

634.459

L 293C

최      중  
연구보고서

# 단감나무 주요 진균병의 진단, 예찰 및 종합방제기술개발

Development of Method of Diagnosis, Forecast, and Integrate  
Control on the Major Disease  
of Sweet Persimmon(*Diospyros kaki* L.)

연구기관  
충북대학교

농림부



# 최 종 보 고 서

2001년도 농림기술개발사업에 의하여 완료한 단감나무 주요 진균병의

진단, 예찰 및 종합방제기술개발 에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이

제출합니다.

- 첨부 : 1. 최종보고서 10부  
2. 최종보고서 디스켓 1매

2001년 10월 15일

주관연구기관 : 충 북 대 학 교

총괄연구책임자 : 김 길 하 (인)

주관연구기관장 : 충북대학교 총장

직 인

농 립 부 장 관 귀 하

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “단감나무 주요 진균병의 진단, 예찰 및 종합방제기술개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2001년 10월 16일

주관연구기관명 : 충북대학교

총괄연구책임자 : 김 길 하

세부연구책임자 : 정 봉 구

연 구 원 : 장 태 현

연 구 원 : 임 태 현

협동연구기관명 : 강원대학교

협동연구책임자 : 이 윤 수

협동연구기관명 : 단감시험장

협동연구책임자 : 송 원 두

여 백

# 요 약 문

## I. 제 목

### 단감나무 주요 진균병의 진단, 예찰 및 종합방제기술개발

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

단감은 1980년 이래 고소득 과수로 인식되면서 재배 면적이 급속히 증가할 뿐만 아니라 지역적인 재배여건과 독특한 단맛으로 기호성이 증대되면서 '80년도에 비하여 5배 이상 재배면적이 넓어졌다. 현재 단감은 5대과수의 하나로 성장하고 있다.

단감은 전남, 경남, 경북 일부 지역에서는 넓은 재배면적을 갖고, 최근 제주도에서 오렌지 수입증가로 인해 감귤재배 농가가 감소하면서 단감재배가 증가하고 있는 고소득 작물인 동시에 수출 유망과수이다. 질 좋은 단감생산에 제일 큰 제한요인 중 하나는 각종 진균에 의한 병해이다. 탄저병은 그 중요성으로 인하여 여러 작물에서 많은 연구가 이루어졌으나, 단감 탄저병은 단감의 지역 농가소득에 대한 기여도의 상승에 따라 최근에 관심이 모아지고 있다. 82%나 차지하는 부유 품종이 탄저병에 감수성 이어서 피해가 증가하고 있는 실정에도 불구하고 그에 관한 연구는 아직까지 미진한 상태이다. 특히, 정확한 병원균의 동정, 생리·생태적 연구가 이루어지지 않아 방제에 어려움을 겪고 있으며, 이의 방제를 위하여 많은 살균제를 이용하고 있다. 또한, 탄저병은 일본에서는 잎과 과일에 발생하는 병원균이 다른 것으로 보고하고 있다.

단감의 과일 탄저병은 과일의 조기 성숙, 조기 낙과 및 저장 중의 피해 등으로 재배자 뿐만 아니라 수출업체에도 막대한 손실을 야기시키고 있다. 현재

까지의 단감의 탄저병 방제로는 체계적으로 연구된 방제력이 없어 대부분의 농가에서는 일반 과수의 탄저병에 준하거나 일본 방제력에 의존해 무계획적인 살균제의 살포에 의존하고 있을 뿐이다. 이러한 살균제의 사용은 환경, 약효저하 및 생산품의 안정성에 대한 위협 등의 여러 문제에 직면하고 있다. 따라서 본 연구에서는 분자생물학적 방법을 이용한 탄저병의 조기 진단법 개발, 정확한 예찰과 동정을 통한 효과적 살균제 선발, 약제 살포 횟수와 살포시기의 구명 등 그 동안 체계적 연구의 미흡으로 인한 과도한 노동력 투여와 약제의 남용에 따른 생산비 증가 그리고 환경 오염에 따른 문제를 최소화하기 위하여, 탄저병원균의 정확한 동정, 발병양상, 조기진단법의 개발 및 합리적 방제력 확립에 초점을 맞추어 연구를 수행하였다. 단감은 독특한 맛과 풍부한 비타민, 영양분을 함유하고 있어 매년 그 소비가 증가 되고있고 남부 지방에서만 재배되는 지역적 특성으로 지역 농가의 고소득 과수로 부상되어 재배 면적과 생산량이 매년 크게 증가하고 있다. 생산량은 '75년도 6,000M/T에 불과하였으나 95년 현재 155,000M/T로 26배 이상 증가하여 우리 나라 주요 과수의 하나로 부상하였다. 그러나 부유 품종의 우수한 품질로 인한 재배농가의 선호는 재배 품종의 획일화를 초래하여, 탄저병을 비롯한 여러 진균성 식물병의 발생에 호조건을 제공하고 있는 실정이다. 하지만 이러한 재배면적의 증가에 따른 문제점을 해결하기 위한 제반 연구에 대한 노력은 미진한 편이고 탄저병(Anthracnose)의 경우 적기 방제 실패는 수확량에 직접적인 영향을 미치므로 재배자는 매년 안정적 수확을 위하여 과도한 약제 살포에 의존하고 있는 실정이다. 최근 들어 식품의 안정성에 대한 소비자의 관심이 높아지면서 생산물의 농약 잔류에 민감한 반응을 보이고 있고 안전한 먹거리 생산을 위한 과도한 약제 살포는 심각한 농약 잔류 문제, 환경 오염 및 생태계 파괴 등의 문제점을 야기 시킨다. 이에 따라 안전한 농산물의 공급은 공급자와 수요자 사이의 신뢰성을 높여 소비를 촉진하고 결과적으로 농가 소득에 크게 기여 할

것으로 생각된다. 단감의 특징, 특히 제한적인 재배지역에 따른 특수성을 고려해 볼 때 수확량의 제한 요인으로 알려져 있는 탄저병의 효과적 방제는 필수적이다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 우리 나라 단감재배에 있어서 생산량과 농가소득에 가장 중요한 제한 요인으로 알려진 단감 과일 탄저병의 방제전략 수립을 위하여 지금까지 축적된 자료와 추가 조사 자료의 분석을 통하여 병원균의 동정 및 특성, 발생양상을 분석하고 분자 생물학적 기법을 이용해 조기 진단 기술과 방제력의 개발과 확립을 목적으로 수행하였다.

### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1998년 10월부터 2001년 10월까지 수행한 본 연구의 결과, 현재 단감 재배 지역에서 대발생하여 재배자에게 큰 경제적 손실을 야기시키는 탄저병은 기중 균사를 형성하며 균사의 색은 회색이고 포자의 모양은 장타원형인 isolates은 group1과 기중 균사를 형성하며 배지표면에 오렌지색의 포자 덩어리를 형성하며 균사의 색은 회색-흑색을 나타내고 포자의 크기는 group 1의 isolates보다 작은 경우는 group 2에 의한 것으로 분석되었다. 또한 두 group중 우점종은 group1에 속한 것으로 분석되었다. 우점종은 기존에 단감 탄저병원균으로 보고되어있는 *C. gloeosporioides*와는 포자의 형태 및 크기에서 다른점을 보였고 일본에서 *C. gloeosporioides*로 개정되기 전까지 *Gleosporium kaki*로 보고되었던 종과 유사하였다. 이에 따라 현재 발생하고있는 탄저병의 병원균은 *C. gloeosporioides*의 race형 또는 *C. gloeosporioides*로 개명한 *Gleosporium*



*kaki*에 의한 것으로 생각된다. 단감에서 분리한 균중 우점종으로 분석된 CH1021 균주는 단감에서 강한 병원성을 나타냈으나, 사과에서는 약한 병원성을 보였다. 또한 분자생물학 실험의 결과 크게 2가지의 균이 복합적으로 나타난 것을 알 수 있었다. 또한 우점종에 특이적으로 반응하는 primer의 개발은 탄저병의 조기 진단과 많은 작물의 곰팡이에 의한 식물병의 진단에 응용 활용할 수 있으리라 생각된다. 26여종의 살균제를 탄저병에 의한 이병과일로부터 분리된 탄저병원균 중 우점종으로 분석된 G1에 속하는 균주인 CH1021 균주에 대한 균사 성장 억제력을 조사한 결과 benomyl를 비롯한 11종이 효과가 우수한 것으로 나타났는데, 주로 benzimidazole계 살균제와 EBI계 살균제들이 우점종에 대해 높은 균사 신장 억제력을 보였다. 현재 농가에서 사용하고 있는 벤레이트와 같은 benzimidazole계열 약제로도 충분히 효과적으로 탄저병을 방제할 수 있으리라 생각된다. 그러나 이러한 약제들은 저항성 균주의 출현으로 방제 효과의 저하가 예상되고 또 현재까지 보고되어 있지는 않지만 이미 단감 과원에 출현했을 가능성이 있는 저항성 균주에 대한 적절한 전략 없이 사용하기에는 위험성을 지니고 있는 약제이다. 유과의 채집시기에 따라 발병율에 차이를 보이지 않았지만 발병력에는 다소 영향을 미쳐 8월 초순에 채집한 어린과일에서 병징이 가장 빠르게 나타났다. 유과(어린 과일)를 이용한 생물 검정 방법은 새로운 식물 보호제 개발 과정에서 그 유용성이 높을 것으로 판단된다. 또한 단감의 경우 생물 검정시 부유 품종의 사용이 효과적인 것으로 생각된다. 4개의 program을 작성하여 시험 수행 전의 감염율이 높았던 경주(18.0%)와 창녕 (15.9%)의 과수원을 대상으로 실증 시험을 수행하였다. 경주의 경우, 작성 program에 따라 약제를 처리한 살포구의 경우, 처리 4의 경우 전혀 발병을 하지 않았으며, 그 외의 처리구는 0.5%에서 2.5%정도의 발병율을 보였다. 예비 작성된 방제 program에 따라 단감 재배시 문제되는 탄저병의 방제를 시도한 결과 관행 방제구에 비하여 낮은 발병율과 우수한 방제가를 확인할 수 있었다.

현재 최종 개발하여 방제 시험에 적용한 결과, 약제의 적용 횟수를 줄여 방제하여도 우수한 방제효과를 얻을 수 있었다. 그러나 이러한 약제 적용 횟수의 감소는 농가의 심리적 불안감을 증가시키는 원인이 될 수 있어, 여러 차례의 포장 실증 실험을 실시하여 그의 신뢰성을 증진시킨 후에야 농가 이용이 가능하리라 생각된다. 최종 작성된 방제 program에 의하면 년 7회 정도의 방제로 효과적 방제를 기대할 수 있으리라 생각된다. 그러나 이러한 방제효율의 경우는 포장의 위생적인 관리를 전제로 한 경우이다. 그러므로 포장의 위생관리에 따라 적절한 약제의 적용 횟수 증감이 필요하리라 생각된다. 특히 전년도에 탄저병의 발생으로 인한 큰 피해를 받았던 포장의 경우 1-2년에 걸친 전염원의 감소를 위한 대책을 수립한 후 방제에 본 program을 적용하는 것이 바람직하다고 판단된다. 발병 현황에서 조사된 발병율과 재식거리의 관계를 분석한 결과에 따르면 재식 거리가 좁았던 포장에서 발병율이 높았는데 이는 밀식에 따른 포장내 통기성 불량으로 인한 상대습도의 상승이 발병에 호조건을 제공함과 동시에 방제 약제 작업시 노동력 투입에 많은 장애를 주어 약제의 올바른 살포를 방해 할 것으로 생각된다. 이런 포장의 경우 간벌이나 과감한 가지치기로 수관의 적절한 거리를 확보한 후 program의 적용이 가능하리라 판단된다. 또한 강우량 및 강우 일수에 맞춰 방제약제 적용의 증감이 필요할 것으로 생각된다. 그러나 평년의 기상 조건을 고려 할 경우 본 연구에서 개발된 program에 따른 방제는 효과적인 탄저병의 방제에 기여 할 수 있으리라 판단된다. 또한 본 연구의 실내 및 유과를 통하여 우수한 방제효과 특성을 보였으나, 단감 혹은 탄저병에 등록이 되어있지 않은 약제의 경우 확대 실험이 필요한 것으로 생각된다.

## SUMMARY

To develop the control method of anthracnose by *Colletotrichum* spp. on persimmons, the analysis of a major pathogen of anthracnose, the analysis of incidence of the disease, the development of a diagnostic primer with a specific responses to fungi causing anthracnose, the development of control method were studied from 1998 to 2001. The focus of this studies was the development of effective control program to anthracnose.

A major pathogen was identified with difference one to the reported *Colletotrichum gloeosporioides*. A major pathogen have larger conidia than those at *Colletotrichum gloeosporioides*. The isolation rate of the major pathogen from symptoms was over 80%. A major pathogen, CH1021, caused the lesion of anthracnose on persimmons, but did not cause the lesion of anthracnose on apples. The results suggested that the pathogen causing the lesion of anthracnose on persimmons was a race or different species with the reported *Colletotrichum gloeosporioides*.

Through molecular studies, the primer with specific responses to a major pathogen as CH1021 was developed, the primer will be useful to the diagnosis of anthracnose on persimmons prior to appearance of symptoms on the surface of fruits.

Several fungicides among the first tested fungicides including benomyl showed an excellent inhibitive activity to mycelial growth, spore germination, and inducing anthracnose on the premature fruits. Carbendazim showed the most excellent inhibitive activity among the fungicides. However, although benzimidazole fungicides such as benomyl and carbendazim and EBIs as bitertanol and tebuconazole was a excellent

agents to control the anthracnose, the using to control the disease have to care inducing resistant-isolates to the fungicides. It is necessary for farmers and researchers to monitor subpopulation of the resistant-isolates in the field to persist efficiency of the fungicides. The screening method with premature fruits of "Buyu" to the potential protective agents against fungi causing anthracnose will be useful. The screening with premature fruits of "Buyu" showed results similar to these of test in mycelial growth and spore germination.

The several programs was made through this studies. In the first test with made programs, program 4 showed the most excellent control value among the programs conducted in Kyoungju and Changnyung. Though experiments of this study, We have been developed the a good control program of anthracnose. According to this program, the effective control of the anthracnose in the persimmons orchards will be obtained from application of 7 times with the selected fungicides in this studies despite of a difficult condition of the orchards. If the condition of orchards is good such as a low density of planting and the eradication of infected fruits and stems in last year, the application of fungicides will reduce with a few times. The field test of this research was conducted with the orchards of a high disease pressure. For example, the orchard of Kyoungju and Changnyung showed a high inducing rate of anthracnose in investigation conducted at 1998. The several results of this studies suggested that a good control of anthracnose should obtain from the application of a proper fungicides and the reasonable management of orchards. The sufficient space between trees is useful to work for the application of fungicides

and then provides good control with farmers. Though experiments of this study, we have been developed the a good control program of anthracnose. However, to apply this program in the field, we think that it necessitates much more experiment in the future. The effective control of the anthracnose in the persimmons orchards will be obtained from the application of 7 times with the selected fungicides regardless of the condition of orchards. The reduction of application of fungicides with program developed in this study will decrease the control cost of anthracnose, improve quality and quantity of persimmons, and give more a lot of money farmer than now.

## CONTENTS

Chapter 1 General introduction .....	15
The objectives of research.....	15
Chapter 2 Identification, cultural characteristics of the pathogen.....	17
General introduction.....	17
Material and methods.....	22
Results.....	25
Discussion.....	36
Reference.....	39
Chapter 3 Incidence.....	41
General introduction.....	41
Material and methods.....	44
Results.....	45
Discussion.....	56
Reference.....	62
Chapter 4 Development of molecular diagnosis.....	64
General introduction.....	64
Material and methods.....	66
Results.....	74
Discussion.....	88
Reference.....	91
Chapter 5 Control.....	96
General introduction.....	96
Material and methods.....	99

Results.....	104
Discussion.....	119
Reference.....	126
Appendixes.....	129

# 목 차

제 1 장 서 론.....	15
제1절 연구개발의 목적과 범위.....	15
제 2 장 단감나무 탄저병원균의 동정 및 배양적 특성.....	17
서론 .....	17
재료 및 방법.....	22
결과.....	25
고찰.....	36
참고문헌.....	39
제 3 장 발생현황.....	41
서론 .....	41
재료 및 방법.....	44
결과.....	45
고찰.....	60
참고문헌.....	62
제 4 장 분자생물학적 기법을 이용한 진단기술.....	64
서론 .....	64
재료 및 방법.....	66
결과.....	74
고찰.....	88
참고문헌.....	91



제 5 장 방제.....	96
서론 .....	96
재료 및 방법.....	99
결과.....	104
고찰.....	119
참고문헌.....	126
부록.....	129

# 제 1장 서론

## 제 1 절 연구개발의 목적과 범위

단감 재배시 양질의 단감 생산을 제한하는 여러 요인 중 진균 병해에 의한 병으로는 탄저병(Anthracnose)의 피해가 가장 심각하다. 탄저병은 과실, 가지 및 잎에 발생하며 특히 과실의 발생은 농가의 수확량과 소득에 직접적인 영향을 미쳐 매년 막대한 손실을 초래하고 있다. 탄저병원균은 여러 식물 곰팡이 병원균 중 생리·생태연구와 방제에 대한 연구가 가장 활발히 진행되고 있는 병원균이다. 그러나 국내 단감재배의 역사와 단감나무 재배면적을 고려할 때 단감 탄저병에 대한 전반적인 연구는 매우 미흡한 실정이다. 국내 재배 단감의 경우 82%를 차지하는 부유 품종은 탄저병에 감수성인 것으로 보고되어 있으나, 그 재배면적은 매년 증가하는 추세이다. 이러한 단일 품종의 증가는 새로운 생물종 출현이나 특정 병원균 집단의 급작스러운 증가를 초래하여 그 병원균에 의한 병의 대 발생은 재배자에게 심각한 문제를 초래할 수 있다. 일본의 경우, 단감 탄저병에 대한 연구가 활발히 진행되어 병원균의 정확한 동정과 생리·생태적 연구에서의 많은 성과를 기초로 효과적인 방제법을 수립하여 수확물의 증가와 품질 향상을 꾀하고 있다. 국내의 경우 현재까지 단감 과일 탄저병에 대해 체계적으로 연구된 방제력이 없어 대부분의 농가에서는 일반 과수의 탄저병 방제법에 준하거나 일본 방제력에 의존해 무계획적인 살균제 살포에 의존하고 있을 뿐이다. 이러한 방제 체계하에서 단 감 탄저병의 효과적 방제를 얻기는 힘들 것으로 생각되며 실제 몇몇 농가는 탄저병에 의한 피해를 감소시키고자 많은 노력을 하고 있는 실정이다. 국내 단감탄저병의 발생율(이별과율)은 지역에 따라 많은 차이를 보이고 있으나, 심한 경우 약 30% 정도의 발병율을 보여 수확 자체를 불가능하게 할 뿐 아니라 저장 중 막대한 손실을 초래하여 재배자에게 많은 어려움을 주고 있다. 탄저병의 병원균은 전년도 이병 잔존물과 토양내 균사체나 포자형태로 월동하여 이듬해 봄(5-6월)

에 1차 전염을 일으킨다. 탄저병의 전형적인 병징은 어린 가지(신초)나 과일에 관찰되며 이러한 병징은 강우 후에 뚜렷하게 나타난다. 감염 시기는 이른 봄부터 가을까지로 유과기 감염은 과일의 연화를 촉진하여 낙과를 초래하여 수확량 감소를 일으킨다. 또한 탄저병원균은 일정기간의 잠복기를 필요로 하는데 이 시기는 식물병 방제에 있어서 매우 중요한 시기이며, 잠복기의 방제 실패는 재배기간 동안의 과원 관리에 많은 어려움과 동시에 전염원 증가를 수반한다. 이에 따라 본 연구는 국내 단감 과원에서 분리된 탄저병의 정확한 동정, 병원균의 포장에서의 발생 생태, 우수 살균제의 선발, 약제의 살포시기 및 분자 생물학적 기법을 이용한 병원균의 조기 진단을 기초로 한 효과적 방제 체계 확립을 목적으로 수행하였다.

단감재배 면적의 증가로 1990년대 중반부터 단감의 탄저병, 원성 낙엽병 및 각지벌레 등 주요 병해충에 대한 연구자들의 관심이 증가되었고 현재 많은 연구성과가 보고되어지고 있다(10). 그러나 방제를 위한 실질적인 연구는 미흡한 실정이다. 특히, 분자 생물학의 눈부신 발전은 동물, 인간 및 식물체 감염원의 조기진단을 가능케하여 치료에 응용되고 있다. 단감에서의 분자생물학적 방법을 이용한 조기진단법 개발은 병방제에 보다 효과적인 방법을 제시하게 될 것으로 생각되며 이는 우수한 살균제의 선발 및 적절한 살포시기의 제시로 보다 높은 방제 효과를 제공할 것으로 생각된다. 또한 탄저병원균의 유전적 다양성을 고려 할 경우 정확한 동정과 이의 생리적 특성의 파악 또한 방제에 도움을 줄 것으로 생각된다. 이러한 방법을 통하여 확립된 조기진단 기술이나 방제의 응용 방법은 다른 작물 병관리 시스템에 적용될 수 있으리라 판단된다. 앞으로 단감의 재배면적은 증가할 것으로 생각되며, 특히 영농 기술의 발달은 현재의 재배한계지역을 넘어서 다른 지역에서도 재배가 가능케 할 것으로 생각된다. 이러한 점을 고려 할 때 단감의 주요 병해충의 자연 환경, 재배 방식 및 재배 농가의 병 관리 체계를 고려한 관리 system의 확립이 절실히 요구된다.

## 제 2장 단감탄저병원균의 동정 및 배양적 특성

### 제 1절 서설

단감나무 탄저병은 단감의 재배기간동안 어린가지(신초) 및 과일에 감염을 일으켜 어린 과일의 경우 조기낙과를 일으키며, 낙과된 이병과일은 적절한 처리가 없을 경우 2차·3차 전염원이 되어 그 피해를 증가시킨다. 또한 어린가지(신초)의 감염은 수세 약화를 초래하여 나무의 정상적인 성장을 제한한다. 국내의 경우 단감 재배지역은 경우 경북 경주 이남의 남부 지방으로 제한되어, 대발생하기 쉽고, 기상조건 특히 강우량에 따라 대 발생하여 심각한 문제를 초래하는 매우 중요한 단감의 병해충이다. 국내의 경우 단감의 주요 병해로 *Mycosphaerella nawae*에 의한 등근무늬낙엽병, 병원균이 *Colletotrichum gloeosporioides*으로 보고된 탄저병 및 *Cercospora kaki*에 의한 모무늬병 등을 들 수 있다. 이중 탄저병은 어린가지(신초), 잎 및 과일 등 단감나무의 거의 모든 부분에 나타나는 병으로 발생은 강우량이 많은 해에 특히 심한 것으로 보고되어 있는데 이는 비와 바람으로 인한 분생포자의 전파에 의한 것이다. 또한 생육초기인 5-6월사이 많은 강우는 기온의 상승과 일치하여 병원균의 생육 및 포자발아에 호조건을 제공하며 이는 병의 대발생을 초래한다. 이러한 집중호우시기는 단감나무 전체의 결로 시간의 연장을 초래하여 탄저병 및 다른 주요 식물병의 침입을 촉진하는 것으로 보고되어 있다(12). 여러 작물에 탄저병을 발생시키는 병원균의 동정은 균사의 형태적 특징, 포자의 형태, 포자의 크기 및 분자 생물학적 기법이 활용되고 있으나, 유전다양성으로 인하여 동정에 많은 어려움을 겪고 있다(4). 탄저병원균인 *Colletotrichum* spp.의 기주 특이성은 높은 것으로 보고되어 있으나, *C. acutatum*, *C. crassipes*, *C. dematium*, 및 *C. gloeosporioides*는 비교적 넓은 기주 범위를 가지고 있는 것으로 보고되어 있다. 현재 국내 단감 탄저병의 병원균은 *Glomerella cingulata*(완전세대)-*C. gloeosporioides* (불완전세대)으로 보고되어 있으나,

일본의 경우 *Gleosporium kaki*로 보고되어 있으며, 이균은 *C. gloeosporioides*의 포자의 형태 및 특히 크기에서 큰 차이를 나타내는 것으로 알려져 있다. *Gleosporium*은 *Colletotrichum*과 강모의 유무에 따라 구분하여 사용되어지고 있으나, 강모는 환경조건 따라 형성에 많은 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 이에 따라 보다 정확한 동정 방법의 이용이 단감 탄저병의 동정이 이용되어야 할 것으로 판단된다. 탄저병은 진전 될 경우 병반 부위의 함몰현상이 나타나며, 병반 주변에 오렌지색의 포자 덩어리를 형성하여 그의 진단에는 어려움이 없다. 병반 주변의 점액질의 형성은 포자의 성숙 전 발아의 억제 및 건조로부터 포자를 보호하는 역할을 한다. 이 환경조건에서의 강우는 포자 전파를 용이하게 하여 병의 대발생을 유도한다(6, 8, 14). 그러므로 포장에서 탄저병 발생에 관여하는 병원균의 subpopulation의 분석은 방제전략 수립에 도움이 되리라 생각된다.

## 제 2절 병원균의 동정, 배양적 특성 및 병원성 조사

### 1. 서론

단감 탄저병은 1910년 일본의 堀(15)에 최초 보고되었으며, 이후 많은 연구자들의 노력의 결과로 일본에서는 많은 연구 결과가 보고되었으며, 1960년 前田이 Von Arx(1)의 분류법에 따라 *C. gloeosporioides*라 개정하였으나 단감 탄저병반으로부터 분리되는 병원균은 포자의 크기에서 *C. gloeosporioides*와 큰 차이를 보이는 것으로 보고되어있다(1, 2).

탄저병원균의 분생포자세대(무성세대)는 강모의 유무와 형성위치에 따라 *Colletotrichum*, *Vermicularia* 및 *Gleospodium* 등 3개의 속으로 구분된다. 1928년 Duke는 *Vermicularia*를 *Colletotrichum*의 이명이라 하였다. 분류의 또 다른 방법은 Dastur(5)에 의하여 제시된 병원균의 병원성에 따른 방법이나 이 방법은 환경 조건에 크게 영향을 받는 단점이 있으며, 또한 강모의 형성도 환경조건에 영향을 받는 것으로 보고되어 있다. 탄저병원균은 포자 형태에 따라 *C. acutatum*, *coccodes*, *coffeanum*, *musae*, 및 *gloeosporioides* 등과 같은 straight-spored species와 *C. dematium*, *capsici*, *lini* 및 *falcatum* 등의 falcate-spored species 등으로 구분되어진다(1). 탄저병이 기주체를 침입하는 방법은 발아하는 포자로부터 발생하는 균사가 기주체의 표피세포를 직접 침입하거나 주로 부착기라는 특수한 기관에서 발생하는 침입균사에 의해서 이루어진다(1). 김 등(10)은 고추 탄저병원균 *C. gloeosporioides*를 분생포자의 형태, 균사생장의 속도, 자낭각 형성 등의 균학적 특성과 병원성에 의해 2계통으로 분류하였다. 이러한 분류 방법은 단감나무 탄저병에도 응용 할 수 있으리라 생각된다. 또한 병원균의 적절한 생육 조건의 조사 및 배양 방법의 확립은 효과적인 방제방법 확립의 기초 자료로 활용하는데 그 유용성이 매우 높다. 현재 국내 단감 재배면적의 80%이상을 차지하고 있는 부유 품종은 일본의 谷(15)에 의하면 탄저병병원균에 대하여 고도의 감수성을 보이는 것으로 보고되

어 있으며, 부유에 비하여 재배면적이 적은 서촌 조생 또는 차량의 경우는 중 정도의 저항성을 보이는 것으로 보고되어있다. 그러나 국내 실제 포장에서의 단감 탄저병의 발생은 부유에 집중적으로 발생하는 것으로 조사되어지고 있다. 일반적으로 탄저병의 균사생육 적온은 25-30℃인 것으로 보고되어 있으며, 남부지방의 기후 조건은 기주인 단감의 생육과 균 생육에 대하여 동시에 호조건을 제공하고 있다. 이러한 조건에서의 병의 효과적 방제의 성취는 많은 어려움을 안고 있는 것으로 생각된다. 탄저병원균은 35℃이상의 고온과 10℃이하의 저온에서 그 생육이 극히 불량한 것으로 보고되어 있다. 생육을 위한 배지의 적정 pH는 6.0-7.0사이로 7.0 이상일 경우 균 생육이 현저히 감소하는 것으로 알려져 있다. 어린가지(신초)의 경우 이른 경우 4월-5월 초순부터 발병하기 시작하는데 보통 10일 정도의 잠복기를 갖는 것으로 알려져 있다. 이러한 어린 가지에 발생한 탄저병은 적절한 방제 대책이 없을 경우 수세 약화는 물론 2차 전염원으로서의 역할을 하여 6월 수정 후 어린과일(유과기)를 감염시켜 재배자에게 여러 가지 어려움을 주며, 특히 이 시기는 장마기의 시작과 일치하여 방제를 위한 약제 살포에 어려움을 겪고 있다(7, 11).

본 연구에서는 국내 단감의 주산지인 경남의 김해, 경주, 창녕 및 밀양 등의 과원으로부터 이병과일을 채집하여 탄저병의 주 병원균을 분리하고, 이병과일로부터 분리되는 병원균 빈도를 분석하여 우점종을 조사함과 동시에 우점종의 동정을 통하여 국내 단감나무에서 발생하는 탄저병의 주 원인 균을 구명하고자 하였다. 동시에 분리된 균의 정확한 동정과 적절한 균사 생육온도, pH, 배지, 포자 발아 및 부착기 형성 등의 배양적 특성의 조사를 통하여 우수한 화학 살균제 선발을 위한 접종원 준비 방법의 확립을 위한 기초자료를 얻고자 수행하였다.

