

632  
L2937

고령지 특용작물인 치커리의 무름병 조기진단법개발,  
발병생태, 피해조사 및 종합적 방제기술 확립

Studies on rapid diagnosis methods, ecology, loss analysis and  
control chicory soft-rot in alpine area

치커리 무름병원균의 조기진단법 개발

Rapid diagnosis methods of chicory soft-rot pathogen

치커리 무름병의 발병생태연구

Ecology of chicory soft-rot pathogen

치커리의 재배면적 및 피해도 조사

Loss analysis by chicory soft-rot pathogen

치커리 무름병 종합적 방제대책 개발

Control of chicory soft-rot pathogen

연구기관

강원대학교

농림부

# 최 종 보 고 서

1998년도 농림특정연구사업에 의하여 완료한 고령지 특용작물인 치커리의 무름병 조기 진단법개발, 발병생태, 피해조사 및 종합적 방제기술 확립에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

첨부 : 1. 최종보고서 8부

2. 최종보고서 디스켓 1매

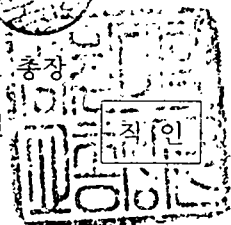
1998. 11. .

주관연구기관 : 강 원 대 학 교

총괄연구책임자 : 임 춘

주관연구기관장 : 강원대학교 총장

하 서 현



농림부장관 귀하

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “고령지 특용작물인 치커리의 무름병 조기진단법개발, 발병생태, 피해조사 및  
종합적 방제기술 확립에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1998. 11. .

주관연구기관명 : 강원대학교

총괄연구책임자 : 임 춘 근

연 구 원 : 차 상 훈

# 요 약 문

## I. 제 목

고령지 특용작물인 치커리의 무름병 조기진단법개발, 발병생태,  
피해조사 및 종합적 방제기술 확립

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

치커리는 국내의 수요증가로 인해 재배면적이 매년 급속도로 증가하는 고소득 작물로서, 현재 강원도에서만 집단으로 재배되고 있으며, 액기스등으로 가공되어 일본등지로 수출되는 고령지 특용작물이다. 이러한 치커리에 가장 큰 경제적 손실을 초래하는 원인으로서는 치커리 무름병 (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*)으로, 재배면적에 비례하여 피해면적도 급증하고 있다. 이 병된 치커리는 생산량의 감소는 물론이고 상품성 저하에 의한 수출감소와, 우루과이라운드에 의해 수입개방이 이루어짐에 따라서 중국등 외국의 저렴한 가격의 치커리 수입에 의한 재배농민 소득감소의 이중고로 작용하고 있다.

치커리 재배상 현상황의 문제에도 불구하고 치커리 무름병원균에 대한 전반적인 지식과 연구 수행은 이루어지지 않고 있다. 특히 병원균분리 및 동정, 생태, 정확한 재배면적 및 피해면적에 대한 조사가 절실하다. 강원도는 치커리 무름병원균인 *E. carotovora* subsp. *carotovora*의 기주범위에 포함되는 배추, 무, 감자, 당근 등 많은 작물이 집단재배되고 있어서 가장 치명적인 병이 확산될 수 있지만, 인식부족으로 연구가 수행되어지지 않았다.

따라서 본 연구에서는 치커리 무름병원균을 포장에서 조기검출 및 조기진단할 수 있는 방법과 병원균의 생활사와 전파과정의 관계에 대한 연구, 정확한 치커리 재배면적 및 피해면적 조사에 근거한 종합적 방제기술 개발을 목표로 하여 고품질의 치커리를 재배하게 함으로써 고소득은 물론이고 외국농산물의 수입개방에 대한 대책마련을 모색하였다. 또한 전국 재배량의 수위를 지키고 있는 강원도 채소류의 무름병 방제기술 개발에 기여하고자 하였다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

연구개발의 목적을 달성하기 위해 본 연구에서는 총 3차년간 세부 목표를 설정하여 진행되었다.

### 1. 치커리 무름병원균의 조기진단법 개발

치커리 무름병원균의 분리·동정에 있어서 쉽고, 시간을 절약할 수 있는 방법을 모색하였다. 즉, 전통적 동정기술을 이용한 조기진단법, Biolog를 이용한 조기진단법, 치커리 무름병원균 항체를 이용한 조기진단법을 개발하였다.

## 2. 치커리 무름병의 발병생태연구

치커리 무름병원균의 발병생태연구로, 병원균의 성장곡선, 최적산도, 최적온도, C.F.U.를 조사하였으며, 토양습도와 치커리 무름병의 발생관계, 토양내 치커리 무름병원균 monitoring법을 개발하였다.

## 3. 치커리의 재배면적 및 피해도 조사

치커리가 집단적으로 재배되고 있는 인제군을 중심으로 직접 방문하여 재배상황, 재배면적 및 치커리 무름병에 의한 피해상황을 조사하였다.

## 4. 치커리 무름병 종합적 방제대책 개발

위의 치커리 무름병에 대한 전반적인 지식하에 치커리 무름병의 화학적, 경종적, 생물적 및 종합적 방제대책을 개발하고자 하였다.

## IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

세부 연구개발 목표별 결과는 다음과 같다.

### 1. 치커리 무름병원균의 조기동정법 개발

먼저 전통적 동정법에 의해서는 치커리 이병조직을 감자절편에 치상하여 무름병원균을 enrichment시킨 후, 이 감자절편에서 분리된 균을 조건적 혐기성 테스트와 전자현미경 관찰을 통하여 쉽게 분리하였으며, 생화학테스트 결과, 36-37°C 성장여부, methyl  $\alpha$ -d glucoside 및 palatinose의 이용도 조사만으로 *E. carotovora* subsp. *carotovora* 균주들을 동정할 수 있었다. 또한 Biolog를 이용한 조기진단법 개발에서는 95가지의 탄수화물과 아미노산이 첨가된 microplate에서의 반응결과를 Biolog system에 입력되어 있는 *Erwinia* species와 비교한 결과 85%이상의 높은 유연관계를 나타내었다. 그리고 항체를 이용한 조기진단법 개발에 있어서는 치커리 무름병원균을 항원으로 하여 토끼에 주입하여 혈액을 채취한 결과 항혈청을 확인할 수 있었다. 또한 ELISA를 이용한 결과에서도 확인이 확인되었으며, 교차반응은 발생되지 않았고,  $10^{-4}$ 까지 조기진단에 활용할 수 있었다.

### 2. 치커리 무름병의 발병생태 연구

치커리 무름병원균의 생태연구에 관한 연구를 수행하였다. 그 결과 대표균주의 성장곡선은 배양 4시간 후에 대수증가기에 이르는 빠른 성장곡선을 나타내었으며, 최적온도는 28-30°C, 최적산도 조건은 pH 5.0 - pH9.0으로 넓은 산도조건에서 자라는 것으로 나타났다. 치커리 무름병원균의 C.F.U.조사에서는 OD 1.0을  $1.81 \times 10^9$ 으로 규정할 수 있었으며, 토양습도가 치커리 무름병원균의 생존율에 중요한 요인인 것을 확인할 수 있었다. 또한 ELISA를 이용하여 짧은 시간내에 토양내의 병원세균을 쉽게 monitoring할 수 있었다.

### 3. 치커리 재배면적 및 피해도 조사

강원도에서 조사된 치커리 재배면적은 150ha에 이르렀으며, 인제군에서만 139호의 농가가 치커리를 재배하였다. 재배지역에서 발생하는 병해로는 무름병이 가장 심각하였으며, 그밖에 진균병

이 발생하였다. 이밖에 파리류와 진딧물등의 해충들도 발생하였다.

#### 4. 치커리 무름병 종합적 방제대책 개발

치커리 무름병에 대한 화학약제 조사결과 농용신 수화제와 구리합성물인 쿠퍼수화제를 혼용한 처리구에서 가장 좋은 효과가 나타났다. 포장시험에서는 최고 68%이하의 방제가로 토양병 방제에서 나타나는 일반적인 방제가를 나타내었다. 생물적 방제를 위한 길항미생물 선발에서 치커리 무름병원균에 강한 길항력을 나타내는 길항미생물을 분리할 수 있었으며, 생리·생화학 실험 결과 *Bacillus* sp.으로 동정되었다.

본 연구에서 분리·동정된 치커리 무름병원균 및 연구개발자료는 즉각적으로

- 1) 미생물유전자원으로 활용가치가 매우 높으며,
- 2) 개발된 조기동정기술은 치커리뿐만 아니라 다른 채소 무름병 조기진단에 활용할 수 있으며
- 3) 항체를 이용한 조기동정기술은 키트화하여 산업화할 수 있을뿐만 아니라
- 4) 치커리 무름병원균의 발병생태와 선발된 약제 및 길항미생물을 이용하여 치커리 무름병을 종합적으로 관리할 수 있을 것으로 판단된다.

# S U M M A R Y

## I. Title :

Studies on rapid diagnosis methods, ecology, loss analysis and control chicory soft rot in alpine area

## 2. Objective and importance of the reserch

Chicory is a high-income crop and it is grown massively in Kangwon-Do. Recently manufactured chicory is exported to Japan. The cause of economical damage in chicory is soft rot caused by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovara* and the size of damaged area is rapidly increasing. *E. carotovora* subsp. *carotovora* can even cause soft rots on diverse vegetable, such as cabbage, raddish, potato, carrot and other ones. So control of the *E. carotovora* subsp. *carotovora* is not only critical for chicory but also for other economically important vegetable grown in Kangwon-Do. However any studies on the chicory soft rot have not been conducted yet and so we are trying here to study rapid diagnosis methods, ecology, loss analysis and control of the chicory soft rot.

## III. Scope and reserch

We have conducted reserch for 3 years.

### 1. Rapid diagnosis methods of chicory soft-rot pathogen

We have studied method of possible isolation and identification of chicory soft-rot in a short period of time by modifying traditional identificational techniques, Biolog program and raised antibody against chicory soft-rot pathogen.

### 2. Ecology of chicory soft-rot pathogen

We have observed growth curve, the optimum pH, the optimum temperature and colony forming unit, relationship between soil humidity and population density of soft-rot pathogen and monitoring system for the soft-rot pathogen in soil.

### 3. Loss analysis by chicory soft-rot pathogen

We have studied cultivated area and infection rate in chicory field, Kangwon-Do.

### 4. Control of chicory soft-rot pathogen

We have studied control measures of the pathogen by chemical and biological tretments.

## IV. Results and proposal of practical use

### 1. Rapid diagnosis methods of chicory soft-rot pathogen

We developed the easiest and fastest way to isolate the pathogen by potato slice inoculation method. Potato slices were inoculated with infected tissue of chicory, and the bacteria were isolated from potato slice showing soft-rot. *Erwinia* species which were facultative anaerobes and had peritrichous flagella under electron microscope were selected.

Thus only three days were needed to identify *Erwinia* species based on potato slice inoculation method. *E. carotovora* subsp. *carotovora* were identified by Schaad's Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic and Bergey's Manual of Systemic Bacteriology. In Biolog test, we found 85% similarity with *E. carotovora* subsp. *carotovora* in microplates that had wells of 95 carbon sources and amino acids. In serological test, we produced antibody in rabbit blood and used for ELISA. It showed no cross-reaction with other microorganisms and so specific for *E. carotovora* subsp. *carotovora*. We used it for rapid diagnosis upto  $10^{-4}/\text{ml}$  of soft-rot pathogen.

## 2. Ecology of chicory soft-rot pathogen

We have studied ecological aspects of the pathogens. The bacteria population increased rapidly at exponential phase 4 hours after inoculation. The optimum temperature of the pathogen was between 28°C and 30°C and optimum pH was broad ranging from pH 4.0 to pH 9.0. We also decided relationship between colony forming unit and optical density and so it could be possible to estimate the inoculum density of the pathogen with O. D. value. High content of the water was found to be important for the increase of the pathogen, suggesting that humid soil condition would be critical environmental factor for outbreak of the soft-rot in chicory field. We also raised antibody in rabbit and used for ELISA to monitor the pathogen in soil. It was observed that ELISA would be rapid and efficient method to monitor ecological dynamics of the pathogen in soil.

## 3. Loss analysis by chicory soft-rot pathogen

Chicory cultivation area was about 150 ha in Kangwon-Do and number of household of farmer growing chicory was 139 within Inje gun. Other fungal pathogens such as *Alternaria* spp. also isolated, suggesting these might be interacting with *E. carotovora* subsp. *carotovora* to cause soft rot. Also, several insects such as moth and aphid were found, suggesting these would be possible vectors for transmission of the pathogens.

## 4. Control of chicory soft-rot pathogen

We found effective chemicals to control the pathogen were mixed Nongyongshin water compound and copper compound. Maximum control rate was about 70% in chicory field. For biological control, we isolated antibiotic producing bacteria from soil and identified *Bacillus* species based on biochemical tests. *Bacillus* species successfully controlled the soft-rot in greenhouse test.

These research results will be immediately applied as following.

- 1) utilize pathogens as germplasm of microorganisms
- 2) rapid diagnosis methods can be used to diagnosis soft-rot diseases of other vegetable crops
- 3) rapid diagnosis methods can be used produced as kits
- 4) chemicals and antibiotic producing bacteria of soft-rot pathogen on chicory can be used as control measures.



## CONTENTS

Chapter 1. Introduction.....	1
1. Objective and Importance of the reserch.....	1
Chapter 2. The scope and content of reserch.....	3
1. Rapid diagnosis methods of chicory soft-rot pathogen.....	3
2. Ecology of chicory soft-rot pathogen.....	6
3. Loss analysis by chicory soft-rot pathogen.....	7
4. Control of chicory soft-rot pathogen.....	7
Chapter 3. Results.....	8
1. Rapid diagnosis methods of chicory soft-rot pathogen.....	8
2. Ecology of chicory soft-rot pathogen.....	31
3. Loss analysis by chicory soft-rot pathogen.....	36
4. Control of chicory soft-rot pathogen.....	38
Chapter 4. Achievements and contributions.....	46
Chapter 5. Applications.....	47

# 목 차

제 1 장	서 론.....	1
제1절	연구개발의 목적과 범위.....	1
제 2 장	연구개발 내용 및 범위.....	3
제1절	치커리 무름병원균의 조기진단법 개발.....	3
제2절	치커리 무름병의 발병생태 연구.....	6
제3절	치커리의 재배면적 및 피해도 조사.....	7
제4절	치커리 무름병 종합적 방제대책 개발.....	7
제 3 장	연구개발수행 결과	
제1절	치커리 무름병원균의 조기진단법 개발.....	8
제2절	치커리 무름병의 발병생태 연구.....	31
제3절	치커리의 재배면적 및 피해도 조사.....	36
제4절	치커리 무름병 종합적 방제대책 개발.....	38
제 4 장	연구개발목표 달성도 및 대외기여도.....	46
제 5 장	연구개발결과의 활용계획.....	47

# 제 1 장 서론

## 제1절 연구개발의 목적 및 중요성

### 가. 연구개발의 목적 및 중요성

#### 1) 기술적 측면

고냉지 치커리 재배현장에서의 가장 큰 애로사항인 치커리무름병을 종합적으로 방제하기 위해서는, 치커리 재배포장으로부터의 세균성무름병원균(*E. carotovora* subsp. *carotovora*)분리 및 동정법 개발, 무름병원균의 생태, 환경과 무름병 발병과의 상관관계, 치커리 재배면적 및 무름병에 의한 피해면적 조사에 대한 연구가 필수적이다. 우선 치커리분리 및 동정의 경우, 치커리 포장에서의 무름병원균을 조기에 검출(detection)하여, 무름병을 조기에 진단(rapid diagnosis)할 수 있는 방법을 개발해야 한다. 둘째로, 치커리무름병원균의 생태, 즉 무름병원균의 생활사 및 전반 과정에 관한 연구는 무름병 방제와 직결되는 문제이므로, 치커리무름병의 전염원 및 전반 과정에 대한 정확한 규명이 필요하다. 셋째로, 현재까지 산발적으로 추정되고 있는 치커리의 재배면적을 자세히 조사하고, 이들 재배지역에서의 무름병 피해상황에 대한 통계처리가 시급히 요구된다. 마지막으로 이상의 연구결과를 바탕으로 고냉지 치커리무름병의 종합적 방제기술을 개발하고, 이 기술을 바탕으로, 강원도내 주요 경제작물들, 즉, 배추, 감자, 무, 당근 무름병(치커리무름병과 동일한 세균인 *E. carotovora* subsp. *carotovora*에 의해 무름병 발생)방제 기술 개발에 활용할 수 있도록 접목시켜야 한다고 사료된다.

