

최 중
연구보고서

환경 친화적 기술에 의한 고령지 감자흑각병
(Potato Blackleg Disease)의 종합적 방제

Integrated Pest Management for Potato
Blackleg Disease by Environmentally
Friendly Techniques

연구기관
강원대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “환경친화적 기술에 의한 고령지 감자흑각병의 종합적 방제”
과제의 최종보고서로 제출합니다.

2002 년 11월 15일

주관연구기관명 : 강원대학교

총괄연구책임자 : 허 장 현

세부연구책임자 : 임 춘 근

세부연구책임자 : 허 장 현

연 구 원 : 박 덕 환

연 구 원 : 주 영 철

연 구 원 : 구 준 학

요 약 문

I. 제 목

환경친화적 기술에 의한 고령지 감자흑각병의 종합적 방제

II. 연구개발의 목적 및 필요성

강원도 고령지 감자재배 면적은 18,413ha로 전국 1위이며, 총생산량은 485,600천톤이며 연간 총생산수입은 3,500억원으로 전국 1위를 차지하고 있다. 그러나 본 연구팀이 1993년~1998년까지 현지에서 조사한 결과 감자의 생산에 치명적인 피해를 줄 수 있는 *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Eca) 세균에 의한 감자흑각병이 중서 생산지, 재배지, 저장과정에서 대량발생 되고 있었다. 현재 국내에는 감자흑각병 방제를 위한 약제가 등록되어 있지 않아 환경친화적인 화학방제법의 조속한 개발과 무병중서 생산체계를 이용한 조기진단기술의 확립이 시급한 실정이다.

본 연구에서는 무병중서 생산을 위한 조기진단기술 개발과 국내 감자흑각병 방제를 위한 화학세균제의 선발을 목적으로 균주 특성분석, 분류체계확립, 조기진단기술 개발 그리고 실내와 포장실험을 통한 우수한 환경친화적 세균제의 선발에 관한 연구를 3년동안 수행하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 조기진단기술을 이용한 무병중서 생산
 - 가. 감자흑각병원균의 특성분석
 - 나. 감자흑각병원균의 분류체계확립
 - 다. 조기진단기술을 이용한 무병중서 생산

2. 세균제를 이용한 감자흑각병의 화학적 방제

가. 우수 세균제 선발 및 특성 분석

나. 선발 약제의 흑각병에 대한 방제효과

다. 화학세균제의 환경친화적 방제법 확립

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 조기진단기술을 이용한 무병종서생산.

가. 강원도 고령지는 우리나라 감자재배 및 종서생산의 중심지 역할을 하고 있으나, 최근 5년 간 조사결과 감자흑각병의 발생이 매우 심각한 실정이다. 따라서 감자흑각병원균의 특성분석 및 분류체계를 확립하고, 조기진단 기술을 이용한 무병종서 생산을 목표로 본 연구를 실시하였다.

나. 국내에서 분리한 감자흑각병원균 (*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*)의 특성 및 분류체계를 확립하기 위하여 국외 감자흑각병원균 및 감자무름병원균 (*E. carotovora* subsp. *carotovora*), 그리고 *Erwinia* soft-rot 그룹과의 유연관계를 알아보았다. 그 결과 국내 감자흑각병원균은 일본 감자흑각병원균과 매우 높은 유사도를 보였으며, 감자무름병원균과도 높은 유사도를 보이는 것으로 본 연구결과 확인되었다. 이는 국내 감자흑각병원균의 경우, 유전적으로도 다양성을 가진다는 것을 간접 시사하며, 진화적으로 모든 *carotovora* 그룹의 병원세균들은 동일한 조상에서 출발하여 환경 및 생태적 조건에 맞추어 진화되었음을 알 수 있다.

다. 국내의 감자흑각병원균은 유전적으로 매우 다양한 특성을 가지고 있었다. 특히 감자무름병원균과는 높은 유연관계를 가지고 있었으므로 본 연구진이 개발한 specific primer를 이용하면 감자흑각병원균 뿐만 아니라 다른 *carotovora* 그룹의 병원균까지 밝혀낼 수 있었다.

본 연구를 통하여 국내 감자흑각병원균의 특성분석과 분류체계를 확립하였고, 본 연구수행 중에 개발된 분자생물학적 조기진단기술을 이용한 무병종서 생산이 가능하게 되었다.

2. 세균제를 이용한 감자흑각병의 화학적 방제

가. 감자흑각병의 방제 시 이병중서의 경우에는 streptomycin (0.14 mM)과 streptomycin sulfate (0.042 mM) 2종의 약제를 중서소독제로 사용하여 안정적으로 방제할 수 있을 것으로 사료된다.

나. 감자식물체가 이병시에는 streptomycin (0.05 mM, 29.0 ppm)에 copper oxide (3.6 mM, 514.8 ppm)를 첨가한 혼합제와 streptomycin sulfate (0.018 mM, 26.2 ppm)에 copper oxide (3.0 mM, 429.0 ppm)를 첨가한 혼합제를 발병초기 7일간격으로 3번 경엽처리하면 안정적으로 방제할 수 있을 것으로 판단된다.

이상의 결과로부터 감자의 안전생산을 위하여 감자흑각병원균의 조기진단기술을 이용하여 무병중서 및 국제검역체계를 확립하여 감자의 무병중서를 생산할수 있어 높은 생산량을 기대할 수 있다. 그리고 감자에 흑각병원균이 감염 시 이병중서의 경우에는 streptomycin (0.14 mM)과 streptomycin sulfate (0.042 mM) 2종의 약제를 중서소독제로 사용하여 방제할 수 있고, 감자 식물체가 이병시에는 streptomycin (0.05 mM, 29.0 ppm)에 copper oxide (3.6 mM, 514.8 ppm)를 첨가한 혼합제와 streptomycin sulfate (0.018 mM, 26.2 ppm)에 copper oxide (3.0 mM, 429.0 ppm)를 첨가한 혼합제를 발병초기 7일간격으로 3번 경엽처리하면 안정적으로 방제할 수 있을 것으로 판단된다.

본 연구과제를 통하여 다양한 종류의 살균제를 이용하여 방제효과 실험을 검증한 결과, 기존의 농약사용량의 비하여 50%이하의 수준에서 감자흑각병을 효과적으로 방제할 수 있어 환경친화적으로 감자흑각병을 방제할 수 있었다. 또한 상기의 확립된 기술들은 농가의 지도사업에 반영하여 농가보급을 도모할 수 있다고 사료된다.

SUMMARY

I. Title

Integrated pest management for potato blackleg disease by environmentally friendly techniques.

II. Objectives

The potato blackleg disease caused by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Eca*) is the major problem in potato cultivation areas of Gangwon-do, Korea. The potato blackleg disease caused both qualitative and quantitative loss in its cultivation. The total 18,413 ha of farmland of Gangwon-do is grown for potato cultivation. The total yield is 485,600 thousand ton per year and the price is 3,500 million won. Field survey from 1993 to 1998 in the potato cultivation areas found the increasing the outbreak of potato blackleg disease, especially in during planting and storing. But, till date, there is no effective bactericides registered in Korea for controlling potato blackleg. Because of its serious problem, it is very urgent to establish the production of sterile potato tubers with the technique of early diagnosis and to develop environmentally friendly bactericides for controlling the potato blackleg disease.

Therefore, the main objectives of this research work are to identify the causal organisms, their classification, early diagnosis method for disease symptoms, development, selection of effective bactericides and to establish international quarantine system for controlling the disease. These research works were performed in *in vitro* and *in vivo* growth during last three years.

III. Research scopes and perspectives

1. Production of sterile potato tubers with the technique of early diagnosis
 - a. Characterization of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*

- b. Taxonomic position of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*
- c. Production of sterile potato tubers with the technique of early diagnosis

2. Chemical control potato blackleg disease by bactericides

- a. Development and selection of bactericides
- b. Control effect of selected bactericides on potato blackleg disease
- c. Establish control method for potato blackleg disease

IV. Results and suggestions

1. Production of sterile potato tubers with the technique of early diagnosis

a. High peak zone of Gangwon-do is the most widely cultivated area for seed growing, potato cultivation and its production in Korea. However, survey of potato cultivation during last 5 years reported the appearance potato blackleg diseases and serious problem in its cultivation. Therefore, identification of the causal pathogens of potato blackleg disease, their phenotypic and molecular characterization, control by selecting resistance cultivars of potatoes for potato blackleg disease, improvement of potato quality and high yield of its production by using biotechnology are the main objectives of this research work.

b. First, the pathogens of potato blackleg disease isolated from Korea were identified as *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Eca*) based on their morphological, biochemical and molecular characters. Phylogenetic analysis and relationship between the pathogens of different locations were studied by comparing the Korean pathogen of potato blackleg with other pathogens of *Erwinia* soft-rot group. Phylogenetic analysis of Korean *Eca* showed high homologous to Japanese *Eca* and type strain of *E. c.* subsp. *carotovora* (*Ecc*). Molecular study showed genetic diversity among the Korean pathogens of potato blackleg and they found to be closed to *Ecc* which may be due to

different geographical and ecological conditions. Therefore, we conclude that Korean pathogens were indirectly evolved from *Ecc*.

c. The specific primers prepared from ITS region of Korean *Eca* isolates also detected from the potato fragility pathogenic bacteria *Ecc*, which also showed the high homologous between these two sub-species.

With these results we conclude that we can develop the sterile potato tubers and their healthy mass production by using early disease diagnosis, correct classification and their detail molecular analyses.

2. Control potato blackleg disease by bactericides

a. Combination of streptomycin (0.14 mM) and streptomycin sulfate (0.042 mM) was observed most effective when applied in potato tuber for controlling of potato blackleg disease.

b. Mixture of copper oxide (3.6 mM, 514.8 parts per millions) and streptomycin (0.05 mM, 29.0 parts per millions), mixture of copper oxide (3.0 mM, 429.0 parts per millions) to streptomycin sulfate (0.018 mM, 26.2 parts per millions) were found effective when applied 3 times of 7 days interval immediately after appearance of disease symptoms.

Treatment of those mixture of bactericides were found most effective in potato tubers and potato plant for their control. Application of bactericides prepared by combining two or more bactericides found environmentally friendly, and less harmful in potato production in compare to those bactericides which are frequently used in agriculture. Because only half of the actual concentration of bactericides is used in the combined bactericides for the control of pathogens.

Such useful bactericides should be recommended for the farmers so as they can use in their farm houses for healthy and high yield of potatoes.