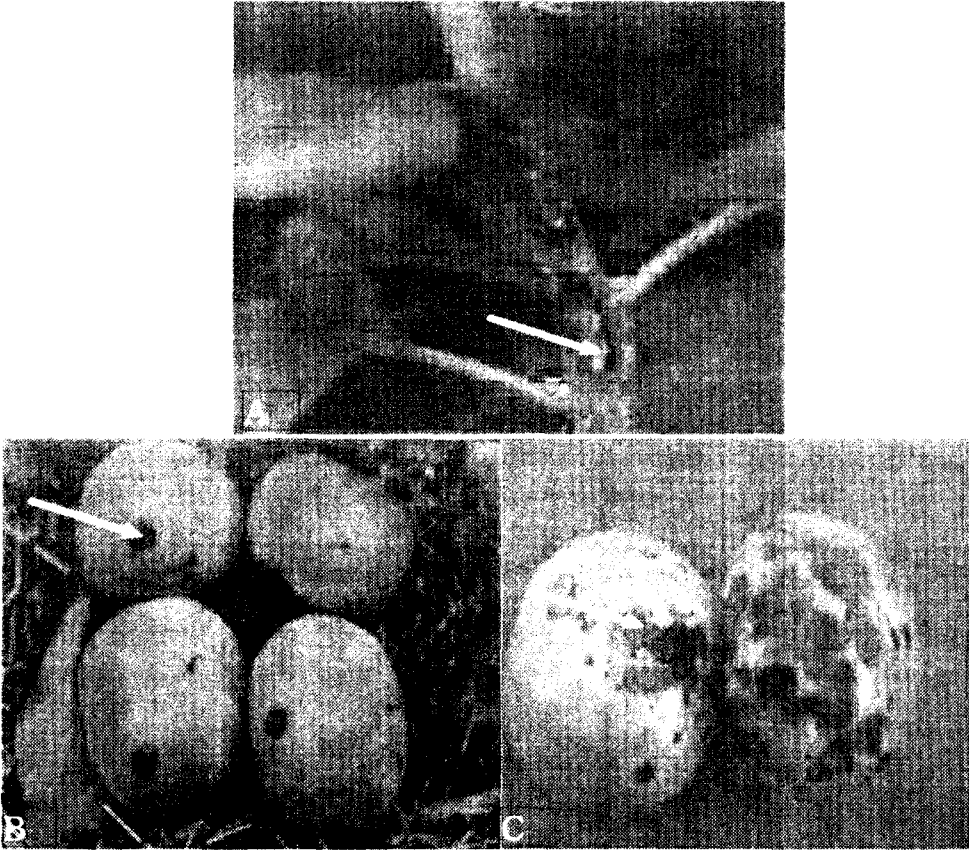


그림 1. 단감 탄저병의 병. 어린가지(A), 유과기 증상(B) 및  
성과증상(C). 화살표; 병반



## 2. 재료 및 방법

### 가. 이병과일로부터의 우점종 분석 및 동정

#### 1) 이병과일의 수집

이병과일로 부터 탄저병원균의 우점종을 분석하기 위하여 국내 단감의 주산지인 경북 경주, 경남 창원, 창원 밀양 및 김해 등지에서 98년부터 2001까지 3년간 이병과일을 채집하였다. 채집된 이병과일의 이병조직으로부터 0.5cm×0.5cm의 절편을 취하여 70% EtOH을 이용하여 표면 소독 후 WA(Water Agar)에 치상하여 28℃ 배양기에서 자라 나오는 균사의 선단을 해부 현미경하에서 취하여 분리하였다. 취한 균사의 절편은 100 $\mu$ g/ml의 streptomycin이 첨가된 PDA(Potato Dextrose Agar) 배지에 이식하여 실험에 사용하였다.

#### 2) 우점종 분석과 동정

우점종은 PDA에서 자라는 균사의 형태 및 형성된 포자의 형태와 크기를 비교하여 분석하였다. 기중 균사를 형성하며 균사의 색은 회색으로 포자의 모양은 장타원형인 isolates은 group 1으로 구분하였으며, 생육이 빠르며 기중 균사를 형성하며 배지표면에 오렌지색의 포자 덩어리를 형성하며 균사의 색은 회색-흑색을 나타내고 포자의 크기가 group 1의 isolates보다 작은 경우 group 2로 나누어 분석하였다.

분리된 균의 동정은 group별 대표 균주를 선발하여 균사의 형태, 포자의 형태 및 크기 및 병원성 검정 등의 균학적 특성을 비교하여 수행하였다.

### 3) 생육 적정 배지의 선발

우점종 분석을 통하여 우점종으로 판단된 isolate (CH1021)를 *C. gloeosporioides*와 일본 MAFF로부터 분양 받은 *Greosporium kaki*를 대상으로 PDA(Potato Dextrose Agar), NA(Nutrient Agar), MEA(Malt Extract Agar) 및 CDA(Czapek-dox Agar) 등 총 5종의 배지를 공시하여 27℃ 배양기에서 7일간 배양 후 배지에 따른 균사생육정도를 측정하였다.

### 4) 생육 적온

공시 균주의 생육에 미치는 온도의 영향을 조사하기 위하여 배양기의 온도를 5, 10, 15, 20, 25, 27 및 30℃ 등 5℃ 간격으로 조절하여 전 배양한 균사의 가장자리로부터 접종원(직경: 5mm)을 준비하여 PDA plate에 접종하여 7일간 배양 후 온도에 따른 균사생육 정도를 측정하였다.

### 5) 최적 pH

공시 균주의 생육에 미치는 배지 pH의 영향을 조사하기 위하여 배지의 pH를 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 및 10.0으로 조절하여 실험을 수행하였다. pH는 10%의 tartaric acid와 1M의 NaOH를 이용하여 조절하였다. 전 배양하여 준비한 균사의 가장자리로부터 접종원(직경: 5mm)을 준비하여 pH가 조절된 배지의 중앙에 접종하여 7일간 배양 후 균사 생육정도를 측정하였다.

## 6) 전염원의 능력 분석

### 가) 결로시간과 발병의 관계

탄저병의 감염에 미치는 결로의 영향을 조사하고자 14일정도 배양하여 병원균의 포자를 수확 후 농도를  $2 \times 10^4$  conidia/ml로 일정하게 현탁하여 pot에 식재되어 있는 유묘에 접종한 후 향온항습실에 보관하며 0, 12, 24, 36, 48 및 60시간째 총 6간격으로 pot를 향온실로 옮겨 놓은 후 발병 상태를 조사하였다. 발병정도는 다음과 같이 조사하였다.

- 0 --- 무발병
- 1 --- 병반이 엽병에만 형성
- 2 --- 잎 주변에 암갈색의 병반 형성 (<5%)
- 3 --- 병반 면적을 5-10%
- 4 --- 병반 면적을 11-50%
- 5 --- 병반 면적을 > 50%

### 나) 병원균의 농도에 따른 발병 상태

병원균의 농도에 따른 탄저병의 발병 정도를 조사하고자 병원균의 농도를  $10^3$ - $10^6$  conidia/ml로 조절하여 pot에 식재되어 있는 유묘에 접종한 후 5-7일 후 발병 정도를 조사하였다. 발병정도는 결로시간의 영향 실험과 동일하게 측정하였다.

### 다) 접종일수에 따른 발병정도

농도 실험을 통하여 선정된  $10^5$  conidia/ml 농도로 접종 4일 후부터 일정한 간격으로 발병 정도를 조사하여 위 접종시의 잠복기를 조사하였다. 발병정도는 결로시간에 따른 발병 실험과 동일하게 실시하였다.

### 3. 결과

#### 1) 이병과일의 수집과 우점종의 분석

1998년부터 2001년도까지 3년간 단감의 주요 생산지인 경북 경주, 경남 창원, 창원, 밀양 및 김해 등지에서 이병과일을 채집하여 매년 약 200여 균주를 분리하였다. PDA에서 균주들의 배양적 특성에 따라, 기중 균사를 형성하며 균사의 색은 회색으로 포자의 모양은 장타원형인 isolates은 group1으로 구분하였으며, 생육이 빠르며 기중 균사를 형성하며 배지표면에 오렌지색의 포자 덩어리를 형성하며 균사의 색은 회색-흑색을 나타내고 포자의 크기는 group 1의 isolates보다 작은 경우는 group 2로 나누어 분석하였다. 그 결과는 표 1과 같으며, 기중 균사를 형성하며 균사의 색은 회색이고 포자의 모양은 장타원형인 group1으로 구분한 균주의 분리 빈도는 3년간 평균 80%이상으로 group2에 비하여 그 분리 빈도가 월등히 높았다(표 1). 지역별로 볼 때, 밀양, 창원 등 두 곳은 다른 지역에 비하여 다소 낮은 분리 비율을 보였다. 이는 지금까지 단감 재배지역에서 발생하는 탄저병은 보고된 전형적인 *C. gloeosporioides*에 의한 것일 수도 있으나, 이 연구의 분석결과, 현재 대발생하여 재배자에게 어려움을 주고 탄저병은 *C. gloeosporioides*의 race형 또는 1960년 前田이 Von Arx(1)의 분류법에 따라 *C. gloeosporioides*로 개명한 *Greosporium kaki*에 의한 것으로 생각된다. 특히 공시 균주로 선정한 CH1021 균주의 포자를 300개 정도 선발하여 포자의 형태 및 크기를 조사한 결과 *C. gloeosporioides*와 많은 차이를 보였다. 이러한 결과는 현재 탄저병으로 인한 재배 어려움을 해결하기 위해서는 우점종에 대한 현재 등록·사용되고 있는 살균제의 약효 검정이 필수적인 선결 과제임을 제시하는 중요한 결과라 하겠다.

표1. 지역별로 채집한 탄저병 병반에서 분리한 균주의 분리비

지역	탄 저 병				
	G1	G2	계	점유율(%)	
				G1	G2
1998 김해	33	3	36	91.7	8.3
밀양	15	5	20	75.0	25.0
창녕	28	2	30	93.3	6.7
경주	69	7	76	90.8	9.2
창원	26	12	38	68.4	31.6
계	171	29	200	85.5	14.5
1999 김해	40	4	44	90.9	9.1
밀양	60	8	68	88.2	12.8
창녕	30	3	33	90.9	9.1
경주	43	4	47	91.5	8.5
창원	46	15	61	75.4	24.6
계	219	34	253	87.4	12.8
2000 김해	45	4	49	91.8	8.2
밀양	25	6	31	80.6	19.4
창녕	35	8	43	81.4	18.6
경주	60	7	67	89.6	10.4
창원	45	14	59	76.3	23.7
계	210	39	249	83.9	16.1

G1:기중 균사를 형성하며 균사의 색은 회색으로 포자의 모양은 장타원형인 isolates.

G2:생육이 빠르며 기중 균사를 형성하며 배지표면에 오렌지색의 포자 덩어리를 형성하며 균사의 색은 회색-흑색을 나타내며 포자의 크기는 group 1 보다 작은 isolates.

## 2) 우점종의 동정

탄저병원균에 감염된 과일로부터 분리된 우점종 중 CH1021 균주를 대표 균주로 하여 실시하였다. 배양적 특성에 따라 동정을 실시한 결과 다음과 같다. PDA 배지상에서 균사의 색은 회색이었으며, 형성된 포자의 모양은 장타원형으로 양끝은 둥근 모양이었다. 포자의 형성은 양호하였고 형성된 포자의 크기는  $15\sim 27.5(21.3)\mu\text{m}\times 3.3\sim 8(5.7)\mu\text{m}$  였다(표2). 강모(setae)는 형성하지 않았으며, 사과와 단감을 이용하여 병원성을 조사한 결과, 공시한 *Colletotrichum gloeosporioides*는 사과에서 강한 병원성을 보였으나, 단감에서는 약한 병원성을 보였다(그림2). 그러나 단감에서 분리균 중 우점종으로 분석된 CH1021 균주는 단감에서 강한 병원성을 나타냈으나, 사과에서는 약한 병원성을 보였다(그림3). 이상의 결과는 일본에서 단감 과일 탄저병으로 보고된 병원균인 *G. kaki*의 배양적 특성과 포자의 크기 및 형태는 유사하지만 *Colletotrichum* spp.의 유전적 다양성을 고려할 경우 단감 *Colletotrichum* sp.에 의한 감염된 탄저병은 단감나무에 대하여 기주 특이성을 나타내는 *Colletotrichum gloeosporioides*의 새로운 race에 의한 감염 또는 *Gleosporium kaki*에 의한 것으로 생각된다.

표 2. 단감 이병과일로부터 분리한 탄저병(CH1021)균의 배양적 특성

Cultural character	Fungi		
	CH1021	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>G. kaki</i>
Mycelial color on PDA	Gray	Gray→Dark gray	Gray
Conidia size on PDA	15~27.5(21.3) $\mu\text{m}$ $\times$ 3.3~8(5.7) $\mu\text{m}$	7.5~22.5(14.8) $\mu\text{m}$ $\times$ 3.3~8.8(5.5) $\mu\text{m}$	15~28 $\mu\text{m}$ $\times$ 3.5~6 $\mu\text{m}$
Shape of conidia	Fusiform	Cylindrical	Fusiform
Setae	Absent	Absent	Absent
Conidia formation	Abundance	Abundance	Abundance
Pathogenicity	Apple	-	±
	Persimmon	++	±

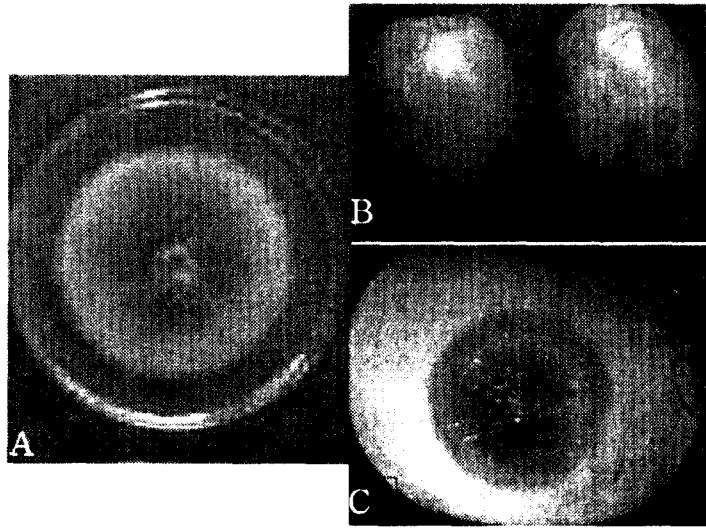


그림2. *Colletotrichum gloeosporioides*의 균사(A)와 병징(단감 B, 사과 C).

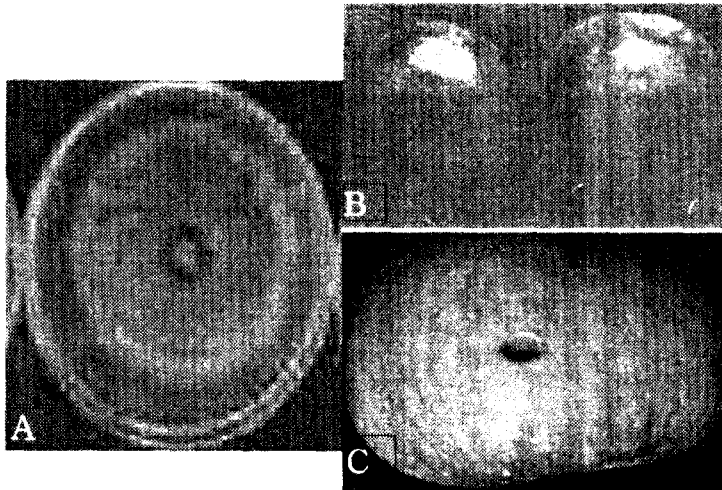


그림3. *Gloeosporium kaki*의 균사(A)와 병징(단감 B, 사과 C).



### 3) 생육 적정 배지의 선발

우점종 분석을 통하여 우점종으로 판단된 isolate (CH1021)를 *C. gloeosporioides*와 일본 MAFF로부터 분양 받은 *Gleosporium kaki*를 대상으로 PDA(Potato Dextrose Agar), NA(Nutrient Agar), MEA(Malt Extract Agar) 및 CDA(Czapek-dox Agar) 등 총 5종의 배지를 공시하여 27℃ 배양기에서 7일간 배양 후 배지에 따른 균사생육정도를 측정된 결과, PDA 배지에서 가장 왕성한 생육을 보였고, NA 배지에서 생육이 가장 저조한 것으로 나타났다으며 균주 간의 차이는 없었다(그림 4).

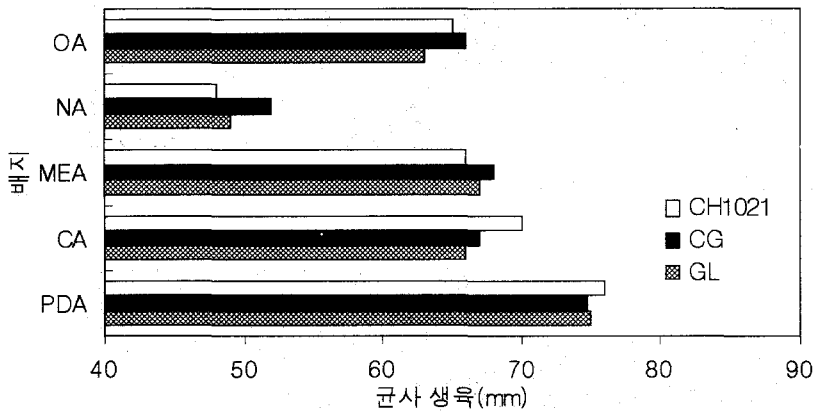


그림 4. 배지에 따른 균사생육

### 4) 생육 적온

공시 균주의 생육에 미치는 온도의 영향을 조사하기 위하여 배양기의 온도를 5, 10, 15, 20, 25, 27 및 30℃ 등 5℃ 간격으로 조절하여 전 배양한 균사의 가장자리로부터 접종원(직경: 5mm)을 준비하여 PDA plate에 접종하여 7일간 배양 후 온도에 따른 균사생육 정도를 측정된 결과, 생육 적은은 25(68.3mm)~27℃(76.0mm)로 나타났으며, 5℃와 30℃ 이상에서는 생육이 저조한 것으로 나

타났다(그림 5).

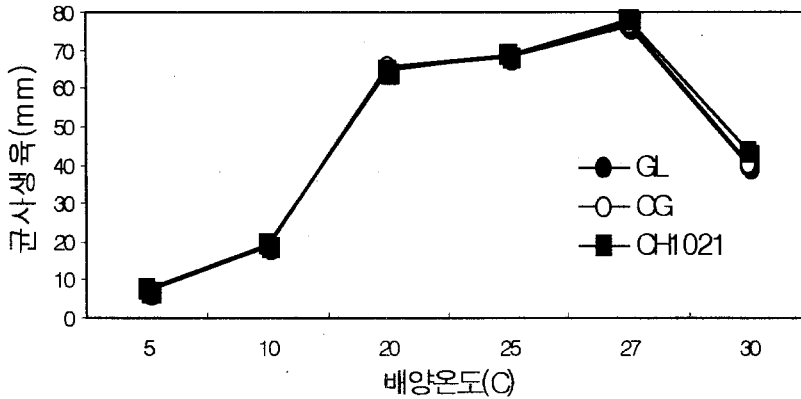


그림 5. 온도에 따른 균사생육

### 5) 최적 pH

공시 균주의 생육에 미치는 배지 pH의 영향을 조사하기 위하여 배지의 pH를 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 및 10.0으로 조절하여 실험을 수행하였다. pH는 10%의 tartaric acid와 1M의 NaOH를 이용하여 조절하였다. 전 배양하여 준비한 균사의 가장자리로부터 접종원(직경: 5mm)을 준비하여 pH가 조절된 배지의 중앙에 접종하여 7일간 배양 후 균사 생육정도를 측정하였다. 생육 최적 pH를 조사한 결과, 생육 최적 pH는 6.0-6.5로 나타났다. pH 7.0 이상에서는 균사생육이 현저히 감소하는 경향을 보였다(그림 6).

### 6) 전염원의 능력 분석

#### 가) 결로시간과 발병의 관계

탄저병의 감염에 미치는 결로의 영향을 조사하고자 14일 정도 배양하여 병원균의 포자를 수확 후 농도를  $2 \times 10^4$  conidia/ml로 일정하게 현탁하여 pot에

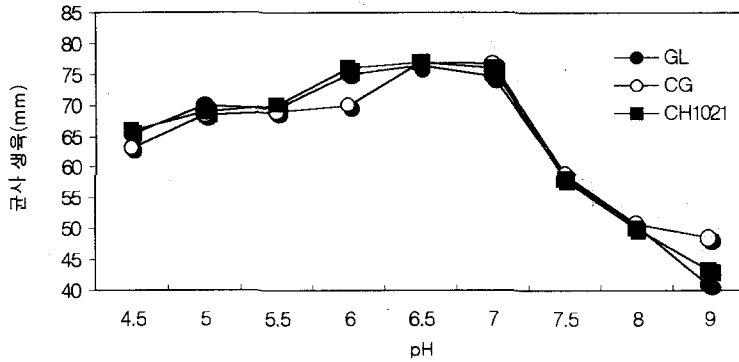


그림 6. pH에 따른 균사 생장

식재되어 있는 유묘에 접종한 후 항온항습실에 보관하며 0, 12, 24, 36, 48 및 60 시간째 총 6간격으로 pot를 항온실로 옮겨 놓은 후 발병 상태를 조사한 결과, 결로 유지시간이 24시간 경과 후부터 병반이 형성되어 60시간의 결로 처리는 발병지수 3-4를 보여 결로시간은 병발생과 고도의 상관관계를 나타냈고, 결로시간의 처리는 12시간부터 60시간까지 조사하였는데 결로시간이 길수록 발병도는 높은 경향이었으며 회귀식은  $Y=0.11X+0.07X$ ,  $R^2=0.82$ 이었다(그림 7).

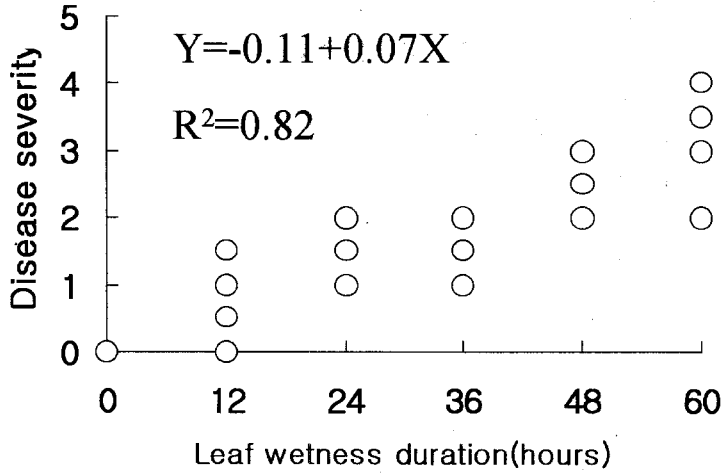


그림 7. 결로 시간과 발병의 관계

나) 병원균의 농도에 따른 발병 상태

병원균의 농도에 따른 탄저병의 발병 정도를 조사하고자 병원균의 농도를  $10^3$ - $10^6$  conidia/ml로 조절하여 pot에 식재되어 있는 유묘에 접종한 후 5-7일 후 발병 정도를 조사하였다. 발병정도는 결로시간의 영향 실험과 동일하게 측정하였다.  $10^3$ conidia/ml 농도에서는 거의 발생이 되지 않았으며,  $10^4$ conidia/ml 농도에서는 발병 지수 1 정도의 발병도를 보였다.  $10^5$ conidia/ml 농도에서는 경미한 발병을 보여 발병도는 5% 미만의 발병 지수 2 정도의 발병도를 보였으며,  $10^6$ conidia/ml 농도에서는 4 정도의 발병도를 보여 잎 표면 전체에 병반이 형성되었다(그림 8). 이러한 결과는 병원균의 농도는 발병과 정의 상관관계가 있음을 보여주는 결과이다.

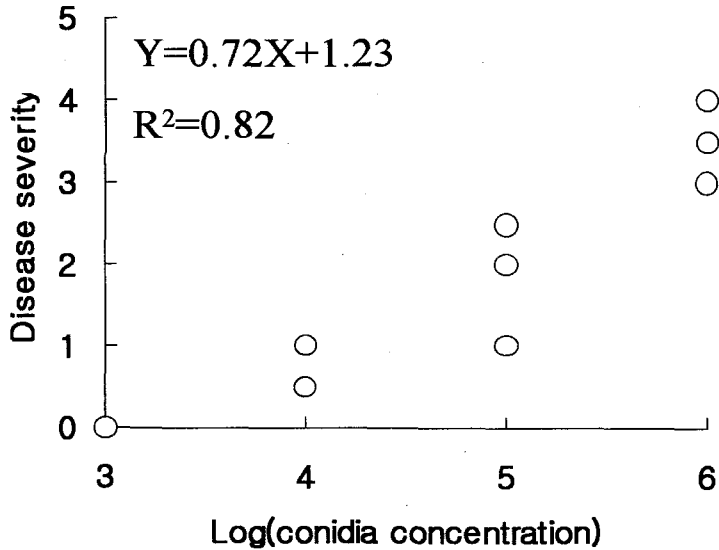


그림 8. 병원균의 농도에 따른 발병정도

다) 접종일수에 따른 발병정도

농도 실험을 통하여 선정된  $10^5$  conidia/ml 농도로 접종 4일 후부터 일정한 간격으로 발병 정도를 조사하여 인위적인 접종시의 잠복기를 조사한 결과, 접종 8일 후부터 병이 발생하여 20일 경과 후 최고조에 이르는 것으로 조사되었다. 이러한 결과는 방제체계 확립을 위한 중요한 자료라 생각된다(그림 9). 위 결과는 일반적으로 알려진 탄저병의 잠복기와 거의 일치하는 결과이며, 감염이 예상될 경우 이른 시간내에 살균제 적용의 필요성을 제시하는 결과이다.

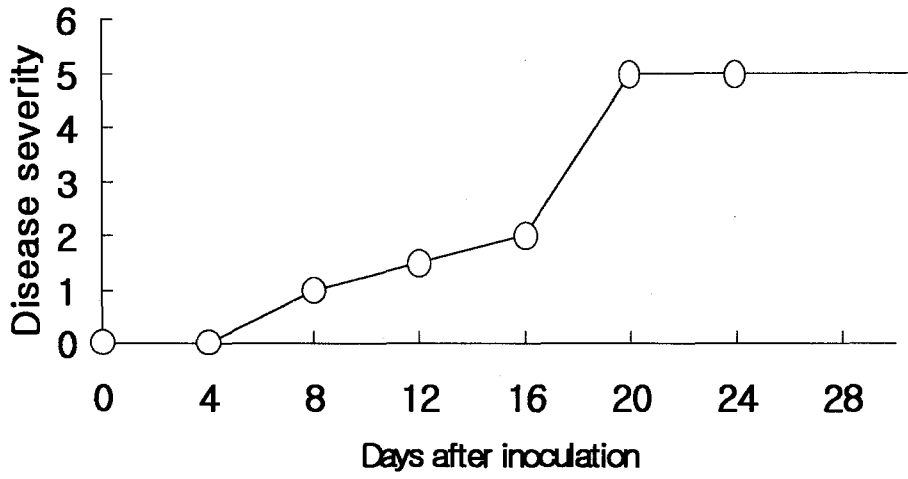


그림 9. 접종 후 시간에 따른 발병양상

#### 4. 고찰

단감의 주요 생산지인 경북 경주, 경남 창녕, 창원, 밀양 및 김해 등지에서 1998년부터 2001년도까지 3년간 균주를 분리하여, 균주들의 PDA에서 우점종을 분석한 결과, 기중 균사를 형성하며 균사의 색은 회색으로 포자의 모양은 장타원형인 group 1의 균주가 3년간 평균 80% 이상으로 나타났다(표 1). 이는 국내 단감에 발생하는 탄저병의 병원균이 기존에 보고되어 있는 *C. gloeosporioides*와는 다른 *C. gloeosporioides*의 race형 또는 1960년 前田이 Von Arx(1)의 분류법에 따라 *C. gloeosporioides*로 개명한 *Gleosporium kaki*에 의한 것으로 판단된다. 또한 우점종의 동정 결과, PDA 배지상에서 균사의 색은 회색이었으며, 형성된 포자의 모양은 장타원형으로 양끝은 둥근 모양이었다. 포자의 형성은 양호하였다. 형성된 포자의 크기는  $15\sim 27.5(21.3)\mu\text{m}\times 3.3\sim 8(5.7)\mu\text{m}$  였다(표2). 강모(setae)는 형성하지 않았다(표 2). 위의 결과는 많은 부분이 *C. gloeosporioides*의 균학적 특성과 유사했지만, 사과와 단감을 이용하여 병원성을 조사한 결과, 공시한 *Colletotrichum gloeosporioides*는 사과에서 강한 병원성을 보였으나, 단감에서는 약한 병원성을 보였다(그림 2). 그러나 단감에서 분리한 균중 우점종으로 분석된 CH1021 균주는 단감에서 강한 병원성을 나타냈으나, 사과에서는 약한 병원성을 보였다(그림 3). 이러한 결과는 우점종으로 분석된 균주들의 기주 특이성을 나타내는 것으로 생각된다. 이상의 결과는 현재 탄저병으로 인한 재배 어려움을 해결하기 위해서는 우점종에 대한 현재 등록·사용되고 있는 살균제의 약효 검정이 필수적인 선결과

제임을 제시하는 중요한 결과라 하겠다. 우점종 분석을 통하여 우점종으로 판단된 균주(CH1021)를 *C. gloeosporioides*와 일본 MAFF로부터 분양 받은 *Gleosporium kaki*를 대상으로 배지에 따른 군사생육정도를 측정한 결과, PDA 배지에서 가장 왕성한 생육을 보여 단감탄저병으로부터 분리되는 탄저병의 생리적 실험을 포함한 여러 실험에서 PDA의 이용이 유용할 것으로 생각된다(그림 4). 여러 온도 범위를 설정하여 군사 생육 적온을 조사한 결과, 25-30°C 사이에서 가장 왕성한 군사 생육을 보여 단감 탄저병에 의한 이병과 일로부터 분리된 우점종의 생육 적온은 25-30°C로 나타났으며, 이는 일반적인 탄저병원균의 군사생육적온과 유사한 경향이다(그림 5). pH가 조절된 배지를 이용한 군사생육 적정 pH를 조사한 결과, 생육 최적 pH는 6.0-6.5로 나타났고, pH 7.0 이상에서는 군사생육이 현저히 감소하는 경향을 보였다(그림 6).