#### 2) 경제·산업적 측면

치커리는 강원도내에서만 집단으로 재배되고 있는 고소득작물로서, 국내에서의 수요가 증가하고 있을뿐만 아니라, 액기스등으로 가공되어 일본등으로 수출되고 있다. 또한 치커리 재배면적이 매년 급속도로 증가하고 있으며(1993년 129 ha, 1994년 234 ha), 무름병에 의한 피해면적 역시 확산되고 있는 추세이다. 실례로 치커리재배 농민의 보고에 의하면, 재배면적의 1/3이 무름병으로 인하여 경제적 손실을 입었다는 것으로 보아, 무름병에 의한 경제적 손실은 재배면적의 확산에 비례하여 증가할 것이라는 것은 쉽게 예상된다. 특히, 지금의 우루과이라운드에 의한 수입개방이 계속된다면, 외국으로 부터의 저렴한 채정된 치커리가 국내에 유입될 가능성이 매우 높고, 이에 따른 일본등으로의 치커리수출에도 상당한 타격을 받을 수 있다. 더불어, 치커리에 무름병을 야기시키는 *E. carotovora* subsp. *carotovora*는 강원도내의 주요 경제작물들, 예로서 배추재배(배추재배의 74.4%가 강원도에서 이루어짐, 농림수산부 통계)에 가장 치명적인 병의 하나임을 감안할때, 치커리병원균에 의한 배추재배지역에서의 경제적 손실도 매우 클 가능성이 크다. 그러므로, 치커리무름병의 방제는 치커리뿐만 아니라 강원도내의 경제작물에서의 경제적 손실과 직접 연관되어 있는, 현장으로 사항으로 간주된다.

#### 3) 사회·문화적 측면

현재 우리나라는 우루과이라운드로 농민이 곤경에 처해져 있다. 이를 극복하기위해, 농업이 전문적 기술개발에 의한 고소득작물재배를 함으로써, 외국과의 경쟁력강화 방향으로 농경정책이 설정되고 있는 실정이다. 이에 따라, 강원도에서는 그 지역적 특성을 장점으로, 경제작물 또는 특용작물 재배에 주안점을 두고 있으며, 강원도는 치커리뿐만 아니라 배추, 감자, 무등의 작물재배로 유명하다. 그러므로, 본 연구과제는 강원도내의 치커리재배 농민이 고품질의 치커리를 재배하게 함으로써 고소득을 보장해 줄뿐만 아니라, UR 개방에 의한 외국수입농산물에 대한 우위를 지키게할 수 있을 것으로 사료된다.

## 나. 국내의 관련기술의 현황

최근의 일본식물병리학회의 보고에 의하면 *Erwinia chrysanthemi*가 치커리의 뿌리에 무름증상을 일으키는 것으로 알려져 있으나, 본 세균병에 의한 피해조사 및 방제법에 대한 연구는 초기단계에 있다고 본다. 특히 일본의 치커리재배 지역에서 심각한 문제가 되고 있는 세균이 *E. chrysanthemi*인 반면, 강원도에서 집단재배되고 있는 치커리의 무름병원균이 *E. carotovora* subsp. *carotovora*이므로, 본 세균의 방제에 대한 연구는 이루어 지지 않고 있다.

한편, 국내에서 이루어진 치커리무름병에 관한 연구는 강원대학교 자원생물환경학부 세균학실험실에서 이루어진 결과뿐이다. 지금까지의 연구개발실적을 요약하면 다음과 같다.

- 1) 치커리에 무름병을 야기시키는 세균은 *E. carotovora* subsp. *carotovora*로 동정됨.
- 2) 치커리 무름병원균의 조기동정법이 개발됨(전통적 방법에 준한 동정이 최소 4개월이 소요되는 반면 개발된 조기동정법의 경우 4일이면 충분).
- 3) 치커리 무름병의 최적생장온도 및 산도에 대한 결과를 얻음.
- 4) 치커리 세균성 무름병을 조기에 동정할 수 있는 항혈청이 개발됨.
- 5) 치커리 재배면적 및 피해상황에 관한 조사가 실시되고 있음.

따라서, 본 결과들을 활용하여 무름병의 생태, 조기진단법 및 방제기술개발에 관한 연구를 계속적으로 실행할 예정이다.

## 다. 앞으로 전망

조기진단법개발로 짧은기간내에 치커리포장에서의 무름병 동정 및 진단이 가능하며, 교육을 통하여 비전문가도 쉽게 진단기술을 습득할 수 있다. 또한 무름병의 발생예찰 시뮬레이션모델개발로 무름병의 발병가능성을 농민들에게 알려줌으로써, 무름병의 발병을 조기에 차단할 수 있다. 특히 본 연구에서 다루고 있는 세균은 다른 경제작물들, 즉 배추등에 심각한 피해를 주고있는 무름병원균과 동일하므로, 본 연구에서 확립될 방제기술은 배추등의 무름병 방제에 즉시 활용할 수 있다. 한편 현재 토양성세균병의 방제 기술개발에 관한 연구는 매우 초기단계에 불과하므로, 본 연구의 결과는 토양성세균병 방제기술개발에 커다란 공헌을 할 수 있으리라 전망된다.

## 라. 기술도입의 타당성

치커리 무름병의 종합적 방제 기술개발을 위해서는, 외국으로 기술도입을 하기보다는, 자체적인 기술개발이 요구된다고 할 수 있다. 그 이유는, 미국, 유럽 및 일본과 같은 외국의 치커리 재배지역에서 문제가 되고 있는 세균이 *P. cichorii*나 *E. chrysanthemi*인데, 이들 세균은 우리나라의 치커리재배 지역에서 문제가 되고 있는 *E. carotovora* subsp. *carotovora*와는 생태적, 지형학적으로 매우 다르므로, 외국에서의 방제기술을 국내에 도입하기가 매우 어렵다. 일본의 경우, 무름병원균이 *E. chrysanthemi*로, 우리나라에서의 *E. carotovora* subsp. *carotovora*와 같은 토양성 세균병이나, 일본 역시 치커리무름병에 관한 연구가 초기단계에 불과하므로, 자체내 방제기술개발이 시급히 요구된다.

## 제 2 장 연구개발 내용 및 범위

본 과제의 목표달성을 위한 이론적, 실험적 접근방법을 원리위주로 기술하면 아래와 같다.

### 제1절 치커리 무름병원균의 조기진단법 개발

치커리무름병원균을 재래식 방법에 준하여 수행할 경우 전문적인 지식이 없으면 정확한 동정을 하기가 매우 어렵다. 특히 우리나라와 같이 “식물세균병리학자”가 희소한 경우는 더욱 그렇다. 그 뿐 만 아니라 “무름병원균의 분리 및 병원성검정”과 “지침서에 의한 동정실험”을 수행하기 위해서는 장기간의 시간 역시 요구되고 있다. 따라서 본 연구에서는 소요되는 시간을 줄이고 수행과정을 단순화하여, 비전문가도 짧은 기간동안에 쉽게 무름병원균을 동정할 수 있는 방법을 모색하였다. 즉, 치커리 무름병원균의 조기진단법개발은 전통적 동정기술을 이용한 조기진단법, Biolog를 이용한 조기진단법, 항체를 이용한 조기진단법을 개발하였다.

#### 1. 전통적 동정 기술을 이용한 치커리 무름병원균의 조기진단법 개발

치커리 무름병원균은 토양성세균이므로, 무름증상을 나타내는 병환부에서 세균들을 분리하였을 경우, 대부분의 세균들이 토양에서 서식하고 있는 부생세균(saprophytic bacteria)들이기에, 치커리에 병원성을 나타내는 *E. carotovora* subsp. *carotovora*를 분리하기가 매우 어렵다. 물론 CVP(Crystal Violet-Pectate)배지와 같은 선택배지가 있으나, CVP배지는 만들기 복잡하고, *E. carotovora* subsp. *carotovora*만을 선택적으로 분리하지도 못한다. 따라서 본 연구에서는, *E. carotovora* subsp. *carotovora*가 감자에서도 강한 무름증상을 나타내고, 혐기상태에서도 성장할 수 있는 세균(facultative anaerobic bacteria)이고, Gram stain에 음성(negative)이며 주생모(peritrichous flagella)를 지닌다는 점을 착안하여 “치커리무름병원균의 분리 및 병원성 검정”법을 개발하였으며, 그 과정을 정리하면 아래와 같다.

#### 과정 1: 치커리무름병원균의 enrichment(기간: 12시간)

치커리 무름병환부에서 무름병원균의 밀도를 높이기 위하여 감자절편을 이용하였다. 즉, 무름증상을 나타내는 치커리 병환부 조직을 마쇄한 후 마쇄조직을 감자절편에 접종하여 28°C의 항온기에서 배양하였다. 배양 12시간 후 감자절편에서 강한 무름증상을 나타내는 이병조직으로부터 *E. carotovora* subsp. *carotovora*균을 분리하였다.

#### 과정 2: 조건적 혐기성(facultative anaerobe)이며 Gram stain에 음성이 세균분리(기간: 3일)

식물병원세균중에서 Gram stain-negative이며 facultative anaerobic인 세균이 *Erwinia* species임에 착안하여 본 실험을 실시하였는데 그 과정은 아래와 같다. 감자에서 무름증상을 나타내는 절편을 절단하여 70% 알콜용액에 표면살균한 후 마쇄하였고, 평판희석법으로 mannitol-glutamate yeast(MGY)배지에 도말배양(smear culture)하여 28°C의 항온기에서 배양하였다. 배양 48시간 후 배지상에 나타난 단일 colony로 부터 세균을 순수분리한 후 조건적 혐기세균을 선별하였다. 즉, Bromthymol blue(1% solution)을 peptone을 첨가한 test tube배지를 만든 후 분리세균을 접종하였다. 접종 후 녹인 파라핀(melted paraffin)으로 test tube 입구를 봉(close)하여 혐기상태로 만든다음 28°C에서 배양하였다. 배양 20시간 후 test tube내의 배지색이 노란색으로 변하면, 분리세균이 혐기세균이다. 이후 3% KOH 용액을 떨어뜨린 slide glass에 분리세균을 접종하여 smear를 만든다음, loop를 이용하여 점액도를 알아보았을 때 loop에서 점액성(sticky)을 나타내면 Gram-negative 세균이다.

과정 3: Facultative anaerobic이며 Gram stain-negative인 세균의 병원성 검정(기간: 12시간)

과정 1, 2를 통하여 선발한 "facultative anaerobic and gram stain-negative" 세균들을 "과정 1"에서 이용한 방법과 유사한 방법으로 병원성을 검정하였다. 즉, 세균을 loop를 이용하여 감자절편에 접종한 후, 28°C 배양기에서 배양하였다. 배양 12시간 후 무름증상을 나타내면 100% "Erwinia species"라고 단정할 수 있다.

과정 4: 전자현미경(Electron microscope)을 이용한 Erwinia species의 확인(기간: 6시간, optimal)

전자현미경을 이용하여 병원성 세균의 편모(flagella)를 관찰하여 주생모이면 Erwinia species임을 100% 확신할 수 있다. 그러나 본 방법은 전자현미경이라는 고가의 실험기계 및 사용상의 전문성을 요구하기에 비전문가가 직접 실험을 수행하기에는 큰 어려움이 있다고 할 수 있다. 다만, 전자현미경의 경우 전문가에게 의뢰하여 병원세균의 편모를 확인함으로써 분리세균이 Erwinia species임을 "視覺的"으로 100% 확신할 수 있다는 강점이 있다.

**2. Biolog를 이용한 치커리 무름병원균의 조기동정법**

Biolog system은 2일 정도의 짧은 시간과 간단한 실험재료가 필요할 뿐 만 아니라, 비전문가라 할지라도 간단한 교육과정을 통하여 쉽게 치커리무름병원균을 동정할 수 있다. Biolog system을 이용한 치커리 무름병원균의 동정과정을 요약하면 아래와 같다.

과정 1: Soft rot causing Erwinia species의 배양과 탄수화물 및 아미노산 이용도 조사(기간: 2일)

병원성이 확인된 세균을 GN medium(Biolog Inc., U.S.A.)에 접종하여 28°C에서 24시간 배양한다. 배양세균을 95개의 탄수화물과 아미노산이 들어있는 Microplate에 0.85% saline solution을 만들어 세균을 optical density가 0.08~0.17이 되도록 현탁한 후 치상하였다. 그 결과를 4시간과 24시간 후에 각각 관찰하였다.

과정 2: 탄수화물 및 아미노산 이용도 분석과 동정(기간: 3시간)

95개의 탄수화물과 아미노산이 들어있는 Microplate의 결과를 table에 기록(양성은 "+"로, 음성은 "-"로 표기)한 후, 기록한 결과를 personal comouter에 입력되어있는 Erwinia species의 결과와 비교하였다.

**3. 항체를 이용한 치커리 무름병의 조기진단법 개발**

치커리무름병의 대량발생을 조기에 방지하기 위해서는 짧은 시간내에 저렴한 비용으로 실시할 수 있는 조기진단법이 절실히 요구되고 있다. 이를 위해서는 PCR(Polymerase Chain Reaction)을 이용한 DNA probe의 개발도 가능한데, 본 방법은 sample준비과정, 처리시간 등의 문제점이 있다. 반면 본 연구에서 개발된 polyclonal antibodies를 이용한 ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)는 많은 sample은 짧은 시간내에 정확히 치커리무름병을 조기진단할 수 있는 방법이다. 이에 "치커리 무름병원균 polyclonal antibodies생산 기술개발"과 "ELISA를 이용한 치커리무름병의 조기진단법개발"에 중점을 두었다.

즉, 치커리무름병원균을 면역원으로하여 항체(polyclonal antibodies)를 생산하여 실험을 수행하였으며, 생산된 Anti-live EC46 항혈청을 이용하여 치커리무름병의 조기진단기술을 개발하였다. 진단기술로는 In-direct ELISA를 사용하였으며, "ELISA를 이용한 치커리무름병원균의 항체생성 유무확인", "ELISA를 이용한 치커리무름병원균항체 교차반응 유무확인", "Live-EC46항체를 이용한 ELISA진단기술개발"에 관한 연구를 집중적으로 수행하였다. 그 과정은 아래와 같다.