Contents

Summary	2
Chapter 1. Introduction	16
Section 1. Necessity of research	16
Section 2. Object and content of research	16
Chapter 2. Present situation of International technical development	17
Chapter 3. Perspectives of research and Results	18
Section 1. Production of sterile potato tubers with the technique of early diagnosis	19
1. Introduction	20
2. Materials and methods	22
1) Characterization of <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>	22
2) Taxonomic position of <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>	24
3) Production of sterile potato tubers with the technique of early diagnosis	28
3. Results and discussion	30
1) Characterization of <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>	30
2) Taxonomic position of <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>	37
3) Production of sterile potato tubers with the technique of early diagnosis	49
4. Summary	55
Section 2. Control potato blackleg disease by bactericides	56
1. Introduction	57
2. Materials and methods	59

1) Development and selection of bactericides	59
2) Control effect of selected bactericides on potato blackleg disease	62
3. Results and discussion	65
1) Development and selection of bactericides	65
2) Control effect of potato blackleg disease by selected bactericides	72
3) Establish control method of potato blackleg disease	78
4. Summary	80
 Chapter 4. Research Achievement and its contribution	81
 Chapter 5. Recommendation	83
 Chapter 6. Reference	84

목 차

요 약 문	2
제 1장 연구개발과제의 개요	16
제 1절 연구개발의 필요성	16
제 2절 연구개발의 목적과 범위	16
제 2장 국내외 기술개발 현황	17
제 3장 연구개발수행 내용 및 결과	18
제 1절 조기진단기술을 이용한 무병종서생산	19
1. 서론	20
2. 재료 및 방법	22
1) 감자흑각병원균의 특성분석	22
2) 감자흑각병원균의 분류체계 확립	24
3) 조기진단기술은 이용한 무병종서 생산	28
3. 결과 및 고찰	30
1) 감자흑각병원균의 특성분석	30
2) 감자흑각병원균의 분류체계 확립	37
3) 조기진단기술은 이용한 무병종서 생산	49
4. 결과 요약	55
제 2절 살균제를 이용한 감자흑각병의 화학적 방제	56
1. 서론	57
2. 재료 및 방법	59
1) 우수 살균제 선발 및 특성분석	59

2) 선발약제의 흑각병에 대한 방제효과	62
3. 결과 및 고찰	65
1) 우수 살균제 선발 및 특성분석	65
2) 선발약제의 흑각병에 대한 방제효과	72
3) 화학살균제를 이용한 감자흑각병의 환경친화적 방제법	78
4. 결과 요약	80
제 4 장 목표달성도 및 관련분야의 기여도	81
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	83
제 6 장 참고문헌	84

List of figure

Fig. 1.	Disease caused by <i>E. carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i> in potato tubers and potato plant	30
Fig. 2.	Pathogenicity test for <i>E. carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i> in the slice of potato tubers	31
Fig. 3.	Electron micrograph of <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>	32
Fig. 4.	PCR amplification of 16S rRNA gene (1.5kb)	37
Fig. 5.	Insert DNA confirmation	37
Fig. 6.	Phylogenetic tree of <i>E. carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i> and related bacteria based on 16S rRNA gene sequences obtained by the neighbor-joining method	38
Fig. 7.	PCR amplification of 16S-23S rRNA interspace (ITS) region	39
Fig. 8.	Phylogenetic tree of <i>E. carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i> and related bacteria based on 16S-23S intergenic transcribed spacer (ITS) region involving tRNA-Glu coding obtained by the neighbor-joining method	40
Fig. 9.	Phylogenetic tree of <i>E. carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i> and related bacteria based on 16S-23S intergenic transcribed spacer (ITS) region involving tRNA-Ala and tRNA-Ile coding obtained by the neighbor-joining method	41
Fig. 10.	PCR amplification of 5S rRNA gene (120bp)	42
Fig. 11.	Insert DNA confirmation	42
Fig. 12.	Phylogenetic tree of <i>E. carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i> and related bacteria based on 5S rRNA gene sequences obtained by the neighbor-joining method	42
Fig. 13.	Phylogenetic tree of <i>E. carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i> and related bacteria based on RAPD by NTSYS program	44
Fig. 14.	SDS-PAGE analysis for the band pattern of total protein isolated from different strains of <i>E. carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>	45
Fig. 15.	Western blot analysis for the total protein	45

Fig. 16.	Phylogenetic tree of <i>E. carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i> and related bacteria based on protein analysis by NTSYS program	46
Fig. 17.	Phylogenetic tree of <i>E. carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i> and related bacteria based on biolog system by NTSYS program	47
Fig. 18.	Phylogenetic tree of <i>E. carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i> and related bacteria based on physiological and biochemical test by NTSYS program	48
Fig. 19.	PCR amplification of pectate lyase gene	50
Fig. 20.	Analysis of restriction enzyme sites in pectate lyase gene by using <i>Sau3A</i> I, <i>Hae</i> II, <i>Alu</i> I, <i>Hap</i> II	51
Fig. 21.	RAPD band pattern of <i>E. carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>	52
Fig. 22.	Alignment of ITS region coding tRNA ^{Glu} of Korean strains with Genbank data of <i>Erwinia</i> soft-rot group	53
Fig. 23.	PCR amplification of ITS tRNA ^{glu} region by using specific primer prepared from the <i>E. carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>	54
Fig. 24.	PCR amplification of ITS tRNA ^{Ile} and rRNA ^{Ala} region by using specific primer prepared from the <i>E. carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>	54
Fig. 25.	Comparison of temperature and humidity	64

List of table

Table 1.	List of strains of <i>E. carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i> used in this study	31
Table 2.	Physiological and biochemical characteristics of domestic strains in comparison to <i>E. carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i> and <i>E. carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	33
Table 3.	Fatty acids analysis of Korean strains and their comparison with <i>Erwinia</i> soft-rot group	35
Table 4.	Host range assay of <i>E. carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>	36
Table 5.	DNA relatedness of <i>E. carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>	43
Table 6.	Bactericides used in the study	60
Table 7.	List of soil physical and chemical properties	63
Table 8.	Effect of <i>Eca</i> strain on bactericides	66
Table 9.	Mimum inhibitory concentrations of bactericides on <i>Eca</i> Hongchon strain	67
Table 10.	Effect of bactericides on <i>Eca</i> Hongchon and ATCC33260 ^T strains	68
Table 11.	Effects of different concentrations of bactericides on the growth of <i>Eca</i> Hongchon and ATCC33260 ^T strain.	70
Table 12.	Bactericides effect of selected bactericides on infected seed potatoes	73
Table 13.	Bactericides effect of selected bactericides on infected plants	74

Table 14. Bactericides effect of selected bactericides on infected potatoes 75

Table 15. Bactericides effect of selected bactericides on infected potatoes 75

Table 16. Bactericides effect of selected bactericides on infected plants 76

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1절. 연구개발의 필요성

강원도 고령지 감자재배 면적은 18,413ha로 전국 1위이며, 총생산량은 485,600천톤이며 연간 총생산수입은 3,500억원으로 전국 1위를 차지하고 있다. 그러나 1993년~1998년 사이 강원대학교 연구팀 조사결과 *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Eca*) 세균에 의한 감자흑각병이 종서의 생산지, 재배지, 저장과정에서 대량발생 되고있다. 현재 국내의 경우 감자흑각병 방제를 위한 약제가 등록되어 있지 않아, 조기진단기술을 이용한 무병종서 생산체계 확립과 세균제를 이용한 감자 흑각병의 환경친화적인 화학적 방제법이 시급한 실정이다.

본 연구에서는 무병종서 생산을 위한 조기진단기술 개발과 국내 감자흑각병 방제를 위한 화학세균제의 선발을 목적으로 균주 특성분석, 분류체계확립, 조기진단기술 개발 그리고 실내와 포장실험을 통한 우수한 환경친화적 세균제의 선발에 관한 연구를 3년 간 동안 수행하였다.

제 2절. 연구개발의 목적과 범위

1. 조기진단기술을 이용한 무병종서 생산
 - 가. 감자흑각병원균의 특성분석
 - 나. 감자흑각병원균의 분류체계확립
 - 다. 조기진단기술을 이용한 무병종서 생산

2. 세균제를 이용한 감자흑각병의 화학적 방제
 - 가. 우수 세균제 선발 및 특성 분석
 - 나. 선발 약제의 흑각병에 대한 방제효과
 - 다. 화학세균제의 환경친화적 방제법 확립

제 2 장 국내 외 기술개발 현황

감자흑각병은 감자의 생산과 저장과정에서 많이 발생하는 병으로서 유럽과 미국의 경우, 유전자 기술을 이용한 조기진단기술을 이용하여 무병종서 생산체계를 확립하였으며, 감자흑각병원균을 검역대상세균으로 제정하여, 검역체계를 강화하고 있다. 또한 지역적으로 가까운 일본에서도 조기진단 기술에 의한 무병종서 생산체계에 관한 연구가 진행 중에 있으며 일단 발견되면 감자종서를 전면 폐기 처분한다. 국내의 경우, 강원대학교에서 감자흑각병의 병조직으로부터 *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*를 분리, 동정하였으며, 감자흑각병원균이 감자이외에 배추, 당근 등의 고령지 주요 원예작물에도 발생한다는 것을 발견하였다. 따라서 균주에 대한 분류학적연구가 진행되었으며, 감자흑각병원균의 16S rRNA gene, ITS region, RAPD primers등을 이용한 조기진단기술을 개발하여 무병종서 생산체계를 확립하였다. 이 중 조기진단기술을 강화하여 수입되는 감자에 대한 수입절차를 강화하여 국내 감자의 경쟁력을 향상시켜 감자재배 농민들의 소득을 향상시킬 수 있다. 또한 국내의 경우 감자흑각병에 대한 방제약제가 등록되지 않아 농민들의 농약남용 실태로 환경 및 감자에 대한 잔류와 저항성균주의 출현이 우려되고 있다. 또한 외국균주와 국내균주간의 유전적 유연관계가 낮아 감자흑각병 방제약제에 대한 자체개발이 필요하다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 조기진단기술을 이용한 무병종서생산

제 2 절 살균제를 이용한 감자흑각병의 화학적 방제

제 1 절 조기진단기술을 이용한 무병종서생산

1. 서 론
2. 재료 및 방법
3. 결과 및 고찰
4. 결과요약

1 서 론

감자(Potato, *Solanum tuberosum* L.)는 남미 안데스산맥지방이며 잉카 원주민이 기원전 200년에 재배된 것으로 알려져 있다. 우리나라에서는 1961년 고령지 농업시험장이 대관령에 설립되면서 우리나라의 감자사업이 심도있게 추진되었고, 연간 생산량은 73만톤 정도로서 강원도에서 33%, 제주도에서 21%를 생산하고 있다. 또한, 감자는 알칼리성 저칼로리 식품으로 국민선호도가 높아지고, 가공산업의 발달로 다양한 가공식품이 생산되면서 소비가 계속 증가되고 있는 실정이다. 이렇듯 많은 소비가 이뤄지고 있는 감자에도 현재까지 알려진 감자의 병해가 200여종으로서 많은 병에 이병성을 나타내고 있는 실정이다.

국내의 경우 감자병해에는 바이러스에 의한 12종, 세균에 의한 8종, 곰팡이에 의한 15종, 그리고 기타 비병원성에 의한 10여종 등 총 45종 병해로 나뉘어져 있다. 이 중 감자흑각병은 병원세균인 *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Eca)에 의하여 감자의 지상부 및 괴경에서 발생한다. 흑각병원세균은 감자, 양배추, 흰꽃양배추, 파, 샐러리, 배추 외 43가지의 채소류와 화훼류 그리고 과일에서 병원성을 나타내며, pectate lyase, cellulase 등을 생산하여 식물세포의 1차 세포벽과 중층을 분해시켜 다른 병원세균에 대한 식물의 저항성을 저하시키고 조직 팽창을 증가시켜 결과적으로 식물조직의 연화, 부패를 유도시킨다고 보고되었는데, 특히 pectate lyase가 가장 중요한 병원성결정요인으로 작용하고 있다(김 등, 1993; 이와 김, 1996).

강원도 고령지는 우리나라 감자재배 및 종서생산의 중심지 역할을 하고 있다. 하지만 강원대학교 연구팀 조사결과(조사기간:1993년-1998년), 현재 강원도 고령지 감자재배지에서의 흑각병(blackleg)피해가 빠른 속도로 증가하고 있는 실정이다. 이에 흑각병 방제대책개발을 호소하는 감자재배농민 및 감자가공업체가 속출하고 있고, 감자흑각병이 제주도 및 국내 주요 감자재배지에도 발생함에 따라 감자흑각병이 전국적으로 확산되고 있어 감자흑각병 방제대책개발은 국가적 차원에서 필히 수행되어야 할것으로 사료된다. 현재 무병종서생산을 위한 조기진단기술 및 흑각병 방제대책이 국내에 없기에 흑각병에 의한 피해가 계속 증가하고 있는 실정이다.