결로 유지시간은 탄저병의 발병에 매우 큰 영향을 미치는 것으로 조사되었는데, 이는 결로는 병원균의 포자 발아를 촉진하는 반면, 감염부위에서의 포자의 건조를 억제시킴으로서 일어나는 결과로 생각된다(3, 12).본 실험의 결과, 단감탄저병은, 결로가 24시간 지속된 경우 병반이 형성되기 시작하여 60시간 이상의 결로 시간은 발병을 급격히 증가시키는 것으로 조사되었다(그림 7). 병원균의 농도에 따른 발병 정도를 조사한 결과,  $10^6$ conidia/ml 농도에서는 4 정도의 발병도를 보여 잎 표면 전체에 병반이 형성되었다(그림 8). 이러한 결과는 병원균의 농도는 발병과 정의 상관관계가 있음을 보여주는 결과이다. 또한 방제 약제에 의한 효과적 방제를 위해서 가장 원론적인 이병 잔존물의 처



리 및 가전염원 처리 등의 위생적인 포장관리의 중요성을 암시하는 것이다. 또한 한번 탄저병으로 인하여 많은 피해를 받은 포장에서는 약제에 의한 방제를 위한 노력 이전에 이른 봄 이병잔존물의 처리로 포장내 전염원 감소에 보다 많은 노력을 해야 할 것으로 생각된다. 농도 실험을 통하여 선정된  $10^5$  conidia/ml 농도로 접종 4일 후부터 일정한 간격으로 발병 정도를 조사한 결과, 접종 8일 후부터 병이 발생하여 20일 경과 후 최고조에 이르는 것으로 조사되었다(그림 9).

## 5. 참고문헌

1. Arx, J. von. 1957a. Die Arten der Gattung *Collectotrichum* Cda. *Phytopatho. Z.* 29:413-468.
2. Bernstein, B., Zher, E.I., and Dean, R. A. 1995. Characteristics of *Colletotrichum* from peac, apple, and other host. *Plant Disease* 79(5):478-482.
3. Casela, C.R., and Frederiksen, R.A. 1993. Survival of *Colletotrichum graminicola* sclerotia in sorghum stalk residues. *Plant disease* 77(8): 825-827.
4. C.M.I Description. No. 318, 319, 320, 514, 515.
5. Dastur, J.F. 1920. *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. and v.Sch. and its conidial forms, *Gleosporium piperatum* E&E., *Colletotrichum nigrum* on chillies and *Carica papaya*. *Ann. App. Biol.* 6:245-268
6. DeVllavieille-Pope, C., Huber, L., Leconte, M., and Goyeau. H. 1995. Comparative effects of temperature and interrupted wet periods on-germination, penetration, and infection of *Puccinia recondita* f. sp. *tritica* and *P. striiformis* on wheat seeding. *Phytopathology* 85(4): 409-415.
7. Dillard, H. R. and Cobb, A. C. 1993. *Colletotrichum lindemuthianum*

- bean debris in New York State. *Plant Disease* 77(12) 1233-1238.
8. Evans, K. J., Nyquist, W. E., and Latin, R. X. 1992. A model based on temperature and leaf wetness during for establishment at *Alternaria* leaf blight of muskmelon. *Phytopathology* 82(8): 890-895.
9. 김성봉. 1992. 단감재배 신기술. 오성출판사 35-80.
10. 김완규, 조의규, 이은중. 1986. 고추탄저병균 *Colletotrichum gloeosporioides* Penz.의 감염. *한국식물병리학회지* 2: 107-113
11. 박은우, 허재선, 윤성철. 1992. 포도탄저병(*C. gloeosporioides*) 방제를 위한 살균제 살포시기 결정용 예찰 시스템. *한식병지* 8(3):177-184.
12. Scherm, H., and Bruggen, A. H. C. 1994. Current spore release infection of lettuce *Bremia lettucae* during morning with prolonged leaf wetness. *Phytopathology* 85(5) : 552-555.
13. 中臣康範. 宮川正通. 1984. 新潟園試試驗成績書 11-12.
14. 前田 知. 1954. 柿炭疽病菌の冬芽越冬. 園藝學會昭 29秋. 講要:1.
15. 谷 利一. 1957. 柿炭疽病菌の培地上の性質並びに同菌有傷接種による柿果上での病斑進展と分生胞子形成の品種間差異. 香川大學報 8(1):115-120.

## 제 3 장 발생 현황

### 1. 서설

단감은 독특한 맛과 풍부한 비타민 그리고 영양분을 함유하고 있어 매년 그 소비가 증가하고 있고 재배지역이 남부 지방으로 제한되어 있기 때문에 지역 농가의 고소득 과수로 부상되어 재배 면적과 생산량이 매년 크게 증가하고 있다(7). 단감의 생산량은 '75년도 6,000M/T에 불과하였으나 95년 현재 155,000M/T로 26배 이상 증가하여 우리 나라 주요 과수의 하나로 부상하였다. 또한 부유 품종의 우수한 품질로 인한 재배농가의 선호는 재배 품종의 획일화를 초래하여, 탄저병을 비롯한 여러 식물 병의 발생에 호조건을 제공하고 있는 실정이다. 그러나 이러한 주요 농가 소득 작물에 대한 여러병에 의한 수확량 손실 및 발생 현황에 대해서는 아직 체계적인 연구가 이루어지지 못하고 있는 실정이다. 단감의 탄저병은 특히 재배 기간 중 비가 많은 해에 대발생하여 방제에 어려움을 주고 있는데 병발생의 원인은 1차 감염 후 병반에 형성된 분생포자가 비바람 또는 빗방울에 의해 전파되는데 있다. 또한 단감 탄저병의 1차 감염 시기는 5-6월 사이로 알려져 있는데 6월 하순은 우리나라의 장마시기가 단감의 주요 생산지인 남부지방부터 시작되는 시기이다. 이러한 기후 조건은 탄저병 방제에 큰 어려움을 주고 있다. 또한 수세관리의 미흡함으로 도장지가 많은 과원에서는 5-6월의 어린가지(신초)에 발생하여 과일을 감염시키는 2차 전염의 증가를 초래한다. 그리고 배수 불량 과원의 경우 다른 과원에 비하여 높은 상대습도를 유지하게 되는데 이러한 상대습도는 분생포자의 건조

억제효과로 탄저병의 감염율을 증가시키는 원인이 되고있다(5). 단위 면적 당 밀집된 단감나무의 식재는 과원내의 통기에 문제를 일으키며, 이러한 통기성의 문제는 과원내의 상대습도와 밀접한 관계가 있어 통기성 불량은 과원내의 높은 상대습도를 유지시키므로 여러 문제를 야기 시킨다. 단감은 독특한 맛과 풍부한 비타민 그리고 영양분을 함유하고 있어 매년 그 소비가 증가하고 있고 재배지역이 남부 지방으로 제한되어 있기 때문에 지역 농가의 고소득 과수로 부상되어 재배 면적과 생산량이 매년 크게 증가하고 있다(7). 특히 식물병의 발병에 대한 재식거리, 온도, 습도 및 바람 등 환경요인의 중요성은 이미 많은 문헌에서 보고되어 있다. 즉, 감수성인 식물체, 좁은 밀식, 많은 강우, 높은 온도 및 습도는 병발생에 호조건을 제공함으로 병의 대발생을 유도한다. 대부분의 병은 병원균이 작물 성장기간동안 한 세대이상 증식하게 되는데 적절한 환경에서는 최대 20번 정도까지 병환을 일으킨다. 위의 발병과 환경 조건을 고려할 경우, 포장내 점염원 제거는 병방제를 1차 적인 요인이며 이를 위한 재배 포장의 전반적인 환경의 조사는 필수적이다. 특히 과수의 경우 식물주체의 제거 및 위생적인 처리가 곤란함으로 적절한 발병환경의 조사에 따르는 올바른 포장의 관리가 필수적이다. 전년도 이병과일과 신초(어린가지) 등의 잔존물의 처리 및 온실이나 포장(과수원)에서의 식물체간의 적당한 거리를 유지한 재배 등 관리는 기주를 1차적인 점염원으로부터 보호하며, 지표면의 습도가 높아지는 것으로 예방하여 포자의 발아, 균사의 성장을 억제하여 병원균에 의한 감염을 억제시킬 수 있다.

특히 과수원의 경우, 토양내 및 표면의 병원균을 제거하기 위한 폴리에틸렌을 이용한 멀칭 등의 방법의 활용이 어려운 이유로 적절한 포장의 관리가 우선이다. 또한 기주 식물체의 유전적 균일성 정도는 새로운 race 출현의 가능성을 증가시키는데 이는 국내 단감 재배지역의 품종을 고려할 때 매우 중요한 사실이다. 단감 부유 품종의 경우 재배면적의 80% 이상을 차지하고 있는데 이런 이유가 위에서 언급한 유전적 균일성 정도를 증가 시켜 현재 탄저병에 의한 문제를 야기시키는 원인이 된 것 같다.

이에 본 연구에서는 주요 단감 생산지인 경남의 밀양, 창녕, 창원, 김해 및 경북의 경주 등의 과원을 대상으로 발병 현황, 포장 조건, 기상조건에 따른 발병 및 기상과 포자비산 등에 관한 연구를 실행하였다.

## 1. 2 서론

단감의 생산량은 '75년도 6,000M/T에 불과하였으나 95년 현재 155,000M/T로 26배 이상 증가하여 우리 나라 주요 과수의 하나로 부상하였다. 또한 부유 품종의 우수한 품질로 인한 재배농가의 선호는 재배 품종의 획일화를 초래하여, 탄저병을 비롯한 여러 식물 병의 발생에 호조건을 제공하고있는 실정이다. 그러나 이러한 주요 농가 소득 작물에 대한 탄저병, 모무늬낙엽병, 흰가루병 및 원성낙엽병 등의 여러병에 의한 수확량 손실 및 발생 현황에 대해서는 아직 체계적인 연구가 이루어지지 못하고 있는 실정이다. 단감 탄저병의 1차 감염 시기는 5-6월 사이로 알려져 있는데 6월 하순은 우리 나라의 장마시기가 단감의 주요 생산지인 남부지방부터 시작되는 시기여서 탄저병 방제에 큰 어

려움을 주고있다. 5-6월의 어린가지(신초)에서 발생한 탄저병은 과일을 감염시키는 2차 전염원의 급격한 증가를 초래한다. 또한 포장내의 통기성은 과원내의 상대습도와 밀접한 관계가 있어 통기성 불량은 과원내의 높은 상대습도를 유지시키므로 여러 문제를 야기 시킨다. 본 연구에서 탄저병의 발병 현황을 중심으로 조사하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가) 발병현황조사

단감 주요 생산지에서의 단감 탄저병의 발생현황을 조사하기 위하여 경남의 창녕, 창원외 각 1곳, 김해 2곳, 밀양 1곳, 경북의 경주 3곳의 과수원을 대상으로 6-10월까지 3년간 발병율을 조사하였으며, 주요 과실에서의 주요 발생지점과 병반의 크기를 나누어 조사하였다. 발병을 조사는 과수원내 여러지점을 선정하여 실시하였다.

### 나) 과수원의 토양의 무기양분 및 과수의 무기양분 조사

발병 현황조사 과수원의 토양을 대상으로 뿌리 근처의 근권 토양을 과수당 500g씩 채취하여 분석에 이용하였다. 분석 방법은 토양 분석 방법(농촌진흥청)에 준하여 실시하였다.

#### 다) 재식 거리 조사 및 기상요인과의 관계분석

단감나무의 과원 내 재식 거리는 위의 발생현황 조사 과원의 탄저병이 발생한 과원과 낮은 발생율을 보였던 다른 과원을 대상으로 조사하였다. 또한 과원이 위치한 인근 지역의 농촌지도소의 기상 자료를 비교분석하였다.

#### 라) 포자비산 조사

단감 탄저병원균의 포자 비산은 당해년도 10월 포장으로부터 이병과일을 채집하여 과수원의 표면과 근권 토양내에서 월동시킨 후 이듬해 4월부터 포자 비산 상황을 일별로 관찰하였다. 2001년도는 가뭄이 심했던 이유로 본 실험의 수행이 불가능하였다.

### 3. 결과

#### 가) 발병현황조사

1998년 단감 주산지의 총 7개 과원 (포장시험과원포함)의 탄저병 발생 현황을 조사한 결과 표 1-1과 같았으며, 평균 발병율은 7.0%으로 조사되었고, 창녕, 밀양, 경주 3 포장에서는 11.5-18.0%의 높은 발병율을 보였고 그 외의 포장에서는 0.1-3.0%의 낮은 발병율을 보였다.



표 1-1. 단감탄저병의 지역별 발생현황 (1998, 10월 조사)

지	역	조사과(개)	발병과(개)	발병율(%)
창	녕	509	81	15.9
창	원	460	14	3.0
김	해1	388	10	2.5
김	해2	510	5	0.1
밀	양	480	55	11.5
경	주1	450	5	1.1
경	주2	500	5	1.0
경	주3	500	90	18.0
합	계	3,797	265	7.0

1999년 동일한 과원을 대상으로 조사한 결과(표1-2), 1998년도와 유사한 발병율을 보여 전년도에 이병과율이 높았던 과원에서 높은 탄저병 이병과율을 보였다.

표1-2. 단감탄저병의 지역별 발생현황 (1998, 10월 조사)

지	역	조사과(개)	발생과(개)	발생율(%)
창	녕	600	90	15.0
창	원	510	18	3.5
김	해1	402	16	4.0
김	해2	500	5	1.0
밀	양	475	55	11.5
경	주1	500	10	2.0
경	주2	500	5	1.0
경	주3	510	95	18.6
합	계	3,997	294	7.4

1999년 5-7월까지 3개월 동안 경남, 진주, 창녕 및 창원 지역의 과수원을 대상으로 순별로 신초와 과일로 나누어 이병율을 조사한 결과, 신초에서 탄저병 발생은 6월 상순에 2곳의 포장에서 관찰되었으며(표 2), 발생율은 1%미만으로 나타났다. 이러한 발병율은 조사기간 동안 변화가 없었다.

이병과율을 조사한 결과 7월 상순에 최초 발병이 관찰되었으며, 7월 중순에는 조사 6개 과원 중 4개 과원에서 발병이 확인되었다. 발병율은 7월 상순 0.1%, 7월 중순 0.1%, 7월 하순 0.2%로 조사되었다(표 4).

표 2. 신초에서의 탄저병 발생율 (1999, 5월-7월)

조사포장	조사시기별 발생율(%)							
	5		6		6		7	
	중순	하순	상순	중순	하순	상순	중순	하순
진주시 진성면	-	0	0	0	0	0	0	0
김해시 진영읍	-	0	0.4	0.4	0.5	0	0.5	0.5
한림면	0	0	0	0	0	0	0	0
창원시 동읍	0	0	0.4	0.4	0.4	0	0.4	0.4
북면	0	0	0	0	0	0	0	0
밀양시 초동면	0	0	0	0	0	0	0	0
평균	0	0	0.1	0	0	0	0.1	0.1

표 3. 탄저병 이병과율조사 (%)

조사포장	조사시기별 발생율(%)				
	6 중순	6 하순	7 상순	7 중순	7 하순
진주시 진성면	0	0	0.2	0.4	0.2
김해시 진영읍	0	0	0.2	0.2	0.4
한림면	0	0	0	0	0
창원시 동읍	0	0	0	0	0
북면	0	0	0	0.2	0.4
밀양시 초동면	0	0	0	0.1	0.2
평균	0	0	0.1	0.1	0.2

1999년도와 같은 시기에 같은 과수원을 조사한 결과, 2000년에는 1999년 신초에서 탄저병 최초 발생시기인 6월 상순에 발병을 관찰 할 수 없었다(표 4).

표 4. 단감나무 신초의 탄저병 발생율(%)

시 험 장 소	순 별			
	5월 중순	5월 하순	6월 상순	6월 중순
진주시 진성면	0	0	0	0
김해시 진영읍	0	0	0	0
한림면	0	0	0	0
창원시 동 읍	0	0	0	0
북 면	0	0	0	0
밀양시 초동면	0	0	0	0
평 균	0	0	0	0

2000년에도 1999년 유과기 탄저병 최초 발생시기인 7월까지의 이병과일을 조사 과원에서 볼 수 없었다(표 5). 최초 발생시기는 1999년도 보다 약 1달 정도 늦은 8월 상순에 1곳의 과원에서 관찰되었으며, 이후 발생과원은 증가하였다. 또한 9월의 경우 모든 과원에서 이병과일을 관찰 할 수 있었다.

표 5. 시기별 탄저병의 이병과율 (2000년도)

시 험 장 소	순 별											
	7 상순	7 중순	7 하순	8 상순	8 중순	8 하순	9 상순	9 중순	9 하순	10 상순	10 중순	10 하순
진주시 진성면	0	0	0	0	0	0	0	0	0.2	0.2	0.2	0
김해시 진영읍	0	0	0	0	0	0	0	0.2	0.5	0.3	0	0
한림면	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.2	0	0
창원시 동 읍	0	0	0	0	0	0	0	0.3	0.3	0.9	0.9	0
북 면	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0.9	0
밀양시 초동면	0	0	0	0.4	8.6	2.3	3.3	9.2	3.1	2.8	1.7	3.2
평 균	0	0	0	0.3	1.4	0.4	0.6	1.6	0.7	0.8	0.6	0.5

2001년에는 7월부터 9월까지 동일한 포장을 대상으로 탄저병에 의한 이병과율을 조사한 결과 표 6과 같다. 2000년도에 비하여 10일 정도 빠른 7월 하순부터 1곳의 포장에서 이병과일을 관찰 할 수 있었으며, 발생한 포장의 경우 시간에 따라, 발병율이 증가하는 것을 관찰 할 수 있었다.

표 6. 시기별 탄저병의 이병과율(2001년도)

시 험 장 소	7			8			9		
	상순	중순	하순	상순	중순	하순	상순	중순	하순
진주시 진성면	0	0	0	0	0	0	0	0	0
김해시 진영읍	0	0	0	0	0	0	0	0	0
한림면	0	0	0	0	0	0	0	0	0
창원시 동 읍	0	0	0	0	0	0	0	0	0
북 면	0	0	0	0	0	0	0	0	0.1
밀양시 초동면	0	0	0.2	0.6	2.1	5.4	4.6	2.7	0.9
평 균	0	0	0.03	0.10	0.35	0.90	0.77	0.45	0.17

#### 탄저병의 발생부위

병반이 나타난 위치를 살펴보면 적도부로 과실당 4.8개의 병반을 보였다(표 7). 발병부위별 병반의 크기는 주로 2mm 이하의 병반이 나타났고(표 8), 가장 많은 병반수를 보인 적도부의 병반의 크기도 2mm 이하의 병반이 가장 많았으며, 20mm 이상의 병반은 가장 적은 것으로 조사되었다(표 7. 8).

표 7. 과일에서의 탄저병의 발생 부위

조사포장	조사과수	병 반 부 위				
		과정부	적도부	꼭지부	계	
진주시	진성면	317	803	1,978	565	3,346
김해시	진영읍	274	269	617	302	1,188
	장유면	285	491	1,003	389	1,883
창원시	동읍	252	518	2,416	692	3,626
	북면	179	166	664	129	959
밀양시	삼랑진읍	160	98	414	226	738
계		1,467	2,345	7,092	2,306	11,740
점유율(%)		-	20.0	60.4	19.6	1,956.7
과실당 병반수 (개)		-	1.6	4.8	1.6	8.0

표 8. 과일에 나타난 병반의 크기

조사포장		조사과수 (개)	병반수(개)					계
			<2mm	2~5	5~10	10~20	20<	
진주시	진성면	317	353	93	55	42	22	565
김해시	진영읍	274	129	51	55	54	13	302
	장유면	285	200	69	69	27	24	389
창원시	동읍	252	457	129	71	26	9	692
	북면	179	83	15	11	16	4	129
밀양시	삼랑진읍	160	121	46	32	16	11	226
계		1,467	1,343	403	293	181	83	2,303
점유율(%)		-	58.3	17.5	12.7	7.9	3.6	100
과실당 평균병반수 (개)		-	0.9	0.3	0.2	0.1	0.1	1.6

나) 과수원의 토양의 무기양분 및 과수의 무기양분 조사

발병 현황조사 과수원의 토양을 대상으로 토양 분석 방법(농촌진흥청)에 준하여 토양 이화학성을 조사한 결과(표 9)와 같다. 탄저병 발생율이 높은 과원의 경우 대체로 칼슘과 가리 함량이 적은 것으로 나타나 이러한 토양 조건이 단감나무의 생리에 영향을 미쳤을 것으로 생각된다. 그러나 이러한 함량의 차이는 통계적 유의성은 보이지 않았다. 또한 발병율이 높았던 과원의 토양 산도가 5.0이하로 나타났고, 이러한 산도는 근권 토양 영양분의 식물체로의 흡수에 악영향을 미쳐 수세관리 및 과수의 건강 상태에도 영향을 미쳤을 것으로

생각된다.

표 9. 과수원 근권토양의 토양이화학성

지 역	발생율 (%)	pH	N(%)	P (ppm)	K (me/100g)	Ca (me/100g)	Mg (me/100g)	Mn (ppm)
창 녕	15.9	4.6	0.31	1164.0	1.02	3.30	1.30	32.3
창 원	3.0	5.7	0.33	614.9	1.90	4.90	0.82	28.7
김 해1	2.5	5.8	0.37	764.9	1.00	5.00	1.00	51.2
김 해2	0.1	4.8	0.26	1640.0	1.09	1.99	1.20	-
밀 양	11.5	4.8	0.20	225.0	0.40	1.30	0.24	12.2
경 주1	1.1	6.8	0.27	984.5	0.95	8.64	2.50	17.7
경 주2	1.0	6.9	0.37	480.7	0.66	10.90	4.35	27.9
경 주3	18.0	5.5	0.35	273.2	0.77	8.80	4.40	38.4

과육의 무기성분을 조사한 결과, 건전과육과 이병과육 사이의 차이를 보이는 것은 칼슘과 망간의 함량으로 조사되었다(표 10). 특히 칼슘은 세포벽의 주요 성분으로 병과의 깊은 관계가 있는 것으로 알려져 있는데 이 조사에서도 이병과보다 건전과에서 칼슘의 함량이 높은 것으로 조사되었다. 망간의 함량은 이병과보다 건전한 과일에서 함량이 많은 것으로 조사되었는데 망간은 몇몇 병에 관해서 식물체의 병 저항성 기작에 관여하는 것으로 알려져 있다.



표 10. 과육 무기성분 분석

지	역	N(%)	P(ppm)	K(%)	Ca(ppm)	Mg(ppm)	Mn(ppm)
창녕	건전과육	0.29	2703.8	1.40	881.0	872.6	213.9
	이병과육	0.27	3010.8	1.63	736.5	875.6	158.4
창원	건전과육	0.24	2665.3	1.75	1042.4	817.6	286.5
	이병과육	0.35	2718.3	1.73	917.4	849.0	180.8
김해2	건전과육	0.14	2120.0	1.21	830.7	876.1	197.1
	이병과육	0.28	2593.9	1.55	825.5	757.3	205.3
밀양	건전과육	0.47	2978.8	2.08	1107.7	991.7	254.8
	이병과육	0.42	3467.6	2.30	959.4	1043.1	164.0
경주2	건전과육	0.29	3559.3	1.62	760.2	947.3	27.3
	이병과육	0.44	4537.0	2.34	476.2	852.2	19.9
경주3	건전과육	0.43	3398.6	1.89	1132.4	1217.7	166.1
	이병과육	0.39	3521.1	2.06	1113.8	1186.3	161.6

다) 재식 거리 조사

단감나무의 과원 내 재식 거리는 위의 발생현황 조사 과원의 탄저병이 발생한 과원과 낮은 발생율을 보였던 다른 과원에서 과수사이의 재식거리를 측정하여 발병율과의 상관관계를 구하였다(그림 1). 재식 거리가 4mm이하의 경우 약 10.0% 이상의 발병율을 보였으며, 재식 거리가 5mm이상일 경우 2.0% 이하의 발병율을 보여 탄저병 방제에서의 과원내의 통기성 향상이 선결되어야 할 항목임을 제시한다. 회귀식은  $y = -3.024 + 19,929x$ ,  $R^2 = 0.5686$ 이었다.

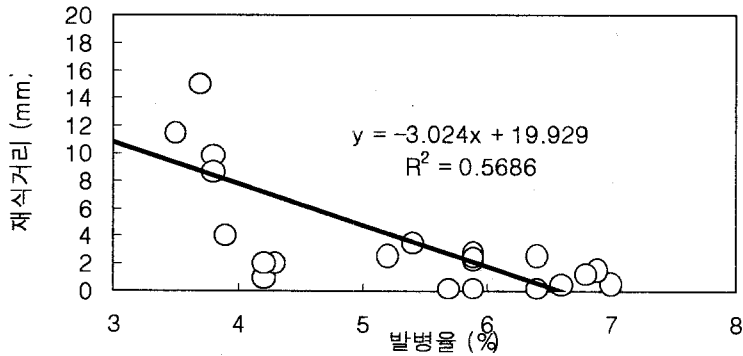


그림 1. 재식거리와 발병율의 관계

전국 최대의 단감재배지로 유명한 김해지역(1999년 7월 상순 발병, 2000년도 7월 상순 무발병)의 기상 요인 중 강수량, 상대습도 및 강우 일수를 분석한 결과 6월과 7월 상순 중 강수량에서 현저한 차이를 보여 이러한 요인이 초기 발병에 영향을 미쳤을 것으로 생각되며, 결로시간에 따른 발병시험의 결과를 뒷받침하는 결과로 생각된다.

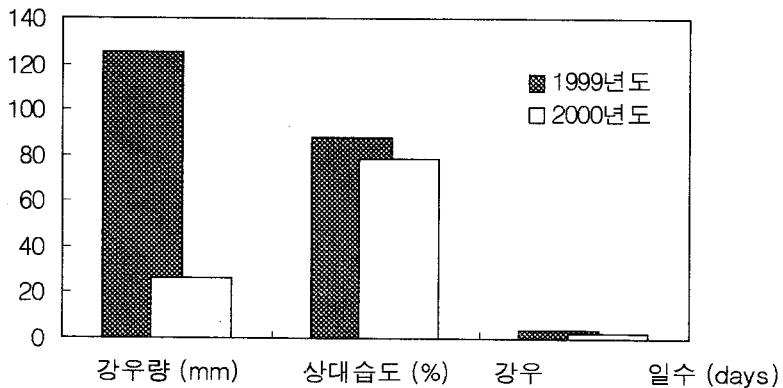


그림 2. 1999년도의 탄저병(과일) 최초 발생시기인 7월 기상요인과 2000년도 7월의 기상요인 비교

## 라) 포자 비산

1998과 1999년 11월에 이병과를 채집하여 지표면과 지하부에 보관하며 월동 후 포자 비산량을 조사한 결과, 지표면에서 4월까지의 포자의 비산을 관찰하지 못하였으나 1998년 5월 7일 최초로 포자의 비산이 관찰되었고 조사 기간중 5월 중순과 6월 초순에 비산량이 다른 시기보다 많았다. 기상 자료와 연관하여 분석한 결과 2-3일간 강우가 계속되어 습도가 증가하는 시기에 포자 비산량이 다른 시기보다 높다는 것을 볼 수 있었다(그림 3). 지하부에 묻어놓은 이병과일로부터는 지표면과 같은 시기인 5월 7일에 최초 비산이 관찰되었으며 비산 경향은 지표면 처리와 유사하였다(그림 4). 1999년 11월에 이병과를 채집하여 지표면에 보관하며 월동 후 포자비산량을 조사한 결과 지표면에서 4월까지의 포자의 비산을 관찰하지 못하였으나, 5월 27일 최초로 포자의 비산이 관찰되어 1차년도와 비교하여 약 20일 정도 늦게 관찰되었고, 조사 기간 중 5월 중순과 6월 초순에 비산량이 다른 시기보다 많았다. 기상 자료와 연관하여 분석한 결과 2-3일간 강우가 계속되어 습도가 증가하는 시기에 포자 비산량이 다른 시기보다 높다는 것을 볼 수 있었다(그림 5).

