L-camitine	-
C12	mono-methyl succinate	±	G12	$\gamma$ -amino butyric acid	±
D1	acetic acid	±	H1	urocanic acid	-
D2	cis-aconitic acid	+	H2	inosine	-
D3	citric acid	±	H3	uridine	-
D4	formic acid	±	H4	thymidine	-
D5	D-galactonic acid lactone	-	H5	phenyl ethylamine	-
D6	D-galacturonic acid	-	H6	putrescine	-
D7	D-gluconic acid	+	H7	2-amino ethanol	-
D8	D-glucosaminic acid	-	H8	2,3-butanediol	-
D9	D-glucuronic acid	-	H9	glycerol	+
D10	$\alpha$ -hydroxybutyric acid	-	H10	D,L- $\alpha$ -glycerol phosphate	-
D11	$\beta$ -hydroxybutyric acid	-	H11	glucose-1-phosphate	-
D12	$\gamma$ -hydroxybutyric acid	-	H12	glucose-6-phosphate	-

<sup>a</sup> + : positive reaction, - : negative reaction, ± : variable.

주는 참다래 께양병균을 처음 보고한 Shizuoka 감귤 시험장에서 분양받은 10개 균주를 공시하였다. 공시한 균주들을 BiOLOG Universal Growth Medium (BUGM)에 24시간 동안 배양하여 얻은 신선한 균총들을 cotton swab으로 채취하여 0.85% saline 용액속에  $3 \times 10^8$  cells/ml 농도로 현탁시킨 후 세균현탁액을 microplate(BiOLOG GN MicroPlate™)의 96 well에 multichannel micropipette으로 150  $\mu$ 씩 분주하여 25°C에서 24시간 동안 각각 배양하였다. 각 균주를 배양한 microplate 상에서 탄소원 이용 여부를 Biolog program 사용설명서에 따라 각 탄소원이 함유된 well의 변색유무로 판명하였다. 즉 탄소원이 들어있지 않은 대조구(A1 well)와 동일하게 변색되지 않은 well은 탄소원이 이용되지 않은 것으로 판명하고 보라색으로 변색된 well은 탄소원이 이용된 것으로 판명하였다. 그 결과 *P. syringae* pv. *actinidiae* 균주들은 D-mannitol, sucrose, cis-aconitic acid, D-gluconic acid, D-saccharic acid, succinic acid, bromo succinic acid, L-aspartic acid, glycerol 등 9종의 탄소원을 잘 이용하였으나,  $\alpha$ -cyclodextrin, dextrin 등 62종의 탄소원을 이용하지 못하였고, tween 40을 비롯한 24종의 탄소원에 대해서는 명확치 않거나 균주에 따라 다른 반응을 나타내었다(Table 1). 이러한 반응을 종합하여 *P. syringae* pv. *actinidiae* 균주들에 의해 이용된 탄소원은 + (positive)로, 이용되지 않은 탄소원은 - (negative)로 각각 판정하고, 반응이 명확치 않거나 균주간 변이가 있는 것은  $\pm$  (variable)로 판정한 data를 Biolog program에 입력하여 참다래 께양병균 동정용 'User data base'를 완성하였으며, *P. syringae* pv. *actinidiae*로 동정될 경우 'ACTINIDIAE'로 출력되도록 프로그램을 작성하였다. 완성된 User data base를 추가한 Biolog program에서 본 시험에 공시한 10개 균주들은 96.6-97.8%의 유사도를 나타내면서 'ACTINIDIAE'로 출력되어 *P. syringae* pv. *actinidiae*로 동정됨으로써 User data base의 효용성이 입증되었다.

한편 우리 나라에서 재배되고 있는 외관상 전전해 보이는 참다래로부터 분리된 미지의 세균들을 대상으로 참다래 께양병균 여부를 동정하기 위해서 분리균을 Peptone Sucrose Agar(peptone 10 g, sucrose 10 g, agar 14 g, distilled water 1,000 ml, pH 6.8)에서 배양하여 단일 균총을 얻은 후 그람염색을 하였다. 선발된 그람음성 세균들을 위해 기술한 방법에 따라 microplate에서 배양하여 각 균주별 탄소원 이용여부에 관한 반응들을 조사하여 Biolog program에 입력시킨 결과 기존 data base와 새로 추가된 참다래 께양병균

동정용 User data base와의 자동검색을 거쳐 미지의 세균들 중에서 참다래 께양병균 균주들은 높은 유사도를 나타내면서 'ACTINIDIAE'로 출력되었다.