본 연구는 감자흑각병이 일반 감자재배지에서 뿐만 아니라 국가산하 감자종

서 생산지역에서도 대량 발생하고 있으므로, 국가산하 감자종서 생산지역으로부터 종서를 구입하여 감자를 재배하고 있는 대부분 농가의 경우 조기진단기술을 이용하여 무병감자종서를 생산하는 것이 흑각병 방제의 필수요인이라 생각하고 그와 관련된 연구를 함으로써 감자흑각병의 환경친화적인 종합적 방제법을 개발함에 있다.

2. 재료 및 방법

1) 감자흑각병원균의 특성 분석.

병원균의 분리 및 병원성검정

강원도 홍천, 평창등지의 감자가 집단 재배되고 있는 고령지 지역으로부터 감자흑각병이 발병된 이병체를 채집하였다. 이 이병체의 이병부위와 건전부위 경계면을 포함하여 약 5 mm³ 정도 자른다음 0.25% sodium hypochloride solutions에 약 1분간 표면살균 후, 살균수에 세척하여 1ml 살균수가 들어있는 튜브에 넣고 마쇄 하였다. 그 후 적당량을 희석하여 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷희석액을 MGY agar 배지 (mannitol 10g, glutamic acid 0.25g, NaCl 0.2g, KH₂PO₄ 0.5g, yeast extract 0.25g, agar 15g/L)에 도말배양하여, 28℃에서 24시간동안 배양한 후 형성된 콜로니를 수집하였다. 순수배양을 위해서는 동일한 배지에 3회 연속 계대배양하고, 모든 균주는 MGY배지에서 키워 5℃ 저온저장고에 보존하였다. 또한 영구보존을 위해서는 동결건조방법으로 처리하여 4℃에서 보존하였다.

순수 분리된 콜로니의 병원성을 검정하기 위해서 감자 괴경을 0.5% NaOCl 용액으로 표면살균하여 0.25cm 두께로 자르고, 자른 감자 절편은 Petri-dish에 습실처리한 다음 치상하였다. 시험균주는 MGY배지에서 28℃, 24시간 배양한 균총을 감자절편에 치상하였다. 28℃ 항온기에서 24시간 배양한 후, 감자절편의 흑각 증상 및 무름증상을 관찰하였다. 또한 pot내에서의 병원성 검정을 위해서는 직경 20cm pot에 종서를 파종후 지상부 및 괴경이 형성되는 한달 후에 줄기 및 괴경에 10⁶/ml 농도로 현탁한 현탁액을 상처접종하였다. 접종구는 습실처리를 하여 2-3일 경과 후 발병유무를 판단하였다.

병원균의 생화학적 특성분석

병원균의 생화학적 특성을 분석하기 위해서 Schaad의 지침서에 준해 실험을 실시하였다. 먼저 Pectatae 분해, gelatin 액화, acetoin 생성, erythromycin에 대한 감수성, phosphatase, glucose로부터 가스생성, lecithinase, indole, 색소형성유무, 환원물질생성, 36-37℃ 성장유무, urease, casein분해, 5% NaCl 성장유무 테스트를 실시하였다. 또한 탄소원 이용도를 알아보기 위해서는 D-lactose, trehalose,

maltose, methyl α -d glucoside, melibiose, cellobiose, palatinose, malonate, galacturonate의 이용도를 조사하였다.

병원균의 지방산 분석

병원균을 MGY액체배지에 28℃ 2일간 배양한 후 원심분리하여 상층액을 버리고 균만을 얻어, 용액 1을 1ml을 가하여 혼합하고 100℃에서 5분간 끓인 후 혼합하고 다시 100℃에서 25분간 끓여 식힌다. 다시 여기에 용액 2를 2ml을 가하여 혼합하고 80℃에서 10분간 끓인 후 바로 차가운 물에 식힌다. 그리고 용액 3을 1.25ml을 가한 후 10분간 천천히 혼합하여 아래층을 조심스럽게 새로운 튜브에 옮긴다. 여기에 용액 4를 3ml 가하고 5분간 혼합하여 상층액을 취해 분석용 GC vial에 옮겨 sealing한 후 gas chromatograph에서 분석하였다.

병원균의 기주범위 조사

기주범위를 조사하기 위해서 감자, 무, 배추, 양파, 당근, 치커리절편을 0.5% NaOCl 용액으로 표면살균한 후, 0.25cm 두께로 자르고, 자른 절편을 Petri-dish에 습식처리를 하여 치상하였다. 시험균주는 MGY배지에서 28℃, 24시간 배양한 균총을 각각의 절편에 치상하였다. 그 후 28℃ 항온기에서 24시간 배양하여 각각의 절편에 형성되는 흑각증상 및 무름증상을 관찰하였다.

2) 감자흑각병원균의 분류체계확립

병원균의 16S rRNA 유전자 분석

병원균의 16S rRNA 유전자를 증폭하기 위해서 Forward primer: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'와 Reverse primer : 5'-ACGGCTACCTGTTACGACTT-3'를 사용하였다. 16S rRNA 유전자부분을 증폭하기 위한 PCR조건은 DNA 50ng, dNTP 200uM, *Taq* polymerase 2.5U, Buffer, MgCl₂ 2.5mM, primer 20pM을 처리하여 95°C 1min, 55°C 1min, 72°C 2min으로 35cycle 반복하였다. 증폭된 유전자는 pGEM-T easy vector에 클로닝하여 *E. coli* DH5a strain에 transformation하여 보존하였으며, ALF red autocycle sequencing kit를 이용하여 direct sequencing하였다. Sequencing을 위해서는 M13 forward primer : 5'-CGCCAGGGTTTCCCAGTCACGAC-3'와 M13 reverse primer : 5'-TTTCACACAGGAAACAGCTATGAC-3'를 사용하였다. 분석된 염기서열은 Genbank database의 자료와 비교·분석하였으며, winstar 및 mega program을 이용하여 유사도 및 계통도를 작성하였다.

16S-23S rRNA interspace 유전자 분석에 의한 분류

감자흑각병원균의 16S-23S rRNA interspace를 분석하기 위해, Nakagawa와 Kwon등에 의한 primer R16-1 : 5'-CTTGACACACCGCCCGTCA-3'와 R23-3R : 5'-GGTACTTAGATGTTTCAGTTC-3'를 사용하여 PCR증폭을 실시하였다. PCR조건으로는 DNA 50ng, dNTP 200uM, *Taq* polymerase 2.5U, 1× Buffer, MgCl₂ 2.5mM, primer 20pM로 처리하여 94°C 1min, 58°C 1min, 72°C 3min으로 35cycle 반복하였다. 증폭된 유전자는 pGEM-T easy vector에 클로닝하여 *E. coli* DH5a strain에 transformation하여 보존하였으며, ALF red autocycle sequencing kit를 이용하여 direct sequencing하였다. Sequencing을 위해서는 M13 forward primer : 5'-CGCCAGGGTTTCCCAGTCACGAC-3'와 M13 reverse primer : 5'-TTTCACACAGGAAACAGCTATGAC-3'를 사용하였다. 분석된 염기서열은 Genbank database의 자료와 비교·분석하였으며, winstar 및 mega program을 이용하여 유사도 및 계통도를 작성하였다.

병원균의 5S rRNA 유전자 분석에 의한 분류

감자흑각병원균의 5S rRNA 유전자 분석에 의한 분류체계를 확립하기 위해, 대장균 (*E.coli*)의 5S rRNA sequence를 기본으로 하여 primer를 제작하였다. Forward primer는 대장균 (K-12) 5'-TGTCTGGCGGCAGTAGC-3'에 일치하는 5'-TGTCTGGCGGCAGTAGC-3'를 사용하였고, Reverse primer로는 대장균 (k-12) 5'-AGGGAAGTGCATGCAT-3'에 일치하는 5'-ATGCATGGCAGTTCCCT-3'를 사용하였다. 5S rRNA 유전자부분을 증폭하기 위한 PCR조건은 DNA 50ng, dNTP 200uM, *Taq* polymerase 2.5U, 1×Buffer, MgCl₂ 2.5mM, primer 20pM을 처리하여 94°C 1min, 58°C 1min, 72°C 2min으로 35cycle 반복하였다. 증폭된 유전자는 pGEM-T easy vector에 클로닝하여 *E. coli* DH5α strain에 transformation하여 보존하였으며, ALF red autocycle sequencing kit를 이용하여 direct sequencing하였다. Sequencing을 위해 사용된 universal primer로는 M13 forward primer: 5'-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3'와 M13 reverse primer : 5'-TTTCACACAGGAAACAGCTATGAC-3'를 사용하였다. 분석된 염기서열은 Genbank database의 자료와 비교 분석하였으며, winstar 및 mega program을 이용하여 유사도 및 계통도를 작성하였다.

DNA-DNA hybridization 분석에 의한 분류

감자흑각병원균의 DNA 100μl (1ng/μl)에 TE buffer 100μl, 10M NaOH 4μl, 20×SSC 35μl를 첨가하여 80°C에서 10분간 끓여 DNA의 변성을 유도하였으며, 얼음에서 변성된 DNA를 고정시켰다. 그 후 1M Tris-HCl (pH 7.5) 40μl를 첨가하여 반응을 멈추고 이를 Hybond-N+ membranes에 slot-blot을 이용하여 부착시켰다. DNA가 부착된 membranes을 UV illuminator로 3분간 DNA를 고정시켜, DIG 11-dUTP가 label된 probe와 52°C에서 각각 prehybridization 3시간, hybridization 12시간을 실시하였다. Hybridization buffer로는 50% formamide, 5×SSC, 2% blocking reagent, 0.1% N-lauroylsarcosine, 0.02% SDS를 사용하였다. Hybridization후 2×SSC, 0.1% SDS buffer로 실온에서 5분간 두 번, 0.1×SSC, 0.1% SDS buffer로 65°C에서 15분간 두 번 washing해주어 DIG Luminescent Detection Kit를 이용하여 반응 유무를 조사하였다.

RAPD 분석에 의한 분류

RAPD에 의한 감자흑각병원균의 특성을 분석하고자 random primer로는 OPERON 10mer kit를 이용하였다. 주형 DNA는 병원균으로부터 분리된 50ng의 genomic DNA를 사용하였다. PCR반응은 10mM Tris-HCl(pH8.0), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.01% gelatin, 200uM dNTP, 200ng primer 및 2.5U의 *Taq* polymerase를 넣고 전체 반응용액은 50 μ l가 되게 하였다. PCR 증폭조건은 DNA의 열변성을 위해 94 $^{\circ}$ C에서 3분, 그후 94 $^{\circ}$ C 1분, 58 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 2분으로 총 35cycle을 실시하였으며, 최종 DNA합성은 7분으로 하였다. 증폭된 PCR산물은 TBE 완충액에서 1%의 agarose gel로 전기영동한 후 ethidium bromide용액에 염색하여 UV 램프하에서 DNA 다형을 관찰하였다.

단백질 분석에 의한 분류

배양된 감자흑각병원균을 0.1M Tris-HCl(pH 8.0)에서 현탁한 후, OD_{600nm}=1.0으로 맞추어 초음파 분해를 2번 반복(185W, 60초)하였다. 파괴된 현탁액을 1 \times Laemmli sample buffer [0.5M Tris-HCl(pH 6.8), 0.0625% glycerol, 10%; 10% SDS, 2%; 2-mercaptoethanol, 5%; 0.5% bromophenol blue, 0.01%; steriled distilled water, 50%]와 4:1의 비율로 혼합하여 끓는 물에서 5분간 처리하고, 원심 분리(15,000 RPM, 5분)하여 완전히 파괴되지 않은 세포 성분을 제거하여 상층액만을 -20 $^{\circ}$ C에 보관하며 실험에 사용하였다. SDS-PAGE는 Laemmli's discontinuous buffer system으로 vertical slab gel(7.5% separating gel)에서 수행하였으며, 각 샘플을 20 μ l씩 sample well로 주입하여 30mA에서 전기영동을 실시하였다. 전기영동 후, 4 $^{\circ}$ C에서 SDS-PAGE gel상에 나타난 total 단백질을 cellulose membrane에 부착시켜, 3% skim milk를 포함하는 PBS 용액에서 20분간 blocking시킨 후, primary antibody와 2시간 동안 반응시켰다. 부착된 membrane을 0.05% Tween 20을 포함하는 PBS로 3회 씻어 준 후, secondary antibody(Anti-Rabbit IgG Alkaline Phosphatase Conjugate, SIGMA, Product No. A-3687)와 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 Membrane를 substrate solution(SIGMA FASTTM BCIP/NBT Buffered Substrate Tablet, Product No. B-5655)에 담그고 선명한 밴드가 형성될 때까지 반응시켜 감자흑각병원균의 단백질 양상을 분석하였다.