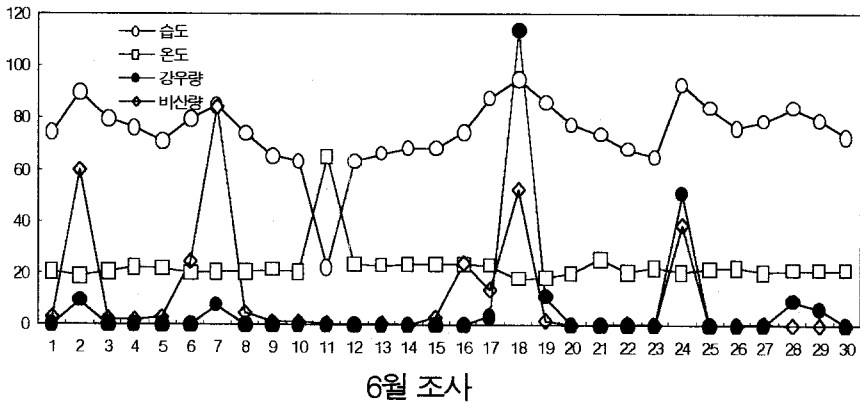
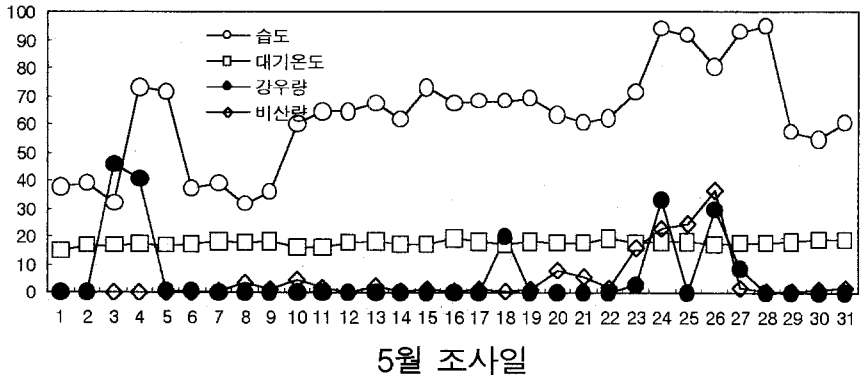
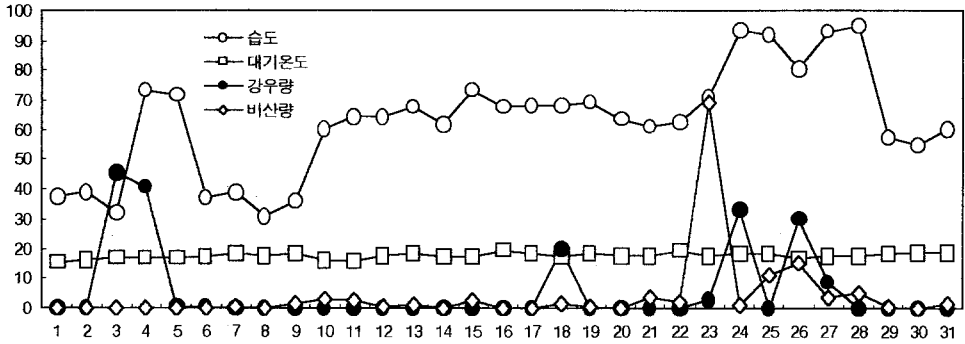
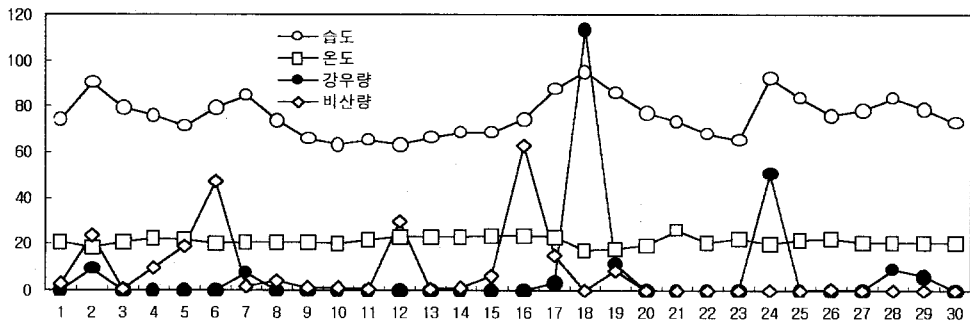


그림 3. 병든 과일들의 지표면 방치 후 탄저병균 포자 비산량 조사(1999)

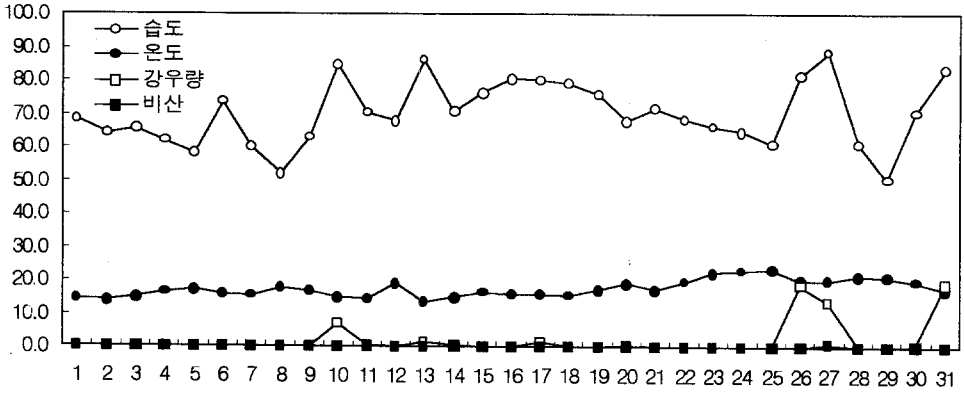


5월 조사일

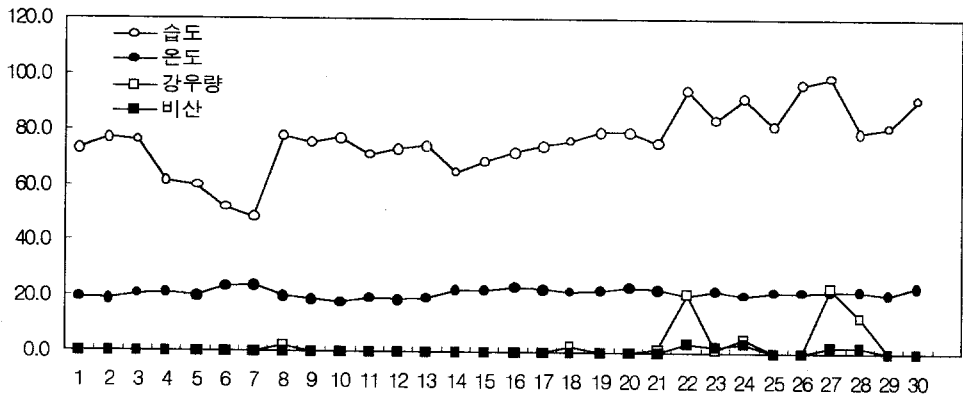


6월 조사일

그림 4. 지하부에 병든 단감을 묻어놓은 후 탄저병균 분생포자의 비산량 조사(1999)



5월 조사일



6월 조사일

그림 5. 병든 과일의 지표면 방치 후 탄저병균 포자 비산량 조사(1999)

#### 4. 고찰

단감 주산지인 경남·북 지방의 단감 과수원을 선정하여 1998, 1999 및 2000년도 총 3년간 탄저병 이병율을 조사한 결과(표1-6), 첫째 발병율이 10% 이상이었던 과원은 조사기간 동안 이병과율이 10%이상으로 유지되었는데 이러한 과원은 재배시즌 초기의 병해 잔존물의 위생적인 처리 없이는 효과적인 병방제를 기대하기 어려울 것으로 생각된다(1). 과일에서의 병반은 일정 부위 없이 과일 전체에 나타나는 것으로 조사되었으며(표 7), 초기의 병반은 약 2mm이하로 병의 진전과 함께 인근 병반과 접합되면서 병반의 확대 및 과일의 낙과를 촉진하는 것으로 조사되었다(표 8). 1999년과 2000년도 최초 발생시기의 기상요인을 비교해 본 결과, 6-7월의 많은 강우는 병의 발생과 병 진전을 촉진하는 것으로 나타났는데, 이는 6-7월의 기상 조건을 고려할 경우 탄저병 방제를 위하여 집중적인 약제 방제가 요구되는 시기로 판단된다. 또한 시기별로 발병율을 조사한 결과, 장마 후인 9월에 탄저병의 발병율이 급격히 증가하는 것으로 나타나 장마 전후에 방제를 위한 노력이 집중되어야 할 것으로 생각된다(8). 이병율 조사 과원의 토양 이화학 성분을 분석한 결과(표 9), 토양 산도는 이병율이 높았던 과원에서 5.0이하로 나타나 토양의 산성화에 따른 영양공급의 불균형으로 수세악화가 탄저병의 감염율을 높힌 것으로 판단된다(7, 10, 11, 12). 특히 토양의 산성화는 불용성 인산의 증가와 일부 금속 원소의 토양내 용해도를 증가시켜 다른 성분의 용해와 작물내로의 흡수 저해를 유발시키는 것으로 알려져있다(1, 11). 과육의 무기성분 분석 결과(표 10), 이병율이

높았던 창녕과 밀양의 과원에서 수집한 이병과육의 경우 건전 과육에 비하여 칼슘과 망간의 함량이 낮은 것으로 나타났는데, 칼슘의 부족은 세포 증벽의 약화를 초래하여 병원균에 의한 감염을 초래한 것으로 생각된다(1). 또한 망간은 여러 작물에서 병 저항성 물질의 유도에 관여하는 것으로 보고되어 있는 점을 고려 할 경우, 토양 산성화에 따른 망간의 식물체내로의 흡수 저해는 식물체(단감 과일)자체의 방어 능력의 저하를 초래했을 가능성이 있는 것으로 판단된다(9).

재식 거리와 발병율의 상관관계를 분석한 결과(그림 1), 이병율이 높았던 과수원의 경우 재식 거리 또한 좁았던 것으로 나타나 높은 밀도의 식재로 인한 통기성의 부족과 약제 살포시의 어려움이 이병율을 증가시킨 것으로 판단된다. 또한 통기성의 부족은 재식 거리가 넓어 공기의 흐름이 원활한 과원에 비하여 과수 혹은 과일의 결로 시간 및 포장 전체의 상대습도를 높였던 원인이 되어 이병율을 증가시켰을 것이다(1, 6, 8, 9, 10). 이러한 사실은 1999년도와 2000년도의 과일에서 최초 탄저병의 감염이 관찰되었을 때의 기상요인을 분석해 본 결과 2000년도에 비하여 1999년도의 강우량이 높았던 사실이 이를 뒷받침한다고 판단한다. 위의 발생 현황에 관한 조사를 토대로 단감 재배시 대발생하여 농가의 소득에 막대한 손실을 주는 탄저병은 적절한 과원의 토양 관리와 과원내의 적절한 과수의 밀도 조절에 따른 통기성의 확보가 약제 살포에 의한 탄저병 방제보다 앞서 선결되어야 할 숙제로 생각된다. 또한 긴 장마 전후의 적절한 살균제의 살포는 반드시 방제를 위하여 필요한 것으로 판단되며,



이른 봄 잦은 강우시 전년도 이병 잔존물로부터 비산하는 분생포자에 의한 1차 전염을 억제 또는 보호하기 위해 석회보르드액과 같은 보호살균제의 살포가 반드시 수행되어야 할 것으로 생각된다(2-5). 또한 토양의 이화학적 성질 및 과수의 무기 영양분의 분석을 통한 올바른 영양공급으로 수세의 유지와 식물 자체의 병에 대한 저항성을 증가시키는 노력이 동시에 이루어져야 화학 살균제를 이용한 탄저병의 효과적인 방제가 이루어지리라 생각된다(1, 7).

## 5. 참고문헌

1. Agrios, G. N. 1997. *Plant Pathology*. Academic Press, Inc., New York. 635pp
2. Bernstein, B., Zher, E.I., and Dean, R. A. 1995. Characteristics of *Colletotrichum* from peach, apple, and other host. *Plant Disease* 79(5):478-482.
3. Casela, C.R., and Frederiksen, R.A. 1993. Survival of *Colletotrichum graminicola* sclerotia in sorghum stalk residues. *Plant disease* 77(8): 825-827.
4. DeVllavieille-Pope, C., Huber, L., Leconte, M., and Goyeau. H. 1995. Comparative effects of temperature and interrupted wet periods on germination, penetration, and infection of *Puccinia recondita* f. sp. *tritica* and *P. striiformis* on wheat seeding. *Phytopathology* 85(4) : 409-415.

5. Dillard, H.R., and Cobb, A.C. 1993. *Colletotrichum lindemuthianum* bean debris in New York State. Plant Disease 77(12) 1233-1238.
6. Evans, K.J., Nyquist, W.E., and Latin, R.X. 1992. A model based on temperature and leaf wetness during for establishment at Alternaria leaf blight of maskmelon. Phytopathology 82(8) : 890-895.
7. 김성봉. 1992. 단감재배 신기술. 오성출판사 35-80.
8. 김완규, 조의규, 이은종. 1986. 고추탄저병균 *Colletotrichum gloeosporioides* Penz.의 감염. 한국식물병리학회지 2: 107-113
9. Scherm, H., and Bruggen, A. H. C. 1994. Current spore release infection of lettuce *Bremia lettucae* during morning with prolonged leaf wetness. Phytopathology 85(5): 552-555.
10. 中臣康範. 宮川正通. 1984. 新潟園試試驗成績書 11-12.
11. 前田 知. 1954. 柿炭疽病菌の冬芽越冬. 園藝學會昭 29秋. 講要:1.
12. 谷 利一. 1957. 柿炭疽病菌の培地上の性質並びに同菌有傷接種による柿果上での病斑進展と分生 胞子形成の品種間差異. 香川大學報8(1):115-120.

# 제 4 장 분자 생물학적 기법을 이용한 조기진단 기술 의 개발

## 1. 서설

현재까지의 단감의 탄저병 방제로는 체계적으로 연구된 방제력이 없어, 대부분의 농가에서는 일반과수의 탄저병에 준하거나 일본 방제력에 의존해 무계획적인 살균제의 살포에 의존하고 있을 뿐이다. 그러므로 분자생물학적 방법을 이용한 조기진단법 개발, 정확한 예찰과 동정 및 효과적 살균제 선발, 약제 살포 횟수와 살포시기의 구명 등 현재 과학적이고 체계적인 연구의 미흡으로 과다한 노동력 투입되고 약제의 남용에 따른 생산비 증가와 환경 오염 문제를 야기 시키고 있는 실정이다. 따라서 탄저병을 최소화하기 위한 전략으로 조기진단법의 개발을 통해 초기 예찰 및 방제 적기 구명이 선결되어야 할 것으로 생각된다.

또한 신속 정확하게 병원균에 대하여 활력을 지닌 살균제의 선발, 스크리닝법 및 살포횟수 확립이 필요하다. 이러한 기술의 확립은 이들 병 방제를 위한 살균제 사용의 올바른 방법을 제시하는 기초자료를 제공하는 동시에 살균제 저항성 균의 발생을 억제 할 수 있는 전략 확립에 유용한 자료를 제공할 것이다. 탄저병(*Glomerella cingulata*)균의 분리와 동정에 많은 시간과 노력이 필요하므로 관행적인 병원균의 분리, 검출, 동정의 방법보다 신속하고 민감한 분자생물학적 방법의 개발이 절실히 요구된다. 탄저병의 예방과 진단을 위한 병원균의 검출과 동정 방법은 미생물학이 발전하면서 꾸준히 발전해 왔다. 하지만 최근 수년간 분자생물학과 미생물 유전학의 발전으로 병원균의 특이적 유전자를 이용한 진단 분자 미생물학이 급속하게 발전하고 있으며 임상분야에 크게 실용화되고 있다. 특히 중합효소연쇄반응(PCR)을 이용한 병원균의 검출

방법은 병 진단의 가장 큰 특징인 신속성, 정확성, 민감성에 있어서 가장 우수한 방법으로 평가되고 있으며, 이를 응용하는 방법에 대한 연구가 증가하고 있다. PCR 방법은 지금까지 개발된 가장 민감한 방법으로 알려진 단일항체(monoclonal antibody)를 이용한 ELISA 방법보다 최소한 10만배-1만배 이상 민감한 방법으로 알려져 있다. PCR 방법은 병원균의 배양 없이 시료로부터 직접 DNA를 추출하여 사용할 수 있으므로 배양이 어려운 병원균, 밀도가 낮은 병원균, 혼합 감염된 병원균도 매우 효과적으로 검출하는 방법으로 알려져 있다.

## 1. 2 서론

탄저병을 최소화하기 위한 전략으로 조기 진단법의 개발을 통해 초기 예찰 및 방제 적기 구멍이 선결되어야 할 것으로 생각된다. 또한 신속 정확한 병원균에 대하여 활력을 지닌 살균제의 선발, 스크리닝법 및 살포횟수 확립이 필요하다. 이러한 기술의 확립은 이들 병 방제를 위한 살균제 사용의 올바른 방법을 제시하는 기초자료를 제공 할 것이다. 탄저병(Antracnose)의 병원균의 분리, 동정에 많은 시간과 노력이 필요하므로 관행적인 병원균의 분리, 검출, 동정의 방법보다 신속하고 민감한 분자생물학적 방법의 개발이 절실히 요구된다. 병의 예방과 진단을 위한 병원균의 검출과 동정 방법은 미생물학이 발전하면서 꾸준히 발전해 왔다. 하지만 최근 수년간 분자생물학과 미생물 유전학의 발전으로 병원균의 특이적 유전자를 이용한 진단 분자 미생물학이 급속하게 발전하고 있으며 임상분야에 크게 실용화되고 있다. 특히 중합효소연쇄반응(PCR)을 이용한 병원균의 검출방법은 병 진단의 가장 큰 특징인 신속성, 정확성, 민감성에 있어서 가장 우수한 방법으로 평가되고 있으며, 이를 응용하는 방법에 대한 연구가 증가하고 있다. PCR 방법은 지금까지 개발된 가장 민감한 방법으로 알려진 단일항체(Monoclonal Antibody)를 이용한 ELISA

방법보다 최소한 10만배-1만배 이상 민감한 방법으로 알려져 있다. PCR 방법은 병원균의 배양 없이 시료로부터 직접 DNA를 추출하여 사용할 수 있으므로 배양이 안되는 병원균, 밀도가 낮은 병원균, 혼합 감염된 병원균도 매우 효과적으로 검출하는 방법으로 알려져 있다. 본 연구에서는 분자 생물적 기법을 이용하여 단감 탄저병원균에 특이적으로 반응하는 probe를 개발하여 이를 이용한 탄저병의 조기진단 및 잠복 감염의 확인 등에 이용하는데 그 목적을 두고 수행하였다.

## 2. 재료 및 방법

단감나무에 생기는 탄저병을 일으키는 탄저병균을 분리한 후 균주(표 1)를 PDA(Potato Dextrose Agar) 배지상에 옮겨 계대배양 하였다. 실험을 수행하기 위하여 PDA(Potato Dextrose Agar)배지에서 7일간 배양한 균주를 PDB(Potato Dextrose Broth)배지에 cork-borer를 이용하여 접종하여 25℃에서 15일간 120rpm으로 진탕배양 하였다.

### 1) Genomic DNA의 분리

배양한 탄저병균들의 genomic DNA를 추출하기 위해서 PDB(Potato Dextrose Broth) 배지에서 15일간 자란 균사를 사용하였다. 광목천으로 PDB(Potato Dextrose Broth)에서 자란 균사를 거른 후 균사의 배지 성분을 제거하기 위해 멸균수로 2-3회 세척한후 균사를 동결건조하였다. 동결건조된 균사를 액체질소를 이용해 마쇄하고 멸균된 50ml tube에 넣어 -70℃ 냉동고에 보관하면서 사용하였다. DNA의 추출은 마쇄된 균사 5g에 lysis buffer(50mM Tris-HCl, pH 8.0; 50mM EDTA, pH 8.0; 3% Sodium Dodecyl Sulfate; 1% 2-mercaptoethanol) 10ml(W/V)을 넣고 68℃ 항온수조에서 1시간 동안 반응시킨다음 3,000rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 Phenol

/Chloroform /Isoamylalcohol (25:24:1)과 Chloroform /Isoamylalcohol (24:1)처리과정을 순차적으로 1회씩 처리한 후, 13,000rpm 에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 상층액에 동량의 isopropanol을 첨가하여 12시간 이상 -20℃냉동고에 보관하였다. 보관된 상층액을 13,000rpm에서 10분간 원심분리하여 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA가 들어 있는 tube에 70% ethanol 500ml를 넣고 세척한 다음 실온에서 완전히 건조시키고 RNase(50 $\mu$ l/ml)가 첨가된 TE buffer(10mM Tris-Cl, 1mM EDTA, pH7.4) 1 ml에 충분히 녹인 후 37℃에서 1시간 보관하였다 (그림 1). DNA를 0.8% Agarose gel을 사용하여 0.5X buffer상에서 100V/cm의 전원으로 60분간 전기 영동 후 UV상자 상에서 이미 농도를 알고 있는 100 lambda DNA를 기준하여 농도를 확인하였고, 확인된 DNA는 -20℃ 냉동고에 보관하여 사용하였다.

## 2) RAPD

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 분석을 통하여 탄저병균주들의 각 균주간 다형화 현상과 maker를 찾아보기 위해 Operon random primer (10-mer)를 실험에 사용하였다(표 2). PCR 반응은 1X reaction buffer, 200 $\mu$ M dNTPs, 1 unit Taq polymerase, 2.5 $\mu$ M primer, 10 ng DNA의 조성으로 최종 20 $\mu$ l의 양으로 수행하였다. PCR 반응조건은 95℃에서 5분간 초기 완전 변성시킨 후, 94℃에서 1분, 35℃에서 1분, 72℃에서 2분간을 한 cycle로 최종 45회 반복하고 72℃에서 10분간 반응시킨 후, 4℃에서 보관하였다. 증폭된 PCR산물은 0.5 $\times$ TBE(0.045M Tris-borate, 0.001M EDTA) buffer를 사용하여 1.5% agarose gel에서 2시간 동안 전기 영동한 후 UV 상자에서 전개된 DNA 단편들의 양상을 관찰하였다.

표 1. 연구에 사용된 균주

Group No.	Isolate No.	Isolate Name
G-1	1	Kungju 1
	2	Kungju 2
	3	Kungju 3
	4	Kungju 5
	5	Kimhae 3
	6	Kimhae 10
G-1-1	7	Changnyung 17
	8	Kimhae 11
	9	Kimhae 27
	10	Milyang 18
	11	Milyang 19
	12	Milyang 20
	13	Changwon 3
	14	Changwon 15
	15	Changwon 29
G-2	16	Milyang 11
	17	Kimhae 22
	18	Kyungju 6
	19	Changwon 4
	20	Changwon 8
	21	Changwon 19
	22	Milyang 7
	23	Changwon 27
	24	Changnyung 16
	25	Changnyung

표 2. 사용 primers

Primer No.	Base sequences(5' to 3')	No. of bands
OPB-2	TGATCCCTGG	12(10)
OPB-3	CATCCCCCTG	14(11)
OPB-4	GGACTGGAGT	13(10)
OPB-5	TGCGCCCTTC	8(6)
OPB-6	TGCTCTGCCC	9(8)
OPB-7	GGTCACGCAG	6(3)
OPB-8	GTCCACACGG	14(11)
OPB-9	TGGGGGACTC	11(8)
OPB-10	CTGCTGGGAC	11(1)
OPB-11	GTAGACCCGT	13(10)
Total		111(78)

### 3) AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism)

본 실험에서는 genomic DNA 2 $\mu$ g에 *EcoR* I(BRL, Germany) 5unit를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 12시간동안 절단한 후 2.5배의 ethanol을 첨가하여 -70 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 침전시킨 후 14,000rpm에서 30분동안 원심분리하여 절단된 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA는 실온에서 충분히 말린 후 *Mse* I(Gibco, USA)으로 DNA를 다시 절단한 후 위와 같은 방법으로 다시 침전시켰다. 침전된 DNA는 멸균된 3차 증류수에 녹인 뒤 5unit의 T4 DNA ligase(Promega, USA)와 0.5 $\mu$ M의 *EcoR* I/*Mse* I adaptor를 첨가한 후 14 $^{\circ}$ C에서 12시간 ligation 시켰다. Ligation 된 DNA는 1:10으로 희석하여 pre-amplification을 하기 위한 재료로 사용하였다.

Pre-amplification은 adaptor에 상보적인 염기서열을 가진 primer를 이용하여 제한효소로 절단된 DNA 중 특정부위의 DNA만 증폭시킨다. PCR 반응조건은 희석된 DNA 5 $\mu$ l에 1X buffer (10mM Tris-HCl, pH8.8, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM KCl, 0.1% Triton X 100), 200 $\mu$ M dNTP, 0.5 $\mu$ M *EcoR* I-0/*Mse* I-1



primer, 1 unit Taq DNA polymerase(Dynazyme™)를 첨가하여 Perkin-Elmer thermal cycler에서 94℃ 30초, 60℃ 1분, 72℃ 1분을 1 cycle로 최종 20회 반복하고 반응을 종료하였다.

Pre-amplification의 PCR 산물은 1:50으로 희석하여 2차 PCR 반응을 수행하기 위한 재료로 사용하였다. 2차 PCR 반응의 조건은 Pre-amplification으로부터 희석된 DNA 5 $\mu$ l에 1X buffer(10mM Tris-HCl, pH8.8, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM KCl, 0.1% Triton X 100), 200  $\mu$ M dNTP, 0.5  $\mu$ M *EcoR* I-2/*Mse* I-3 primer, 1 unit Taq DNA polymerase(Dynazyme™)를 첨가하여 최초 94℃에서 30초, 65℃에서 30초, 72℃에서 1분을 첫 cycle로 시작하여 다음 cycle부터는 annealing 온도를 1℃씩 감소시키면서 11 cycles를 반복한 뒤 마지막으로 94℃에서 30초, 56℃에서 30초, 72℃에서 1분을 23회 반복하고 반응을 종료하였다.

최종 PCR 반응이 끝난후 PCR산물 6 $\mu$ l를 취하여 formamide loading dye(95% formamide, 10mM EDTA, pH8.0, 0.05% bromo phenol blue, 0.05% Xylene cyanol FF) 4 $\mu$ l와 혼합한 뒤 95℃에서 5분간 가열하여 준 다음 그중 6 $\mu$ l를 55℃로 미리 가열된 6% denaturing polyacrylamide gel (acrylamide:bisacrylamide =19:1), 7.5M urea, 1X TBE (0.89M Tris-HCl, pH8.3, 0.89M boric acid, 0.02M EDTA, pH8.0)에 loading한 후 1,800V 80W에서 3시간동안 전기영동 한 다음 silver staining으로 결과를 분석하였다.

표4. AFLP 분석을 위한 Oligonucleotide adapters 와 primers

---

<i>EcoR</i> I -adaptor <sup>a/</sup> CTCGTAGACTGCGTACC	
CATCTGACGCATGGTTAA	
<i>Mse</i> I -adaptor <sup>a/</sup> GACGATGAGTCCTGAG	
TACTCAGGACTCAT	
AFLP primer <sup>b/</sup>	
<i>EcoR</i> I +0: GACTGCGTACCAATTC	<i>Mse</i> I +0: GATGAGTCCTGAGTAA
<i>EcoR</i> I +2	<i>Mse</i> I +3
E1 GACTGCGTACCAATTC+AT	M1 GATGAGTCCTGAGTAA+CAG
E2 GACTGCGTACCAATTC+AC	M2 GATGAGTCCTGAGTAA+CAC
E3 GACTGCGTACCAATTC+TA	M3 GATGAGTCCTGAGTAA+CTA
E4 GACTGCGTACCAATTC+TG	M4 GATGAGTCCTGAGTAA+CTT
Primer combinations analyzed in this experiment	
E1/M1	E1/M2 E1/M3
E2/M1	E2/M2 E2/M3
E4/M2	E4/M2 E4/M3

---

<sup>a/</sup> *EcoR* I and *Mse* I adaptors were ligated onto the ends of restriction fragments of template genomic DNAs.

<sup>b/</sup> *EcoR* I +0 and *Mse* I +0 primers were used in the preamplification of template DNA. The AFLP fingerprint was generated using pairs *EcoR* I +2 and *Mse* I +3 primers.

3) Cloning of ITS region

Cloning을 위해서 Wizard<sup>®</sup> PCR Preps(DNA Purification System)을 사용하여 증폭된 DNA 절편을 정제했다. Taq DNA polymerase에 의한 PCR산물은 양끝에 adenine이 붙는 특징이 있어 직접 ligation 할 수 있도록 제작된 pGM<sup>®</sup>-T Easy Vector에 ligase시킨 후 cell에 transformation 하고

white/blue 선발을 거쳐 DNA가 삽입된 것으로 사료되는 colony을 선발하여 ampicillin( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ )이 들어 있는 LB broth에서 16시간 정도 배양한 후, Birnion(1979)과 IshHorowicz (1981) 등의 방법을 수정하여 plasmid를 추출한 후 pUC/M13 forward primer(CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC)와 pUC/M13 reverse primer(TCACACAGGAAACAGCTATGAC)를 사용하여 PCR증폭으로 삽입여부를 확인한 후 automatic sequencer를 이용해 염기서열을 밝혔다.

#### 4) Southern hybridization

##### (1) Probe labelling

탄저병의 18S+ ITS I +5.8S+ITS II 영역을 probe로 사용하기 위해 PCR labelling 방법으로 표식하여 사용하였다. PCR labelling 반응물의 조성은 template DNA 10ng, primer  $0.5 \mu\text{M}$ , 10X buffer, 5 unit *Taq* polymerase, 0.1mM dGTP, dCTP, dATP, 0.09mM dTTP, 1mM digoxigenin-dUTP(Boehringer Mannheim, Germany)을 총  $100 \mu\text{l}$ 로 하여  $94^\circ\text{C}$ 에서 1분 30초,  $50^\circ\text{C}$ 에서 1분 30초,  $72^\circ\text{C}$ 에서 2분을 한 과정으로 하여 25번 반복한 후,  $72^\circ\text{C}$ 에서 4분을 반응시켰다. PCR-labelling 산물을 확인하기 위해서 1% agarose gel에서 전기 영동후 확인하였다.

##### (2) Hybridization

Blotting시킨 membrane을 standard hybridization solution(5X SSC, 0.02% SDS, 0.1% N-lauroylsarcosine, 1% blocking reagent)과  $60^\circ\text{C}$ 에서 1시간 동안 prehybridization 시킨 다음 기존의 buffer를 제거하고, denaturing한 probe  $30 \mu\text{l}$ 와 standard hybridization solution으로  $60^\circ\text{C}$ 에서 12시간

hybridization하였다.