가. 치커리 무름병원균 항체 생성

#### 과정 1: 항체생산을 위한 치커리 무름병원균의 처리방법

항체생산을 위하여 치커리(*Cichorium intybus* L. var. *foliosum*)에 무름병을 발생시키는 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*(EC46으로 명명함)를 3가지 방법(live EC46, glutaraldehyde-fixed EC46 및 heat-treated EC46)으로 처리하였는데 처리방법을 요약하면 다음과 같다. Live EC46의 경우 EC46균주를 MGY 고체배지에서 15시간 배양한 후 phosphate-buffered saline(PBS)으로 현탁액을 만들었다. 현탁액을 원심분리로 2회 반복하여 세균을 씻어(washing)준 후, PSB용액에서 optical density(OD)<sub>600nm</sub>=1.0으로 맞추었다. Glutaraldehyde-fixed EC46의 경우 EC46 현탁액(OD=1.0 at 600 nm)을 2% glutaraldehyde에서 3시간 고정된 후, 여분의 glutaraldehyde를 제거하기위하여 PBS용액에서 24시간 동안 씻었다. Heated EC46의 경우, EC46현탁액(OD=1.0 at 600 nm)을 끓는 물에 2시간동안 처리하였다.

#### 과정 2: 항원주사 및 혈액으로부터 항혈청(antiserum)분리

준비된 세가지 항원(정확한 표현은 면역원:immunogen) 즉 live EC46, glutaraldehyde-fixed EC46 및 heat-treated EC46각각을, 동량의 Freund's complete adjuvant와 충분히 혼합한 다음 토끼(New Zealand white rabbit)의 등쪽 피하조직으로 각각 주입하였다. 1차 boosting의 경우, 각각의 면역원과 동량의 Freund's incomplete adjuvant를 충분히 혼합한 다음 재주입하여 2주일이 지난 후에 토끼의 귀로부터 50ml의 혈액을 채취(1차 혈액채취)하였다. 이후 2차 boosting을 위하여 1차 혈액채취 2주 후에 동일한 방법으로 각각의 면역원을 재주입하여 다시 2주가 경과한 후, 50ml의 혈액을 채취하였다(2차 혈액채취). 3차 boosting의 경우 2차 혈액채취 2주 후에 동일한 방법으로 각각의 면역원을 재주입하였으며, 다시 2주가 지난다음 50ml의 혈액을 채취하였다(3차 혈액채취).

항혈청(antiserum) 분리의 경우, 채취한 혈액의 상층액을 2회 원심분리한 후 filter membrane(0.2 $\mu$ m millipore)로 여과시키서 생성된 액을 0.1% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>와 혼합하여 -20℃에 보관하였다.

#### 과정 3: 치커리 무름병원균의 항혈청생성유무 검정

항혈청생성유무를 확인하기위하여 Ouchterlony 이중확산법(Ouchterlony double diffusion)을 수행하였다. 즉 PBS에 0.75%의 purified agar를 녹인 후 플라스틱 petri-dish에 15 ml 분주하였다. Agar가 고체화된 것을 확인한 다음 3mm의 wells를 3mm간격으로 만들었다. 가운데 wells에는 항혈청(anti-live EC46, anti-glutaraldehyde-fixed EC46 및 anti-heated EC46)을, 주위의 wells에는 항원(live EC46, glutaraldehyde-fixed EC46 및 heated EC46)을 각각 주입하였다. 주입 후 4<sup>o</sup>C에 유지하면서 침강선의 생성유무를 관찰하였다.

#### 과정 4: 치커리 무름병원균의 sero-type 분석

치커리 무름병원균과 국내에서 분리한 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 균주 22개와의 혈청학적 관계를 규명하기 위하여 Ouchterlony 이중확산법을 수행하였다. 이를 위하여 각 균주들을 100℃에서 30분간 열처리하였으며 항체로는 anti-live EC46를 사용하였다.

#### 과정 5: 치커리무름병원균의 항혈청 titer 측정

1, 2, 3차에서 채취한 혈액으로부터 얻은 각각의 항체를 PBS에서 serial dilution하여 petri-dish에 한방울씩 떨어뜨린 후, live EC46(OD<sub>600nm</sub>=0.1)를 항체위에 떨어뜨렸다. 반응 4시간 경과후 광학현미경으로 침전물의 생성유무로써 항혈청 titer를 측정하였다.

나. ELISA를 이용한 치커리무름병원균의 항체생성 유무확인

Ouchterlony double diffusion test로서 crude한 항혈청생산을 확인한 후, ammonium sulfate

를 이용하여 항혈청을 부분정제하였다. 이후 Indirect-ELISA방법으로 항체의 생성유무를 확인하였다. 항원으로는 치커리무름병원균을 positive control로, *E. coli*, 건전한 토기에서 채혈한 혈액 및 *Pseudomonas putida*를 negative controls로 사용하였다.

다. ELISA를 이용한 치커리무름병원균항체 교차반응 유무확인

Indirect-ELISA를 이용하여 치커리무름병원균과의 교차반응을 살펴보았다. 치커리무름병원균을 positive control로, 양파 및 생강에서 분리한 무름병원균, *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, *E. chrysanthemi*, *P. marginalis*를 negative controls로 사용하였다.

라. Live-EC46항체를 이용한 ELISA진단기술개발

항체로서 crude EC-46항체와 partially purified EC46항체를 사용하였으며, Indirect-ELISA를 실시하였다. 항원으로는 순수분리된 Ecc 24균주, Eca 2균주, *E. carotovora* subsp. *wasabiae* 1균주, *E. chrysanthemi* 1균주, *P. marginalis* 1균주, *P. putida* 1균주 및 *E. coli*를 사용하였다.

마. 기내에서의 ELISA조기진단기술 활용

치커리 무름병원균 항체를 이용하여 실제 포장으로부터 병원세균을 조기진단하는 것을 목표로 하였다.

## 제2절 치커리무름병의 발병생태연구

생태에 대한 기초자료로서 치커리무름병의 생리에 관한 연구를 수행하였다. 생리에 관한 연구로서는 치커리무름병의 생장곡선, 산도측정 및 최적온도를 측정하였다. 또한 치커리 무름병원균의 밀도 측정 방법인 C. F. U. 조사, 토양습도와 치커리 무름병의 발생관계, 토양내 치커리 무름병원균 monitoring법 개발을 목표로 하였다.

### 1. 치커리 무름병원균 생장곡선 조사

치커리 무름병원균을 배지에 접종한 후, 시간에 따른 O. D. 값을 spectrometer (spectronic 20, Milton Loy)를 이용하여 측정하였다.

### 2. 치커리 무름병원균 최적온도 조사

치커리 무름병원균을 배지에 접종한 후, 20℃ - 40℃까지 2℃간격으로 최적온도범위를 조사하였다.

### 3. 치커리 무름병원균 최적산도 조사

치커리 무름병원균을 배지에 접종한 후, pH 4.0부터 pH 9.0까지 pH 1.0간격으로 최적산도범위를 조사하였다.

### 4. 치커리무름병원균의 c. f. u. 조사

치커리무름병원균을 배지에 접종한후, 시간에따른 O. D. 값을 측정하였다. c. f. u.는 serial dilution plating방법으로 계산한 후, O. D. 값과 c. f. u.와의 상관관계를 log paper에서 산출하였다.



#### 5. 토양습도와 치커리무름병의 발생관계

토양을 isotemp merchine(Fisher Scientific)으로 가열하여 토양수분함량을 0%로 맞춘 후, 멸균수를 가하여 20, 40, 60, 80, 100%로 맞추었다(토양수분함량= 수분무게/토양무게 x 100). 이후 치커리 무름병원균을 토양에 접종하였다. “토양습도가 치커리무름병에 미치는 영향” 조사의 경우, 시간에 따라 토양을 채취하여 dilution plating 방법으로 토양내에 존재하는 치커리무름병원균의 밀도를 측정하였으며, “토양습도가 치커리무름병의 발생에 미치는 영향” 조사에서는 토양에 치커리를 심은후, 시간에 따른 이병율을 계산하였다.

#### 6. 토양내 치커리 무름병원균 monitoring법 개발

조절된 수분함량을 지닌 토양에 치커리 무름병원균을 접종한후, 시간에 따른 토양내 치커리 무름병원균의 밀도를 ELISA 방법으로 monitoring하였다.

### 제3절 치커리의 재배면적 및 피해도 조사

치커리가 집단적으로 재배되고 있는 인제군을 중심으로 직접 방문하여 재배상황, 재배면적 및 무름병에 의한 피해상황을 조사하였다.

### 제4절 치커리 무름병 종합적 방제대책 개발

치커리 무름병의 화학적, 경종적, 생물적 및 종합적 방제대책 확립을 목표로 실험을 수행하였다.

#### 1. 화학적 방법에 의한 치커리 무름병 방제

기초 실험으로서 기내 약제방제실험은 농용신 수화제, 쿠퍼 수화제, 혼용제를 사용하였다. 포장시험의 경우는 농용신 수화제와 쿠퍼수화제 및 후루아지남 분제를 사용하였다. 약제처리 방법으로는 실내시험의 경우 치커리 뿌리 절편에 약제 살포 후 공시균을 접종하였으며, 포장시험의 경우 공시균주를 접종 후 약제를 살포하였다. 이후 약제의 의한 방제가를 백분율로 계산하였다.

#### 2. 생물학적 방법에 의한 치커리 무름병 방제

치커리 무름병원균에 대해 길항력을 가지고 있는 미생물을 선발하여 생물학적 방제방법에 사용하고자 실시하였다. 먼저 춘천시 근교의 토양으로부터 분리한 균주를 NB 액체배지(meat extract 0.3%, peptone 0.5%)에 접종하여 30℃에서 3일간 진탕배양하였다. 배양액을 12,000×g에서 20분간 원심분리 후 치커리 무름병원균(*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*)을 대상균으로하여 paper disk법으로 항균활성을 측정하였다. 그 방법은 치커리 무름병원균을 피검균으로 하여 cup method법으로 실시하였다. MGY 배지에 치커리 무름병원균을 28℃, 24시간 배양한 후 TSA 배지에서 배양된 항균균주의 배양층을 cup(내경 6mm, 외경 8mm, 높이 10mm)에 올려놓고 28℃에서 48시간 배양하였다.

항균균주의 동정은 Bergey's manual of determinative bacteriology, Bergey's manual of systematic bacteriology 및 Schaad 지침서를 이용하여 동정을 수행하였다.

## 제 3 장. 연구개발수행 결과

### 제1절 치커리 무름병원균의 조기진단법 개발

개발된 “조기동정법”과 “전통적 동정법”의 특성을 정리하였다(표 1 참조).

표 1. 치커리 무름병원균 조기동정법의 장점

구 분	전통적 동정법	조기동정법
병원성 검정	분화한 치커리에 병원균 접종	감자절편에 병원균 접종
병원균 동정방법	Bergey's manual 및 Schaad지침서에 준한 동정	간단한 전통적 방법, Biolog-system, ELISA를 이용한 동정방법
동정의 난이도	전문적인 동정기술이 요구	간단한 교육과정 후 동정 가능
동정에 필요한 시약	소모적이고 지속적인 공급이 요구	Microplate 등의 간단한 시약 공급
경제성	고가의 비용 요구	5만원정도의 비용 요구
동정에 필요한 기간	4 ~ 6개월	7 ~ 10일

#### 1. 전통적 동정법을 이용한 치커리 무름병의 조기진단법

표 1에서 기술하였듯이 개발된 조기동정법은 비전문가도 짧은 기간동안에 저렴한 가격으로 치커리 무름병원균을 동정할 수 있는 방법이다. 본 기술을 개발하기 위하여 “치커리로부터 *E. carotovora* subsp. *carotovora*의 분리 및 병원성 검정”과정을 단순화하였다. 즉, 이병 치커리뿌리에서 무름병원균을 직접분리하지 않고 치커리 이병조직을 감자절편에 치상하여 무름병원균을 enrichment시켰다(그림 1 참조). 감자절편에서 무름병원균을 enrichment시켰을 때, *E. carotovora* subsp. *carotovora*균을 효과적으로 분리할 수 있음이 확인되었다. 이후 감자절편에서 분리한 세균중에서 *Erwinia species*를 선별하기 위하여 “조건적 혐기성 테스트(그림 2 참조)” 및 “전자현미경적 관찰(그림 3 참조: optional)”을 하였다. 만약 식물병원세균중 감자절편에 무름병을 발생시키고, 혐기적으로 자라며, 주생모를 지닌 세균으로 판명되면 *Erwinia species*로 100% 확신할 수 있다.

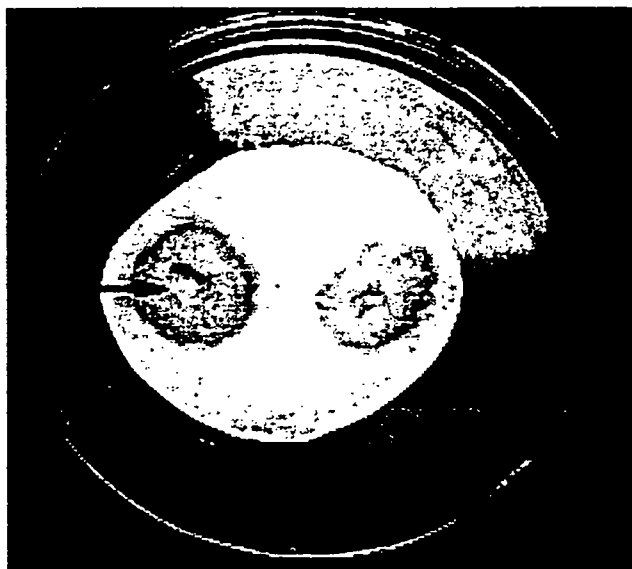


그림 1. 감자절편에서의 치커리 무름병원균 enrichment. 무름증상을 나타내는 치커리조직을 감자 절편에 치상한 후 12시간 배양하였을 때 나타나는 무름증상. “화살표”가 enrichment에 사용한 치커리 절편을 표시.

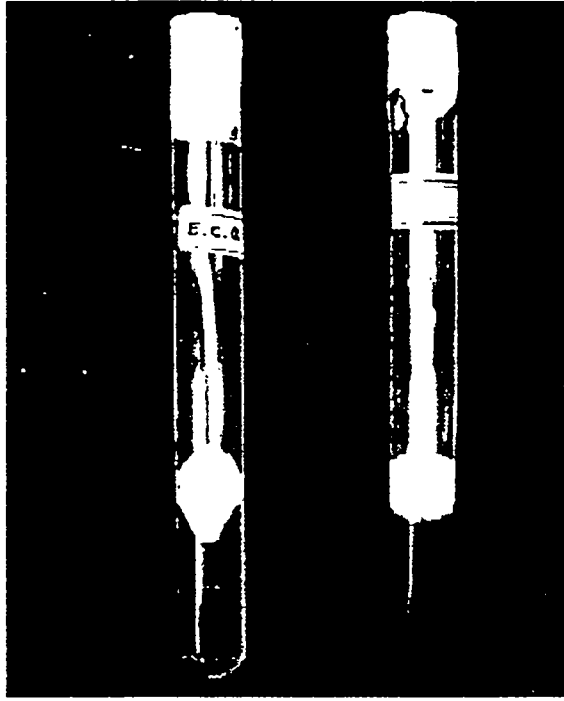


그림 2. *Erwinia species* 조기동정법 개발에 중요한 검색표가 되는 “조건적 혐기테스트”. 왼쪽 test tube가 혐기적으로 자라고 있는 치커리 무름병원균으로 노란색을 나타냄. 오른쪽 test tube는 대조구로서, 혐기적으로 자라지 못하는 세균을 접종하였을때의 모습으로 배지색이 푸른색을 나타냄.