Biolog program에 의한 분류

감자흑각병원균을 BUGM배지에 24-48시간 배양한 후, 0.85%의 saline solution에 O.D. 0.08-0.17 cells/ml로 현탁하여 95가지의 서로 다른 탄소원들이 채워져 있는 microplate에 치상하였다. 이 후 각각 4, 24시간 후에 관찰결과를 Biolog Program에 입력하여 병원세균의 동정자료로 이용하였다.

3) 조기진단기술을 이용한 무병종서 생산

염색체 특이 유전자를 이용한 진단기술개발

감자흑각병원균의 특성을 분석하기 위해 특이 유전자 중, 흑각증상을 유도하는 대표적 유전자로 알려진 pectate lyase(*pel*) 유전자를 PCR 방법으로 증폭하였다. 증폭 primer로는 프랑스의 Yves Bertheau등이 제안한 5' - T T A C C G G A C G C C G A G C T G T G G C G T - 3' 과 5'-CAGGAAGATGTCGTTATCGCGAGT-3'를 이용하였으며 PCR 조건으로는 94°C 1분, 65°C 1분, 72°C 1분 30초의 조건으로 25회 반복 수행하였다. 이렇게 얻어진 *pel* 유전자를 각각 *Sau3A* I, *Hae* II, *Alu* I, *Hap* II 제한효소로 절단하여 pectate lyase 유전자의 양상을 분석하였다.

RAPD specific 유전자와 ITS specific DNA를 이용한 진단기술개발

RAPD specific 유전자를 알아보기 위하여 Random primer로 OPERON 10mer kit를 이용하였다. 주형 DNA는 병원균으로부터 분리된 50ng의 genomic DNA를 사용하였고, PCR반응은 10mM Tris-HCl(pH8.0), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.01% gelatin, 200uM dNTP, 200ng primer 및 2.5U의 *Taq* polymerase를 넣어 전체 반응용액은 50 μ l가 되게 하였다. PCR 증폭조건은 DNA의 열변성을 위해 94°C에서 3분, 그후 94°C 1분, 58°C 1분, 72°C 2분으로 총 35cycle을 실시하였으며, 최종 DNA합성은 7분으로 하였다. 이렇게 얻어진 다형화된 밴드내에서 specific 유전자를 찾아 그의 염기서열을 분석하였다.

또한, 감자흑각병원균의 ITS 지역을 분석한 결과, tRNA^{Glu}와 tRNA^{Ile}지역을 포함하는 두 개의 지역이 있는 것으로 나타나 이들 ITS 지역으로부터 감자흑각병원균을 특이적으로 선별할 수 있는 진단용 primer를 개발하기 위해 이 두 지역의 염기서열을 비교·분석한 후 higher variable지역에서 총 3개의 specific primer를 선별하여 유전자를 증폭하였다. Primer로는 tRNA^{Glu}지역에서는 FoSm1 (5'-TAAAGATGTGTGTTAA-3')과 ReSm1 (5'-AACTCGCCCTAAGGC-3'), tRNA^{Ile}지역에서는 FoLa1 (5'-TAAAAAAGACTTCAGAGC-3')과 ReLa1 (5'-CCCGAAGG CAGTCATGCA-3'), 그리고 FoLa2 (5'-TAAAGATGTCTGTGTTAA-3')와 ReLa2 (5'-TTG ATTCATCATCGC-3')등

세 개의 Primer를 제작하여 국내 감자흑각병원균과 국외 감자흑각병원균 그리고 *Erwinia* soft-rot 그룹의 균주들을 증폭하였다.

3. 결과 및 고찰

1) 감자흑각병원균의 특성분석.

병원균의 분리 및 병원성 검정

괴경에 발생한 흑각병징은 그림1과 같다. 병원균의 분포는 괴경의 경우, 감자둘레에 형성되는 흑각증상지역과 건전지역의 경계부위에서 가장 빈도가 높았으며, 줄기에서는 수침상이 형성된 가지에서 가장 많은 병원균이 존재하는 것으로 조사되었다. 또한 부생균에 비해 빈도가 적은 병원균의 enrichment를 위함과 동시에 조기병원성검정을 확인하기 위해서, 감자흑각병원균이 pectinase 효소를 분비한다는 점에 착안하여 감자절편에 이병체 마쇄액을 직접 접종하는 방법을 택하였다 (그림2).



Fig. 1. Disease caused by *E. carotovora* subsp. *atroseptica* in potato tubers and potato plant.



Fig. 2. Pathogenicity test for *E. carotovora* subsp. *atroseptica* in the slice of potato tubers.

그 결과, 감자절편에서 감자흑각병원균으로 예상되는 soft-rot 병원세균을 쉽게 분리할 수 있었으며, 또한 분리된 균들의 병원성을 조기에 확인할 수 있었다. 따라서 enrichment를 이용한 본 방법은 병원세균의 분리 및 병원성검정을 조기에 해결할 수 있는 효율적인 방법으로 사료된다. 본 연구에서는 이 방법에 의해 효과적으로 국내감자흑각병원균 4균주를 분리하였으며, 그밖에 type strain 및 일본, 스웨덴에서 분리된 감자흑각병원균을 대조균주로 이용하였다 (표 1).

Table 1. List of strains of *E. carotovora* subsp. *atroseptica* used in this study.

No.	Locality	Strain
1	Korea	Hong-potato
2	Sweden	LMG6693
3	Korea	Pyung-chang
4	Korea	Hong-chon3
5	Japan	301629
6	Korea	Je-ju
7	Japan	301630
8	U.K	ATCC33260

병원균의 생화학적 특성분석

먼저 병원균의 형태를 분석하기 위하여 TEM (Transfer Electric Microscope)을 이용하여 외부형태를 관찰하였다. 관찰 결과 분리된 감자흑각병원

균들은 전형적인 주생모의 간균형태로 감자흑각병원균의 외부형태와 일치하였다 (그림 3). 또한 병원균의 생리·생화학적 특성조사는 Schaad의 지침서와 Bergey's manual에 준해 실시하였다 (표 2). 그 결과 모든 병원균들이 감자흑각병원균의 특성과 일치하였으며, 특히 감자흑각병원균과 무름병원균이 구분되는 36-37°C 성장유무 실험에서 성장하지 못하여 감자흑각병원균으로 동정되었다. 그러나 탄소원 중 methyl- α -D-glucoside와 palatinose 이용도에서는 감자흑각병원균의 전형적인 특성과 일치하지 않는 균주들도 있었다. 따라서 본 병원균의 형태적·생화학적 특성은 soft-rot 그룹 세균들의 일반적인 특성과 대부분 일치하며, 감자흑각병원균만을 특이적으로 구분할 수는 없는 것으로 나타났다. 그러나 모든 국내·외 감자흑각병원균이 36-37°C에서 성장하지 못하는 점을 고려할 때, 저온에서 성장이 양호한 저온성 (psychrophiles)균주로 진화된 것으로 사료된다. 특히 국내 균주와 국외 균주와의 표현형적인 특성이 다르게 나타났는데, 이는 지역차에 따른 생태균의 차이에 의해 다르게 진화된 것으로 사료된다.



Fig. 3. Electron micrograph of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*.

Table 2. Physiological and biochemical characteristics of domestic strains in comparison to *E. carotovora* subsp. *atroseptica* and *E. carotovora* subsp. *carotovora*.

	<i>E.</i> <i>carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i> ^a	<i>E.</i> <i>carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	Hong- potato	Pyung- LMG6693	Hong- chang chon3	Hong- 301629	Je- ju	301630	ATCC33260 ^T
Pectate degradation	+ ^b	+	+	+	+	v	+	+	+
Potato soft rot	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatin liquefaction	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acetoin production	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sensitivity to erythromycin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Phosphatase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gas from glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lesithinase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pigment production	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reducing substances from sucrose	V	-	-	V	-	-	-	-	-
Growth at 36-37°C	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Acid production from:									
D-lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
trehalose	+	+	+	V	V	V	+	+	V
maltose	V	-	-	-	V	-	-	-	V
methyl α-d glucoside	+	-	-	+	+	-	+	-	V
melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
palatinose	-	+	-	-	-	-	+	-	+
Utilization of:									
malonate	-	-	-	-	-	+	-	-	-
galacturonate	+	+	+	+	+	+	+	+	+

^aDetails of *Eca* and *Ecc* described by Schaad' s method in laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria (page:56-72)

^b + : positive reaction, - : negative reaction, v : variable.

병원균의 지방산 분석

병원균의 지방산 분석에서 사용된 균주는 국내에서 분리·동정되어진 4균주 중 대표균주로 선발된 홍천감자와 홍천3 균주를 이용하였으며, 대조균주로 *E. carotovora* subsp. *atroseptica* (ATCC33260^T), *E. carotovora* subsp. *carotovora* (ATCC15713^T), *E. carotovora* subsp. *betavescolorum* (ATCC43762^T), *E. carotovora* subsp. *wasabiae* (ATCC43316^T), *E. chrysanthemi* (ATCC11663^T) 및 지상병원균인 *E. amylovora* (ATCC15580^T)의 type strain을 비교 분석하였다(표 3). 그 결과 국내 분리균주인 홍천감자와 홍천3 및 *E. carotovora* subsp. *atroseptica*의 type strain은 15:0 anteiso의 feature2, feature3, 16:0, 18:1 w7c의 지방산 함유율이 가장 높게 나타나, 다른 soft-rot그룹과 종류 및 함유율에 있어서 동일한 양상을 나타내었다. 따라서 지방산 분석에 의해 감자흑각병원균과 지하부병을 주로 야기시키는 soft-rot그룹을 구분할 수는 없는 것으로 사료되며, 또한 지방산 조성에 따른 *E. carotovora* 그룹내의 특성은 모두 동일한 것으로 나타났다. 그러나 지상부 병원균인 *E. amylovora*에서 가장 많은 조성으로 나타난 18:1 w9c, 18:0, TBSA 10 Me 18:0, 19:0, 20:0의 지방산은 포함하고 있지 않거나, 매우 낮은 함량으로 나타나 지상부병과는 확실하게 구분할 수가 있었다. 즉 이는 지방산 분석에 의해 아종 (subsp.)이하의 단위를 구분하기는 적절하지 못한 방법으로 나타난 반면, 중간에 있어서는 효율적으로 그 특성에 따라 구분할 수 있다고 사료된다.

Table 3. Fatty acids analysis of Korean strains and their comparison with *Erwinia* soft-rot group.