### (3) Probe detection

Color detection은 anti-DIG-AP(Alkaline Phosphatase) conjugated antibody를 첨가하여 발색시키는 방법으로 hybridization한 membrane을 washing buffer(Maleic acid buffer, 0.3% Tween 20)에서 5분 정도 씻은 후, 1× Blocking solution 100ml에서 30분 동안 incubation시켰다. 1×blocking solution에 anti-DIG-AP conjugate를 첨가하여 30분 동안 membrane을 incubation 시키고 washing buffer(Maleic acid buffer, 0.3% Tween 20)에서 15분 동안, detection buffer(0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl, pH 9.5)에서 5분을 흔들어준 후, NBT/BCIP buffer(0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl, pH 9.5, NBT/BCIP)에서 5분 동안 흔들어준 뒤에 membran을 염색하였다.

### 5) Amplification of specific primer

탄저병원균의 ITS지역을 증폭, cloning 후 제작된 specific primer인 CO-1(ataacccttt gtgaacatac)와 ITS-4(tcctccgctt attgatatgc)를 이용하여 PCR을 다음과 같은 조건으로 수행하였다. 10 ng DNA, 200 μM dNTPs, 0.1 μM primer each(ITS3 primer: GCATCGATGAAGAACGCAGC, ITS4 primer: TCCTCCGCTTTATTGATATGC), 1Unit, polymerase, 1×buffer. 반응액을 초기 denaturing을 94℃에서 1 min. 으로 하고 94℃에서 30 sec. 55℃에서 30 sec. 72℃에서 30 sec.를 1 cycle로 총 30 cycle을 실행하며 최종 extension을 72℃에서 8 min. 으로 프로그래밍한 PTC-100™ Programmable Thermal Controller(MJ Research, Inc., USA)에서 반응시켰으며 증폭된 PCR 산물은 1% agarose(Metaphor® agarose)에서 확인하였다.

### 6)농도 결정

탄저병의 최소 농도를 결정하기 위해서 추출한 DNA로부터 1/10 의 비율로 희석하여 최소농도를 결정하였다( 100 $\mu$ g, 10 $\mu$ g, 1 $\mu$ g, 100ng, 10ng, 1ng, 100pg, 10pg, 1pg).

### 3. 결과

RAPD분석은 10개의 random한 primer를 사용하여 0.3-3.2k에 속하는 DNA band를 얻었으며, 이들을 NTSYS-pc program을 이용하여 이들의 유연 관계를 분석하고, 특이 band를 확인하였다. 창녕 17과 경주 3 균주는 높은 상동성을 보였으며, 경주 2와 김해 3은 0.439의 낮은 상동성을 보였다. 각각의 균주들은 크게 3그룹으로 나뉘었고, primer에 따라서 김해 3은 같은 그룹내의 균주나 다른 그룹의 균주들과 다른 특이성을 나타내기도 하였다(그림 1. 2 와 표3).

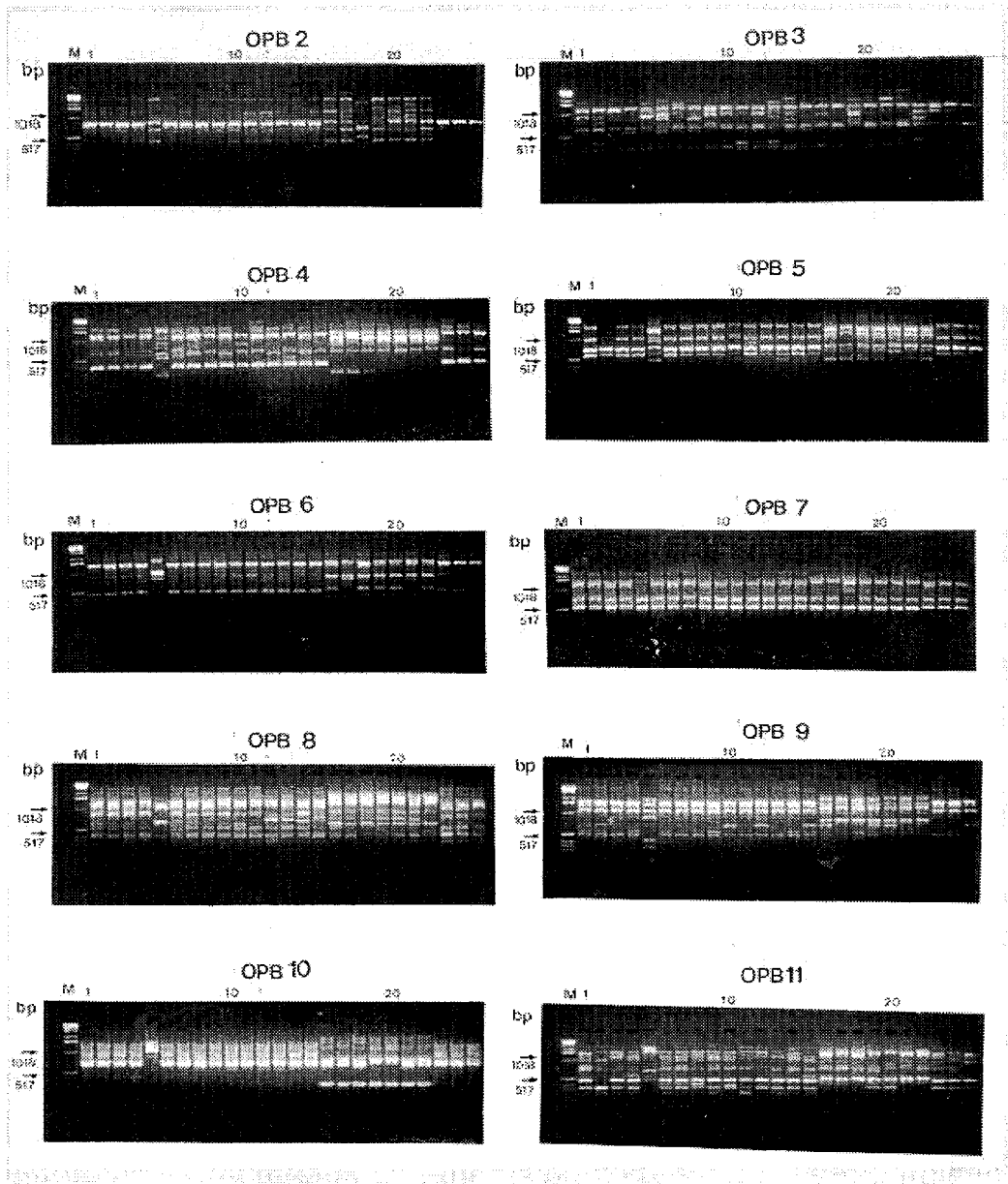


그림 1. 분리 탄저병균주의 PCR에 의한 증폭 Genomic DNA

표 3. RAPD 분석에 의한 유사성 분석

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
2	0.923																								
3	0.934	0.879																							
4	0.923	0.868	0.945																						
5	0.472	0.439	0.494	0.483																					
6	0.890	0.835	0.912	0.923	0.516																				
7	0.945	0.890	0.967	0.934	0.483	0.901																			
8	0.912	0.857	0.934	0.923	0.472	0.912	0.945																		
9	0.934	0.879	0.934	0.945	0.472	0.912	0.923	0.912																	
10	0.879	0.824	0.923	0.890	0.549	0.879	0.890	0.901	0.901																
11	0.912	0.857	0.912	0.901	0.450	0.846	0.923	0.868	0.912	0.857															
12	0.879	0.868	0.901	0.868	0.483	0.835	0.912	0.857	0.857	0.868	0.901														
13	0.857	0.802	0.857	0.868	0.505	0.879	0.846	0.879	0.879	0.846	0.857	0.868													
14	0.868	0.835	0.890	0.879	0.494	0.868	0.901	0.868	0.890	0.857	0.890	0.901	0.901												
15	0.824	0.791	0.846	0.857	0.560	0.824	0.857	0.824	0.802	0.857	0.846	0.879	0.813	0.824											
16	0.659	0.626	0.637	0.626	0.571	0.593	0.648	0.593	0.637	0.670	0.637	0.626	0.582	0.593	0.659										
17	0.714	0.659	0.692	0.681	0.582	0.648	0.703	0.648	0.670	0.681	0.692	0.659	0.615	0.626	0.714	0.901									
18	0.604	0.549	0.560	0.571	0.472	0.582	0.571	0.560	0.582	0.571	0.560	0.527	0.593	0.604	0.560	0.835	0.780								
19	0.615	0.582	0.615	0.626	0.505	0.571	0.604	0.571	0.593	0.626	0.615	0.604	0.582	0.571	0.637	0.868	0.813	0.835							
20	0.615	0.582	0.615	0.604	0.483	0.571	0.648	0.593	0.571	0.626	0.615	0.648	0.538	0.571	0.637	0.868	0.813	0.791	0.890						
21	0.615	0.560	0.593	0.582	0.527	0.571	0.604	0.549	0.571	0.582	0.593	0.582	0.538	0.549	0.615	0.824	0.835	0.747	0.780	0.802					
22	0.626	0.593	0.582	0.571	0.516	0.582	0.593	0.560	0.560	0.571	0.582	0.571	0.549	0.582	0.626	0.813	0.780	0.802	0.791	0.769	0.857				
23	0.813	0.758	0.857	0.868	0.483	0.835	0.846	0.835	0.835	0.824	0.857	0.824	0.802	0.813	0.835	0.604	0.703	0.549	0.604	0.604	0.626	0.637			
24	0.835	0.780	0.879	0.868	0.483	0.857	0.868	0.857	0.857	0.846	0.857	0.846	0.846	0.835	0.835	0.604	0.681	0.571	0.604	0.604	0.582	0.593	0.934		
25	0.813	0.780	0.857	0.846	0.527	0.857	0.846	0.835	0.835	0.846	0.835	0.846	0.802	0.813	0.813	0.648	0.703	0.571	0.626	0.626	0.582	0.571	0.890	0.934	

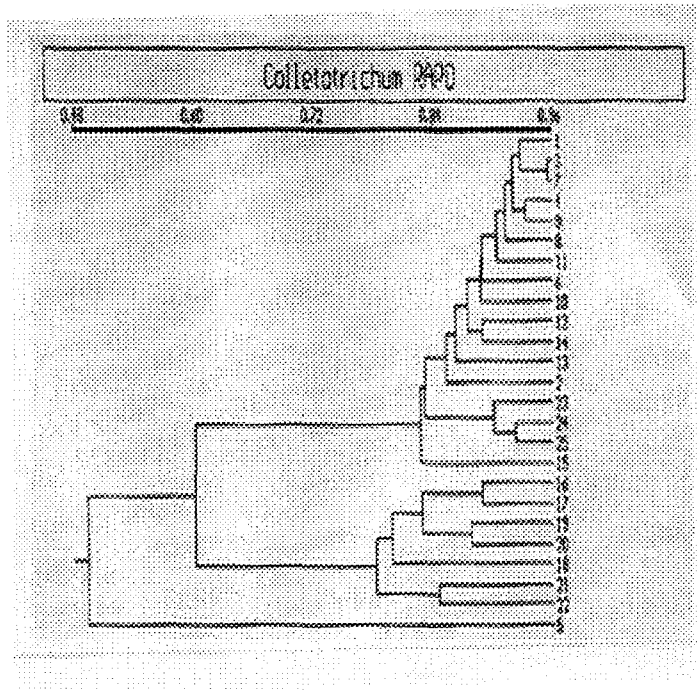


그림 2. 분석한 탄저병균주의 UPGMA dendrogram

## 2) AFLP

분리한 탄저병균 genomic DNA의 AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism)의 유연관계를 분석하기 위해서 9개의 primer조합(표 4)을 (E1/M1, E1/M2, E1/M3, E2/M1, E2/M2, E2/M3, E4/M1, E4/M2, E4/M3)을 사용하였으며 분석된 9개 primer 조합당 평균 50개 정도의 band가 증폭되었으며, 300-1,500bp 사이에 위치하였다(그림 3-6). 9개의 primer를 사용해서 증폭된 bands를 가지고 binominal matrix code(0, 1)를 작성하고, dendrogram을 나타내는 NTSYS-PC에서 UPGMA program을 이용하여 clustering analysis를 이행하였다. Dendrogram을 작성한 결과 크게 3집단으로 나뉘어졌고(그림 2) 작게는 8개의 그룹으로 나뉘어졌다. RAPD 결과와는 달리 김해 11과 밀양18은 유연관계가 가장 높은 상동성을 보였으며 김해 3과 창원 3이 가



장 낮은 상동성을 보였으며 각각의 그룹에는 특이성을 보이는 band는 9개 정도가 나타났다(표 2). AFLP 실험결과 배양적 특성에 따라 1차적으로 구분하였던 각 그룹들간에 유전적 특성이 서로 다르게 나타났으며, 각 그룹에 특이 marker band를 찾을 수 있는 경우도 있었다. 따라서 이들 각 그룹에 특이적으로 나타난 band를 이용한 marker 개발이 가능하리라 생각되어 차후 AFLP 실험을 다른 primer 조합을 이용하여 수행할 계획이다.

AFLP를 이용한 생물 다양성 연구는 RAPD에 비해 재현성이 높고 각 반응마다 생성되는 단편들의 수는 50~100개 정도로 각 개체간 변이가 아주 심하여 maker 개발에 매우 유용한 것으로 밝혀졌다. 또한 AFLP는 유전자 지도작성에 유용하고, 생물다양성 분석에 매우 효과적이며 genome의 근연관계 및 계통발상과정을 조사 또는 도입염색체의 확인 및 동정에 적합한 기술이다. 본 실험 결과 AFLP는 RAPD 보다는 종내 다양성을 비교 분석하는데 더 적합하다는 사실을 확인하였다.

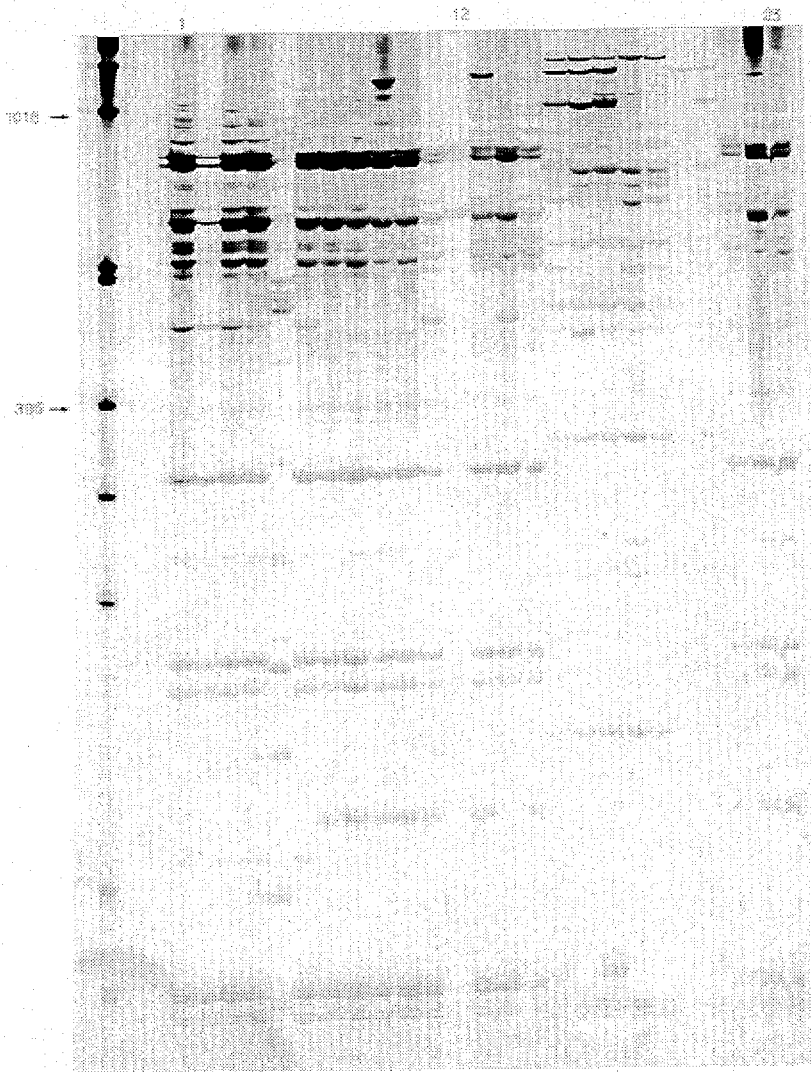


그림 3. primer E4+M1를 이용한 AFLP profile

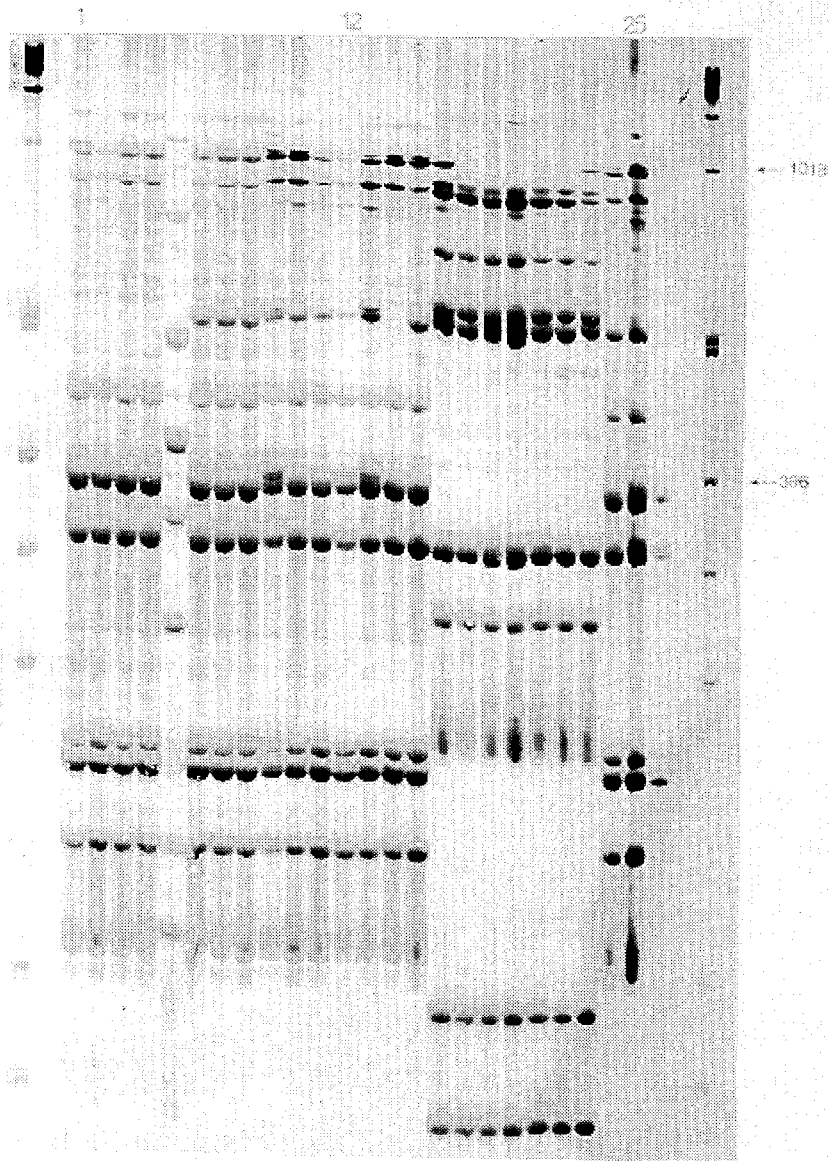


그림 4. primer E4+M4를 이용한 AFLP profile

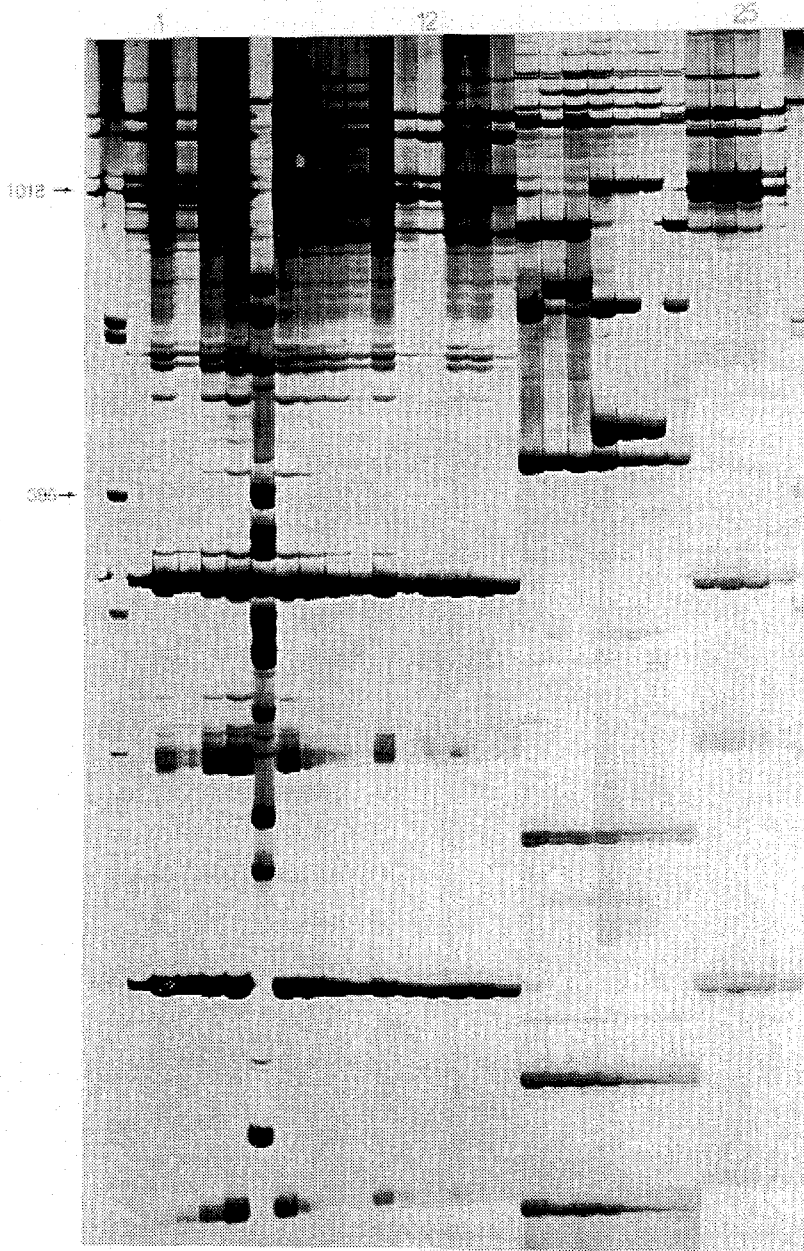


그림 5. primer E1+M1를 이용한 AFLP profile

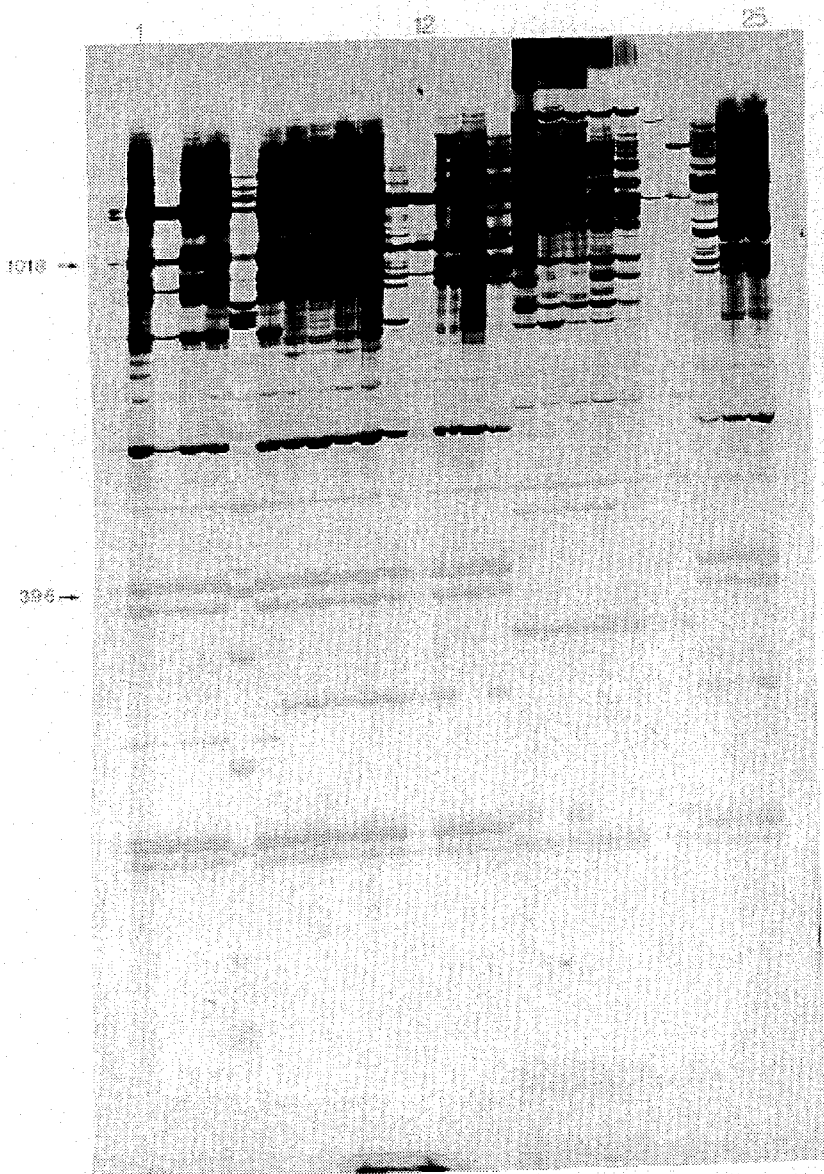


그림 6. primer E1+M3를 이용한 AFLP profile

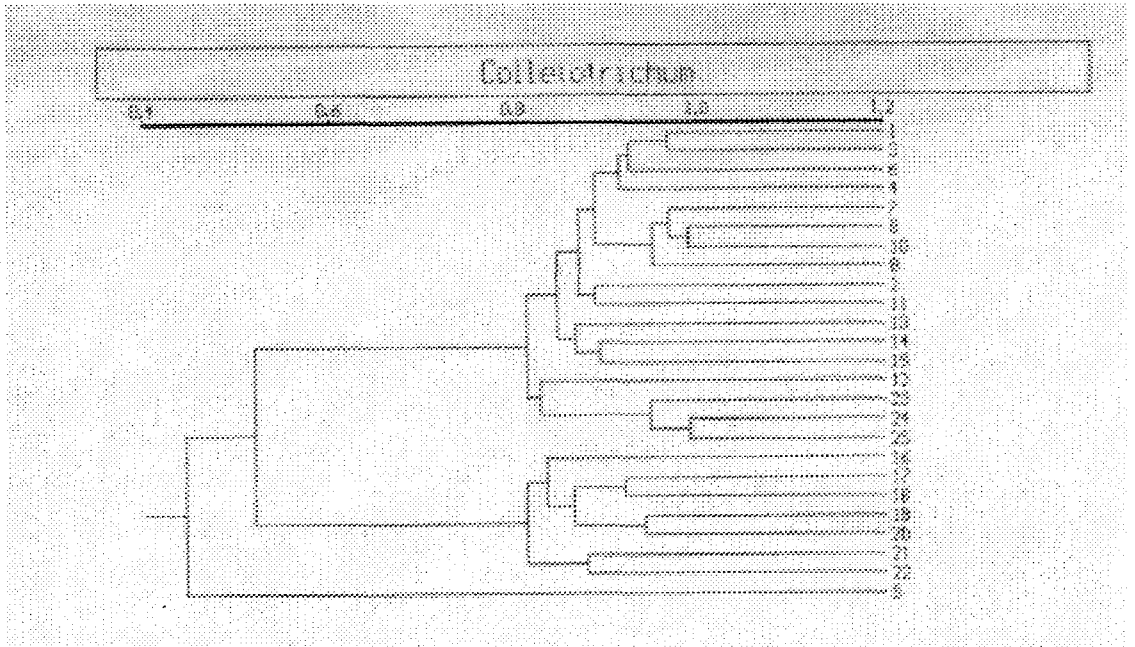


그림 7. AFLP 분석에 의한 UPGMA dendrogram

### 3) Cloning of ITS region

탄저병의 대표적인 예는 사과 탄저병을 예로 들 수 있는데 사과 탄저병의 경우 불완전세대가 1856년 Berkeley에 의해 처음으로 발견된 후 *Gloeosporium fructigenum*으로 사용되어 오다가 1879년 Thuem에 의해 *Gloeosporium rufomaculans*라 하였으며 1950년 *Colletotrichum fructigenum* Vas-silievsky로 속명이 바뀌었다가 von Arx에 의해 현재까지 *C. gloeosporiodes*로 사용되고 있다. 단감나무에도 *C. gloeosporiodes*가 발생하는 것으로 알려져 있는데 본 실험에서는 공시균주인 *Gloeosporium kaki*를 이용하여 sequencing한 결과 *C. acutatum*으로 밝혀졌다(그림 8). 균의 ITS지역을 cloning한 결과 *C. gloeosporiodes* 와 *C. acutatum*사이에는 base sequence 몇 개의 차이가 나타날 뿐 더 이상의 종 구분은 분별하기 힘들었다.