그림 3. 치커리에서 분리한 *E. carotovora* subsp. *carotovora*의 전자현미경 사진(Zeiss E. M 109, Germany).

한편 전통적 동정법에 준한 생화학테스트를 조사해 본 결과, 3가지의 생화학테스트결과로 무름 병원균을 정확히 동정할 수 있었다(표 2 참조).

표. 치커리 무름병원균을 동정하는데 필요한 생화학테스트 선발

Test	<i>E. carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>	<i>E. carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	<i>E. chrysanthemi</i>	<i>E. cypripedii</i>	<i>E. rhapontici</i>	EC46 <sup>a</sup>	EC10	EC12	EC16	EC1
Pectate degradation	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
facultative anaerobically	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Peritrichous flagella	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Potato soft rot	+	+	+	-	w	+	+	+	+	+
Gelatin liquefaction	+	+	V <sup>b</sup>	-	-	+	+	+	+	+
Acetoin production	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Sensitivity to erythromycin	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
Phosphatase	-	-	+	V	V	-	-	-	-	-
Gas from glucose	-	-	V	+	-	-	-	-	-	-
Lesithinase	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-
Indole	-	-	V	-	-	-	-	+	-	+
Pigment production	-	-	V	-	+	-	-	-	-	-
Reducing substances from sucrose	V	+	V	-	V	+	-	-	+	-
Growth at 36-37°C	-	+	+	+	V	+	+	+	+	+
Acid production from:										
D-lactose	+	+	V	-	+	+	+	+	+	+
trehalose	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
maltose	V	-	V	+	-	-	-	-	-	-
methyl α-d glucoside	+	-	-	-	V	-	-	-	-	-
melibiose	+	+	V	+	+	+	+	+	+	+
cellobiose	+	+	V	+	+	+	+	+	+	+
palatinose	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Utilization of:										
malonate	-	-	+	V	+	-	-	-	-	-
galacturonate	+	+	+	+	V	+	+	+	+	+

<sup>a</sup> : EC46, EC10, EC12, EC16, EC1은 치커리, 감자, 배추, 당근, 와사비(고추냉이)에서 각각 분리한 *E. carotovora* subsp. *carotovora*균주들. <sup>b</sup> : +=양성, -=음성, w=반응이 약함, V=반응이 일정치 않음.

표 2에서 나타나듯이, 3가지 생화학조사(외곽선으로 표시), 즉 36-37°C에서의 성장여부, methyl α-d glucoside 및 palatinose의 이용조사만으로도 *E. carotovora* subsp. *carotovora*균주들을 동정할 수 있다.

## 2. Biolog를 이용한 치커리 무름병의 조기진단법

Biolog system을 이용하거나 전통적 동정법을 3-4가지만 실시하여 무름병원균을 최종적으로 동정하였다. Biolog system의 경우, 95가지의 탄수화물과 아미노산이 첨가된 microplate에서의 실험 결과(그림 4 참조)를 Biolog system에 입력되어 있는 *Erwinia* species의 결과와 비교(그림 5 참조)하였다. 이때 치커리에서 분리한 *Erwinia* species세균과 이미 입력된 *E. carotovora* subsp. *carotovora*세균을 비교해 본 결과 85%이상의 높은 유연관계를 나타내었다.

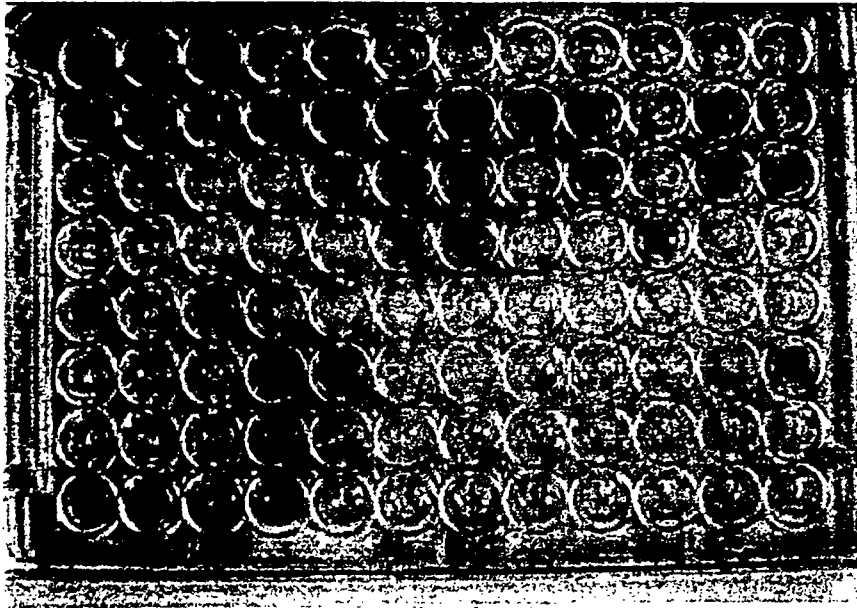


그림 4. 치커리 무름병원균을 95개의 탄수화물과 아미노산이 들어있는 microplate에 접종한 후 24시간 후에 관찰한 모습(진한 보라색으로 변한 wells이 “양성”이며 변색을 보이지 않는 wells이 “음성”임)

BIO NUMBER : 0025-2773-7763-7540-0005 6030-0010-3477

SPECIES IDENTIFICATION : ERWINIA CAROTOVORA SS CAROTOVORA

CLOSEST SPECIES	SIM.	DIST.	AVG.	MAX
1) ERWINIA CAROTOVORA SS CAROTOVORA	0.858	2.046	1.363	6.116
2) ERWINIA CHRYSANTHEMI	0.000	4.307	1.719	5.406
3) ERWINIA CAROTOVORA SS ATROSEPTICA	0.000	6.545	1.250	4.275
4) ERWINIA CAROTOVORA SS BETAVASCULORUM	0.000	8.904	0.206	1.494
5) ENTEROBACTER SAKAZAKII	0.000	10.832	0.613	5.675
6) ENTEROBACTER AGGLOMERANS BIGROUP 2 B	0.000	13.794	1.315	3.300
7) RAHNELLA AQUATILIS	0.000	15.131	1.011	4.325
8) VIBRIO CHOLERAE	0.000	15.369	2.094	3.669
9) ESCHERICHIA VULNERIS	0.000	15.445	0.975	4.239
10) VIBRIO METSCHNIKOVII	0.000	15.831	1.556	4.606
Other :	.....	.....	.....	.....

그림 5. Biolog program을 이용하여 치커리 무름병원균의 동정. 치커리 무름병원균이 Biolog program에 입력된 *E. carotovora* subsp. *carotovora* 균주와 85%이상의 유사도(similarity)를 지님.

그림 5. Biolog program을 이용하여 치커리 무름병원균의 동정. 치커리 무름병원균이 Biolog program에 입력된 *E. carotovora* subsp. *carotovora* 균주와 85%이상의 유사도(similarity)를 지님.



### 3. 항체를 이용한 치커리무름병의 조기진단법 개발

치커리무름병원균의 항체를 생산하기 위하여 준비된 세가지 항원 즉, live EC46, glutaraldehyde-fixed EC46 및 heat-treated EC46 각각을 토끼의 등쪽 피하조직(그림 6 참조)에 주입하여 혈액을 채취하였다(그림 7 참조) .



그림 6. 토끼(New Zealand white rabbit)의 등쪽 피하조직으로 면역원(immunogen)을 주입하는 모습.



그림 7. 토끼귀의 혈관으로부터 혈액을 채취하는 모습.

채취한 혈액에 항혈청이 생성되었는지를 Ouchterlony 이중확산법으로 확인하여 보았다(그림 8 참조). “그림 8”의 결과에 의하면 서로다른 면역원 처리방법이 항체의 생성자체에는 커다란 영향을 주지 않았다. 하지만 anti-heated EC46항체를 사용하여 Ouchterlony 이중확산법을 수행하였을때는 침강선의 형성유무가 일정하지 않았기에, 치커리 무름병의 조기진단법 개발을 위해서는 항원을 live상태 또는 glutaraldehyde로 고정하여 사용하는 것이 더욱 효과적이라고 사료된다. 또한 항체와 항원간의 침강선의 모양을 자세히 살펴보면 한 개 이상의 주요 침강선(major precipitin band)를 생성하는 것으로 보아 1개이상의 주요 epitope가 존재함을 알 수 있었다.



그림 8. Ouchterlony 이중확산법에 의한 항혈청 생성유무검정. 전반적으로 볼 때, 생성된 항체는 항원과 반응하여 침강선을 형성하였다. 그러나 anti-heated EC46항체(그림의 C에 해당)와 glutaraldehyde-fixed EC46항원(그림의 2에 해당)과는 침강선을 형성하지 않았다. 따라서 치커리 무름병 조기진단법 개발을 위해서는 anti-live EC46항체 나 anti-fixed EC46항체를 사용해야한다고 사료된다.

그림 설명. 1, live EC46, ; 2, glutaraldehyde-fixed EC46; 3, heat-treated EC46(이상 항원).  
A, anti-live EC46; B, anti-fixed EC46; C, anti-heated EC46(이상 항체)

치커리 무름병원균과 국내에서 분리한 *E. carotovora* subsp. *carotovora* 균주 22개와의 혈청학적 관계를 구명하기 위하여 Ouchterlony 이중확산법을 수행하였다(그림 9 참조). "그림 9"에서 보여주듯이 22개의 국내 균주 중 양파에서 분리한 균주만이 치커리 무름병원균 항체와 반응하여 선명한 침강선을 형성하였다. 본 결과는 치커리 무름병원균과 양파 무름병원균은 동일한 sero-type임을 알려주는 것이다. 반면 다른 21개의 균주들은 치커리 무름병원균의 항체와 반응하지 않았다. 본 결과는 매우 중요한 내용으로써 치커리와 양파 이외의 작물에서 발생하는 무름병을 조기에 진단하기 위해서는 이들 작물에서 분리한 *E. carotovora* subsp. *carotovora* 균주들을 이용하여 polyclonal antibodies를 생산해야함을 시사해 주고 있다. 또한 국내에 존재하는 *E. carotovora* subsp. *carotovora* 균주들은 다양한 sero-type를 지니고 있음을 알 수 있다.

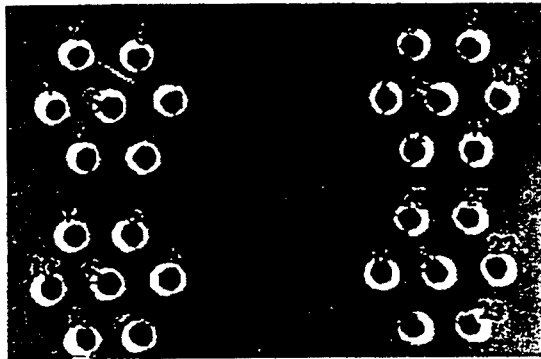


그림 9. 치커리 무름병원균과 국내에서 분리한 *E. carotovora* subsp. *carotovora* 균주 22개와의 혈청학적 관계를 구명하기 위하여 Ouchterlony 이중확산법을 수행한 모습. 그림에서 보듯이 치커리 무름병원균을 항원으로 생성된 anti-live EC46을 항체로 사용했을 때, 국내에서 분리한 항원(번호1부터 23로 표기)중에서 항원 3번(EC46, 대조구로서 치커리 무름병원균)과 항원 17번(양파에서 분리한 무름병원균)만이 반응을 보였다. 본 결과에 의하면, 치커리 무름병원균과 혈청학적으로 유사한 균주는 국내에 매우 적으리라 사료된다. 한편 치커리 무름병원균과 양파 무름병원균은 같은 계통의 sero-type로서 sero-type 1으로 명명하였다.

한편 항원을 live상태로 사용하였을 때 보다 phenol로 처리한 후 Ouchterlony 이중확산법을 실시하였을 때 더욱 선명한 침강선을 관찰할 수 있었다(그림 10). 본 결과는 무름병원균의 sero-type를 정확히 확인하기 위해서는 항원을 phenol로 처리하는 것이 보다 효과적임을 시사해 주었다.

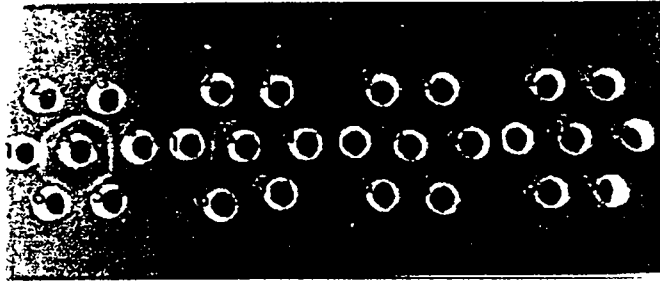


그림 10. 항원을 live상태로 사용하였을 때 또는 phenol을 처리했을 때 나타나는 침강선의 모습. 그림의 중요한 내용만을 요약하면 다음과 같다. 그림의 A는 항체로서 anti-live EC46임. 그림의 1은 live EC46인 반면 3은 phenol을 처리한 EC46 임. 그림에 나타나듯이, 항체 A와 항원 3(phenol 처리한 EC46)사이에서 형성된 침강선과 항체 A와 항원 1(live EC46)사이에서 형성된 침강선을 관찰해 보면 항체 A와 항원 3의 침강선이 더욱 분명함을 알 수 있다. 그러므로 항원-항체 간의 sero-type를 분석할 때는 항원을 phenol처리하는 것이 더욱 분명한 결과를 나타낸다고 사료된다(그밖의 그림에 대한 설명은 편의상 생략함).

분리한 항혈청의 질(quality)을 알아보기 위하여 항혈청 titer 측정을 실시하였다(표 3 참조). 2, 3차에서 채취한 항혈청의 반응결과에 의하면 항원을 live 또는 glutaraldehyde로 고정하였을 경우 모두 동일한 titer(1:256)를 나타내었다. 반면 항원을 열처리(heated)하였을 경우는 titer가 현격히 감소하였다. 그러므로 차기년도에 개발할 ELISA를 이용한 치커리 무름병 조기 진단법 개발의 경우 anti-live EC46 또는 anti-fixed EC46를 사용하는 것이 바람직함을 알 수 있었다.