참다래 께양병균 동정용 User data base의 완성으로 복잡하고 3-6개월이 소요되는 세균의 생리·생화학적 반응조사를 통한 전통적인 세균 동정방법을 거치지 않고 Biolog program을 이용하여 1주일 이내에 신속, 정확하게 참다래 께양병균을 동정할 수 있는 참다래 께양병균 동정체계가 마련되었다. 따라서 외관상 전전해 보이는 참다래 나무일지라도 Biolog program을 활용하여 께양병균 존재여부를 신속하게 동정하여 께양병 감염여부를 조기에 진단함으로써 께양병 방제 효과를 극대화시킬 수 있을 것으로 전망된다.

## 요 약

참다래 께양병균(*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*)의 microplate(BiOLOG GN MicroPlate™)에 있는 95개의 탄소원 이용성질을 조사하였다. 참다래 께양병균은 D-mannitol, sucrose 등 9종의 탄소원을 잘 이용하였으나,  $\alpha$ -cyclodextrin, dextrin 등 62종의 탄소원은 전혀 이용하지 못하였다. 이러한 microplate에서의 반응을 종합하여 참다래 께양병균 동정용 'User data base'를 완성하여 Biolog program(BiOLOG MicroLog™ 2)에 입력시켰다. 이 data base를 이용하여 참다래에서 분리된 께양병균 균주들은 높은 유사도를 나타내면서 *P. syringae* pv. *actinidiae*로 자동으로 동정되어 출력됨으로써 참다래 께양병 감염여부를 빠르고 간편하게 진단할 수 있었다.

## 감사의 말씀

이 연구는 1994년도 농림부 농림수산물개발사업(원장애로기술개발사업) 연구비에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Hildebrand, D. C., Schroth, M. N., and Sands, D. C. 1988. *Pseudomonas*. In: *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*, 2nd ed, ed. by N. W. Schaad, pp.60-80. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA. 164pp.
- 고영진. 1995. 참다래 주요 병. 식물병과 농업 1(1): 3-13.

3. 고영진, 박숙영, 이동현. 1996. 우리 나라 참다래 껌양병 발생 특성 및 수간 주입에 의한 방제. *한식병지* 12(3):324-330.
4. 고영진, 차병진, 정희경, 이동현. 1994. 참다래 껌양병의 격발 및 확산. *한식병지* 10(1):68-72.
5. Palleroni, N. J. 1984. Genus I. *Pseudomonas*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. I, ed. by N. R. Krieg and J. G. Hort, pp.141-199. Williams & Wilkins, Baltimore, USA. 964pp.
6. Serizawa, S., Ichikawa, T., Takikawa, Y., Tsuyumu, S., 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.
7. Takikawa, Y., Serizawa, S., Ichikawa, T., Tsuyumu, S. and Goto, M. 1989. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* pv. nov.: The causal bacterium of canker of kiwifruit in Japan. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 55:437-444.
8. Ushiyama, K. 1993. Studies on the epidemics and control of bacterial canker of kiwifruit caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Bulletin of the Kanagawa Horticultural Experiment Station* 43:1-76.

(Received March 28, 1997)

여 백

# 한국참다래 동호회지

The Kiwifruit Growers' Society of Korea Newsletter

제 4 호  
1997. 12. 26  
No. 4



## ■ 참다래 궤양병 격발 원인 분석 및 대책을 위한 제언 ■

우리나라에서 재배된 지 불과 10여년만에 참다래 산업은 괄목할 만한 성장을 해왔다. 그러나 최근에 발생하기 시작한 궤양병은 수만평의 참다래 과원을 빼앗아 치명적인 피해를 주면서 참다래 생산기반을 위협하고 있다. 그러면 우리나라에서 궤양병이 격발한 원인은 무엇일까?