선발된 primer를 (ITS-4: tcctccgctt attgatatgc와 CO-1: ataacccttt

gtgaacatac) 이용하여 경주, 김해, 밀양, 창원, 창녕에서 분리한 *Colletotrichum* sp. 균주, 주식회사 대유로부터 제공받은 *Gloeosporium kaki*, *Colletotrichum* sp.에 감염되지 않거나, 반감염, 또는 감염된 단감나무잎, 그리고 *Colletotrichum* sp.에 감염되지 않거나, 반감염, 또는 감염된 단감, 또한 *Mycosphaerella*에 감염되지 않거나, 반감염, 또는 감염된 단감과 *Pestalotiopsis* 속, *Rhizoctonia solani*속, *Ewinia*속, *Phytophthora infestance*, 또는 *Fusarium oxysporum*에 대하여 PCR 반응을 실시하였다. Pair primer를 이용하여 PCR 반응을 일으킨 결과 단일 band가 나타나는 것을 알 수가 있었다(그림 8). *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Pseudomonas* spp. *Erwinia* spp.와 감염되지 않은 단감나무 잎, 과실은 증폭은 일어나지 않았으며 경주, 김해, 밀양, 창원, 창녕에서 분리한 *Colletotrichum* sp.,를 주식회사 대유로부터 제공받은 *Gloeosporium kaki* 그리고 감염된 단감나무 잎, 과실에서는 500bp 정도의 band가 나타나는 것을 알 수가 있었다. 또한 *Mycosphaerella*에 감염되지 않거나, 반감염, 또는 감염된 단감과 *Pestalotiopsis* 속, *Rhizoctonia solani*속, *Ewinia*속, *Phytophthora infestance* 또는 *Fusarium oxysporum*에서는 전혀 증폭이 일어나지 않았다. 그러나 감염된 단감나무잎, 과실에서는 500bp 정도의 밴드가 나타나는 것을 알 수 있었다(그림 9). 500bp의 증폭된 PCR product를 nylon membrane에 transfer 한 뒤 ITS지역을 cloning한 probe를 사용하여 southern 한 결과 같은 결과를 얻을 수 있었다(그림 10).

*Colletotrichum*을 검출 할 수 있는 최소농도를 알아보기 위해서 최소 농도를 확인 결과 10ng과 100pg에서는 강한 band를 얻을 수 있었지만 1pg에서는 희미한 band가 검출되었다. 이것으로 보아 *Colletotrichum*의 최소 농도는 10pg 까지 검출할 수 있다는 것을 알 수 있었다(그림 11). 결론적으로, 제작된 primer(CO-1)는 탄저병 병원균에 대해서 광범위하게 detection 할 수 있으며

다른 병원균과는 PCR 반응을 일으키지 않는 것을 알 수 있었다.

```
Colletotrichum gloeosporioides internal transcribed spacer 1, 5.8S
ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2,
complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial
sequence
Length = 500

Score = 563 bits (284), Expect = e-158
Identities = 379/404 (93%), Gaps = 5/404 (1%)
Strand = Plus / Minus

Query: 43 cctgatccgaggtcaacctgtaaagaatttgggggtttaacggcaagagtcctccggat 102
|||||
Sbjct: 500 cctgatccgaggtcaacctttgaaaattgggggttttacggcaagagtcctccggat 441

Query: 103 cccagtgcgagacgcta-gttactacgcaaaggaggctccgggagggtccgccactacct 161
|||||
Sbjct: 440 cccagtgcgagacgtaaaagtactacgcaaaggaggctccgggagggtccgccactacct 381

Query: 162 ttaagggccacgctcgccgtggggcccccacccaagcgggtgcttgagggtgaaatga 221
|||||
Sbjct: 380 ttgagggcctacatcggtctagggcccccacccaagcagagcttgagggtgaaatga 321

Query: 222 cgctcgaacaggcatgctcgccagaatgctggcgagcgcaatgtgcggttcaaagattcga 281
|||||
Sbjct: 320 cgctcgaacaggcatgcccgccagaatgctggcgggcgcaatgtgcggttcaaagattcga 261

Query: 282 tgattcactgaattctgcaattcacattacttatcgcatcttcgctgcttcttcacatgat 341
|||||
Sbjct: 260 tgattcactgaattctgcaattcacattacttatcgcatcttcgctgcttcttcacatgat 201

Query: 342 gccagaaccaagagatcc-gttgttaaaagttttaattatttgcttgccactcagaag 400
|||||
Sbjct: 200 gccagaaccaagagatccggttggttaaaagttttgattatttgcttgaccactcagaag 141

Query: 401 agacgtcgtgtaa-at-agagtttggtt-tcctccggcgggcgcc 442
|||||
Sbjct: 140 aaacgtcgt-taaatcagagtttggttatcctccggcgggcgcc 98
```

그림 8. NCBI 프로그램을 이용한 Blast search의 결과



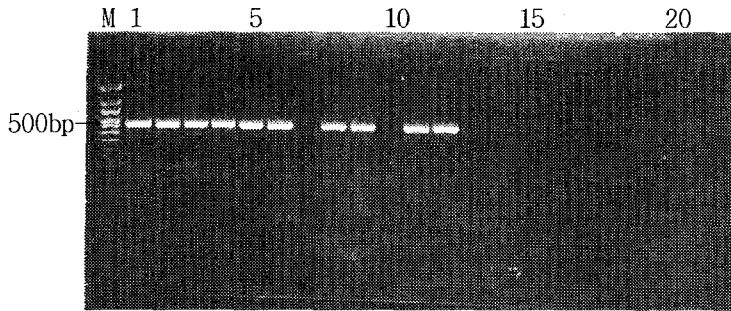


그림 9. ITS 4와 CO-1 primer를 이용한 PCR의 결과

Lanes; M: Molecular marker. 1: *Colletotrichum* sp. isolated Kyungju 1., 2: *Colletotrichum* sp. isolated Kimhae 11., 3: *Colletotrichum* sp. isolated Milyang 11., 4: *Colletotrichum* sp. isolated Changwon 4., 5: *Colletotrichum* sp. isolated Changnyung 16., 6: *Gloeosporium kaki* 7: Persimmon leaf uninfected with *Colletotrichum* sp., 8: Persimmon leaf semiinfected with *Colletotrichum* sp., 9: Persimmon leaf infected with *Colletotrichum* sp., 10: Persimmon fruit uninfected with *Colletotrichum* sp., 11: Persimmon fruit semiinfected with *Colletotrichum* sp., 12: Persimmon fruit infected with *Colletotrichum* sp., 13: Persimmon fruit uninfected with *Mycosphaerella*, 14: Persimmon fruit semiinfected with *Mycosphaerella*, 15: Persimmon fruit infected with *Mycosphaerella*, 16: *Pestalotiopsis* sp., 17: *Rhizoctonia solani* sp., 18: *Ewinia* sp., 19: *Phytophthora infestans*, 20: *Fusarium oxysporum*

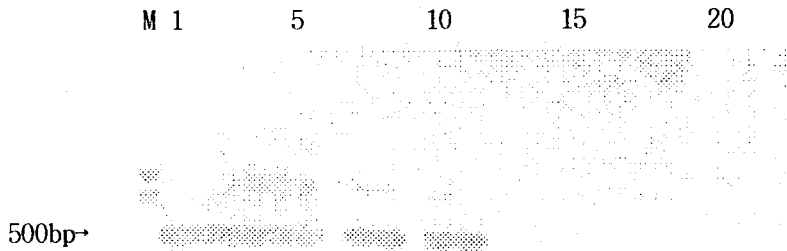


그림 10. labelled plasmid pGM T-easy vector를 이용한 southern hybridization의 결과

Lanes; M: Molecular marker. 1: *Colletotrichum* sp. isolated Kyungju 1., 2: *Colletotrichum* sp. isolated Kimhae11., 3: *Colletotrichum* sp. isolated Milyang 11., 4: *Colletotrichum* sp. isolated Changwon 4., 5: *Colletotrichum* sp. isolated Changnyung 16., 6: *Gloeosporium kaki* 7: Persimmon leaf uninfected with *Colletotrichum* sp., 8: Persimmon leaf semiinfected with *Colletotrichum* sp., 9: Persimmon leaf infected with *Colletotrichum* sp., 10: Persimmon fruit uninfected with *Colletotrichum* sp., 11: Persimmon fruit semiinfected with *Colletotrichum* sp., 12: Persimmon fruit infected with *Colletotrichum* sp., 13: Persimmon fruit uninfected with *Mycosphaerella*, 14: Persimmon fruit semiinfected with *Mycosphaerella*, 15: Persimmon fruit infected with *Mycosphaerella*, 16: *Pestalotiopsis* sp., 17. *Rhizoctonia solani* sp, 18: *Ewinia* sp., 19: *phytophthora infestance*, 20: *Fusarium oxysporum*

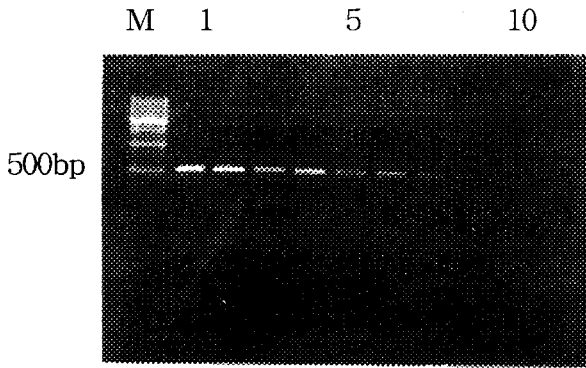


그림 11. *Colletotrichum* sp.의 DNA농도에 따른 Amplification

M: molecular marker, 1: infected cv. persimon 100 $\mu$ g, 2: 10 $\mu$ g, 3:1 $\mu$ g, 4:100ng, 5:10ng, 6:1ng 7:100pg, 8:10pg, 9:1pg,

#### 4. 고찰

*Colletotrichum* spp. 는 광범위한 기주 범위를 갖는 다범성 균으로 특히 과실에 많은 피해를 주어 문제가 되고 있는 중요한 식물병원진균이다. 최근 국내에서 널리 재배되고 있는 단감, 사과, 복숭아 및 포도 등에 탄저병이 발생하여 많은 경제적 손실을 초래하고 있다(1, 2, 18, 22). 탄저병 병원균의 경우 기존에는 주로 형태적 특징이나 배지 상에서의 특성, 기주에 대한 병원성의 차이에 의존하여 분류를 해 왔다(20). 그러나 최근에는 병원균의 분류에 있어 문제점을 해결하기 위하여 형태적 특성, 배양적 성질 및 병원성 뿐만 아니라 분자생물학적 방법을 이용하고 있으므로 탄저병 병원균의 분류 및 동정에도 분자생물학적인 방법(5, 6, 9, 16, 24)을 도입하여 재정리할 필요성이 요구되고 있다. 최근에 분자생물학적 방법으로는 RFLP(restriction fragment length polymorphism), RAPD(random amplified polymorphic DNA), AFLP(amplified fragment length polymorphism) 및 rDNA를 이용go

핵산의 차이로 병원균의 분류 및 동정을 많이 하고 있다(10, 11, 21, 23).

RAPD는 염기의 수가 9~12mer 정도의 짧은 short oligonucleotide primers를 이용하여 genomic DNA에 무작위로 배열되어 있는 부위를 증폭하는 PCR법의 하나로 증폭 후 산물을 전기영동상에서 관찰할 수 있는 방법인데, 이때 나타나는 다형화 현상은 genomic DNA에서 primer 증폭부위의 삽입(insertion), 결실(deletion)등에 의해 나타나게 되고 이 방법은 아주 간편하고 빠른 시간 안에 분석결과를 얻을 수 있어 많은 실험실에서 사용하고 있는 방법이다(20). 이때 primer의 10mer 중 GC 함량이 40%이상이어야 하고 DNA 농도, 마그네슘과 polymerase 농도 및 denaturation 농도가 결과와 재현성에 영향을 미치는 요인이라고 한다. 그러나 RAPD의 기법은 재현성이 많이 떨어진다는 단점이 있는데 이를 극복하기 위하여 AFLP기법에서 genomic DNA를 제한효소로 절단한 후 증폭반응을 하고 증폭양상이 단순화되며 bands의 상대적인 강도가 변하여 재현성이 높은 AFLP 방법을 개발하였다(12, 14). AFLP는 RFLP의 정확성과 RAPD의 간편함을 각각 수용함과 동시에 문제점을 극복하기 위하여 제한효소를 이용하여 DNA를 절단 후 adaptor에 상응하는 primer를 이용하여 RAPD와 같이 PCR을 이용하여 DNA 단편을 증폭하여 marker를 얻을 수가 있는데 분석범위가 상당히 넓고 각 반응마다 생성되는 단편들의 수는 약 50-100개 정도로서 이들은 각 개체 간 변이가 아주 심하여 marker 개발에 아주 유용하게 사용되고 있다. AFLP는 어떤 새로운 기원의 식물체 DNA를 fingerprinting 하는데 아주 유용한 도구일 뿐만 아니라 유전분리 집단분석에 매우 유용한 것으로 보고되어있다. 이러한 다양한 분자생물학적인 시도 중에서도 리보솜 RNA 유전자의 염기서열에 근거한 계통분류가 가장 유력한 분류방법으로 간주되었다(8, 11, 12). 균류를 포함한 진핵생물의 ribosome RNA 유전자의 전사단위는 18S, 5.8S, 28S rDNA로 이것을 차례로 2개의 internal transcribed spacer(ITS)로

분리 연결되어 있다. 초기에는 5.8S 부위에 대한 sequences의 비교가 분류의 근거로 주로 이용되었지만 이 부위는 염기수가 120개 전후로 길이가 상당히 짧고 매우 보존적인 부위이기 때문에 관련된 종들 사이에서는 거의 동일한 sequences를 나타내므로 이들 상호간의 구별을 위한 분류에서는 사용될 수 없는 난점이 있었다. 그러나 18S 및 28S rDNA는 통계적으로 신뢰성이 있는 정보를 가지고 있으며, 염기보존이 높은 부분, 중간정도의 부분, 변이가 심한 부분이 공존하므로 계통분화를 논하는데 적합한 수단으로 취급되었다. 그러나 18S와 28S는 각각 1,600bp 와 3,300-4,800bp로 그 전의 염기서열을 결정하는 것은 많은 시간과 노력을 요구하고, 부분 염기서열은 보다 광범위한 계통발생학적 진화관계를 가지는 속간의 비교에서는 대상으로 하는 염기서열의 부족으로 분류지표로 이용될 수 있는 정보량이 적은 난점이 지적되었다(13, 17). ITS I+II는 가운데 5.8S를 포함하여 500bp 정도로, 그 염기서열을 결정하기가 간편하고 시간적인 제약을 덜 받기 때문에 다수의 균종을 대상으로 하는 분류학적 연구에 적합하며, 그 분자진화속도가 빨라 염기서열의 다양성을 요구하는 종, 속의 분류에 적합하다. 더구나, 보존성이 높은 5.8S 부위를 포함하고 있으므로 ITS 부위와의 각각의 비교가 가능하며, 이러한 풍부한 정보량과 간편성으로 동일속내의 종간 및 속간의 유연관계의 연구에 유용한 수단이 되어왔다(6, 7, 19). 본 실험에서는 AFLP의 기법을 이용하여 탄저병원균의 유연 관계를 밝히고자 하였다. AFLP의 분석의 경우 band수가 많게는 50에서 적게는 30개의 밴드가 나타나므로 각각의 그룹에서도 차이를 볼 수가 있어 정확한 계통분류의 방법이라 할 수 있을 것이다(그림 1, 2). 위의 결과로 단감 탄저병 원균은 크게는 2개의 그룹으로, 작게는 5개의 그룹으로 나뉘어지는 것을 알 수 있었다. 경주1, 경주3, 경주5, 창원15, 경주2등은 첫 번째 그룹으로, 김해10, 창녕7, 김해11, 밀양1, 창원3, 창원27, 창녕16, 창녕, 김해27, 창원29는 두 번째 그룹으로, 밀양19, 밀양 20

은 세 번째 그룹으로, 밀양11, 창원4, 밀양 7, 창원8, 경주6은 4번째 그룹으로, 김해2, 창원 19는 5번째의 그룹으로 나뉘어졌다(그림 3). 큰 그룹에 속하는 균들의 상동성은 높게는 0.97이었고 낮게는 0.76의 scale로 나타났으며, 다른 그룹에 속하는 균들의 경우 0.38-0.52정도의 scale로 낮게 나타나는 것을 알 수 있었다(표 3). 이로서 단감나무에 탄저병을 일으키는 균의 경우 크게는 2가지의 균이 복합적으로 나타난 것을 알 수 있었다.

#### 5. 참고문헌

1. Bernstein, B., Zher, E. I., and Dean, R. A. 1995. Characteristics of *Colletotrichum* from peach, apple, and other host. *Plant Disease* 79(5): 478-482.
2. Bruhn, J.A., and Fry, W.E. 1981. Analysis of potato late blight epidermiology by simulation modeling. *Phytopathology* 71: 612-616.
3. CAC : Codex Alimentarius Commission. 1984. Codes General Standard for Irradiate Foods and ed. Recommended International code of Practice for the Operation of Radiation Facilities Used for the Treatment of Foods. CAC/VOL. XV, FAO, Rome.
4. Casela, C. R., and Frederiksen, R. A. 1993. Survival of *Colletotrichum graminicola* sclerotinia in sorghum stalk residues. *Plant disease* 77(8): 825-827.
5. Choi, H. S., K. S. Kim, Y. A. Chae, C. Y. Yu and Youn Su Lee. 1997. Evaluation of genetic diversity of callus-derived plantlets of *Rehmannia glutinosa* using randomly amplified polymorphic DNA(RAPD). *J. Agric. Development Research*.2:143-147.
6. Coddington, A., and Gould, D. S. 1992. Use of RFLPs to identify races of fungal pathogens. In: *Techniques for the rapid detection of*

plant pathogens. Duncan, J.M. and Torrance, L. (Eds.) Blackwell Scientific, Oxford.

7. 최혜선, 김경수, 정천순, 이윤수. 1997. 머스크 멜론과 그 교배종의 RAPD를 통한 유전적 다변성 구명. 농촌개발연구 2:133-141.
8. 최혜선, 김경수, 최장경, 이경국, 홍대기, 이윤수. 1997. 나리(*Lilium*)의 Randomly Amplified Polymorphic DNA를 이용한 품종구분. 농시논문집 xx(x): in press.
9. 조성인, 박은우, 양장식. 1995. 시설오이 병해 진단 및 방제 관리 전문가 시스템개발. 농림수산부 제1차년도 중간보고서.
10. C.M.I Description. No. 318, 319, 320, 514, 515.
11. DeVllavieille-Pope, C., Huber, L., Leconte, M., and Goyeau. H. 1995. Comparative effects of temperature and interrupted wet periods on-germination, penetration, and infection of *Puccinia recondita* f. sp. *tritica* and *P.striiformis* on wheat seeding. Phytopathology 85(4):409-415.
12. Dillard, H. R.,and Cobb, A. C. 1993. *Colletotrichum lindemuthianum* bean debris in New York State. Plant Disease 77(12) 1233-1238.
13. Evans, K.J., Nyquist, W.E., and Latin, R.X. 1992. A model based on temperature and leaf wetness during for establishment at alternaria leaf blight of maskmelon. Phytopathology 82(8): 890-895.
14. 김경수, 최혜선, 이민웅, 심재욱, 이윤수. 1997. *Cordyceps* species 를 포함한 곤충기생성균의 RAPD를 이용한 유전적 관계분석. 농업과학연구 8: in press.
15. King, S. B., and Scott, G. E. 1981. Genotype differences in maze to

- kerne infectionl by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology* 71:1245-1247.1
16. 김성봉. 1992. 단감재배 신기술. 오성출판사 35-80.
  17. Lee, Y. S., C. H. Park, K. Y. Kang, and N. S. Kim. 1995. RAPD analyses using rapidly extracted genomic DNAs in plant species. *Kor. J. Breeding* 26:187-293.
  18. Loaharanu, P. 1990. Prospects of international trade in irradiated foods. *Int. J. Radiat. Appl. Instrum, Part. C., Radiat. Phys. Chem.*, 35, 223-231 (1990)
  19. Money, T., Steve Reader, Li Jia Qu, Roy P. Dunford and Graham Moore. 1996. AFLP-based mRNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 24(13):2616-2617.
  20. Montesinos, E., Moragrega, C., Llorente, I., Vilardell, P., Bonaterra, A., Ponti, R., Cavanni, P., and Brunelli, A. 1995. Development and evaluation of an infection model for *Stemphylium vesicarium* on pear based on temperature and wetness duration. *Phytopathology* 85(5) : 586-592.
  21. Paran, I., and Michelmore, R. W. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *TAG* 85:985-993.
  22. Pieter Vos, R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijter, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23(21):4407-4414.
  23. 박은우, 허재선, 윤성철. 1992. 포도탄저병(*C.gloeosporiodies*)방제를 위한



- 살균제 살포시기 결정용 예찰 시스템. 한식병지 8(3):177-184.
24. Ross, P. F., Ledet, A. E., Owens, D. L., Rice, L. G., Nelson, H. A., Osweiler, G. D. and Wilson, T.M. 1933. Experimental equine leukoencephalomalacia, toxic hepatitis, and encephalopathy caused by corn naturally contaminated with fumonisins. J. Vet. Diagn. Invest. 5, 69-74.
  25. Ross, P.F., Rice, L.G., Plattner, R.D., Osweiler, G.D., Wilson, T.M., Owens, D.L., Nelson, H.A. and Richard, J.L. 1991. Concentrations of fumonisin B in feeds associated with animal health problems. Mycopathologia. 114: 129-135.
  26. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd Ed. Coldspring Harbor, New York.
  27. Scherm, H., and Bruggen, A.H.C. 1994. Weather variables associated with infection of lettuce by downy mildew(*Bremia lettucae*) in Coastal California. Phytopathology 84(8) : 860-865.
  28. Scherm, H., and Bruggen, A.H.C. 1994. Current spore release infection of lettuce *Bremia lettucae* during morning with prolonged leaf wetness. Phytopathology 85(5) : 552-555.
  29. Shi, Y., Correll, J.C., Guerber, J.C., and Rom, C.R. 1996. Frequency *Colletotrichum* species causing bitter rot of apple in the southeastern United States. Plant Disease 80(6):692-696.
  30. Williams, J. G. K., Hanafey, M. K., Rafalski, J. A., and Tingey, S. V. 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. In: Methods in Enzymology. Vol. 218. Wu, R. (Eds.)

Academic Press, San Diego, pp. 7-4-740.

31. Wilson, T. M., Ross, P. F., Owens, D. L., Rice, L. G., Green, S. A., Jenkins, S.J. and Nelson, H. A. 1992. Experimental reproduction of ELEM. *Mycopathologia* 117:115-120.

## 제 5 장 방제력 확립

### 1. 서설

단감 재배시 양질의 단감 생산을 제한하는 여러 요인 중 진균 병해에 의한 병으로는 탄저병(Anthracnose)의 피해가 가장 심각하다. 탄저병(Anthracnose)은 과실, 가지 및 잎에 발생하며 특히 과실의 발생은 농가의 수확량과 소득에 직접적인 영향을 미쳐 매년 막대한 손실을 초래하고 있다(1, 12, 23-26). 탄저병은 그 중요성으로 인하여 사과와 고추 등을 비롯한 여러 작물에서 많은 연구가 이루어졌으나 단감나무는 관심이 적었던 이유로 연구가 미흡하여 그에 의한 피해는 증가하고 있는 실정이다. 특히, 단감의 경우 재배 지역의 북방한계선을 고려할 경우 재배 가능 지역의 재배농가에게는 고소득작물이다(12). 그러나 현재 재식 되어있는 단감 품종의 80%이상이 탄저병에 감수성인 부유로 탄저병에 대한 연구 특히 수확량을 제한하는 탄저병에 대한 연구가 절실히 요구되고 있는 실정이다. 국내에서는 연구가 거의 이루어지지 않아 정확한 병원균의 동정, 생리·생태적 연구가 되지 못하고 있다. 특히 병원균은 일본에서는 잎과 과일에 발생하는 병원균이 다른 것으로 보고하고 있으며, 이의 방제를 위한 program이 개발되어 효율적인 방제가 이루어지고 있다. 그러나 국내의 경우 현재까지 단감의 탄저병 방제를 위해 체계적으로 연구된 방제력이 없어 대부분의 농가에서는 일반 과수의 탄저병에 준하거나 일본 방제력에 의존해 무계획적인 살균제의 살포에 의존하고 있을 뿐이다. 이에 따라 효과적인 살균제 선발, 약제 살포 횟수와 살포시기의 구명 등의 과학적 연구가 수행이 선결되어야 할 과제로 생각되어 본 연구를 수행하였다. 현재의 방제체계 하에서의 방제는 과도한 노동력의 투입과 약제의 남용에 따른 생산비 증가, 환경 오염 문제 및 생산물의 안정성에 대한 문제를 야기 시킬 수 있다. 특히 살균제에 의한 농업 생산물에 대한 일반 소비자의 관심이 높아지면서 재배자는 병의 효과적 방제와 생산물의 안정확보라는 두 가지 목표를 달성해야하는 현실에 직

면하고 있다. 따라서 탄저병에 의한 수확량 감소 및 저장·유통 중의 피해를 최소화하기 위한 전략으로 조기 진단법의 개발을 통해 초기 예찰 및 방제 적기구명이 선결되어야 할 것으로 생각된다(12). 또한 신속 정확한 병원균에 대하여 활력을 지닌 살균제의 선발, 스크리닝법 및 살포횟수 확립이 필요하다. 이러한 기술의 확립은 이들 병 방제를 위한 살균제 사용의 올바른 방법을 제시하는 기초자료를 제공하는 동시에 현재 세계적으로 여러 작물의 병원성 곰팡이의 방제에서 문제가 되고 있는 작물 보호용 살균제의 저항성 균주의 출현으로 인한 약효 저하현상을 감소시키면서 효율적인 방제를 할 수 있으리라 생각된다(1, 3, 4, 11, 14). 특히 현재 농가에서는 농민 자신들의 경험, 방제 비용 및 농약 시판상의 권유에 따라 약제 살포에 의한 방제를 실시하고 있다. 그러나 이러한 약제들은 위에서 언급한 저항성 균주의 출현으로 방제 효과의 저하가 예상되어지는 약제들이 다수 포함되어 있다. 이는 적절한 시기에 방제약제를 살포했음에도 불구하고 탄저병에 의한 피해를 감소시킬 수 없는 한 원인이기도 하다. 국내에서 일반 과채류의 재배에 있어서 benomyl(베노밀, 벤레이트), thiophanate-methyl (톱신엠) 및 carbendazim(가벤다) 등의 benzimidazole계 살균제와 iprodione (로브랄), vinclozolin (놀란) 및 procymidone (팡이탄)의 dicarboximide계 살균제에 대한 저항성 문제가 심각한 것으로 근래 들어 보고되어지고 있다 (11, 14). 특히, 먼저 사용한 살균제에 저항성을 획득한 저항성 균주는 후에 살포되는 약제 대해서도 저항성을 획득할 수 있는 잠재적 위험성이 있는 것으로 보고되어지고 있다(7, 11). 또한 동일 포장내의 저항성 균의 subpopulation는 연속적인 살균제의 적용에 의하여 증가하게 되고 이러한 증가는 방제 어려움을 가중시킬 수 있을 것으로 판단된다. 또한 위에서 언급한 benzimidazole 약제들은 그 작용점의 특이성으로 인한 저항성균주의 출현이 도입 후 짧은 기간내에 발생하는 것으로 보고되어 있다. 현재 단감재배 농가 뿐 아니라 다른 경우에 있어서도 각종 주요 작물 곰팡이

성 방제를 위하여 이들 약제를 2회 이상 적용하고 있는 실정이다(11). 이에 따라 본 연구에는 현재 단감 탄저병 방제를 위하여 등록·시판·사용되어 지고 있는 약제를 중심으로 군사 생육 저지, 포자 발아 억제, 어린과일을 이용한 약제 효과의 생물 검정 및 실내 검정을 토대로 선발된 약제를 이용한 포장 실증 검정을 수행하였다.

## 1.2 서론

단감 재배시 양질의 단감 생산을 제한하는 여러 요인 중 진균 병해에 의한 병으로는 탄저병(anthracnose)의 피해가 가장 심각하다. 탄저병(anthracnose)은 농가의 수확량과 소득에 직접적인 영향을 미쳐 매년 막대한 손실을 초래하고 있다(1, 12, 23-26). 탄저병은 그 중요성으로 인하여 사과와 고추 등을 비롯한 여러 작물에서 많은 연구가 이루어졌으나 단감나무는 관심이 적었던 이유로 연구가 미흡하여 그에 의한 피해는 증가하고 있는 실정이다. 국내에서는 연구가 거의 이루어지지 않아 정확한 병원균의 동정, 생리·생태적 연구가 되지 못하고 있다. 특히 일본에서는 잎과 과일에 발생하는 병원균이 다른 것으로 보고하고 있으며, 이의 방제를 위한 program이 개발되어 효율적인 방제가 이루어지고 있다. 그러나 국내의 경우 현재까지 단감의 탄저병 방제를 위한 체계적으로 연구된 방제력이 없어 대부분의 농가에서는 일반 과수의 탄저병에 준하거나 일본 방제력에 의존해 무계획적인 살균제의 살포에 의존하고 있을 뿐이다. 탄저병에 의한 수확량 감소 및 저장·유통 중의 피해를 최소화하기 위한 전략으로 조기 진단법의 개발을 통해 초기 예찰 및 방제 적기구명이 선행되어야 할 것으로 생각된다. 이에 따라 본 연구에는 현재 단감 탄저병 방제를 위하여 등록·시판·사용되어 지고 있는 약제를 중심으로 군사 생육 저지, 포자 발아 억제, 어린과일을 이용한 약제 효과의 생물 검정 및 실내 검정을 토대로 선발된 약제를 이용한 포장 실증 검정을 수행하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가) 사용 살균제 및 균사 신장억제

1998년 현재 과수에 등록되어 사용되고 있는 benomyl 살균제 비롯하여 약 26종의 살균제를 선정하여 실내에서  $10\mu\text{g a.i./ml}$  농도에 1차로 균사 생육 정도를 조사하였다(표1). 약제 배지는 적절한 농도로 희석한 약제 용액을  $50-60^{\circ}\text{C}$  까지 cooling한 멸균된 PDA 배지에 최종 시험농도가 되도록 첨가하여 일회용 Petri dish에 분주하여 조제하였다. 대조구의 경우 약제를 첨가하지 않은 배지를 이용하였다. 균사 생육억제 정도는  $\{(\text{대조구 균사 신장}-\text{처리구 균사신장})/\text{대조구 균사 신장}\} \times 100$ 으로 하여 산출하였다.