표 3. Drop agglutination방법에 의한 항혈청 titer 측정

	Reciprocal of antisera titer		
	Anti-live EC46	Anti-fixed EC46	Anti-heate EC46
1차 혈액 채취	256	ND*	ND
2차 혈액 채취	256	256	32
3차 혈액 채취	256	256	128

\*:Not Determined

○ ELISA를 이용한 치커리 무름병원균의 항체 생성 유무 확인

Ouchterlory double diffusion(ODD)test를 이용하여 crude한 항혈청의 생성을 확인(그림 11)한 후, ammonium sulfate와의 침전반응을 통하여 얻은 부분 정제된 Anti-live EC46를 희석하여 사용하였다. MGY 액체배지에서 약 12시간 배양한 균주들을 PBS에서 현탁한 후, coating buffer를 이용하여 약  $10^7$  cells/ml로 맞추고 끓는 물에서 15분간 열처리하여 항원으로 사용하였다. ELISA용 96-well microplate에 항원을 주입한 후 37℃에 1시간 정치시키고, 부분 정제된 Anti-live EC46를 PBS에서 1/10, 240-1/655, 360으로 희석하여 항원과 반응시켰다. 37℃에서 1시간 정치된 항원-항체 결합체에 alkaline phosphatase가 결합된 secondary antibody(anti-rabbit IgG)를 첨가시키고 37℃에서 1시간 정치시켜 항원-항체-secondary antibody 결합체를 형성시켰다. 그 후 alkaline phosphatase와 반응하는 기질 p-nitrophenyl phosphate를 첨가시키고 실온에서 기질의 반응을 관찰하였다. 약 5-6분 경과 후, 효소에 의해서 분해된 기질은 무색에서 노란색으로 변화(그림 12)하였으며, 변화의 정도를 ELISA reader를 사용하여 수치로 나타내었다. Lane A는 면역원으로 사용된 EC46과 Anti-live EC46과의 반응, lane B는 *E. coli* DH5a와 Anti-live EC46과의 반응, lane C는 면역원을 주입하기 전 채취한 혈청과 EC46과의 반응, lane D는 *Pseudomonas putida*와 Anti-live EC46과의 반응을 각각 나타내고 있다. Lane A와 C를 비교해 보면, Anti-live EC46은 EC46에 대해서 생산된 것을 알 수 있으며, lane A에 의해 background 수치(A 405nm=0.093)의 두배 이상을 나타내는 수치(A 405nm=0.23)에 해당하는 항혈청 희석률 1/163,840을 Anti-live EC46의 역가로 결정하였다. 또한 lane B와 D의 결과에서는, EC46은 *E. coli*와 근연관계를 가지고 있으며 *Pseudomonas putida*와는 근연관계가 먼 균주임을 제시하고 있다(그림 13).

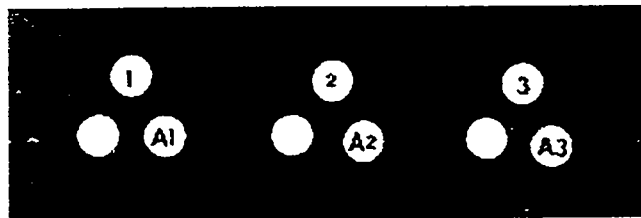


그림 11. 세 종류로 처리한 항원(live EC46, fixed EC46, heated EC46)과 생성된 세 종류의 항혈청(Anti-live EC46, Anti-fixed EC46, Anti-heated EC46)과의 Ouchterlory double diffusion pattern. S1=Anti-live EC46, S2=Anti-fixed EC46, S3=Anti-heated EC46, 1=live EC46, 2=fixed EC46, 3=heated EC46, Unmarked wells were filled with sera bled, respectively, from three rabbits before three kinds of immunogens were injected.

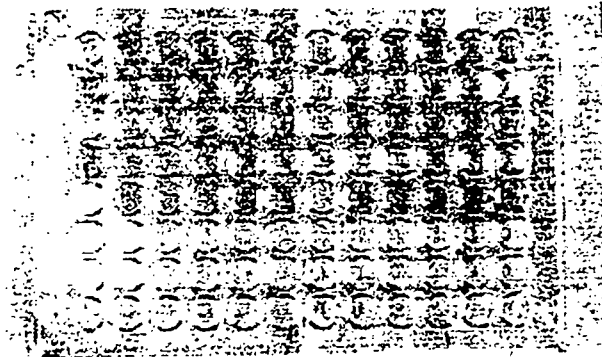


그림 12. Indirect ELISA 반응에서 alkaline phosphatase에 의해 분해되는 p-nitrophenyl phosphate의 반응 정도를 보여주고 있는 96-well microplate.



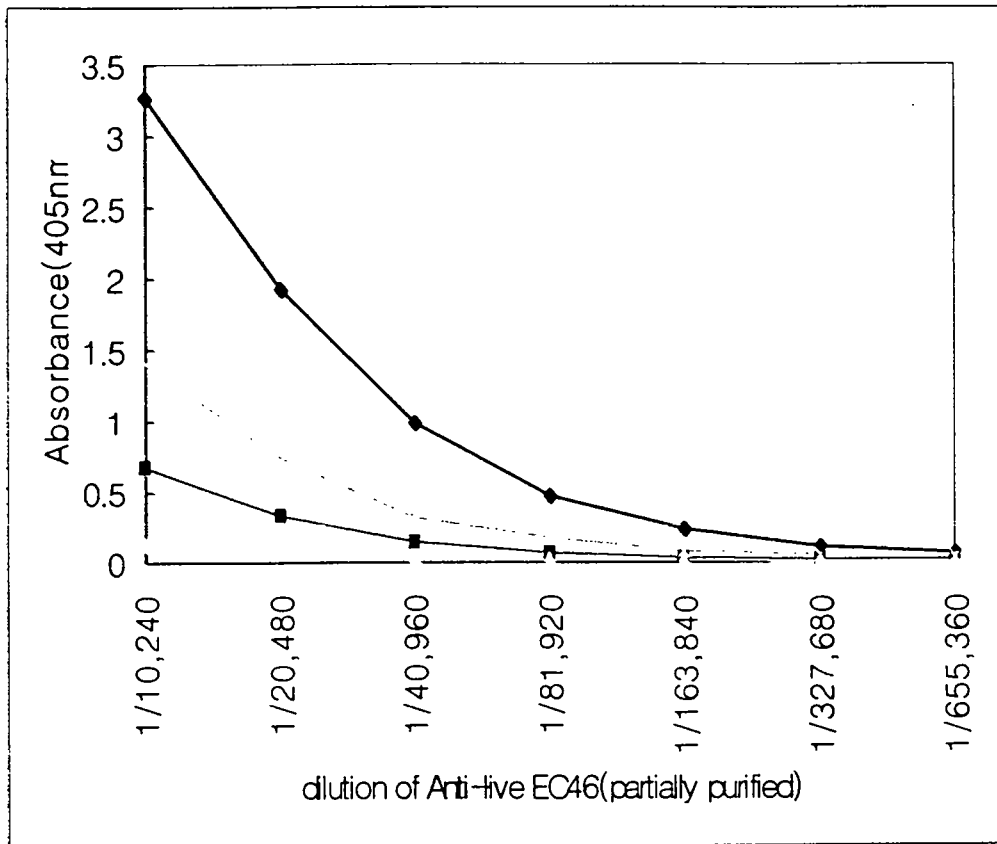


그림 13. EC46에 대한 Anti-live EC46의 생성유무를 확인하기 위한 ELISA 반응결과. lane A: reaction of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*(Ecc) with Anti-live EC46, B: reaction of *E. coli* with Anti-live EC46, C: reaction of Ecc with serum bled before injection, D: reaction of *Pseudomonas putida* with Anti-live EC46 .

○ ELISA를 이용한 치커리무름병원균의 항체생성 유무확인

Indirect ELISA에 의해 부분 정제된 Anti-live EC46과 분리 지역 및 기주가 다른 *Erwinia carotovora* 및 다른 pectolytic strains인 *E. chrysanthemi*, *P. marginalis*와의 교차반응을 조사하였다(그림 14). 그 결과, Ecc strains은 높은 흡광도를 나타내었으며 *E. carotovora* subsp. *atroseptica*(Eca)는 보다 낮은 흡광도를 나타내었고, *E. chrysanthemi*와 *P. marginalis*는 더욱 낮은 흡광도를 나타내었다. 위의 결과로 볼 때, Anti-live EC46은 종 단위까지는 교차반응이 없으며 *P. marginalis*는 혈청학적 유연관계가 매우 낮아 ELISA에서 (-)control로서 사용하기에 적합하리라 생각된다.

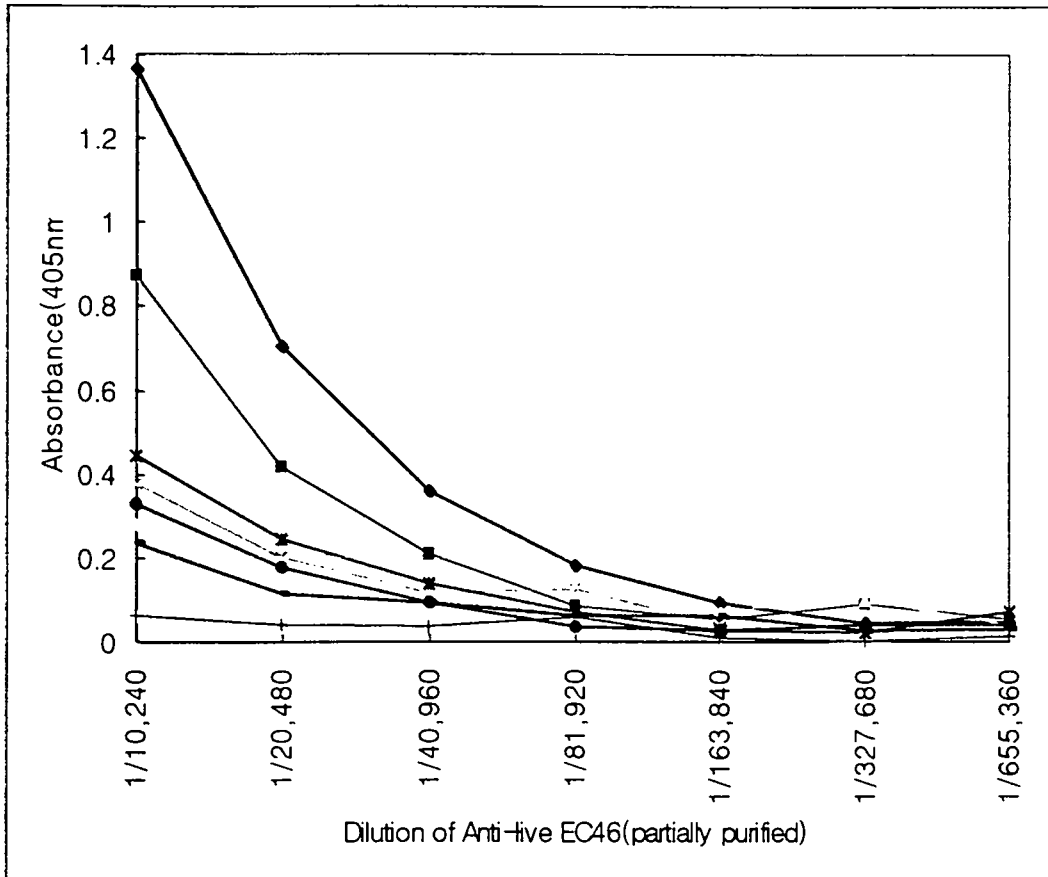


그림 14. 부분 정제한 Anti-live EC46과 *Erwinia*, *Pseudomonas*속간의 ELISA를 이용한 교차반응 조사. lane A: *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* of chicory, B: *E. carotovora* subsp. *carotovora* of onion, C: *E. carotovora* subsp. *carotovora* of ginseng, D: *E. carotovora* subsp. *carotovora* of potato, E: *E. carotovora* subsp. *atroseptica* originated from Japan, F: *E. carotovora* subsp. *atroseptica* of potato, G: *E. chrysanthemi* of radish, H: *P. marginalis* of lettuce

○ Live-EC46항체를 이용한 ELISA진단기술개발

ELISA에 의해 생산과 교차반응의 유무가 확인된 Anti-live EC46을 치커리 무름병의 조기 진단에 이용하기 위하여 실험을 수행하였다. 먼저 ODD test를 통해서 치커리 무름병의 조기 진단 시 이용 가능성을 조사하였으며, 여러 균주들과 crude 상태의 Anti-live EC46 혹은 부분 정제된 Anti-live EC46를 반응시켜 indirect ELISA에 적합한 항혈청의 처리 조건을 조사하였다. 또한 부분 정제된 Anti-live EC46을 사용한 치커리 무름병의 진단 시 검출 가능한 cell 수를 조사하였으며, 항원의 처리 상태에 따른 검출 한계점을 조사하였다. 순수 분리된 Ecc 24 균주, Eca 2 균주, *E. carotovora* subsp. *wasabiae* 1 균주, *E. chrysanthemi* 1 균주, *P. maginalis* 1 균주, *P. putida* 1 균주, *E. coli* 1 균주를 ODD test 와 indirect ELISA의 공시 균주로 사용하였다.

○ ODD test에서 Anti-live EC46과 다양한 균주와의 반응

토끼로부터 채취한 항혈청을 0.2 $\mu$ m filtering tube에서 여과시켜 얻은 crude 상태의 Anti-live EC46과 phenol 처리한 균주들을 ODD test로 반응시킨 결과, 치커리 무름병원균과 양파 무름병원균 2 균주들만이 분지선(spur)를 형성하지 않고 선명한 침강선을 보인 반면, 나머지 29 균주들은 아주 흐린 침강선을 형성하거나 침강선을 형성하지 않았다(그림 15). Test 결과로 볼 때, crude 상태의 Anti-live EC46을 ODD test에 이용한다면 치커리 무름병원균과 양파 무름병원균을 검정할 수 있다. 그러나 혈청학적으로 다양한 Ecc 균주에 돌연변이가 생긴다면, ODD test에서 침강선을 형성하지 않는 다른 Ecc 균주와 마찬가지로 검출할 수 없게 되므로, 보다 반응성과 특이성이 뛰어난 indirect ELISA를 이용하기로 했다.

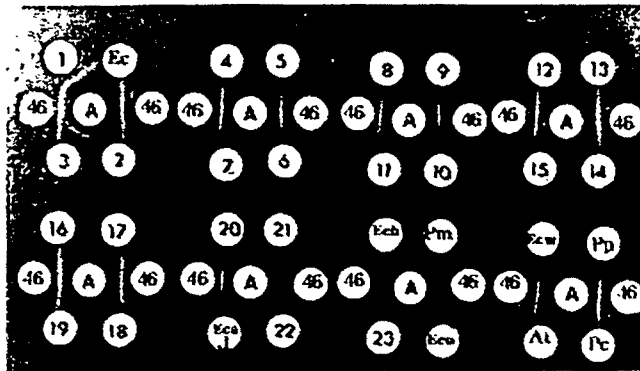


그림 15. Crude 상태의 Anti-live EC46과 다양한 균주들과의 ODD pattern. Center well의 Anti-live EC46과 좌우 두 well의 EC46과의 반응에서 생긴 침강선을 대조구로 사용하였다. Eca : *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, Ech : *E. chrysanthemi*, Ecw : *E. carotovora* subsp. *wasabiae*, Pm : *P. maginalis*, Pp : *P. putida*, Ec : *E. coli*, the other wells : *E. carotovora* subsp. *carotovora*, ( ↓ ) : 치커리 무름병원균, ( ↓ ) : 양파 무름병원균.

○ Indirect ELISA에 적합한 항혈청의 처리.

Indirect ELISA를 기본으로 연구를 수행하였다. 약  $10^3$  cells/ml의 농도로 31 균주들이 coating된 96-well microplate에 crude 상태의 Anti-live EC46과 부분 정제된 Anti-live EC46를 각각 반응시켰다. 실험 결과, crude 상태의 Anti-live EC46은 ODD test에서 선명한 침강선을 형성한 치커리 무름병원균 및 양파 무름병원균과는 가장 높은 수치의 흡광도를 나타내었다. 아주 흐린 침강선을 형성하거나 침강선을 형성하지 않은 몇몇 Ecc 균주들과는 다소 낮은 수치의 흡광도를 나타냈으며, *E. carotovora* subsp. *atroseptica* 2 균주, *E. chrysanthemi* 1 균주, *E. carotovora* subsp. *wasabiae* 1 균주, *E. coli* 1 균주 역시 (-) control로 사용한 *P. marginalis*과 *P. putida*보다 높은 흡광도를 나타내었다(그림 16-A).