이러한 참다래 궤양병의 격발에는 여러 가지 원인이 복합적으로 관여했던 것으로 추정되지만 가장 큰 원인은 재배자들의 참다래 및 병원균에 대한 인식 부족이었다. 아열대 과수인 참다래를 온대지역인 우리나라에서 재배하기 위해서는 겨울철 보온대책이 필수적임에도 불구하고 기후조건에 맞는 재배기술개발과 방풍림조성 등 재배시설에 대한 투자가 미약했던 것이 사실이다. 더불어 궤양병균은 비바람에 의해 전염되고 상처를 통해 침입하므로 비바람을 막아주고 상처를 막거나 치유시키는 재배관리가 선행되어야 함에도 병해관리 노력이 거의 이루어지지 않았었다.

또한 참다래 궤양병이 짧은 기간동안에 급속하게 확산된 배경으로 묘목생산 및 보급체계의 허점을 지적하지 않을 수 없다. 우리나라에서 궤양병균의 유입경로를 추정해 볼 때 일부 재배가 또는 묘목을 통하여 전파된 것으로 추정되고 있다. 더구나 일본에서는 1983년부터 궤양병에 의해 빼앗긴 과수원이 속출하기 시작했으므로 이에 대한 대책을 강구했어야 함에도 참다래를 농약살포가 불필요한 무병과수로 농가에 인식시켜 온 것이 사실이다. 이러한 사실을 돌이켜 볼 때 그동안 식물병의 중요성을 간과한 채 양적성장에만 치우쳤던 참다래 산업의 현주소가 그대로 투영되어 있음을 부인할 수 없다. 그러면 참다래 궤양병의 발생을 효율적으로 억제할 수 있는 대책은 무엇일까?

우선 참다래 산업의 질적성장을 이룰 수 있는 참다래 전업농의 육성이 필요하다. 참다래 산업도 국제경쟁력이 있는 전업농으로 구조조정이 이루어져야 재배기술연구나 시설에 대한 투자를 기대할 수 있다. 특히 참다래 궤양병균의 전염을 막을 수 있는 방풍림, 비가림시설 또는 비닐하우스 등에 대한 투자가 시급하다. 이러한 측면에서 최근에 이루어지고 있는 비가림시설에 대한 정부의 지원은 궤양병 방제는 물론 고품질 참다래를 생산할 수 있는 기반조성이라는 점에서 매우 고무적인 일이다.

궤양병은 치료가 어렵기 때문에 예방위주의 방제노력이 이루어져야 한다. 나무가 건강하게 크도록 유기질 위주의 비배관리와 전정관리를 충실하게 하고 적정수준의 착과만을 허용하여 수세를 건강하게 유지시키는 것이 궤양병 예방의 지름길이다. 더불어 겨울전정 직후와 이른봄 약제의 적기살포는 궤양병의 격발을 경감시켜 줄 수 있다. 불행하게도 궤양병 방제약제가 항생제와 동제로 한정되어 있지만 가능한 여러 가지 약제를 교대로 사용하면 약제저항성균의 출현을 억제할 수 있으며 방제 효과 또한 증진시킬 수 있을 것이다.

수간주입에 의한 궤양병 치료는 발병초기에 이루어져야 효과를 거둘 수 있다. 궤양병은 감염 2~3년이 지나야 잎과 줄기에서 병징이 나타나기 때문에 궤양병을 감염초기에 조기진단하는 것이 수간주입에 의한 치료효과를 극대화시킬 수 있다. 다행스럽게 최근에 궤양병을 조기에 진단할 수 있는 기술이 개발되고 있어 조기진단에 의한 수간주입과 약제살포로 궤양병을 방제하는 것이 앞으로 가능할 것으로 전망된다. 그러나 고가의 장비와 숙련된 기술이 요구되는 조기진단 기술의 실용화는 긴밀한 산학협동체계의 구축과 지속적인 정부 지원이 없이는 불가능함을 강조하고 싶다.

1997년 12월

순천대학교 교수 고영진