Fatty acid	% of total fatty acids in:							
	Hong- potato	Hong- chon3	ATCC 33260 ^a	ATCC 15713	ATCC 43316	ATCC 43762	ATCC 11663	ATCC 15580
10:0	0.13	0.17	-	-	-	0.32	0.28	-
12:0	8.40	12.08	6.52	5.42	3.77	17.57	0.36	4.99
13:0 anteiso	-	-	-	0.24	-	0.51	-	-
12:0 3OH	-	-	-	-	-	1.27	0.37	-
14:0	2.17	2.96	2.61	2.59	-	4.27	7.06	6.85
15:0 anteiso	0.28	0.17	0.31	0.39	0.33	0.97	-	-
sum in feature 2	7.88	12.34	7.28	6.96	7.57	22.88	12.03	6.66
sum in feature 3	32.49	32.74	40.08	29.00	31.13	31.65	25.95	17.41
16:1 w5c	0.23	0.21	0.40	-	-	-	-	-
16:0	33.15	28.98	32.56	42.20	21.08	18.11	32.01	39.28
16:0	0.26	-	-	-	-	-	-	-
16:0 3OH	0.45	0.23	0.37	0.40	-	1.11	-	-
17:0 anteiso	-	0.30	2.00	-	0.26	-	4.74	3.08
17:0 cyclo	0.22	0.16	-	-	-	-	-	6.24
18:1 w9c	12.24	7.91	6.96	11.47	32.77	-	10.78	5.72
18:1 w7c	0.95	1.05	0.21	0.85	1.30	-	0.59	2.33
18:0	-	-	-	-	-	-	-	2.01
TBSA 10 Me 18:0	0.43	0.35	-	-	-	-	-	-
11 methyl 18:1 w7c	-	-	-	-	-	-	4.83	-
19:0 cyclo w8c	-	-	-	-	-	-	-	-
19:0 10 methyl	-	-	-	-	-	-	-	1.23
19:0	-	-	-	-	0.26	-	0.15	-
20:1 w7c	-	-	-	-	-	-	-	0.32
20:0	-	-	-	-	-	-	-	-

^aType strain of *E. carotovora* subsp. *atroseptica* (ATCC33260), *E. carotovora* subsp. *carotovora* (ATCC15713), *E. carotovora* subsp. *betavescolorum* (ATCC43762), *E. carotovora* subsp. *wasabiae* (ATCC43316), *E. chrysanthemi* (ATCC11663) and *E. amylovora* (ATCC15580).

병원균의 기주범위 조사

분리되어진 감자흑각병원균 및 대조균주의 기주범위를 조사한 결과, 감자, 배추, 무, 당근, 양파, 치커리 모두에서 24시간 배양 후 조직이 물러지고 썩는 강한 병원성을 확인할 수 있었다 (표 4). 특히 국내에서 분리한 감자흑각병원균과 외국에서 분리한 감자흑각병원균간에 기주 차이는 없는 것으로 나타났으며, 모든 감자흑각병원균이 광범위한 기주 범위(broad host range)를 갖는 것으로 나타났다.

Table 4. Host range assay of *E. carotovora* subsp. *atroseptica*.

기주 병원균	감자	배추	무	당근	양파	치커리
Hong-potato(Korea)	+++	+++	+++	+++	+++	+++
LMG6693(Sweden)	+++	+++	++	+++	+++	++
Pyung-chang(Korea)	+++	+++	++	++	+++	++
Hon-chon3(Korea)	+++	+++	+++	+++	+++	+++
301629(Japan)	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Je-ju(Korea)	+++	+++	+++	+++	+++	+++
301630(Japan)	+++	+++	+++	+++	+++	+++
ATCC33260 ^T (U.K)	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Control	-	-	-	-	-	-

+++ : > 90% pathogenicity, ++ : > 70% pathogenicity, - : Non-pathogenicity.

2) 감자흑각병원균의 분류체계확립

병원균의 16S rRNA 유전자 분석

감자흑각병원균의 16S rRNA 유전자를 분석하기 위해, 국내 분리균 중 홍천3, 제주 균주를 선발하였으며, 일본 균주 301629, 국외 감자흑각병원균 ATCC33260^T 및 LMG6693을 사용하였으며, 기타 다른 soft-rot 그룹의 염기서열은 GenBank로부터 이용하여 대조구로 사용하였다. 16S rRNA 유전자를 증폭하기 위한 universal primer인 fD1과 rP2는 병원균의 16S rRNA 유전자를 효율적으로 증폭하였으며 (그림 4), 증폭된 16S rRNA 유전자는 pGEM-T easy vector에 클로닝한 후, *EcoR* I 으로 digestion하여 insert DNA를 확인하였다 (그림 5). 그러나 대부분의 Gram negative 세균의 16S rRNA 유전자는 중앙내부에 *EcoR* I 인식사이트가 있으므로 약 0.8kb와 0.7kb의 두 밴드가 나타났다. 클로닝된 16S rRNA 유전자의 염기서열을 분석한 결과, 이들은 약 1,470bp의 길이였으며, 유사도 및 cluster method에 의해 계통도를 작성하였다 (그림 6). 그 결과 국내 감자흑각병원균 중 홍천3과 일본흑각병원균은 (301629) 매우 높은 유사도 (99.2%)를 나타내었으며, 유럽균주 (LMG6693, ATCC33260^T)간 또한 매우 높은 유사도 (99.9%)를 나타내었다. 그러나 국내 및 일본균주와 유럽균주간에는 최고 98.7% 이하의 유사도로 지역간 차이가 있는 것으로 나타났다. 즉 이는 환경적인 격리, 즉 지역적인 차이에 의해서 원인 되어지는 것으로 사료된다. 국내 분리균 중 제주균주는 *E. carotovora* subsp. *wasabiae*와 99.1% 유사도로 가장 높게 나타났다.

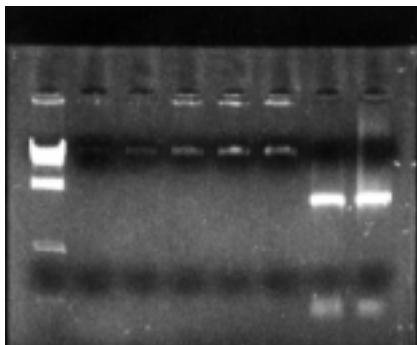


Fig. 4. PCR amplification of 16S rRNA(1.5kb) gene

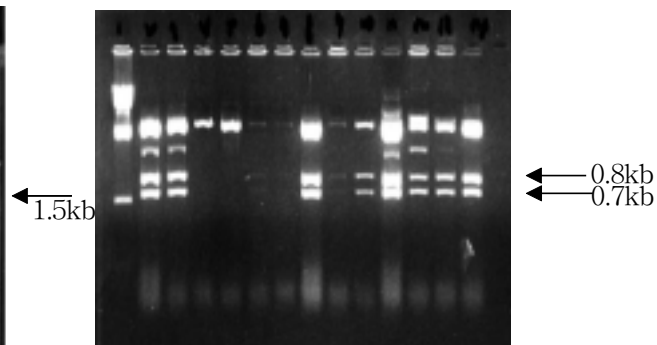


Fig. 5. Insert DNA confirmation.

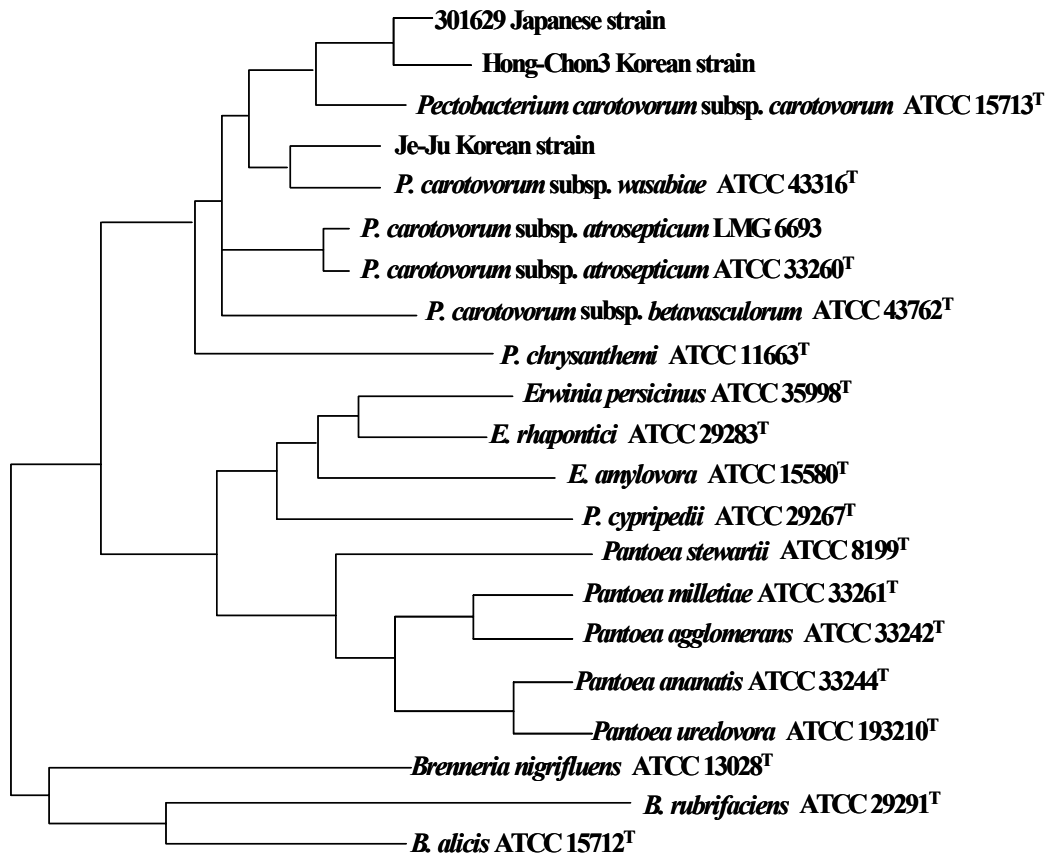


Fig. 6. Phylogenetic tree of *E. carotovora* subsp. *atroseptica* and related bacteria based on 16S rRNA gene sequences obtained by the neighbor-joining method.

16S-23S rRNA interspace (ITS) 유전자 분석에 의한 분류

감자흑각병원균의 ITS 지역을 분석하기 위해, 16S rRNA 유전자와 동일한 홍천3, 제주균주와 일본균주 301629, 국외 균주 ATCC33260^T 및 LMG6693을 사용하였다. PCR 증폭된 모든 감자흑각병원균(그림 7)은 두 종류 즉, small과 large의 두 단편으로 구분할 수 있었다. small 단편은 tRNA^{Glu}를 코딩하고 있었으며(그림 8), large 단편은 tRNA^{Ile}와 tRNA^{Ala} 유전자를 코딩하고 있는 것으로 나타났다(그림 9). 이 두 유전자를 이용한 감자흑각병원균의 계통학적 분류를 위해서는 같은 soft-rot 그룹에 속하는 균주들의 16S-23S rRNA 유전자를 분석하여 winstar 및 mega program을 이용하여 비교하였다. 그 결과 아래의 계통도를 얻

을 수 있었으며 (그림 8, 9), small 단편 분석결과, 홍천3과 일본 흑각병원균은 (301629) 매우 높은 유사도 (97.3%)를 나타내었으며, 유럽균주간에서는 또한 매우 높은 유사도 (96.9%)를 나타내어 16S rRNA 유전자 분석 결과와 동일한 결과를 나타내었다. 반면, 제주균주는 국외 감자흑각병원균인 ATCC33260^T균주와 92.8%의 가장 높은 유사도를 나타내었다. 결론적으로 국내 감자흑각병원균의 16S rRNA-23S rRNA interspace 지역의 small 단편 분석결과, 국내균주는 일본균주 및 유럽균주와 높은 유사도를 나타내는 두 그룹으로 분리되었다. 이는 표현형과 생리·생화학적 특성 중 단지 저온성에만 의존하여 감자흑각병원균을 분리하는 것에는 한계가 있다는 것을 시사한다.

또한 large 단편 분석결과, 위 결과와 마찬가지로 홍천3과 일본 흑각병원균은 (301629) 매우 높은 유사도 (98.2%)를 나타내었으며, 이 두 균주는 무름병원균인 *E. carotovora* subsp. *carotovora*와 모두 높은 유사도를 나타내었다. 제주균주는 *E. carotovora* subsp. *betavescolorum*과 90.4%의 유사도로 가장 유사하게 나타났다. 반면, 유러균주간에는 100%의 유사도로 나타났다.