반면에 부분 정제된 Anti-live EC46은 치커리 무름병원균과 양파 무름병원균 2 균주에서만 특이적으로 반응하였으며, 다른 균주들은 모두 *p. marginalis*보다 낮은 흡광도를 나타내었다(그림 16-B). 두 결과를 비교해 보면, indirect ELISA에서 crude 상태의 Anti-live EC46은 혈청학적으로 다양한 Ecc 균주들을 검정하는데 있어 부분 정제된 Anti-live EC46보다는 유리하나 Ecc 균주 이외의 다른 균주들과도 교차반응을 보이므로 특이성이 떨어졌다. 반면에 부분 정제된 Anti-live EC46은 ECC 25 균주들 중 단지 2 균주만을 검정할 수 있는 단점이 있으나 치커리 무름병원균과 특이적으로 반응한다는 장점을 가지고 있으므로 치커리 무름병의 조기 진단에 바람직하다고 생각된다.

그림 16-A)

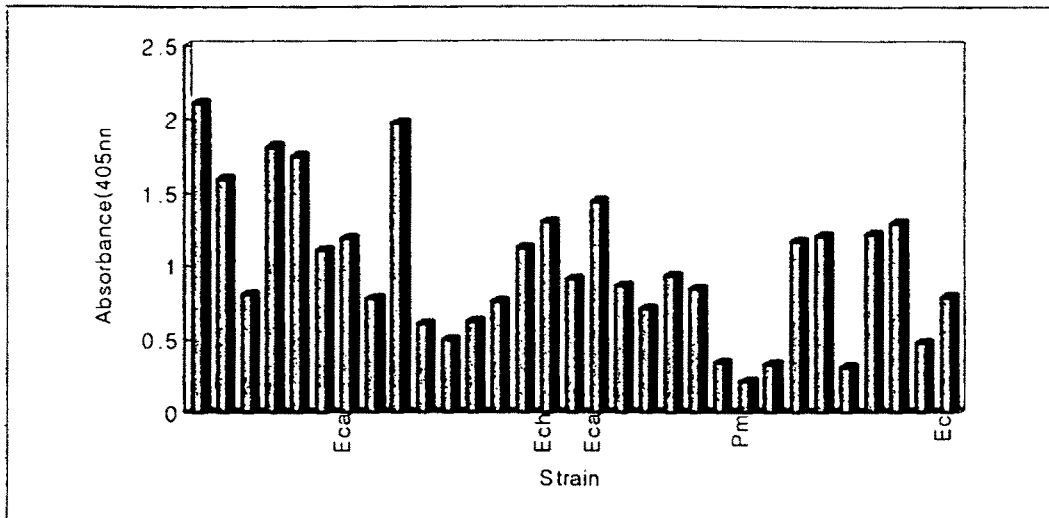


그림 16-B)

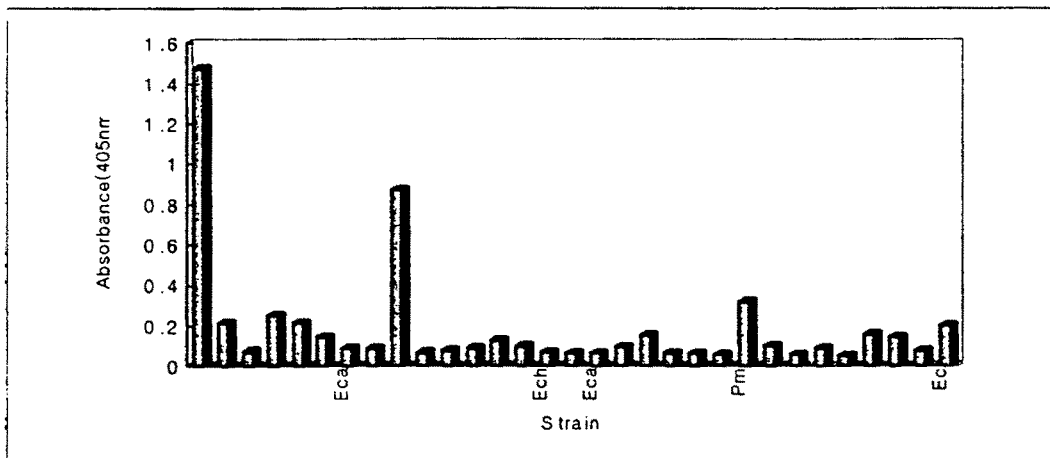


그림 16. (A) Crude 상태의 Anti-live EC46과 다양한 균주들과의 indirect ELISA 반응 결과. (B) 부분 정제된 Anti-live EC46과 다양한 균주들과의 indirect ELISA 반응 결과. Eca : *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, Ech : *E. chrysanthemi*, Ecw : *E. carotovora* subsp. *wasabiae*, Pm : *P. maginalis*, Pp : *P. putida*, Ec : *E. coli*, the others : *E. carotovora* subsp. *carotovora*, ( ↓ ) : 치커리 무름병원균, ( ↓ ) : 양파 무름병원균.

○ 치커리 무름병원균의 처리 방법에 따른 검출 한계점

Indirect ELISA에서 치커리 무름병원균의 검출 가능한 cell 수와 항원의 처리 방법에 따른 검출 한계점을 조사하기 위해, PBS에서 현탁한 항원을 약  $10^9$ - $10^1$  cells/ml으로 다양하게 희석한 후 아무런 처리하지 않은 live 상태의 항원과 끓는 물에서 15분간 열처리한 항원을 각각 microplate에 coating하였으며, 부분 정제된 Anti-live EC46과 반응시켰다. 실험 결과, (-) control로 사용한 *P. putida*의 흡광도(A 405nm=0.171)의 두배 이상(A 405nm=0.734)에 해당하는 cell의 수를 검출 한계점으로 보았을 때, live 상태 혹은 열처리한 치커리 무름병원균의 검출 한계는 모두  $10^5$  cells/ml이었으나 흡광도는 live 상태에서 높게 나타났다(그림 17).

위의 실험들에의하면, indirect-ELISA방법으로 치커리무름병을 조기진단할 경우, live상태로 처리한 항원과 부분 정제된 Anti-live EC46을 반응시키는 것이 바람직하다.

그림 17-A)

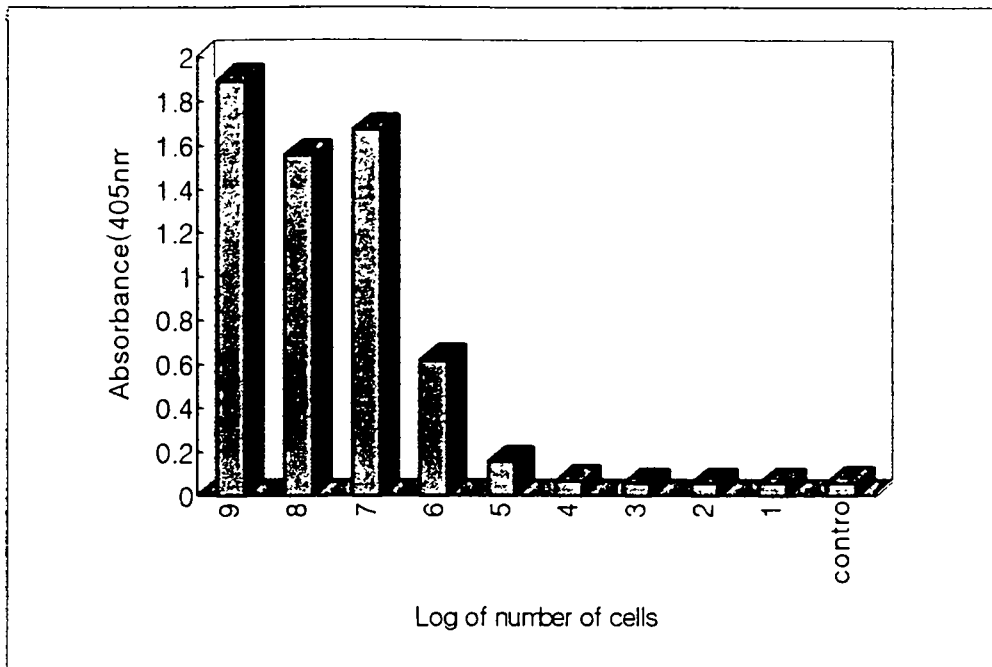


그림 17-B)

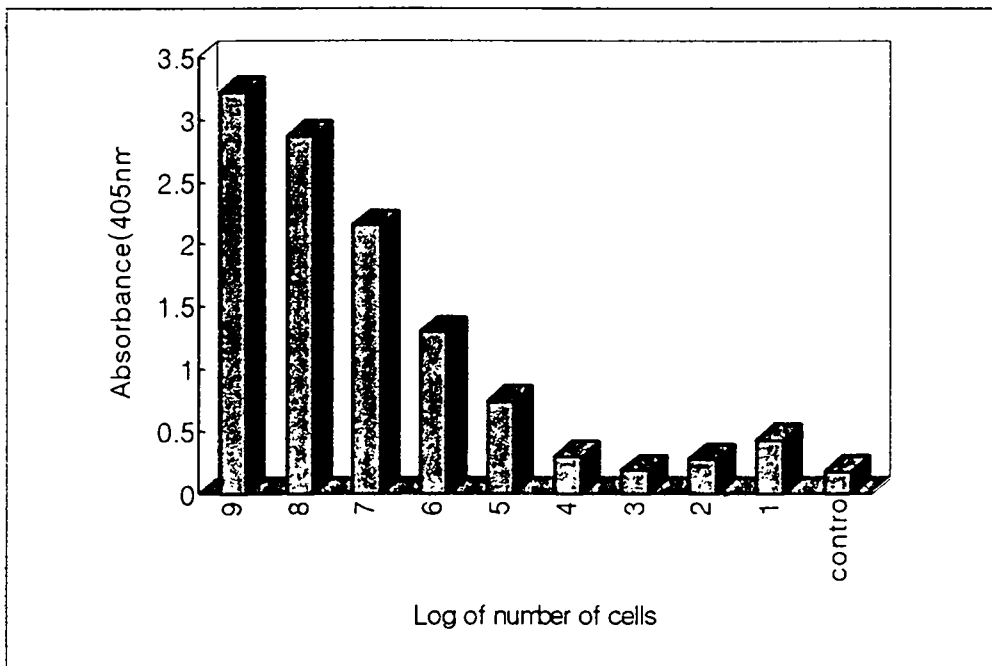


그림 17. 부분 정제된 Anti-live EC46과 live 상태 혹은 열처리한 치커리 무름병원균과의 반응 (A) 열처리한 치커리 무름병원균, (B) Live 상태의 치커리 무름병원균.

○ 기내에서의 ELISA조기진단기술 활용

치커리 무름병원균 항체를 이용하여 실제 포장으로부터 병원세균을 조기진단하는 것을 목표로 하였다. 이에 기내에서 멸균된 토양에 치커리 무름병원균을 약  $10^8$  cells/ml로 처리한 뒤 토양 10g을 멸균수에 현탁하여 28℃ 진탕배양기에서 2시간 배양한 후 상층액을  $10^{-6}$ 까지 희석하여 ELISA를 실시하였다. 그 결과  $10^{-4}$ 까지 진단이 가능하였다.

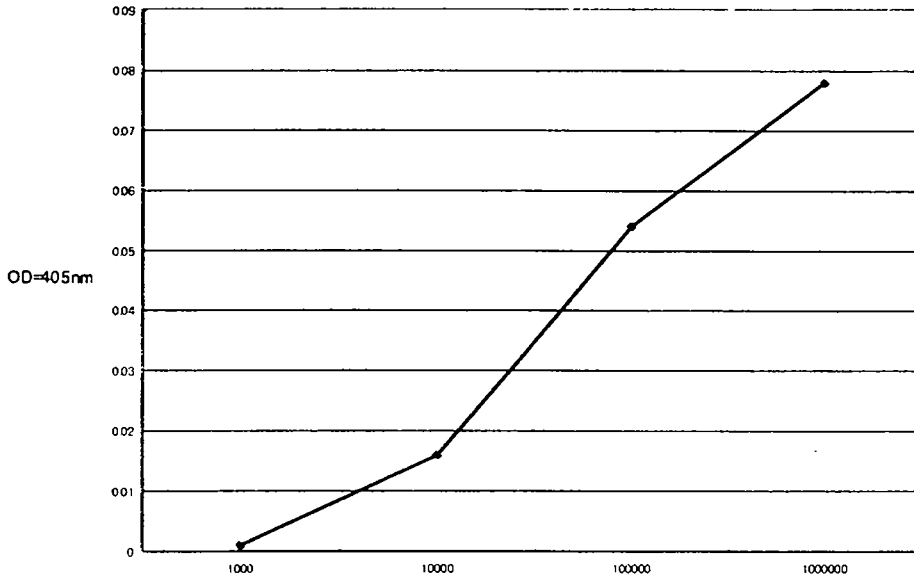


그림 18. 치커리 무름병원균 항체를 이용한 기내에서의 ELISA조기진단



## 제2절. 치커리 무름병의 발병생태연구

치커리 무름병의 생태연구에 관한 연구를 수행하였다(그림 19, 20, 21 참조). 실험결과에 의하면, 치커리무름병원균은 접종 4시간만에 대수기를 시작으로 10시간 후에는 안정기에 이를 정도로 매우 빠르게 성장하고 있는 세균임을 알 수 있었다. 또한 치커리무름병원균은 pH 4~pH 9의 매우 넓은 산도에서 생장을 할 수 있는 세균으로, 30°C전후의 성장적온을 지니고 있음이 관찰되었다.

그러므로 치커리무름병원균은 토양의 산도에 큰 영향을 받지 않으며, 다른 식물병원세균에 비하여 성장속도도 빠르고 고온에서 잘자라므로, 여름철에 대량으로 발생할 수 있는 매우 무서운 세균임을 알 수 있었다. 특히, 세균들이 습도를 좋아하는 일반적인 성향을 고려해 볼 때, 여름철 장마 후 고온 다습한 시기에 치커리무름병이 대량으로 발생할 가능성이 매우 높다고 사료된다.