표 1. 실험에 사용한 약제

처리약제(유효성분)	품 목 명	농도 ( $\mu\text{g a.i./ml}$ )
대조구	-	-
Carbendazim+Diethofencarb	디에토펜카브·가벤다수화제	10
Difenoconazole	디페노코나졸수화제	10
Bitertanol	바타롤수화제	10
Cymoxanil+Mancozeb	싸이옥시닐·만코지 수화제	10
Iprodione	이프로 수화제	10
Vinclozolin	빈졸 수화제	10
Procymidone	프로파 수화제	10
Hymeaxazol+Metalaxyl	다찌밀 분제	10
Polyoxin	포리옥신 수화제	10
Cyprodinil+Fludioxonil	싸이프로디닐·후루디옥소닐수화제	10
Myclobutanil+Mancozeb	부탄엠 수화제	10
Tebuconazol	테부코나졸 수화제	10
Cyproconazol	싸이프로코나졸 액제	10
Fenarimol	훼나리 유제	10
Hexaconazol	헥사코나졸 액상 수화제	10
Imibenconazol+thiram	이미벤코나졸·치람수화제	10
Myclobutanil	마이탄 수화제	10
Carbendazim	가벤다 수화제	10
Thiophanate-methyl	지오판 수화제	10
Thiabendazole	치아벤다졸수화제	10
Thiophanate-methyl+	지오판·리프졸 수화제	10
Triflumizole		
Benomyl	베노밀 수화제	10
Pyrimethanil	피리메타닐 액상 수화제	10
Propineb	프로피 수화제	10
Validamycin-A	바리신 액제	10
Hymeaxazol	다찌가렌	10

나) 포자발아 억제 시험

1차 균사 신장 억제 시험을 통하여 선발된 약제를 대상으로 약제의 포자 발아 억제 능력을 실험 수행하였다. 검정을 위한 집종원(포자)의 준비는 7일간 전배양하여 자란 균사 plates를 12시간씩 명/암을 교차로 처리하여 포자 형성을 유도하였다. 살균수 50ml로 포자를 수확하여 포자 농도에 따른 발병시험에서 병의 발생을 유도한 농도인  $1 \times 10^5$  conidia/ml로 조절하여 실시하였다. 약제 배지는 균사신장 억제 실험과 동일한 방법으로 조제하였으며, 약제의 농도는 0.01, 0.1 및  $1 \mu\text{g a.i./ml}$ 로 조절하여 실시하였으며, 처리당 3반복 반복당 300개의 포자를 대상으로 발아율을 측정하였다. 포자의 발아는 발아관의 길이가 포자의 길이보다 긴 경우 발아 한 것으로 판단하여 조사하였다. 대상 약제는 1차 균사 신장억제 실험에서 80.0% 이상의 억제율을 보였던 benomyl를 포함한 10개 약제를 선발하여 실시하였다(표 2).

표 2. 포자 발아 억제 실험에 이용한 살균제

살균제 (유효성분)	품목명
Carbendazim+Kasugamycin	가벤다 · 가스신 수화제
Carbendazim	가벤다 수화제
Thiophanate-methyl	지오판 수화제
Thiabendazole	치아벤다졸수화제
Thiophanate-methyl+Triflumizole	지오판 · 리프졸 수화제
Cyprodinil+Fludioxonil	싸이프로드닐 · 후루디옥소닐수화제
PolyoxinD+Carbendazim	포리옥신디 · 가벤다수화제
Bitertanol	바타롤수화제
Tebuconazol	터부코나졸 수화제
Benomyl	베노밀 수화제
Carbendazim+Diethofencarb	디에토펜카브 · 가벤다수화제



#### 다) 유과를 이용한 생물 검정

1차 실내에서 선발된 10개 약제(표 2)를 대상으로 6, 7 및 8월에 유과(어린과일 - 부유, 차량)을 채집하여 예비실험을 통하여 적절한 생물재료의 준비를 위한 기초 자료를 얻은 후 8월에 생물 재료를 채집하여 실험을 수행하였다. 채집한 과일은 포장 상태의 감염원을 제거하기 위하여 흐르는 수돗물과 증류수에 3회 세척하여 하였으며, 70% EtOH로 표면소독 후 사용하였다. 약제의 농도는 10과 100 $\mu$ g a.i./ml로 조절하여 희석액을 사용하였다. 약제의 처리 방법은 희석액에 30분간 침지함으로써 수행하였으며 처리 후 1시간 정도 음건하여 준비된 접종원을 접종하였다. 접종된 과일은 군사 생육의 적정온도로 조사된 28 $^{\circ}$ C의 항온기에서 발병을 유도하였으며, 일정한 간격으로 병반 출현 이병과율을 조사하였다. 또한 시기별 부유와 차량을 대상으로 sucrose를 비롯한 3종의 당을 분석하였으며, 표피의 조직을 광학현미경을 이용하여 분석함으로써의 생물 검정을 위한 적절한 생물 자료의 확보를 위한 기초자료를 얻었다.

#### 라) 포장적용 시험

군사신장 억제 실험, 포자 발아 억제 및 유과를 이용한 실험을 통하여 선정된 약제와 농가에서 선호하고, 주로 사용되어지고 있는 약제를 선정하여, 1차년도 탄저병 이병율의 조사 결과 10.0%이상의 이병율을 보였던 과원 2곳을 선정하여 1차 4개의 방제 program을 작성하여 방제를 실시하였다. 이러한 program은 과원에서 탄저병 방제를 위하여 시험 전 사용한 약제와 본 실험을

통하여 선정된 약제를 기초하여 작성하였다. 또한 살포 횟수는 선정 농가의 관행 횟수를 고려하여 1-2회 정도 줄여 수행하였다. 2·3차 시험은 1차 수행한 결과를 기초하여 1개의 program을 선정하여 수행하였다. 2·3차 시험을 위하여 작성된 방제 비용의 절감과 효과적 방제를 위하여 방제 횟수를 1회 정도 줄여 실시하였으며, 또한 석회브로드액의 처리를 장마 직후에 첨가하여 작성하였다(표 4)

표 3. 1차 탄저병의 포장 방제에 이용한 방제 program

살 포 일	약제 처리			
	처 리 1	처 리 2	처 리 3	처 리 4
3월 하순	석회브로드액	석회브로드액	석회브로드액	석회브로드액
5월 하순	가벤다	가벤다+목초액500	시스템엠*	다이센엠*
6월 중순	시스템엠	시스템엠 +목초액500	벤레이트	실바코
7월 초순	툽신엠	툽신엠 +목초액500	다이센엠*	뚜려탄*
7월 중순	실바코	실바코 +목초액500	시스템엠*	균타임*
8월 초순	뚜려탄	뚜려탄 +목초액500	실바코	시스템엠*
8월 중순	바이코	바이코 +목초액500	가벤다	바이코
9월 초순	벤레이트	벤레이트 +목초액500	시스템엠*	실바코
9월 중순	가벤다	가벤다 +목초액500	벤레이트	훼나리

\*농가 사용선택약제

표 4. 1차 시험을 토대로 작성된 2단계 적용 방제 program

살포일	약제 처리	
	처리1	처리 2
3월 하순	-	석회보르드액
5월 중 하순	석회보르드액	-
6월 중순	다이센엠	가벤다
7월 초순	뚜려탄	군타임
7월 중순	석회보르드액	석회보르드액
8월 중순	바이코	실바코
9월 초순	훼나리	훼나리
9월 중순	가벤다	바이코

### 3. 결과

#### 가) 군사 신장 억제 시험

시판 중인 26여종의 살균제를 탄저병에 의한 이병과일로부터 분리된 탄저병원균 중 우점종으로 분석된 G1에 속하는 균주인 CH1021 균주에 대한 군사 생장 억제력을 조사한 결과는 표 5-1. 2와 같다. 이중 benomyl를 비롯한 11종이 효과가 우수한 것으로 나타났는데, 주로 benzimidazole계 살균제와 EBI계 살균제들이 우점종에 대하여 높은 군사 신장 억제력을 보였다. 활력이 높은 약제는 가벤다·가스 신 수화제, 가벤다 수화제, 지오판 수화제, 치아벤다졸 수화제, 지오판·리프졸 수

화제, 싸이프로디닐·후루디옥소닐 수화제, 포리옥신디·가벤다 수화제, 비타를 수화제, 터부코나졸 수화제, 베노밀 수화제 및 디에토펜카브·가벤다 수화제였다(표 5-1.2). 선정 약제 중 균사의 신장을 50% 억제하기 위한 농도인 EC<sub>50</sub> 값이 가장 적은 약제는 싸이프로디닐·후루디옥소닐 수화제로 0.04  $\mu\text{g a.i./ml}$  이었다(표 6). 선발된 약제중 최소억제농도가 1 $\mu\text{g a.i./ml}$  이하로 나타난 약제는 가벤다·가스신 수화제, 가벤다 수화제, 포리옥신디·가벤다 수화제 및 베노밀 수화제 등 4 약제였으며, 10 $\mu\text{g a.i./ml}$  이하인 약제는 치아벤다졸 수화제, 지오판·리프졸 수화제, 싸이프로디닐·후루디옥소닐 수화제 및 디에토펜카브·가벤다 수화제 등 4약제, 10  $\mu\text{g a.i./ml}$  이상의 약제는 지오판 수화제, 비타를 수화제 및 터부코나졸 수화제 등의 3 약제로 나타났다(표 6). 농도에 따른 역가를 검정해 본 결과 가벤다·가스신 수화제, 가벤다 수화제, 포리옥신디·가벤다 수화제 및 베노밀 수화제 등의 약제는 1 $\mu\text{g a.i./ml}$ 에서 100%의 균사 신장 억제능력을 보였다(표 6). 그리고 치아벤다졸 수화제, 지오판·리프졸 수화제, 싸이프로디닐·후루디옥소닐 수화제 및 디에토펜카브·가벤다 수화제 등의 4약제는 10  $\mu\text{g a.i./ml}$ 에서 100%의 균사 신장 억제능력을 보였으나, 나머지 지오판 수화제, 비타를 수화제 및 터부코나졸 수화제 등의 3약제는 10  $\mu\text{g a.i./ml}$ 에서 각각 87.6, 88.8, 89.0%의 균사신장 억제 능력을 보였다(그림 1).

표 5-1. 우수 화학살균제 1차 선발(실내검정)

처리약제 (유효성분)	품목명	농도 ( $\mu\text{ga.i./ml}$ )	GL*		CH1021	
			균사생장 (mm)	방제가 (%)	균사생장 (mm)	방제가 (%)
대조구	-	-	64.8	0.0	65.2	0.0
Carbendazim+	디에토펜카브·가벤					
Diethofencarb	다	10	0.0	100	0.0	100
	수화제					
Difenoconazole	디페노코나졸	10	16.6	74.4	15.6	76.1
	수화제					
Bitertanol	바타롤수화제	10	11.1	82.9	11.7	82.9
Cymoxanil+	싸이옥시닐·					
Mancozeb	만코지 수화제	10	52.5	19.0	51.6	20.8
Iprodione	이프로 수화제	10	27.7	57.3	28.1	56.9
Vinclozolin	빈졸 수화제	10	37.4	42.3	35.5	45.6
Procymidone	프로파 수화제	10	37.9	41.5	36.1	44.6
Hymeaxazol+						
Metalaxyl	다찌밀 분제	10	31.8	50.9	32.8	49.6
Polyoxin	포리옥신 수화제	10	55.9	13.7	56.9	12.8
Cyprodinil+	싸이프로디닐·					
Fludioxonil	후루디옥소닐	10	0.0	100	0.3	99.5
	수화제					
Myclobutanil+						
Mancozeb	부탄엠 수화제	10	30.8	52.5	28.8	55.9
Tebuconazol	테부코나졸 수화제	10	11.6	82.0	11.0	83.1
Cyproconazol	싸이프로코나졸 액제	10	42.0	22.8	50.1	23.1
Fenarimol	훼나리 유제	10	21.4	67.0	20.6	68.4
Hexaconazol	헥사코나졸 액상					
	수화제	10	14.2	78.1	13.0	80.1
Imibenconazol+	이미벤코나졸·치람					
thiram	수화제	10	19.3	70.2	18.6	71.5
Myclobutanil	마이탄 수화제	10	28.1	59.0	28.1	59.0

\* 일본으로부터 분양 받은 *Gleosporium kaki*

표 5-2. 우수 화학살균제 1차 발(실내검정)

처 리 약 제 (유 효 성 분)	품 목 명	농도 ( $\mu\text{g.a.i./ml}$ )	GL*		CH1021	
			균사생장 (mm)	방제가 (%)	균사생장 (mm)	방제가 (%)
대조구	-	-	64.8	0.0	65.2	0.0
Carbendazim	가벤다 수화제	10	0.0	100	0	100
Thiophanate- methyl	지오판 수화제	10	8.0	87.6	7.7	88.2
Thiabendazole	치아벤다졸 수화제	10	0.0	100	0.0	100
Thiophanate- methyl+	지오판 · 리프졸 수화제	10	0.0	100	0.0	100
Triflumizole						
Benomyl	베노밀 수화제	10	0.0	100	0.0	100
Pyrimethanil	피리메타닐 액상 수화제	10	63.3	1.5	63.4	2.0
Propineb	프로피 수화제	10	57.2	11.7	58.0	11.0
Validamycin- A	바리신 액제	10	39.4	39.2	35.9	40.5
Hymeaxazol	다찌가렌	10	48.4	25.3	45.4	30.3
Flusilazol	후루실나졸 수화제	10	0.0	100	0.0	100
Probenazole	베나솔 입제	10	25.3	61.0	26.3	59.6
Imibeconazole +Carbendazim	이미베큐코나졸 · 가벤다 수화제	10	0.0	100	0.0	100
Dimethomorph +Mancozeb	디메쏘모르프 · 만코지 수화제	10	47.8	25.7	52.3	20.6
Kasugamycin+						
Copper oxychloride	가스란 수화제	10	63.5	1.2	65.2	0.0
Carbendazim+	가벤다 · 가스신	10	0.0	100	0.0	100
Kasugamycin	수화제					
PolyoxinD+	포리옥신디 · 가벤다수	10	0.0	100	0.0	100
Carbendazim	화제					

\* 일본으로부터 분양 받은 *Gleosporium kaki*

표 6. 선발 약제의 EC<sub>50</sub>와 최소억제농도(Minimum inhibitory concentration ; MIC)

살균제 (유효성분)	품목명	EC <sub>50</sub> (μg a.i./ml)	MIC(μg a.i./ml)
Carbendazim+	가벤다·	0.08	<1
Kasugamycin	가스신 수화제		
Carbendazim	가벤다 수화제	0.07	<1
Thiophanate- methyl	지오판 수화제	2.95	> 10
Thiabendazole	치아벤다졸 수화제	0.32	<10
Thiophanate- methyl+	지오판·		
Triflumizole	리프졸 수화제	0.17	<10
Cyprodinil+	싸이프로디닐·		
Fludioxonil	후루디옥소닐 수화제	0.04	<10
PolyoxinD+	포리옥신디·가벤다수화제	0.07	> 1
Carbendazim			
Bitertanol	바타롤수화제	0.20	> 10
Tebuconazol	테부코나졸 수화제	0.94	> 10
Benomyl	베노밀 수화제	0.07	<1
Carbendazim+	디에토펜카브·가벤다		
Diethofencarb	수화제	0.13	<10

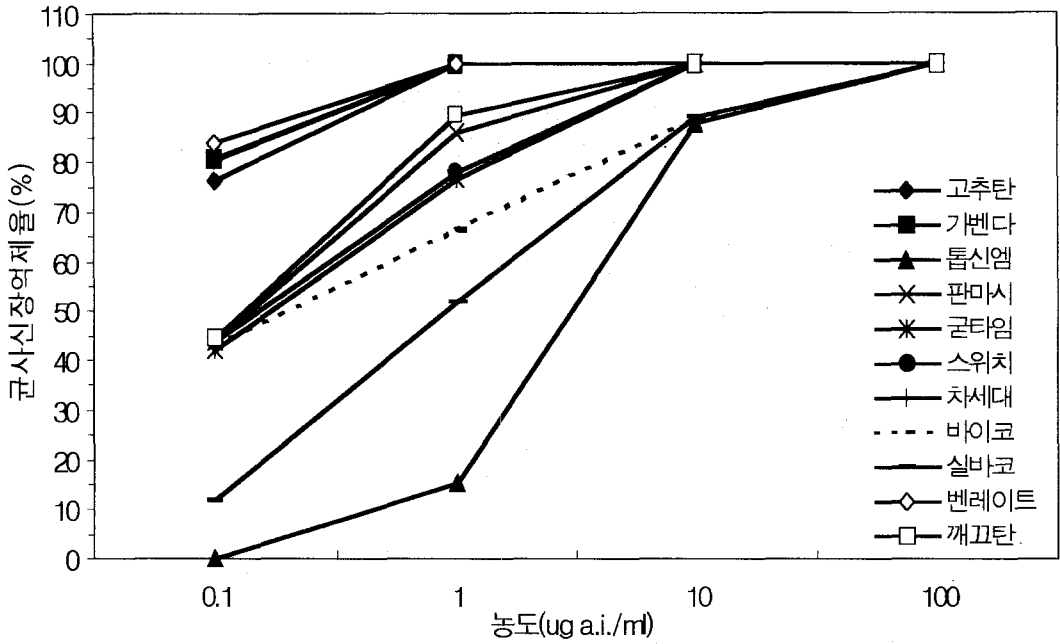


그림 1. 선정 살균제의 농도( $\mu\text{g a.i./ml}$ )에 따른 이병과일로부터 분리된 우점종의 균사 신장 억제효과 (범례에 나타난 약제명은 상품명을 표시)

#### 나) 포자 발아

탄저병에 의한여 감염된 이병과일로부터 분리한 탄저병의 우점종 분석 결과 우점종으로 나타난 group1의 1균주를 선발하여 약제의 농도를 0.01, 0.1, 1 및  $10\mu\text{g a.i./ml}$ 로 조절한 배지를 이용하여 포자 발아 억제 능력을 검정하였다. 가벤다 수화제의 경우  $0.01\mu\text{g a.i./ml}$  농도에서 70%이상의 억제율을 보여  $0.1\mu\text{g a.i./ml}$  농도이상에서는 완전히 발아를 억제하는 것으로 조사되었다(그림2). 베노밀, 톱신엠 및 판마시 수화제의 경우 가벤다와 같은 계열의 살균제임에도



별구하고 약간 낮은 발아억제력을 보였다.

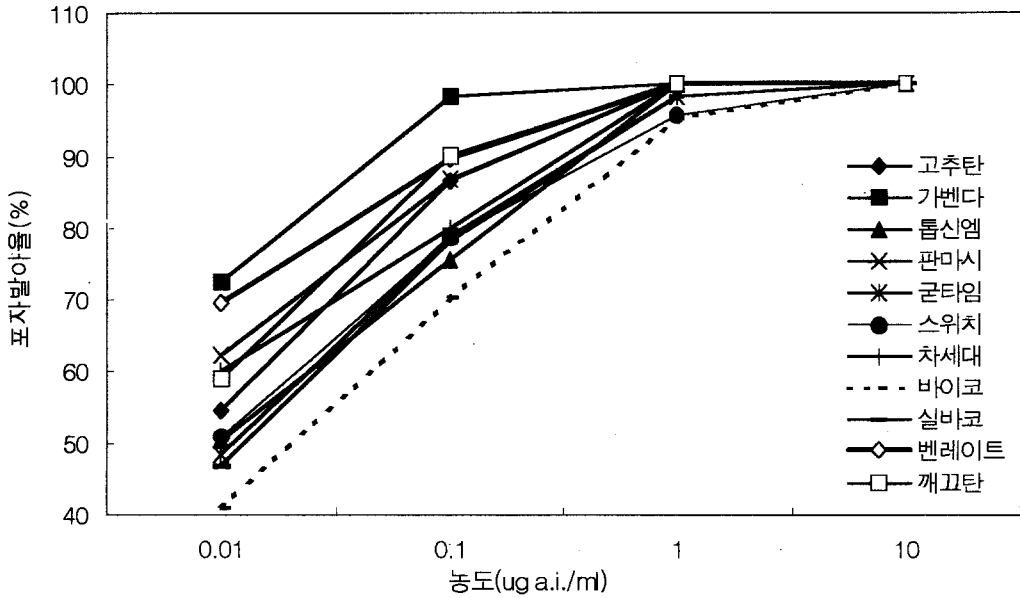


그림 2. 선정 살균제의 농도( $\mu\text{g a.i./ml}$ )에 따른 이병과일로부터 분리된 우점종의 포자 발아 억제 효과(범례에 나타난 약제명은 상품명을 표시)

그러나 그 외의 약제들은  $0.01 \mu\text{g a.i./ml}$ 에서는 50%내외의 낮은 포자발아 억제력을 보였으며,  $1 \mu\text{g a.i./ml}$ 이상의 농도에 90.0%이상의 발아 억제력을 보였다 (그림 2).

#### 다) 유과를 이용한 생물 검정

적절한 접종원의 농도에 따른 우수화학살균제의 효과를 검정하고자 접종원의 농도를  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  및  $10^7$  conidia/ml로 조절하여 실시한 결과, 그림 3과 같다. 접종원의 농도가  $10^5$ 이하일 경우 발병율이 낮아 정확한 약제의 효과를 검정하고 판단하기에 부적절한 것으로 판단되었다 (그림3). 또한 포자의 농

도가  $10^6$  이상으로 높을 경우 약제의 방제가가 떨어지는 것으로 조사되어 접종원의 준비 단계에서의 용이성과 약효를 고려할 경우  $10^5$ 의 농도가 약효의 생물 검정에 적당할 것으로 판단되었다.

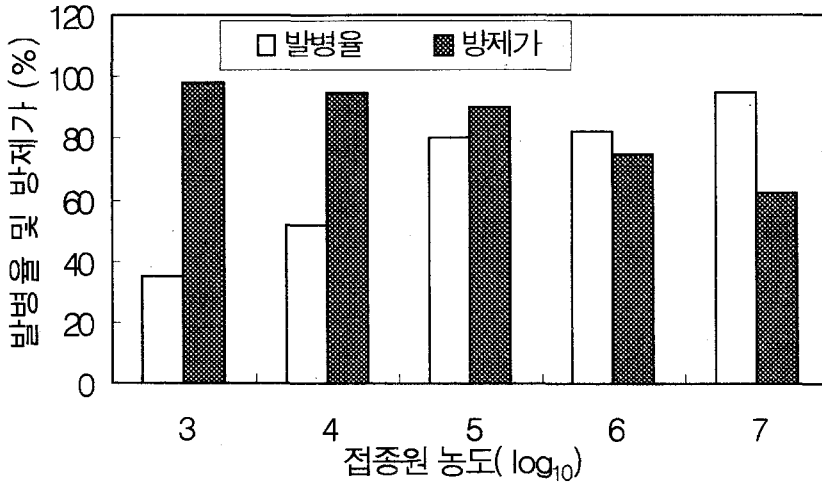


그림 3. 접종원의 농도에 따른 탄저병의 발병율과 약제 방제효과

1차 실내에서 선발된 11개 약제의 유과(어린과일)를 이용한 효과 검정 결과 (표 7), 실내에서와 유사한 효과를 보였다. 유과의 채집시기에 따라 발병율에 차이를 보이지 않았지만 발병력에는 다소 영향을 미쳐 8월 초순에 채집한 어린과일에서 병징이 가장 빠르게 나타났다. 배지를 이용한 균사 신장과 포자발아 실험을 통하여 가장 좋은 효과를 보였던 benzimidazole계 살균제들은 효과가 우수한 것으로 조사되었다(표 7). 특히 베노밀 수화제의 경우 높은 방제가를 보였다. 또한, 이런 살균제는 단감재배시 문제되는 탄저병 방제에 이용하고 있거나 재배자 자신의 경험에 따라 사용되어지고 있는 약제들이었다. 또한 유과(어린 과일)를 이용한 생물 검정 방법은 새로운 식물보호제 개발 과정에서 그 유용성이 높을 것으로 판단된다.

표 7. 유과를 이용한 약제의 생물 검정

살균제 (유효성분)	품목명	방제가			
		처리과 (개)	발병과 (개)	발생율 (%)	방제가 (%)
대조구	-	200	170	85	-
Carbendazim+Kas ugamycin	가벤다· 가스신 수화제	200	32	16	81
Carbendazim	가벤다 수화제	200	33	16.5	80.6
Thiophanate- methyl	지오판 수화제	200	32	16	81
Thiabendazole	치아벤다졸 수화제	200	31	16	81
Thiophanate- methyl+ Triflumizole	지오판· 리프졸 수화제	200	32	16	81
Cyprodinil+ Fludioxonil	싸이프로디닐· 후루디옥소닐 수화제	200	25	12.5	85.3
PolyoxinD+ Carbendazim	포리옥신디·가벤 다수화제	200	34	17	80
Bitertanol	바타롤수화제	200	35	17.5	79.4
Tebuconazol	터부코나졸 수화제	200	20	10	88.3
Benomyl	베노밀 수화제	200	17	8.5	90
Carbendazim+ Diethofencarb	디에토펜카브·가 벤다 수화제	200	19	9.5	88.8

부유를 비롯한 차랑 및 서촌조생의 성숙 전 유과의 과육내의 당을 분석한 결과 (표 8), 부유와 차랑의 경우 조사기별의 분석당의 뚜렷한 함량차이는 보이지 않았으나 sucrose의 함량 증가는 두 품종에서 유사한 경향을 보였다.

표 8. 단감 주요 품종의 과육내 당 함량변화

품	종	당 종류	7. 12	7. 27	8. 13	8. 27	9. 12	9. 27
부 유		sucrose	1.71	3.11	4.89	6.89	8.43	11.50
		glucose	1.90	1.80	1.29	1.05	1.17	1.23
		fructose	1.42	1.33	1.16	0.97	0.99	1.04
차 량		sucrose	2.16	4.07	6.24	8.03	10.16	11.95
		glucose	1.98	1.85	1.56	1.44	1.65	1.83
		fructose	1.92	1.80	1.43	1.19	1.30	1.66
서촌조생		sucrose	1.75	2.56	3.55	5.59	6.74	6.81
		glucose	1.74	1.99	2.27	2.99	3.77	4.01
		fructose	1.52	1.64	1.91	2.64	3.04	3.44

특히 부유와 차량은 서촌 조생에 비하여 월등히 높은 sucrose 함량을 보였는데 높은 sucrose의 함량은 탄저병의 감염 후 생장에 많은 영향을 줄 것으로 생각된다. 그리고 차량과 부유의 표피 세포층의 두께를 비교한 결과(그림 4), 차량의 경우 탄저병에 감수성을 나타내는 부유에 비하여 월등히 두껍고 견고한 표피세포조직을 가진 것으로 나타났다. 이러한 결과는 부유 품종이 다른 품종에 비하여 탄저병 쉽게 감염될 수 있는 소인을 시사하며, 이러한 품종 자체의 소인이 방제의 어려움에 원인이 될 수 있음을 시사한다.

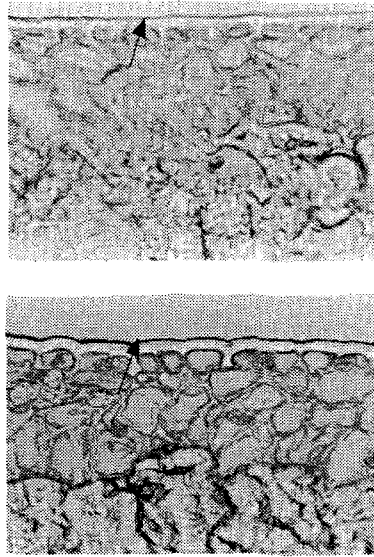


그림 4. 차랑과 부유의 표피세포(위; 부유, 아래; 차랑)

#### 라) 선발약제의 포장 적용 실험

##### 예비실험

1·2차 실내에서 배지와 유과를 이용한 검정 결과 선발된 약제를 포함한 4개의 방제 program을 작성하여(표 3) 시험 수행 전 감염율이 높았던 경주(18.0%)와 창녕(15.9%)의 과수원을 대상으로 실증 시험을 수행하였다. 경주의 경우(표 8), 1차 조사시(1999. 9 .8), program 처리구획에 포함된 대조구(무처리)의 경우 6.7% 그리고 관행 방제구의 경우 8.9%의 이병과율을 보였으나, 작성 program에 따라 약제를 처리한 살포구의 경우, 처리 4의 경우 전혀 발병을 하지 않았으며, 그 외의 처리구는 0.5%에서 2.5%정도의 발병율을 보였다. 1차 조사 1주일 후 조사한 2차 조사에서는 program처리 구획에 포함된 대조구(무처리)의 경우 19.4%, 그리고 관행 방제구의 경우 26.0%의 높은 이병과율을 보여 막대한 수확량 감소와 잠복감염에 의한 저장·유통과정에서의 2차적인 손실이 있을 것으로 판단되었다. 그러나 이병과율은 보였으나, 작성 program에 따라 약제를 처리한 살포구의 경우, 처리 내용

에 따라 이병과율의 차이를 보였지만 최저 2.1%에서 4.1%의 이병과율을 보여 78% 이상의 방제가를 보였다. 이러한 결과는 2000년도 실시한 2차 시험에서도 유사한 결과를 보였다(표 9). 대조구의 경우 관행 방제구에 비하여 다소 낮은 이병과율을 보였는데 방제약제의 근접살포에 의한 영향과 처리구내의 병원균의 밀도 감소의 원인이라 생각된다. 또한 관행방제구에 비하여 방제가 높았던 원인은 적절한 약제의 선발에 따른 결과로 생각된다.