16S-23S rRNA interspace (ITS) 지역 내 small 단편과 large 단편의 염기서열을 분석한 결과를 종합해보면, 국내 감자흑각병원균은 soft-rot 그룹내의 감자흑각병원균 (*E. carotovora* subsp. *atroseptica*), 무름병원균 (*E. carotovora* subsp. *carotovora*), 비트무름병원균 (*E. carotovora* subsp. *betabescolorum*)과 유사하게 나타났다. 즉 이는 국내 감자흑각병원균이 유전적으로 매우 heterogeneous한 그룹임을 시사한다.

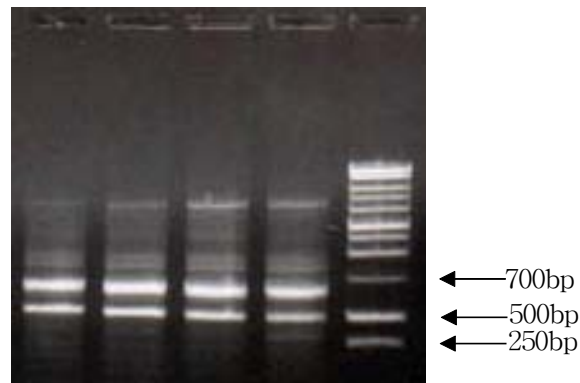


Fig. 7. PCR amplification of 16S-23S rRNA interspace (ITS) region.

① glutamic acid (small)

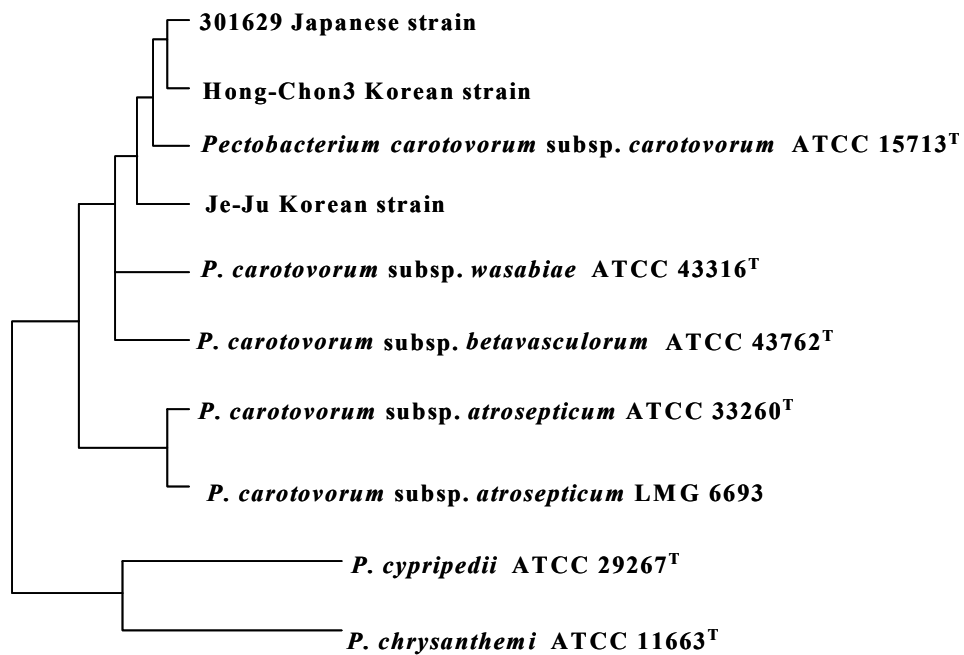


Fig. 8. Phylogenetic tree of *E. carotovora* subsp. *atroseptica* and related bacteria based on 16S-23S intergenic transcribed spacer (ITS) region involving tRNA-Glu coding obtained by the neighbor-joining method.

② isoleucine (large)

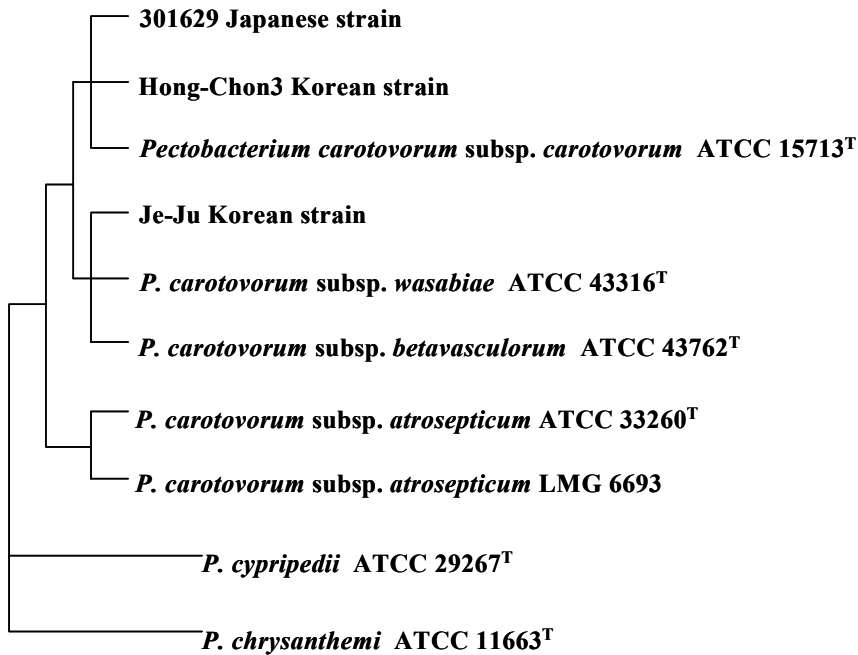


Fig. 9. Phylogenetic tree of *E. carotovora* subsp. *atroseptica* and related bacteria based on 16S-23S intergenic transcribed spacer (ITS) region involving tRNA-Ala and tRNA-Ile coding obtained by the neighbor-joining method.

병원균의 5S rRNA 유전자 분석

5S rRNA 유전자를 증폭하기 위하여 자체 제작한 primer로 홍천3, 홍천감자, 301630 및 유럽균주 (ATCC33260^T, LMG2375)의 5S rRNA 유전자를 효율적으로 증폭하였다 (그림 10). Primer로부터 증폭된 5S rRNA 유전자를 pGEM-T easy vector에 클로닝 하였다. 클로닝의 여부는 *EcoR* I 으로 digesiton하여 1kb DNA ladder Marker를 사용하여 250bp보다 작은 DNA 밴드로 확인하였다(그림 11). 클로닝된 5S rRNA 유전자의 염기서열을 분석한 결과, 이들은 모두 120bp의 크기였으며, 유사도 및 cluster method에 의해 계통도를 작성하였다 (그림 12). 그 결과 국·내외 감자혹각병원균의 염기서열은 모두 동일한 결과를 나타내었으며, *E. coli*와의 염기서열은 99.2%로 아주 높은 유사도를 보였다. 이는 Enterobacteriacee그룹내 5S rRNA 유전자가 모두 동일한 형태로 잘 보존되어 있

는 것으로 사료된다. 따라서 5S rRNA 유전자 염기서열 분석으로는 감자흑각병원균 및 다른 soft-rot그룹내의 병원균을 구분할 수 없는 것으로 판단된다.

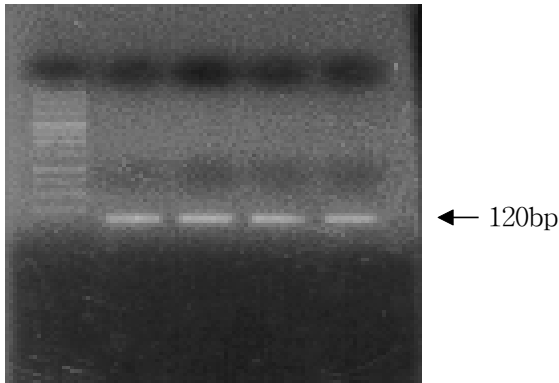


Fig. 10. PCR amplification of 5S rRNA gene(120bp).

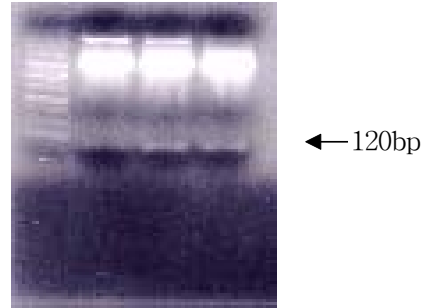


Fig. 11. Insert DNA confirmation.

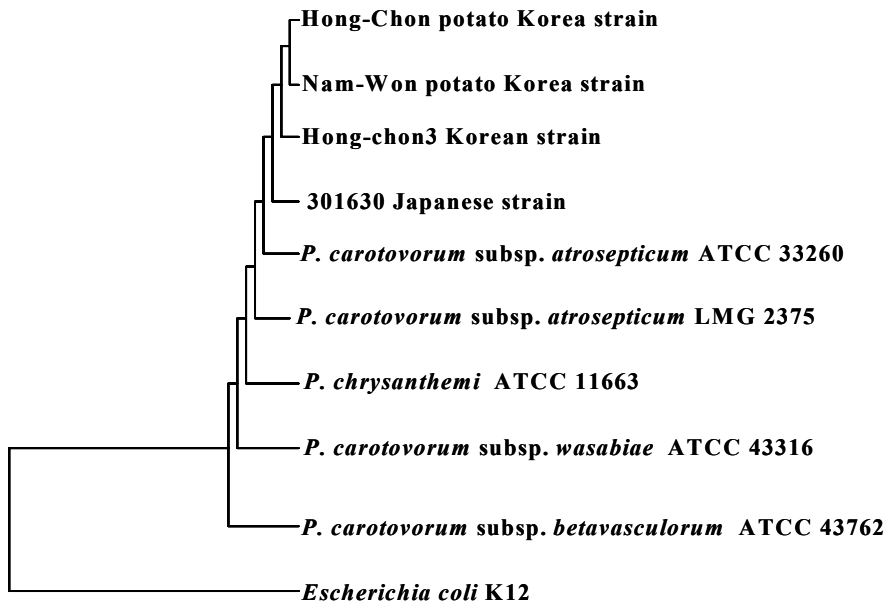


Fig. 12. Phylogenetic tree of *E. carotovora* subsp. *atroseptica* and related bacteria based on 5S rRNA gene sequences obtained by the neighbor-joining method.

DNA-DNA hybridization 분석에 의한 분류

감자흑각병원균의 total DNA을 분리하여 DIG 11-dUTP로 반응시키는 paper-method 방법으로 국내, 일본 및 유럽지역의 감자흑각병원균의 total genome 유사도를 조사하였다. 그 결과, 감자흑각병원균 및 다른 soft-rot 그룹내의 병원균들은 80-100%의 DNA relatedness를 나타내어 동일한 그룹으로 나타났다. 그러나 지상부 병원균인 *E. amylovora*와는 40%이하의 DNA relatedness로 전혀 다른 세균임을 알 수 있었다 (표 5). 즉 같은 종인 *carotovora*이며, soft-rot 그룹에 속하면서 아종 (subsp.)에 따라서만 분리된 본 그룹은 매우 높은 동질성을 가지고 있으며, 국내 및 일본과 유럽 및 미국지역의 분리균간에는 다른 성질이 존재하는 것으로 사료된다.