온도조사

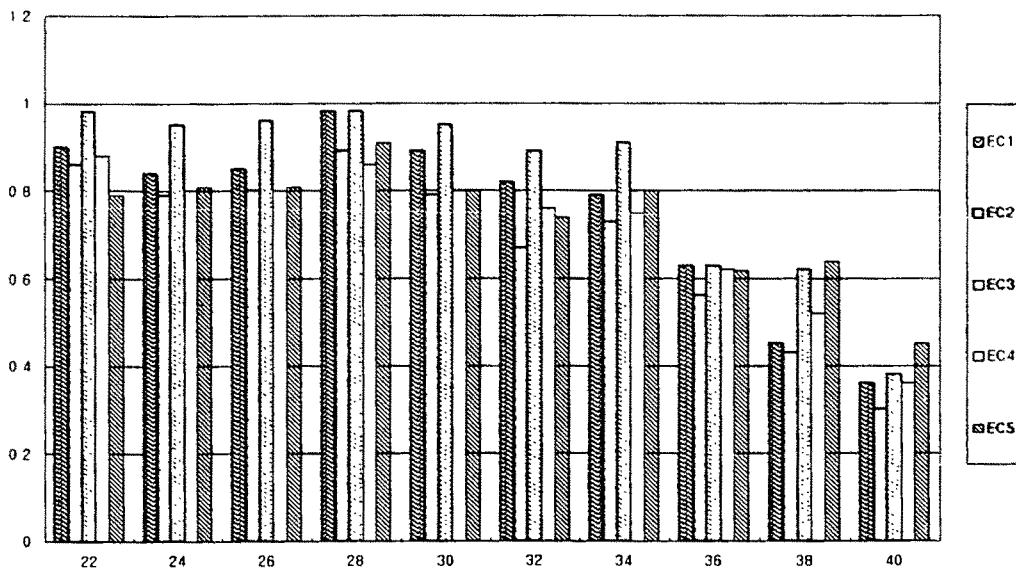


그림 19. 치커리 무름병원균의 최적온도 조사.

### 생장곡선

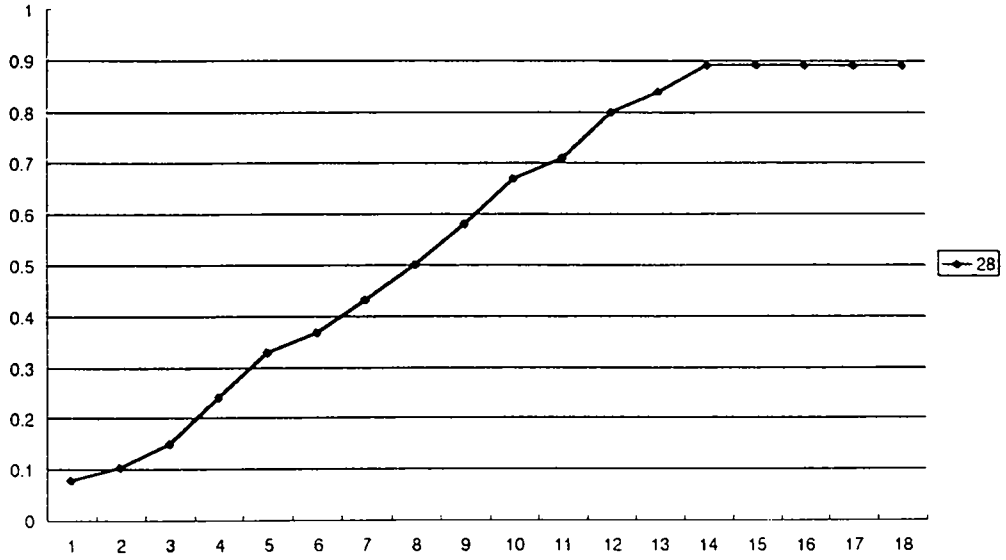


그림 20. 치커리 무름병원균의 생장곡선.

### 산도조사

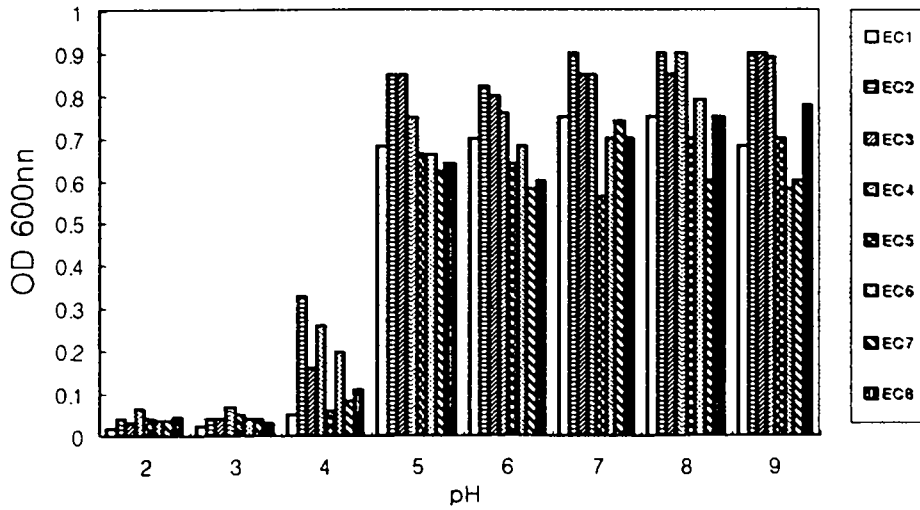


그림 21. 치커리무름병원균의 최적산도 조사.

○ 치커리무름병원균의 c. f. u. 조사

치커리 무름병원균을 일반 배지인 MGY (Mannitol Glutamic acid Yeast esxtract) 액체 배지에 초기 OD(optical density) 600nm에서 0.06으로 병원균을 접종하여 28℃로 배양하였다. 1시간 간격으로 OD를 측정하고 OD의 변화에 따라 배양액에서 1ml을 채취한 후 MGY 고체 배지에 도말 배양하여 28℃에서 24시간에 얻어지는 colony의 수를 측정하였다. 그 결과 얻어지는 각각의 OD에 따른 colony수를 측정할수 있었다. 아래의 그림에서 보는 것 처럼 OD 0.1에서는  $6.29 \times 10^7$ , 0.4에서는  $2.32 \times 10^8$ , 0.9에서는  $5.6 \times 10^8$ , 1.0에서는  $1.81 \times 10^9$ 이었다(그림 22).

○ 토양습도와 치커리무름병의 발생관계

재배 토양에서 토양 10g을 채취하여 105℃에서 5시간 건조하여 토양의 수분을 0%로 만든후 수분을 가하여 20, 40, 60, 80, 100%로 만들었다. 하루 전에 배양해 두었던 치커리무름병원균주를 멸균수에 희석하여 OD 600nm에서 농도가 1이 되도록 맞춘후 준비해준 토양에 1ml씩 분주하여 28℃에서 배양시켰다. 배양직후부터 2일 간격으로 토양 sample을 1g씩 채취하여 액체 상태의 MGY 배지에 30분간 incubation shaking을 한 후 희석하여 100μl를 MGY배지 위에 도말배양하여 c. f. u.를 계산하였다(그림 23). 그결과 다음과 같은 결론을 얻었수있었다. 즉, 습도가 치커리무름병원균의 밀도에는 큰 영향을 주지않지만 치커리무름병원균의 생존율은 토양습도가 높을수록 증가한다는 것을 알수있었다. 따라서 치커리재배지에서의 토양습도가 높을 경우, 토양내에 존재하는 무름병원균의 밀도가 일정 수준으로 유지되다가 발병조건이 적합하게되면 무름병이 대량으로 발생하게될 가능성이 높기에, 우기를 전후하여 치커리무름병의 방제에 더욱 유의해야한다고 사료된다.

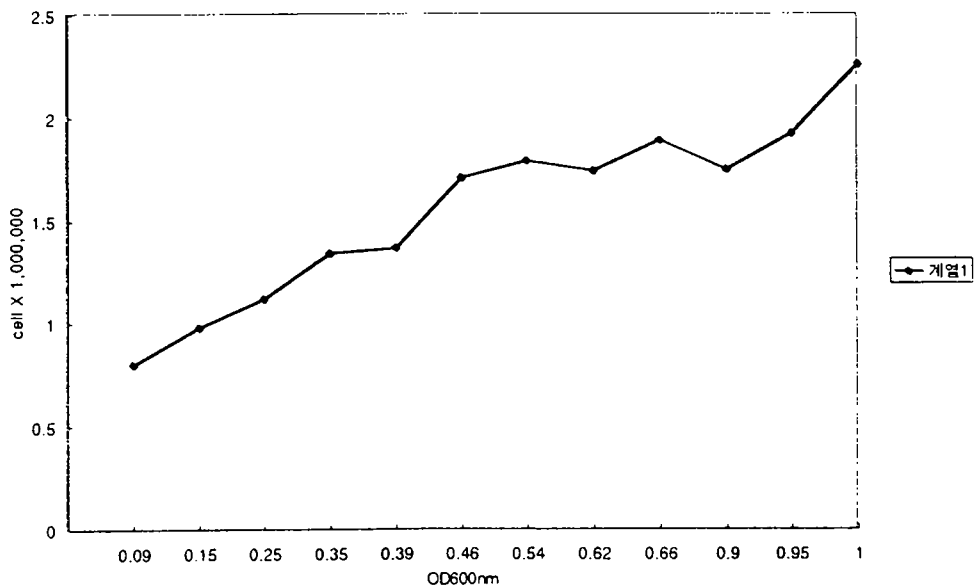


그림 22. 치커리무름병원균의 c. f. u. 조사

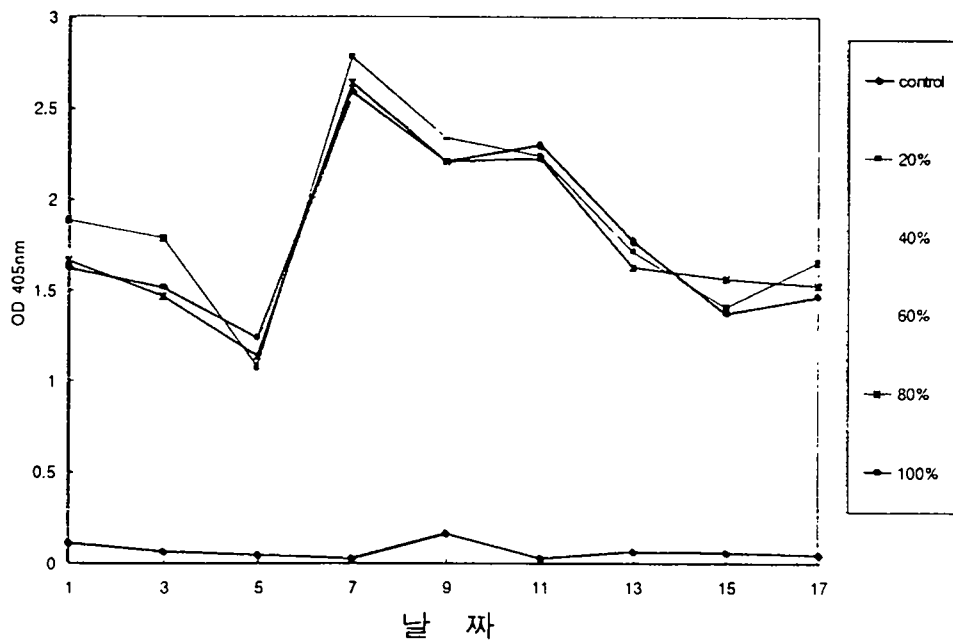


그림 23. 토양습도와 치커리무름병의 발생관계

○ 토양내 치커리 무름병원균 monitoring법 개발

토양내의 무름병원균의 monitoring을 하기 위하여 ELISA 방법을 사용하였다(그림 24). 즉, 배양한 치커리무름병원균을 멸균수에 희석하여 OD 600nm = 1(c.f.u=10<sup>9</sup>)로 맞춘 후 수분 함량이 20%, 40%, 60%, 80%로 만든 멸균된 토양에 1ml씩 분주하였다. 이 토양에서 sample Ig를 채취하여 Anti-Live EC46항혈청을 probe로하여 ELISA를 수행하였다. 이때 ELISA 방법은 indirect 방법으로, 접종한 토양에서 채취한 sample Ig를 coating buffer에 희석하였다. 이 희석액을 ELISA plate에 200 $\mu$ l씩 분주하여 4℃에서 overnight 시킨후 washing buffer로 씻어 주었다. 충분히 건조 시킨후 first antibody, secondary antibody을 1시간 간격으로 37℃에서 배양 시킨후 세척, 건조의 과정을 거쳐서 기질을 처리 하였다. 상온에서 1시간 동안 기질 처리 한 것을 3mol의 NaOH을 사용하여 반응을 정지 시킨후 ELISA reader로 OD 값을 읽었다. 이때 OD는 파장이 405nm로 사용되어졌다. control은 균을 접종하지 않은 상태의 토양을 사용하였다. 그 결과 치커리무름병원균을 접종하지 않은 토양에서는 매우 낮은 O.D. 값이었으나 접종토양의 경우 높은 수치로 치커리무름병원균의 밀도가 monitoring되었다. 따라서 개발된 기술은 짧은시간에 토양시료에 존재하는 치커리무름병원균을 ELISA방법으로 쉽게 monitoring할 수 있는 첨단기술이라 할 수 있다.

습 도

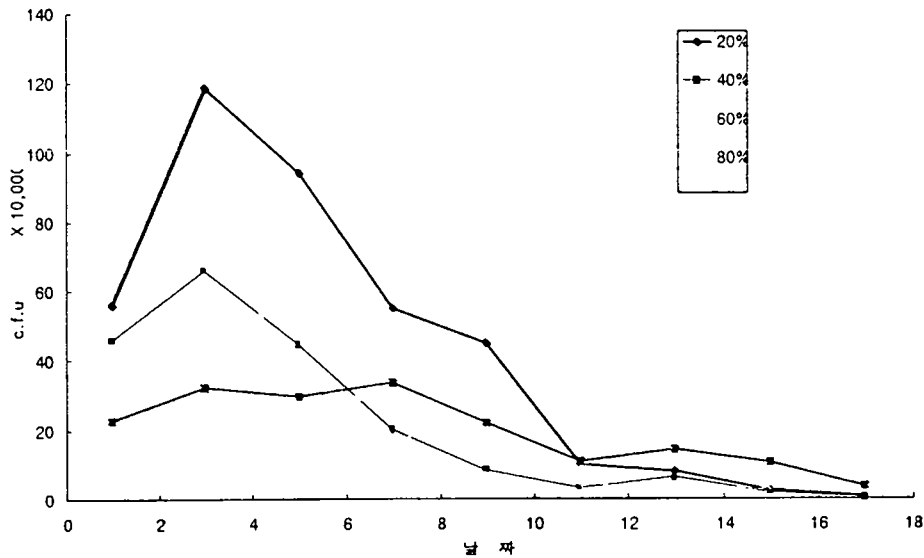


그림 24. ELISA를 이용한 토양내 치커리 무름병원균 monitoring

### 제3절 치커리의 재배면적 및 피해도 조사

치커리를 집단적으로 재배하고 있는 인제군을 중심으로 재배면적을 조사하였다. 조사는 1달에 1회씩 6회에 걸쳐서 실시하였다(표 4 참조). 조사에 의하면 현재 확인된 면적이 약 150ha에 이르렀으며, 재배농가수는 139개에 달하였다. 조사기간 중 발생한 병해로는 무름병(*E. carotovora* subsp. *carotovora*), 잎마름병(*Alternaria* sp.), 잎끝마름병(*Alternaria* sp., *Fusarium* sp.)이 관찰되었다(표 5). 이들 병에 의한 발병율은 무름병과 잎마름병이 경우 대략 10%정도였으며, 잎끝마름병의 경우 약 5%에 해당하였다. 잎의 경우는 *Alternaria* sp., *Fusarium* sp. 등의 진균에 의한 피해가 있는 반면, 뿌리에서는 *E. carotovora* subsp. *carotovora*에 의한 세균병이 관찰되었다. 특히 진균에 의한 병의 경우 잎의 병해가 관찰되더라도 뿌리는 건전하였으나, 세균에 의한 무름병이 발생한 경우는 식물의 지상부까지 고사하였다. 또한 우리나라에서는 뿌리만을 가공하여 상품화하고 있기에, 실질적으로 치커리재배지역에서 문제가 되고 있는 병은 *E. carotovora* subsp. *carotovora*에 의한 무름병이라 할 수 있다.