표 9. 작성 program의 포장 실증시험결과 (1999)

처 리 내 용	시 험 포 장					
	경			주		
	1차 조사 (1999.9.8)			2차 조사 (1999.9.17)		
	조 사 과 일 (개)	이 병 과 일 (개)	이 병 과 율 (%)	조 사 과 일 (개)	이 병 과 일 (개)	이 병 과 율 (%)
처 리1	237	6	2.5	240	7	2.9
처 리2	385	2	0.5	380	8	2.1
처 리3	352	3	0.9	338	14	4.1
처 리4	300	0	0.0	301	8	2.7
대 조 구	360	24	6.7	350	68	19.4
관 행 방 제	292	26	8.9	500	130	26.0
-----						
1998.10						
이병과율				18.0		
(%)						

표 10. 작성 program의 포장 실증시험결과 (2000)

처 리 내 용	시 험 포 장		
	경	주	
	조 사 과 일 (개)	이 병 과 일 (개)	이 병 과 율 (%)
처 리1	220	7	3.1
처 리2	300	9	3.0
처 리3	348	17	4.9
처 리4	290	8	2.8
대 조 구	350	75	21.4
관 행 방 제	405	100	24.7
-----			
1998. 10 이병과율 (%)		18.0	

창녕의 경우(표 11), 1차 조사 시(1999. 9. 9), program처리 구획에 포함된 대조구(무처리)의 경우 8.2% 그리고 관행 방제구의 경우 2.8%의 이병과율을 보였으나, 작성 program에 따라 약제를 처리한 살포구의 경우, 경주 처리구에서 방제 효과가 높았던 처리 4의 경우 0.9%, 처리 3는 1.7%, 처리 1과 2는 각각 0.6와 0.7%의 발병율을 보여 무처리나 관행방제구에 비하여 낮은 이병과율을 보였다. 1차 조사 1주일 후 조사한 2차 조사에서는 program처리 구획에 포함된 대조구(무처리)의 경우 급격히 이병과율이 증가하여 약 19.3% 정도의 보였으며, 관행방제구는 약 10.0%의 발병율을 보여 1998년에 비하여 다소 낮은 발병율을 보였다. 그리고 처리 3과 4의 경우 각각 4%미만의 낮은 이병과율을 보여 경주 과원에서와 유사한 결과

를 얻을 수 있었다.

표 11. 작성 program의 포장 실증시험결과 (1999)

처 리 내 용	시 험 포 장					
	창			녕		
	1차 조사(1999.9.8)			2차 조사(1999.9.17)		
	조 사 과 일	이 병 과 일	이 병 과 율	조 사 과 일	이 병 과 일	이 병 과 율
	(개)	(개)	(%)	(개)	(개)	(%)
처 리1	500	3	0.6	511	30	5.9
처 리2	440	3	0.7	459	37	8.1
처 리3	520	9	1.7	554	18	3.2
처 리4	430	4	0.9	487	19	3.9
대 조 구	380	31	8.2	300	58	19.3
관 행 방 제	360	10	2.8	350	32	9.1
1998. 10						
이병과율			15.9			
(%)						

2차 조사에서는 모든 처리구에서 이병과율이 높았으나, 처리 3과 4에서는 4%미만의 이병율을 보여 관행 방제구에 비하여 60%이상의 방제가를 보였다. 경주에 비하여 낮은 방제가를 보인 이유는 이 지역의 기상 조건과 관련이 있을 것으로 생각된다. 이러한 결과는 2000년도 실시한 2차 시험에서도 유사한 결과를 보였다(표 12). 대조구의 경우 관행 방제구에 비하여 다소 낮은 이병율을 보였는데 방제약제의 근접살포에 의한 영향과 처리구내의 병원균의 밀도 감소가 원인이라 생각된다. 또한 관행 방제구에 비하여 방제가 높았던 원인은 적절한 약제의 선발에 따른 결과로 생각된다.



표 12. 작성 program의 포장 실증시험결과 (2000)

처 리 내 용	시 험 포 장		
	조 사 과 일 (개)	이 병 과 일 (개)	이 병 과 율 (%)
처 리1	405	21	5.2
처 리2	430	30	6.9
처 리3	510	12	2.3
처 리4	439	10	2.3
대 조 구	381	50	13.1
관 행 방 제	362	40	11.0
-----			
1998.10 이 병 과 율 (%)		15.9	

1차 예비실험을 토대로 작성된 2 program(표 4)을 창녕, 경주 및 창원의 과원에서 확대 실험을 수행한 결과(표 13), 창녕의 경우(표 13), program처리 구획에 포함된 대조구(무처리)의 경우 7.0% 정도의 이병과율을 보였으며, 처리 1과2의 처리구는 각각 3.0%와 2.8%의 발병율을 보여 무처리에 비하여 50%이상의 방제가를 보여 처리내용에 따른 차이는 없었다. 그러나, 경주에서 80% 이상의 방제가를 보여 창녕의 결과와는 다소 차이나는 결과를 보였다. 그러나 창원의 과수원에서 실시한 실험은 대조구의 낮은 발병율으로 결과 분석을 하지 못하였다. 2001년도에는 봄철의 긴 가뭄으로 인한 기상조건의 악화로 대체로 발병율이 낮았으며, 이에따른 처리과원내의 발병율이 10월 상순 현재까지 낮아 이를 토대로한 방제가

산출에는 많은 어려움이 있을 것으로 판단된다. 예를 들어 창녕의 경우 무처리나 관행방제구에서 모두 발병율이 2.0%이하였다. 또한 경주 과원의 경우도 역시 예년에 비하여 탄저병 발생이 매우 낮게 조사되었다.

표 13. 예비실험을 통한하여 선발된 약제 방제 program에 의한 방제효과(2000)

지역	무처리		처 리 1		처 리 2	
	발병율(%)	방제가(%)	발병율(%)	방제가(%)	발병율(%)	방제가(%)
창녕	7.0	0	3.0	57.1	2.8	60.0
창원	1.0	0	0.0	-	0	-
경주	20.2	0	2.9	85.6	3.2	84.2

#### 4. 고찰

단감 재배시 양질의 단감 생산을 제한하는 여러 요인 중 진균 병해에 의한 병으로는 탄저병(anthracoze)의 피해가 가장 심각하다(12, 19-26). 탄저병(anthracoze)은 과실, 가지 및 잎에 발생하며 특히 과실의 발생은 농가의 수확량과 소득에 직접적인 영향을 미쳐 매년 막대한 손실을 초래하고 있다. 이러한 탄저병의 효과적인 방제를 위하여 등록·시판되고 있는 살균제와 현재 농가에서 관행적으로 사용하고 있는 약제의 실내검정과 포장 적용실험을 통하여 방제효율을 증진시키고자 본 실험을 수행하였다. 26여종의 살균제를 탄저병에 의한 이병과일로부터 분리된 탄저병원균 중 우점종으로 분석된 G1에 속하는 균주인 CH1021 균주에 대한 균사 생장 억제력을 조사한 결과는 표 5-1, 2에 나타난 것처럼 benomyl를 비롯한 11종이 효과가 우수한 것으로 나타났는데, 주로 benzimidazole계 살균제와 EBI계 살균제들이 우점종에 대해 높은 균사 신장 억제력을 보였다. 활력이 높은 약제는 가벤다·가스신 수화제, 가벤다 수화제, 지오판 수화제, 치아벤다졸 수화제, 지오판·리프졸 수화제, 싸이프로드닐·후루디옥소닐 수화제, 포리옥신디·가벤다 수화제, 비타를 수화제, 터부코나졸 수화제, 베노밀 수

화제 및 디에토펜카브·가벤다 수화제였다(표 5-1, 2). 선정 약제 중 균사의 신장을 50% 억제하기 위한 농도인  $EC_{50}$  값이 가장 적은 약제는 싸이프로디닐·후루디옥소닐 수화제로  $0.04 \mu\text{g a.i./ml}$  이었다(표 6). 선발된 약제중 최소억제농도가  $1\mu\text{g a.i./ml}$  이하로 나타난 약제는 가벤다·가스신 수화제, 가벤다 수화제, 포리옥신다·가벤다 수화제 및 베노딜 수화제 등의 4 약제였으며,  $10\mu\text{g a.i./ml}$  이하인 약제는 치아벤다졸 수화제, 지오판·리프졸 수화제, 싸이프로디닐·후루디옥소닐 수화제 및 디에토펜카브·가벤다 수화제 등의 4 약제,  $10 \mu\text{g a.i./ml}$  이상의 약제는 지오판 수화제, 비타롤 수화제 및 터부코나졸 수화제 등의 3약제로 나타났다(표 6). 이에 따라 현재 농가에서 농민의 경험 또는 시판상의 추천에 의한 방제약제의 선택은 탄저병 방제에 효과적으로 이용될 수 있으나, 대부분 그렇지 못하고 포장내의 disease pressure만을 높이는 역효과를 낼 수 있을 것으로 판단된다. 보호살균제와 침투성 살균제의 적절한 이용은 효과적으로 병 방제에 도움을 줄 것으로 판단된다(11, 14). 위 약제 농도에 따른 효과를 조사한 결과 benzimidazole계 살균제 또는 이 계통의 약제와 혼합하여 제조된 약제의 경우  $1\mu\text{g a.i./ml}$ 의 낮은 농도에서도 높은 균사 신장 억제력을 보여 단감 탄저병의 방제에 유용할 것으로 생각된다(표 5-1, 2). 그리고 치아벤다졸 수화제, 지오판·리프졸 수화제, 싸이프로디닐·후루디옥소닐 수화제 및 디에토펜카브·가벤다 수화제 등의 4 약제는  $10 \mu\text{g a.i./ml}$ 에서 100%의 균사 신장 억제능력을 보였으나, 나머지 지오판 수화제, 비타롤 수화제 및 터부코나졸 수화제 등의 3약제는  $10 \mu\text{g a.i./ml}$ 에서 각각 87.6, 88.8, 89.0%의 균사신장 억제 능력을 보였다(그림 1). 또한 균사 신장 억제 시험 결과를 토대로하여 우점종 분석 결과 우점종으로 나타난 group1의 1 균주를 선발하여 약제의 농도를 0.01, 0.1, 1 및  $10\mu\text{g a.i./ml}$ 로 하여 포자발아 억제 능력을 검정하였는데, 가벤다 수화제의 경우  $0.01\mu\text{g a.i./ml}$  농도에서 70%이상의 억제를 보였고  $0.1\mu\text{g a.i./ml}$  농도 이상에서는 완전히 발아를 억제하는 것으로 조사되었다(그림 2).

베노밀, 톱신엠 및 판마시 수화제의 경우 가벤다와 같은 계열의 살균제임에도 불구하고 약간 낮은 발아억제력을 보였다. 이와 같은 반응특성의 차이는 실제 농가에서 약제를 선택 할 때 고려해야 할 사항으로 생각된다. 예를 들어 형성된 병반이 관찰되지 않는 상태에서 예방을 목적으로 하는 약제 적용은 가벤다 수화제가 다른 benzimidazole계열 약제에 비하여 효과적일 것으로 생각된다(2, 5, 6, 8). 이러한 약제의 반응상은 대상 식물병원균에 따라 매우 다양한 것으로 알려져있다(1). 위의 두 실험의 결과를 기초로 하여 약제를 선택한다면, 현재 농가에서 사용하고있는 벤레이트와 같은 benzimidazole계열 약제로도 충분히 효과적으로 탄저병을 방제할 수 있으리라 생각된다. 그러나 이러한 약제들은 저항성 균주의 출현으로 방제 효과의 저하가 예상되고 또는 현재까지 보고되어 있지는 않지만 이미 단감 과원에 출현했을 가능성이 있는 저항성 균주에 대한 적절한 전략 없이 사용하기에는 위험성을 지니고 있는 약제이다(7). 이는 적절한 시기에 방제약제를 살포했음에도 불구하고 탄저병에 의한 피해를 감소시킬 수 없는 한 원인이 될 수 있다. 이미 국내에서 일반 과채류의 재배에 있어서 benomyl(베노밀, 벤레이트), thiophanate-methyl (톱신엠) 및 carbendazim(가벤다) 등의 benzimidazole 계 살균제와 iprodione (로브랄), vinclozolin (놀란) 및 procymidone (팡이탄)의 dicarboximide계 살균제에 대한 저항성 문제가 심각한 것으로 근래 들어 보고되어지고 있다(11, 14). 특히, 먼저 사용한 살균제에 저항성을 획득한 저항성 균주는 후에 살포되는 약제 대해서도 저항성을 획득할 수 있는 잠재적 위험성이 있는 것으로 보고되어지고 있다(7). 또한 동일 포장내의 저항성균의 subpopulation는 연속적인 살균제의 적용에 의하여 증가하게 되고 이러한 증가는 방제 어려움을 가중시킬 수 있을 것으로 판단된다. 또한 위에서 언급한 benzimidazole 약제들은 그 작용점의 특이성으로 인한 저항성균주의 출현이 도입 후 짧은 기간 내에 발생하는 것으로 보고되어 있다. 현재 단감재배 농가 뿐 아니라 다른 경우에 있어서도 각종 주

요 작물 곰팡이성 방제를 위하여 이들 약제를 2회 이상 적용하고 있는 실정이다(7, 11, 14). 차후 단감 탄저병원균의 방제약제에 대한 저항성에 관한 연구가 수행되어야 할 필요성이 있다고 판단된다. 군사 신장과 포자 발아 억제실험에서 우수한 억제효과를 보였던 가벤다 수화제를 선발하여 접종원의 농도에 따른 효과를 검정하여 생물검정을 위한 기초자료를 얻었다. 그림 3과 같이 접종원의 농도가  $10^5$ 이하일 경우 발병율이 낮아 정확한 약제의 효과를 검정하고 판단하기에 부적절한 것으로 판단되었다(그림 3). 또한 포자의 농도가  $10^6$  이상으로 높을 경우 약제의 방제가가 떨어지는 것으로 조사되어 효과 및 접종원의 준비 단계에서의 용이성을 고려할 경우  $10^5$ 의 농도가 약효의 생물 검정에 적당할 것으로 판단되었다. 이 실험은 포장에서 병방제를 위한 방제용 약제의 살포 전에 포장의 위생적인 관리가 선결되어야 하는 이유를 간접적으로 시사하는 결과라 생각된다. 지표면과 잡초들 사이에 존재하는 이병 잔존물의 경우 반드시 제거되어야 할 것으로 판단된다(8, 9, 10, 15). 유과의 채집시기에 따라 발병율에 차이를 보이지 않았지만 발병력에는 다소 영향을 미쳐 8월 초순에 채집한 어린과일에서 병징이 가장 빠르게 나타났다. 배지를 이용한 군사 신장과 포자 발아 실험을 통하여 가장 좋은 효과를 보였던 benzimidazole계 살균제들의 효과가 우수한 것으로 조사되었다(표 7). 특히 베노밀 수화제의 경우 높은 방제가를 보였다. 이들 살균제는 현재 단감 재배시 문제되는 탄저병 방제에 이용하고 있거나 재배자 자신의 경험에 따라 사용되어지고 있는 약제들이었다. 유과(어린 과일)을 이용한 생물 검정 방법은 새로운 식물 보호제 개발 과정에서 그 유용성이 높을 것으로 판단된다. 또한 단감의 경우 생물 검정시 부유 품종의 사용이 효과적인 것으로 생각된다. 즉, 다른 품종에 비하여 재배 또는 재료의 준비가 용이하며, 다른 품종 서촌조생에 비하여 당성분이 높은 것으로 조사되어졌으며(표 7), 차량(그림 4)에 비해서는 표피세포가 얇아 병원균의 침입과 생장에 용이할 것으로 판단된다 (1). 1·2차 실내에서 배지와 유과를 이용한 검정 결과 선발된 약제를 포함한 방제

4개의 program을 작성하여(표 3) 시험 수행전의 감염율이 높았던 경주(18.0%)와 창녕(15.9%)의 과수원을 대상으로 실증 시험을 수행하였다. 처리 1과 2는 선정 과원에서 탄저병 및 다른 곰팡이에 의한 식물병을 방제하기 위하여 사용하고 있는 약제와 농민들 사이에 보조제로 사용되고있는 목초액을 중심으로 작성하였으며, 처리 3과 4는 선발 약제와 관행적으로 농민들이 사용하고 있는 약제를 중심으로 작성하였다. 경주의 경우(표 9), 1차 조사시(1999. 9. 8), program처리 구획에 포함된 대조구(무처리)의 경우 6.7% 그리고 관행 방제구의 경우 8.9%의 이병과율을 보였으나, 작성 program에 따라 약제를 처리한 살포구의 경우, 처리 4의 경우 전혀 발병을 하지 않았으며, 그 외의 처리구는 0.5%에서 2.5%정도의 발병율을 보였다. 이러한 발병율의 차이는 방제 약제의 선택에 따른 문제로 생각되며 실제 이농가는 탄저병을 방제하기 위하여 관행적으로 1차 생물검정 및 실험에서 효과가 저조했던 iprodione(로브랄)와 같은 약제를 이용하는 것으로 조사되었다. 1차 조사 1주일 후 조사한 2차 조사에서는 program처리 구획에 포함된 대조구(무처리)의 경우 19.4% 그리고 관행 방제구의 경우 26.0%의 높은 이병과율을 보여 막대한 수확량 감소 및 잠복감염에 의한 저장·유통과정에서의 2차적인 손실이 있을 것으로 판단되었다. 그러나 처리1가 처리 2는 저항성 균주의 출현 위험성이 높은 약제를 중심으로 작성되었던 점을 감안하면 이들 program은 재조정이 필요할 것으로 생각된다. 작성 program에 따라 약제를 처리한 살포구의 경우, 처리내용에 따라 이병과율의 차이를 보였지만 최저 2.1%에서 4.1%의 이병과율을 보여 78% 이상의 방제가를 보였다. 이러한 결과는 2000년에 실시한 2차 시험에서도 유사한 결과를 보였다(표 9). 대조구의 경우 관행방제구에 비하여 다소 낮은 이병율을 보였는데 방제약제의 근접살포에 의한 영향과 처리구내의 병원균의 밀도 감소가 원인이라 생각된다. 또한 관행방제구에 비하여 방제가 높았던 원인은 적절한 약제 선발에 따른 결과로 생각된다. 창녕의 경우(표 10), 1차 조사시(1999. 9. 9), program처리 구획에 포함된 대조구(무처리)의 경우 8.2% 그리고 관행 방제구의 경우 2.8%의

이병과율을 보였으나, 작성 program에 따라 약제를 처리한 살포구의 경우, 경주 처리구에서 방제 효과가 높았던 처리 4의 경우 0.9%, 처리 3는 1.7%, 처리 1과 2는 각각 0.6과 0.7%의 발병율을 보여 무처리나 관행방제구에 비하여 낮은 이병과율을 보였다. 1차 조사 1주일 후 조사한 2차 조사에서는 program처리 구획에 포함된 대조구(무처리)의 경우 급격히 이병과율이 증가하여 약 19.3%정도를 보였으며, 관행방제구는 약 10.0%의 발병율을 보여 1998년에 비하여 다소 낮은 발병율을 보였다. 그리고 처리 3과 4의 경우 각각 4%미만의 낮은 이병과율을 보여 경주 과원에서와 유사한 결과를 얻을 수 있었다. 2차 조사에서는 모든 처리구에서 이병과율이 높아졌으나, 처리3과4에서는 4%미만의 이병율을 보여 관행 방제구에 비하여 60%이상의 방제가를 보였다. 경주에 비하여 낮은 방제가를 보인 이유는 이 지역의 기상 조건과 관련이 있을 것으로 생각된다. 이러한 결과는 2000년도 실시한 2차 시험에서도 유사한 결과를 보였다(표 12). 예비 작성된 방제 program에 따라 단감 재배시 문제되는 탄저병의 방제를 시도한 결과 관행 방제구에 비하여 낮은 발병율과 우수한 방제가를 확인할 수 있었다. 그러나 위에서 언급한 바와 같이 저항성 균주의 출현 지연이나 살균제에 의한 selection pressure를 감소시키기 위한 대책마련에 관한 연구도 차 후 수행되어야 할 것으로 생각된다. 1차 방제를 기초로 하여 최종 방제 program을 작성하여(표 4) 포자의 비산 시기 및 기상사항을 고려하여 실행한 탄저병 방제를 결과(표 13), 창녕의 경우(표 13) program처리 구획에 포함된 대조구(무처리)의 경우 7.0% 정도의 이병과율을 보였으며, 처리 1과 2의 처리구는 각각 3.0%와 2.8%의 발병율을 보여 무처리에 비하여 50% 이상의 방제가를 보였으나 처리내용에 따른 차이는 없었다. 경주의 경우 80% 이상의 방제가를 보여 창녕의 결과와는 다소 차이나는 결과를 보였다. 그러나 창원의 과수원에서 실시한 실험은 대조구의 낮은 발병율으로 결과 분석을 하지 못하였다. 2001년도에는 봄철의 긴 가뭄으로 인한 기상조건에 의한 발병 환경의 악화로 대체로 발병율이 낮았으며, 이에 따른 처리 과원내의 발병율이 10월 상순 현재까지 낮

아 이를 토대로 한 방제가 산출에는 많은 어려움이 있을 것으로 판단된다. 예를 들어 창녕의 경우 무처리나 관행 방제구에서 모두 발병율이 2.0%이하였다. 또한 경주 과원의 경우도 역시 예년에 비하여 탄저병 발생이 매우 낮게 조사되었다. 그러나 현재 최종 개발하여 방제 시험에 적용한 결과, 약제의 적용 횟수를 줄여 방제하여도 우수한 방제효과를 얻을 수 있었다. 그러나 이러한 약제 적용 횟수의 감소는 농가의 심리적 불안감을 증가시키는 원인이 될 수 있어, 여러 차례의 포장 실증 실험을 실시하여 그의 신뢰성을 증진시킨 후에야 농가 이용이 가능하리라 생각된다. 최종 작성된 방제 program에 의하면 년 7회 정도의 방제로 효과적 방제를 기대할 수 있으리라 생각된다. 그러나 이러한 방제효율의 경우 포장의 위생적인 관리를 전제로 한 경우이다(9). 그러므로 포장의 위생관리에 따라 적절한 약제의 적용 횟수의 증감이 필요하리라 생각된다. 특히 전년도에 탄저병의 발생으로 인한 큰 피해를 받았던 포장의 경우 1-2년에 걸친 전염원의 감소를 위한 대책을 수립 한 후 방제에 본 program을 적용하는 것이 바람직하다고 판단된다(1, 9). 발병 현황에서 조사된 발병율과 재식거리의 관계를 분석한 결과에 따르면 재식 거리가 좁았던 포장에서 발병율이 높았는데 이는 밀식에 따른 포장내 통기성 불량으로 인한 상대습도에 상승이 발병에 호조건을 제공함과 동시에 방제 약제를 작업시 노동력 투입에 많은 장애를 주며 이는 약제의 올바른 살포를 방해 할 것으로 생각된다. 이런 포장의 경우 간벌이나 과감한 가지치기로 수관의 적절한 거리를 확보한 후 program의 적용이 가능하리라 판단된다(9, 13, 16, 17, 18). 또한 강우량 및 강우 일수에 방제약제 적용의 증감이 필요할 것으로 생각된다. 그러나 평년의 기상 조건을 고려 할 경우 본 연구에서 개발된 program에 따른 방제는 효과적인 탄저병의 방제에 기여 할 수 있으리라 판단된다. 또한 본 연구의 실내 및 유과를 통하여 우수한 방제효과 특성을 보였으나, 단감 혹은 탄저병에 등록이 되어있지 않은 약제의 경우 확대 실험이 필요한 것으로 생각된다.



## 5. 참고문헌

1. Agrios, G. N. 1997. *Plant Pathology*. Academic Press, Inc., New York. 635pp
2. Bernstein, B., Zher, E. I., and Dean, R. A. 1995. Characteristics of *Colletotrichum* from peach, apple, and other host. *Plant Disease* 79(5):478-482.
3. Bruhn, J. A., and Fry, W. E. 1981. Analysis of potato late blight epidermiology by simulation modeling. *Phytopathology* 71: 612-616.
4. Bus, V. G., Bongers, A. J. and Risse, L. A. 1991. Occurrence of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* resistant to benomyl, thiabendazole, and imazail on citrus fruit from different geographic origins. *Plant Dis.* 75:1098-1100.
5. Casela, C.R., and Frederiksen, R.A. 1993. Survival of *Colletotrichum graminicola* sclerotia in sorghum stalk residues. *Plant disease* 77(8): 825-827.
6. 조성인, 박은우, 양장식. 1995. 시설오이 병해 진단 및 방제 관리 전문가 시스템개발. 농림수산부 제1차년도 중간보고서.
7. Delp, C. J. 1988. *Fungicide resistance in North America*. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minn. 133pp.
8. DeVllavieille-Pope, C., Huber, L., Leconte, M., and Goyeau. H. 1995. Comparative effects of temperature and interrupted wet periods on-germination, penetration, and infection of *Puccinia recondita* f. sp. *tritica* and *P. striiformis* on wheat seeding. *Phytopathology* 85(4) : 409-415.

9. Dillard, H. R., and Cobb, A. C. 1993. *Colletotrichum lindemuthianum* bean debris in New York State. *Plant Disease* 77(12) 1233-1238.
10. Evans, K. J., Nyquist, W. E., and Latin, R. X. 1992. A model based on temperature and leaf wetness during for establishment at *Alternaria* leaf blight of maskmelon. *Phytopathology* 82(8) : 890-895.
11. Kim, B.S., Lim, T.H., Park, E.W. and Cho, K.Y. 1995. Occurrence of multiple resistant isolates of *Botrytis cinerea* to benzimidazole and N-phenylcarbamate fungicide. *Korean. J. Plant Pathol.* 11:146-150.
12. 김성봉. 1992. 단감재배 신기술. 오성출판사 35-80.
13. Montesinos, E., Moragrega, C., Llorente, I., Vilardell, P., Bonaterra, A., Ponti, R., Cavanni, P., and Brunelli, A. 1995. Development and evaluation of an infection model for *Stemphylium vesicarium* on pear based on temperature and wetness duration. *Phytopathology* 85(5): 586-592.
14. Lim, T. H., Chang, T. H. and Cha, B. J. 1998. Incidence of benzimidazole- and dicarbimide resistant isolates of *Monilinia fructicola* from overwintering mummies and peduncles on peach trees. *Korean. J. Plant Pathol.* 14:367-370.
15. 박은우, 허재선, 윤성철. 1992. 포도탄저병(*C. gloeosporioides*) 방제를 위한 살균제 살포시기 결정용 예찰 시스템. *한식병지* 8(3):177-184.
16. Scherm, H., and Bruggen, A.H.C. 1994. Weather variables associated with infection of lettuce by downy mildew (*Bremia lettucae*) in Coastal California. *Phytopathology* 84(8): 860-865.
17. Scherm, H., and Bruggen, A.H.C. 1994. Current spore release infection of lettuce *Bremia lettucae* during morning with prolonged

- leaf wetness. *Phytopathology* 85(5): 552-555.
18. Shi, Y., Correll, J.C., Guerber, J.C., and Rom, C.R. 1996. Frequency of *Colletotrichum* species causing bitter rot of apple in the southeastern United States. *Plant Disease* 80(6):692-696.
  19. 作物病原菌 研究技法の基礎. 1995. 日本植物防疫協會 342pp.
  20. 中臣康範. 宮川正通. 1984. 新潟園試試験成績書 11-12.
  21. 前田 知. 1954. 柿炭疽病菌の冬芽越冬. 園藝學會昭 29秋. 講要:1.
  22. 谷 利一. 1957. 柿炭疽病菌の培地上の性質並びに同菌有傷接種による柿果上での病斑進展と分生孢子形成の品種間差異. 香川大學報8(1):115-120.
  23. 谷 利一. 1965. カキ炭疽病の發生生理學的研究, とくに罹病果實の病徴發現にあずかるペクチン質分解酵素の役割. 香川大學紀要 18: 1-83.
  24. 鑄方末彦. 1931. ボルドウ液による柿落葉病の安全なる防除法. 農及園 6:947-950.
  25. 鑄方末彦. 1942. 柿の重要寄生性病害に關する病理並に治病學的研究:192-215.
  26. 多久田達雄, 鑄澤敬之. 1977. カキ圓星落葉病の感染時期と潜伏其間. 日病報 44:88

## 단 감 탄 지 병 방 제 방 제 력

구분	1월	2월	3월	4월	5월			6월			7월			8월			9월			10월			11월	12월
					상순	중순	하순	상순	중순	하순	상순	중순	하순	상순	중순	하순	상순	중순	하순	상순	중순	하순		
생육 단계	휴면기				신초 신장기			과실 1 비대기			과실 2 비대기			과실 3 비대기 및 수확			휴면기							
병원 균	월동기 (균사/포자형태)				포자 비산 및 1차 감염 시기			1차 전염원의한 2차 감염 시기			2차 전염원에 의한 3차 감염 시기			월동 (균사/포자)										
방제 작업	이병 잔존물의 제거 및 보호살균제 살포				[Bar chart showing black bars for 5/5, 6/5, 7/5, 8/5, 9/5]			[Bar chart showing black bars for 5/6, 6/6, 7/6, 8/6, 9/6]			[Bar chart showing black bars for 5/7, 6/7, 7/7, 8/7, 9/7]			[Bar chart showing black bars for 5/8, 6/8, 7/8, 8/8, 9/8]			[Bar chart showing black bars for 5/9, 6/9, 7/9, 8/9, 9/9]			이병잔존물의 제거				
					보호살균제 살포			보호 살균제 및 침투성 약제의 살포																
법제					전년도 이병율이 높아 피해를 높았던 포장 과 많은 경우량으로 높은 상대습도 유지되는 경우 살포												약제의 살포 횟수는 농가의 과원 관리 상태에 따라 증감될 수 있음							
					저장 중의 피해 감소를 위한 침투성 약제의 살포																			
				집중적 약제 살포시기 - 특히 장마 직후 약제 살포는 탄저병 방제에 기본적인 사항임.																				