Table 5. DNA relatedness of *E. carotovora subsp atroseptica*. Unit: %

	Hong-potato	Hong-chon3	ATCC 33260 ^T	ATCC 15713 ^T	ATCC 43762 ^T	ATCC 15580 ^T
Hong-potato	100	98	81	82	90	17
LMG6693	84	83	95	83	88	15
Pyung-chang	88	92	83	90	92	23
Hong-chon3	91	100	83	92	90	34
301629	93	92	87	88	88	19
Je-ju	96	88	85	88	87	9
301630	95	90	87	90	94	23
ATCC33260 ^T	83	82	100	82	85	28

RAPD 분석에 의한 분류

RAPD 분석을 위해, 감자흑각병원균인 홍천3, 홍천감자, 제주, 301629, 301630, ATCC33260^T, LMG6693 및 대조균주로 무름병원균인 남원, 대관령, ATCC15713^T 그리고 ATCC43762^T, ATCC11663^T, ATCC43316^T 균주를 사용하였다. 증폭 random primer로는 OPERON 10-Mer를 사용하였으며, 그중 B-05, 06, 07, 08, 10, 11, 12, 14의 총 8개의 primer로부터 다형화 밴드양상을 얻을 수 있었다. 이를 바탕으로 NTSYS program을 이용하여 유연관계를 분석하였다 (그림 13). 그 결과 유럽균주는 같은 그룹으로 grouping되었으며, 국내 및 일본 감자흑각병원균은 매우 heterogeneous하게 나타났다. 이는 국내 감자흑각병원균의 경우,

유전적으로도 다양성을 가진다는 것을 간접 시사하며, 진화적으로 모든 *carotovora* 그룹의 병원세균들은 동일한 조상에서 출발하여 환경 및 생태적 조건에 맞추어 진화되었음을 알 수 있다.

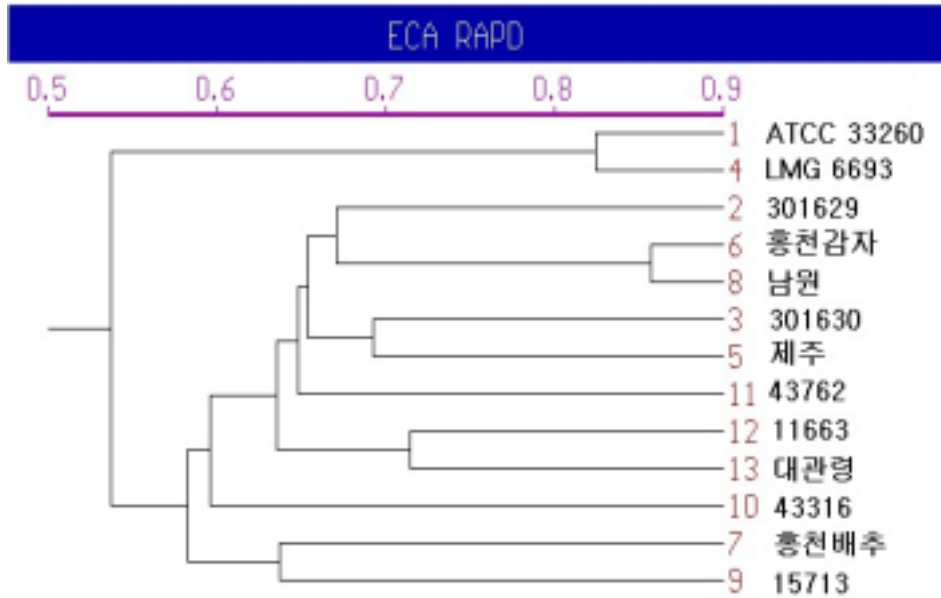


Fig. 13. Phylogenetic tree of *E. carotovora* subsp. *atroseptica* and related bacteria based on RAPD by NTSYS program.

단백질 분석에 의한 분류

감자흑각병원균의 단백질을 추출하기 위해서, 대수증가기까지 배양한 흑각병원균을 0.01M phosphate-buffer(pH7.4)에 두 번 씻어준 후, 동일 buffer에서 2분간 sonication하여 total 단백질을 회수하였다 (그림 14). Total 단백질의 양상을 이용하여 soft-rot 그룹내의 유연관계를 분석하기 위해, 무름병원균을 항원으로 하여 생성된 polyclonal antibody를 이용한 western blot을 실시하였다 (그림 15). Western blot을 통하여 나타난 밴드의 양상을 이용하여 감자흑각병원균 및 대조균주의 유연관계를 알아보려고 NTSYS program을 이용하여 계통도를 작성하였다 (그림 16). 그 결과, 홍천3 균주는 일본균주 301629와 유사하게 나타나 16S rRNA 유전자와 ITS지역 분석결과와 일치하였다. 그리고 홍천감자, 제주균주는 유럽균주 (LMG6693)와 동일한 그룹으로 나타난 반면, 또 다른 유럽균주

(LMG2375)와는 전혀 다른 그룹이었다. 따라서 유럽내의 균주간에도 표현형적 및 유전적으로 다양한 균주가 존재할 수 있음을 나타내었다. 전체적으로 국내·외 감자흑각병원균은 *E. carotovora* subsp. *wasabiae* 및 *E. carotovora* subsp. *carotovora*와 유사한 그룹으로 나타난 반면, *E. carotovora* subsp. *betavescolorum* 및 *E. chrysanthemi*와는 다른 그룹으로 나타났다

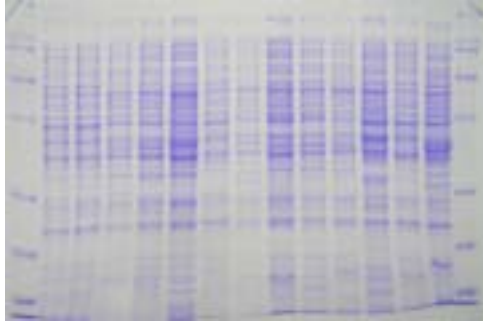


Fig. 14. SDS-PAGE analysis for the band pattern of total protein isolated from different strains of *E. carotovora* subsp. *atroseptica*.

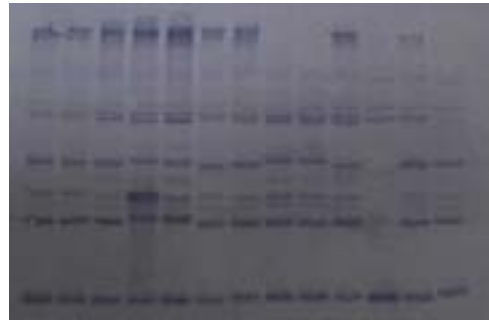


Fig. 15. Western blot analysis for the total protein.

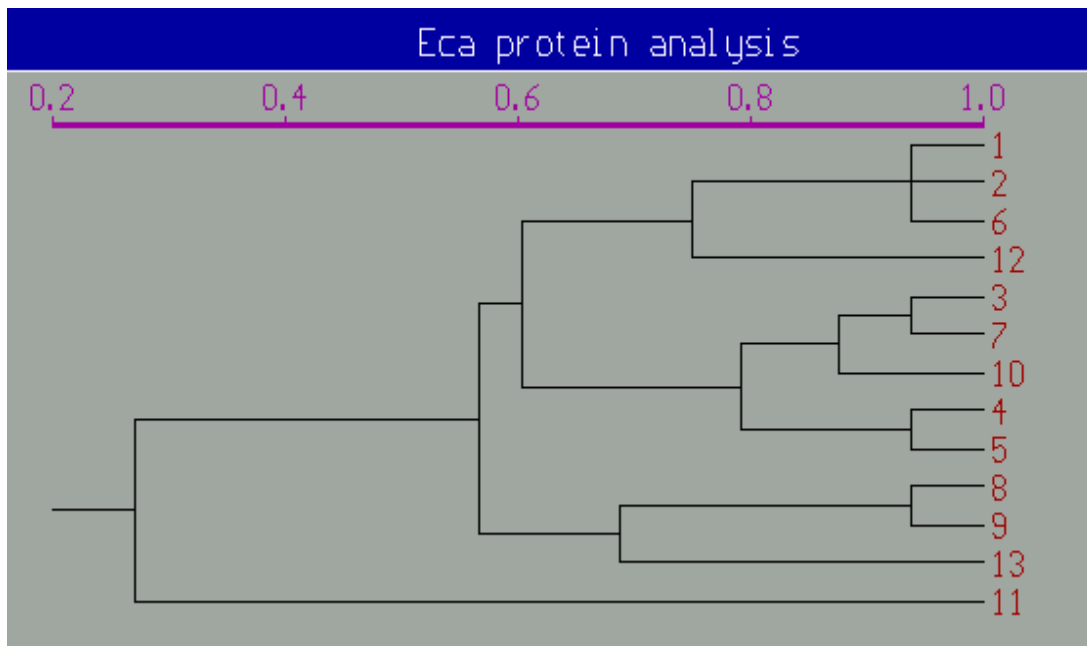


Fig. 16. Phylogenetic tree of *E. carotovora* subsp. *atroseptica* and related bacteria based on protein analysis by NTSYS program. 1 : Hong-potato, 2 : LMG6693, 3 : Pyung-chang, 4 : Hong-chon3, 5 : 301629, 6 : Je-ju, 7 : 301630, 8 : *E. carotovorum* subsp. *atrosepticum*(ATCC33260^T), 9 : LMG2375, 10 : *E. carotovorum* subsp. *carotovorum*(ATCC15713^T), 11 : *E. chrysanthemi*(ATCC11663^T), 12 : *E. carotovorum* subsp. *wasabiae*(ATCC43316^T), 13 : *E. carotovorum* subsp. *betabvescutorum*(ATCC43762^T).

Biolog program에 의한 분류

서로 다른 95가지의 탄소원에 대한 이용도를 조사하고자 Biolog system을 이용하였다. 먼저 BUGM배지에서 28℃, 24시간 배양한 후, saline solution에 현탁도 63%로 현탁하여 biolog GN2 plate에 치상한 후, 24시간 배양하여 반응 결과를 reader로 분석하였으며, 균주간 유연관계를 분석하기 위해 NTSYS program을 이용하여 계통도를 작성하였다 (그림 17). 그 결과, 감자흑각병원균 그룹은 매우 heterogeneous하게 나타났다. 또한 탄소원 및 질소원으로의 각종 아미노산과 당의 이용도를 측정하는 Biolog system의 특성상 감자흑각병원균과 무름병원균의 다른 soft-rot 그룹을 구분하기는 어려운 것으로 조사되었다.

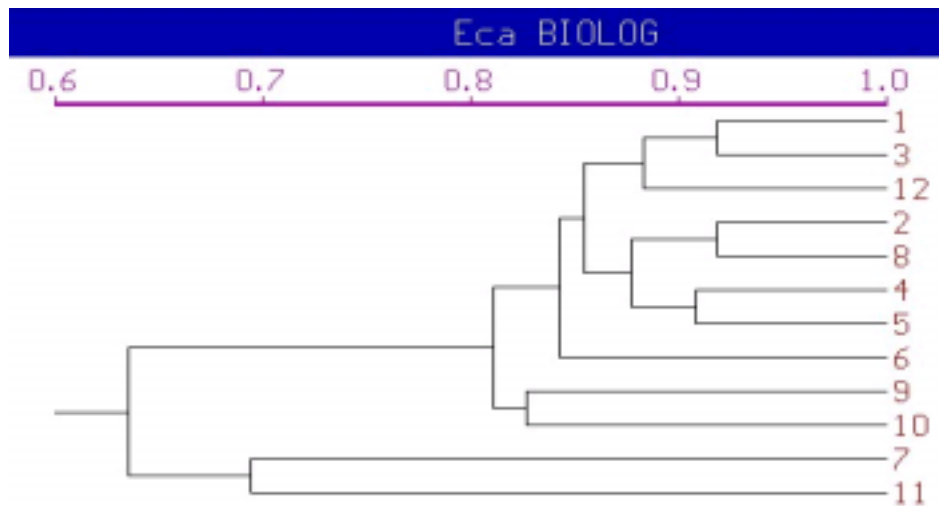


Fig. 17. Phylogenetic tree of *E. carotovora* subsp. *atroseptica* and related bacteria based on biolog system by NTSYS program. 1 : ATCC33260^T (*Eca*) , 2 : 301629 (Jap), 3 : 301630 (Jap), 4 : Je-ju, 5 : Hong-potato, 6 : Hong-chon3, 7 : Pyung-chang 8: ATCC15580^T (*Ecc*), 9 : ATCC43316^T (*E.cw*), 10 : ATCC43762^T (*E.cb*), 11 : ATCC11663^T (*E.chy*), 12 : LMG6693 (Sweden).