한편, 치커리에 피해를 주는 해충으로서는 파리류, 콩금무늬밤나방, 진딧물류, 파밤나방등이 관찰되었으며(표 6), 파리류는 뿌리부위를, 그 밖의 해충들은 지상부를 가해하였다. 그러나 우리나라에서는 뿌리만을 상품화하고 있으므로 파리류의 방제가 건전한 치커리재배와 직결된다고 할 수 있다.

표 4. 인제지역을 중심으로 조사한 치커리재배 면적

구 분	인 제	북	기 린	서 화	합 계
재배면적(ha)	56	44.7	47	4.5	152.2
조사농가수(호)	43	72	14	10	139

표 5. 치커리 재배지의 병해 발생상황

병 해 증 상	병 인 균 명	발병율(%)
무름병	<i>E. carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	9.0
앞마름병	<i>Alternaria</i> sp.	9.0
앞끝마름병	<i>Alternaria</i> sp. <i>Fusarium</i> sp.	4.5

표 6. 치커리 재배지의 충해 발생상황

해 충 명	가 해 부 위	피해정도 (%)
파 리 류	뿌리	15.0
콩금무늬밤나방	잎	7.0
진 덧 물 류	잎, 줄기	6.0
파 밤 나 방	잎	7.0

## 제4절 치커리 무름병 종합적 방제대책 개발

### ○ 치커리 무름병의 화학약제 선발

치커리 무름병에 대한 화학약제를 선발하고자 먼저, 실내에서 약제방제 실험을 수행하였다. 그 결과는 표 7과 같으며, 농용신 수화제와 구리합성물인 쿠퍼수화제를 혼용한 처리구에서 가장 좋은 효과를 얻을 수 있었다. 이는 세균제제로 일반적으로 사용해온 항생제제와 구리합성물제제처리에서 단독처리구는 비슷한 방제결과였지만, 이 둘을 혼용처리 할 경우 방제가가 높아 우리나라의 경우 세균제에 대한 저항성의 문제점은 없는 것으로 사료된다. 포장시험의 경우 스트렙토마이신+클로로타닐 수화제, 클로로탈로닐+페림존 수화제, 농용신 수화제, 옥소리닉에시드 수화제, 쿠퍼 수화제, 페림존 수화제, 스트렙토마이신+옥신쿠퍼 수화제, 후루아지남 분제의 순으로 방제효과가 나타났다(표 8). 또한 약제를 단독, 또는 혼용하여 사용하였을때의 방제가는 최고 68%수준에 머물렀는데, 이는 화학제를 이용한 토양병방제에 나타나는 일반적 현상이라 할 수 있다. 그러므로 본 약제방제 시험을 토대로 종합적인 방제 대책이 강구되어야 한다.

표 7. 실내에서의 치커리 무름병원균 약제방제 실험

공시약제	처리약량	발병지수(0-5)	피해율	방제가
농용신 수화제	750배	1.4	27.4	49.8
쿠퍼수화제	500배	1.5	29.7	45.6
혼용제(농용신+쿠퍼수화제)	750배+500배	0.5	10.6	80.6
무처리	-	2.7	54.6	-



표 8. 포장에서의 약제방제 시험

공시약제	처리약량	발병율	방제가	약해
스트렙토마이신+ 클로로탈로닐 수화제	500배	20.8	68.3	
클로로탈로닐+페 림존 수화제	500배	32.3	50.8	0
농용신 수화제	750배	34.7	47.1	
옥소리닉에시드 수화제	1,000배	40.1	38.9	
쿠퍼수화제	500배	46.3	29.4	
페림존 수화제	1,000배	48.8	25.6	0
스트렙토마이신+ 옥신쿠퍼 수화제	500배	52.4	20.1	
후루아지남분제	250kg/ha	61.7	5.9	0
무처리	-	65.6	-	-

○ 생물학적 방법에 의한 치커리 무름병 방제

치커리 무름병균에 대해 길항력을 가지고 있는 미생물의 형태적 특징은 표 9와 같다. 또한 Bergey's manual 과 Schaad 지침서에 준한 생리·생화적인 동정표는 표 10과 같다.

항균균주의 치커리 무름병원균에 대한 기내 길항력 실험에서는 paper disk방법을 이용하였으며, 그림 24에 알 수 있듯이 치커리 무름병원균에 대해 높은 길항력을 나타내는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 포장내에서의 실질적 방제효과를 측정하기 위해 실시한 포장실험에서는 pot내에서 재배되고 있는 치커리를 이용하였으며, 액체배지상에서 대량배양된 균주를 원심분리하여 그 pellet을 멸균수에 현탁하여  $10^8$ /ml cells로 만들어 치커리 무름병원균과 동시 처리하였다. 이때 대조구로서는 치커리 무름병원균만을 단독 처리하여 비교하였다(그림 25).

표 9. 항균균주의 형태적 특징

Form	Circular
Surface	Smooth
Edge	Undulate
Opacity	Opaque
Color	Creamy

표 10. 길항미생물의 생리·생화학 tests

Tests	Present isolate <sup>a</sup>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. polymixa</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. brevis</i>	<i>B. coagulans</i>	<i>B. circulans</i>
Gram reaction	+ <sup>b</sup>	+	I	+	I	+	I
Motility	+	+	+	+	+	+	+
Oval spore	+	+	+	+	+	+	+
Spore position:							
Terminal		-	+	-	+	+	+
Central	+	+	+	+	+	+	+
Subterminal		-	+	-	+	+	+
Swelling of bacillary body	ND	-	+	-	+	V	+
Growth at 45°C	-	+	-	+	V	+	V
Growth at pH 5.7	+	+	+	+	V	+	V
Growth in 7% NaCl	+	+	-	+	-	-	V
Utilization of citrate	+	+	-	+	V	V	-
Anaerobic growth in glucose broth	V	-	+	+	-	+	V
Acid from:							
Arabinose	+	+	+	+	-	V	+
Mannitol	+	+	+	+	V	V	+
Xylose	+	+	+	+	V	V	+
VP test	+	+	+	+	-	V	-
Stach hydrolysis	+	+	+	+	-	+	+

a : 치커리 무름병원균에 길항력을 나타내는 길항미생물.

b : + = 양성, - = 음성, V = 반응이 일정치 않음.

표 10에서 나타나듯이 치커리 무름병원균에 대해 길항력을 나타내는 길항미생물은 *Bacillus*속으로 종동정에서는 *B. polymixa*, *B. circulans*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. brevis*와 유사하게 동정되었다.

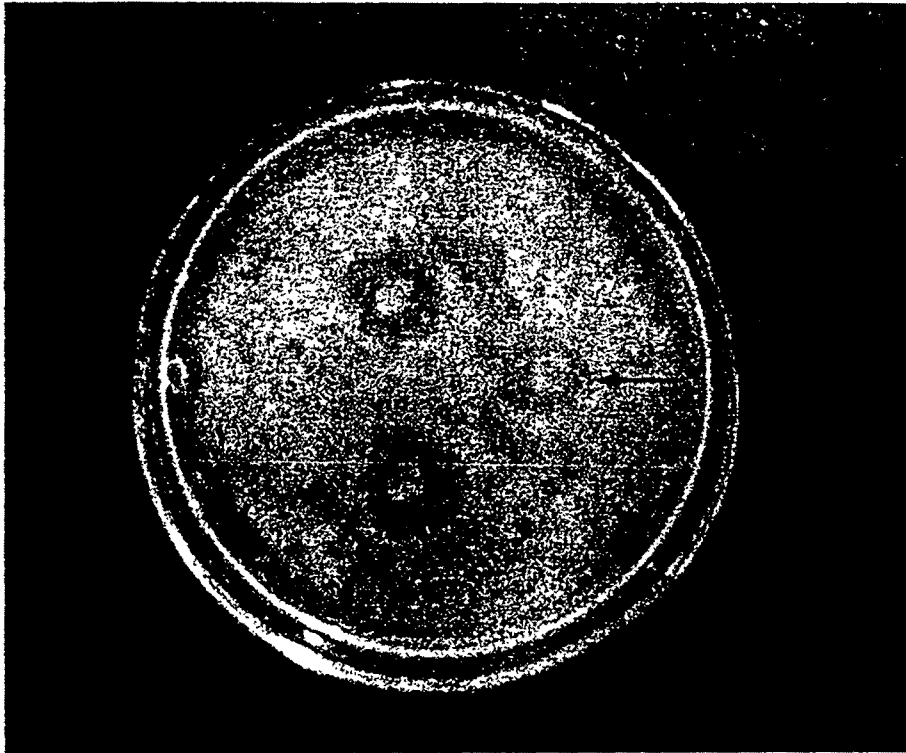
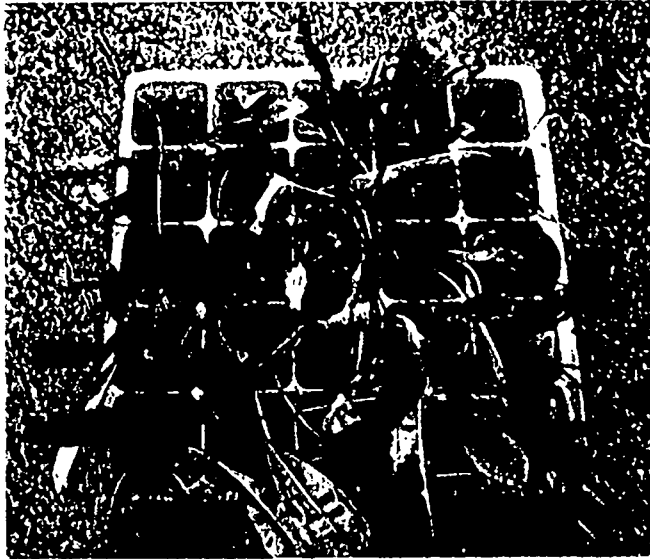


그림 24. 치커리 무름병원균(*E. carotovora* subsp. *carotovora*)에 대한 길항미생물의 항균력 조사. 화살표는 치커리 무름병원균이 길항미생물(*Bacillus* spp.)에 의해 억제되어 나타나는 clear zone의 모습.

치커리 무름병원균에 대해 길항력을 가지고 있는 미생물을 선발하여 생물학적 방제방법에 사용하고자 실시하였는데, 그 방법으로는 먼저 춘천시 근교의 토양으로부터 분리한 균주를 NB 액체배지 (meat extract 0.3%, peptone 0.5%)에 접종하여 30℃에서 3일간 진탕배양하였다. 배양액을 12,000×g에서 20분간 원심분리 후 치커리 무름병원균(*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*)을 대상균으로하여 paper disk법으로 항균활성을 측정하였다. 그 결과 그림 24에서와 같이 치커리 무름병원균에 대해 높은 활성을 나타내는 것을 확인 할 수 있었다.

○ 치커리 무름병원균에 대한 길항미생물의 길항력 test



A



B

그림 25. 길항력 test를 실시하기 위해 치커리를 pot에 파종한 후 처리방법을 네가지로 나누어 실험을 실시하였다. 그 결과 사진에서 나타나듯이 치커리가 실험에 적당한 크기로 성장한 후 치커리 무름병원균(Ecc)과 길항미생물(B.)을 동시에 처리한 구에서 가장 좋은 효과를 나타내었다.

A : 치커리 무름병원균만 단독처리한 대조구, B : 병원균과 길항균 동시 처리구.

## 제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

본 연구의 연구개발목표는 치커리 무름병원균의 조기진단법 개발, 치커리 무름병의 발병생태 연구, 치커리의 재배면적 및 피해도 조사, 그리고 치커리 무름병의 종합적 방제대책 개발로, 이에 대한 연구 결과를 근거로 하여 각 세부 목표별 달성도를 자체 평가한 결과는 아래와 같다.

구 분	연구개발목표	연구개발내용 및 범위	목표 달성도
제1차년도 (1995. 12. 1- 1996. 11. 30)	조기진단법 개발, 발병생태연구, 피해도 조사,	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 치커리 무름병원균의 생리연구</li> <li>○ 치커리 무름병원균의 조기동정법 개발</li> <li>· 전통적 동정법 및 Biolog program을 접목한 조기동정법 개발</li> <li>○ 치커리 무름병의 조기진단법 개발 I</li> <li>· 치커리 무름병원균의 항혈청 생산기술 개발</li> <li>○ 치커리 무름병의 피해도 조사 I</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>100%</li> <li>100%</li> <li>100%</li> <li>100%</li> </ul>
제2차년도 (1996. 12. 1- 1997. 11. 30)	조기진단법 개발, 발병생태연구, 피해도 조사	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 치커리 무름병의 조기진단법 개발 II</li> <li>· 치커리 재배지에서의 ELISA의 실용화체계 확립</li> <li>○ 치커리 무름병의 생태 연구</li> <li>· 치커리 무름병원균의 생활사 및 전반과정 구명</li> <li>○ 치커리 무름병의 피해도 조사 II</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>100%</li> <li>100%</li> <li>100%</li> </ul>
제3차년도 (1997. 12. 1- 1998. 11. 30)	종합적 방제대책 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 화학적 방법</li> <li>· 구리제 및 항생물질 처리에 의한 무름병원균 제어</li> <li>○ 생물학적 방법</li> <li>· 항생물질 생산 균주를 이용한 무름병원균 제어</li> <li>○ 종합적 방제</li> <li>· 위 두가지 방법을 이용한 종합적 방제 대책 수립</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>100%</li> <li>100%</li> <li>100%</li> </ul>
최종평가		<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 치커리 무름병의 조기진단법 장점</li> <li>○ 치커리 무름병의 발병생태 자료의 중요성</li> <li>○ 치커리 무름병의 종합적 방제 대책의 실용성</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>100%</li> <li>100%</li> <li>100%</li> </ul>



## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

치커리는 생식과 가공용으로 수요가 급증한 고소득 작물이다. 이에 재배면적 역시 증가하여, 현재 강원도에서만 집단재배되고 있다. 이러한 치커리 재배지에서 수량감소 및 농가소득을 저해하는 가장 큰 요인으로 치커리 무름병(*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*)에 의한 피해가 속출하고 있다. 그러나 피해의 심각성에도 불구하고 치커리 무름병원균의 생태, 조기동정, 피해면적, 그리고 방제대책에 대한 연구는 이루어지지 않았다.

따라서 본 연구는 치커리 무름병원균을 쉽고 빠른 방법으로 분리·동정하여 조기진단법을 개발하고, 발병생태에 대한 연구결과를 바탕으로 종합적 방제대책을 모색하여 재배농가의 현장애로사항을 해결하려고 하였다. 특히 본 연구에서 개발된 연구결과의 특성은,

- 1) 미생물유전자원으로 활용가치가 매우 높으며,
- 2) 개발된 조기동정기술은 치커리뿐만 아니라 다른 채소 무름병 조기진단에 활용할 수 있으며
- 3) 항체를 이용한 조기동정기술은 키트화하여 산업화할 수 있을뿐만 아니라
- 4) 치커리 무름병원균의 발병생태와 선발된 약제 및 길항미생물을 이용하여 치커리 무름병을 종합적으로 관리할 수 있을 것으로 판단된다.