생리·생화학적 특성을 이용한 분류

Schaad의 지침서 및 Bergey's manual을 이용한 국내외 감자흑각병원균의 생리·생화학적 특성을 이용하여 유연관계를 분석하고자 NTSYS program을 이용하여 계통도를 작성하였다 (그림 18). 생리·생화학적 특성을 이용한 국내외 감자흑각병원균의 계통도 조사 결과, 감자흑각병원균은 두 그룹으로 구분되었으며, 무름병원균인 *E. carotovora* subsp. *carotovara*와는 구분되었다. 이는 생리·생화학적 특성 중 흑각병원균과 무름병원균이 다른 특성을 나타내는 36-37°C 성장유무, methyl α-d glucoside 및 palatinose의 이용도에 있어서 본 연구에 사용된 분리균들이 잘 일치한 결과로 사료된다.

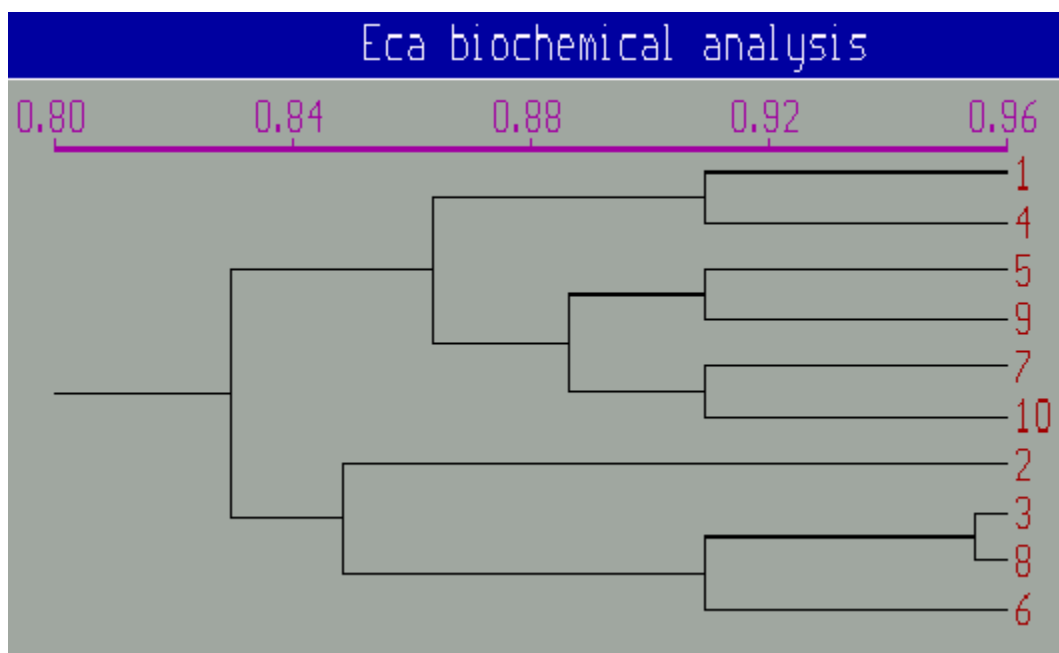


Fig. 18. Phylogenetic tree of *E. carotovora* subsp. *atroseptica* and related bacteria based on physiological and biochemical test by NTSYS program. . 1 : *E. carotovora* subsp. *atroseptica* (Schaad's manual), 2 : *E. carotovora* subsp. *carotovora* (Schaad's manual), 3 : Hong-potato, 4 : LMG6693, 5 : Pyung-chang, 6 : Hong-chon3, 7 : 301629 (Jap), 8 : Je-ju, 9 : 301630 (Jap), 10 : ATCC33260^T (*Eca*).

3) 조기진단기술을 이용한 무병종서 생산

염색체 특이 유전자를 이용한 진단기술개발

감자흑각병원균의 특성을 분석하기 위해 특이 유전자 중, 흑각증상을 유도하는 대표적 유전자로 알려진 pectate lyase (*pel*) 유전자를 PCR 방법으로 증폭하였다. 증폭 primer로는 프랑스의 Yves Bertheau등이 제안한 5' - T T A C C G G A C G C C G A G C T G T G G C G T - 3' 과 5'-CAGGAAGATGTCGTTATCGCGAGT-3'를 이용하였으며 PCR 조건으로는 94℃ 1분, 65℃ 1분, 72℃ 1분 30초의 조건으로 25회 반복 수행하여 증폭된 밴드를 얻을 수 있었다 (그림 17). 그 결과 같은 감자흑각병원균이라도 병원균의 기주에 따라서 pectate lyase 유전자를 인식하는 것이 다른 양상을 보여왔다. 병원균의 기주가 감자인 ATCC 33260^T, LMG6693, 301629, 홍천감자, 제주, 남원감자에서는 pectate lyase 유전자가 증폭되었으나 기주가 감자가 아닌 다른 흑각병원균과 soft-rot 그룹의 병원균에서는 증폭이 되지 않았다. 이는 같은 병원균일지라도 기주에 따라서 heterogeneous한 유전자를 갖고 있는 것으로 사료된다.

또한 이들의 세밀한 분석을 위해 증폭된 밴드를 제한효소로 절단하여 그들의 RFLP 양상을 분석하였다 (그림 19). PCR 방법에 의해 증폭된 pectate lyase 유전자는 strain간의 차이에 의해 증폭된 밴드의 강도가 서로 다르게 나타났다. 그러나 이는 미생물의 환경 적응적인 변화로 이해할 수 있었으며, 보다 더 정확한 분석을 위해 이들 증폭된 밴드를 제한효소로 절단하여 그들의 양상을 관찰하였다.

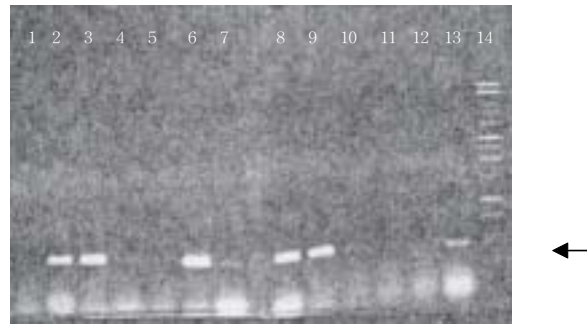


Fig. 19. PCR amplification of pectate lyase gene. Lane 1 : Dae, 2 : ATCC 33260 (U.K), 3 : LMG6693 (Sweden), 4: Hong-chon3, 5 : 301630 (Jap), 6 : Hong-potato, 7 : 301629 (Jap), 8 : Je-ju, 9 : Nam-won, 10 : *E. carotovorum* subsp. *wasabiae* (ATCC43316^T), 11 : *E. chrysanthemi* (ATCC11663^T), 12 : *E. carotovorum* subsp. *betabvescolorum* (ATCC43762^T) , 13 : *E. carotovorum* subsp. *carotovorum* (ATCC15713^T), 14 : Size marker, Arrow : Amplification of pectate lyase gene.

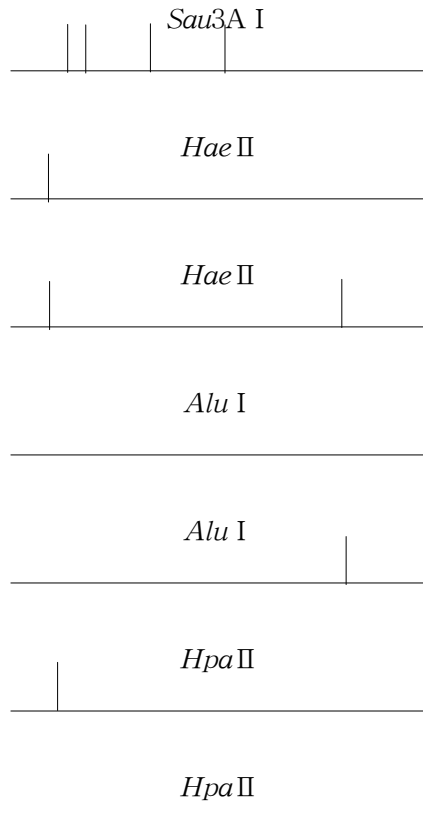


Fig. 20. Analysis of restriction enzyme sites in pectate lyase gene by using *Sau3A I*, *Hae II*, *Alu I*, *Hpa II*.

RAPD 특이 유전자와 ITS specific DNA를 이용한 진단기술개발

감자 흑각병원균들에 대한 RAPD 특이 유전자를 선별하기 위해 OPERON 10-mer kits의 random primer를 이용하여 RAPD를 실시하였다 (그림 21). 그 결과 국내·외 감자흑각병원균의 RAPD 밴드 양상은 매우 heterogeneous하게 나타났으며, 무름병원균 (ATCC15713^T)와 다른 soft-rot 그룹의 병원균과도 매우 heterogeneous한 밴드 양상을 볼 수가 있었다. 이는 국내 감자흑각병원균의 경우, 유전적으로도 다양성을 가진다는 것으로 사료되며, 진화적으로 모든 carotovora 그룹의 병원세균들은 동일한 조상에서 출발하여 환경 및 생태적 조건에 맞추어 진화되었음을 알 수 있다. 따라서 감자흑각병원균만의 RAPD 특이 유전자를 선

발한다는 것은 매우 어려운 일이며, 선발한다 하더라도 *corotovora* 그룹과 구별하기는 힘들다고 사료된다.



Fig. 21. RAPD band pattern of *E. carotovora* subsp. *atroseptica*. Lane 1 : Size marker; 2, 10, 18, 26 : ATCC 33260^T (U.K); 3, 11, 19, 27 : LMG6693 (Sweden); 4, 12, 20, 28 : 301629 (Japan); 5, 13, 21, 29 : 301630 (Japan); 6, 14, 22, 30 : Hong-potato; 7, 15, 23, 31 : Hong-chon3; 8, 16, 24, 32 : Je-ju; 9, 17, 25, 33 : Pyung-chang.

감자흑각병원균의 ITS 지역은 2년차에서 수행된 결과, tRNA^{Glu}와 tRNA^{Ile}+tRNA^{Ala}지역을 포함하는 두 개의 지역이 있는 것으로 나타났고, 이들 ITS 지역으로부터 감자흑각병원균을 특이적으로 선발할 수 있는 진단용 primer를 제작하기 위해 이 두 지역의 염기서열을 비교 분석하였다 (그림 22). 그리고, 이들 ITS 지역 higher variable region에서 primer를 각각 tRNA^{Glu}에서 한 개, tRNA^{Ile}+tRNA^{Ala}에서 2개를 선발·제작하여 국내 및 국외의 감자흑각병원균과 다른 soft-rot 그룹내의 균주들과 비교 분석하였다. 그 결과 국외 감자흑각병원균인 ATCC33260^T, LMG6693만이 특이적으로 반응하였고, 나머지 균주들은 동일한 밴드양상을 나타내었다. 이는 국내 감자흑각병원균과 환경과 생태의 변화에 따른 진화적으로 틀린 유전자를 가지고 있는 두 균주(ATCC33260^T, LMG6693)만이 반응한 것으로 사료된다. 따라서 *corotovora* 그룹간 아종(subsp.)사이의 유전적 차이는 많이 나타나지 않았고, 이 병원세균들은 동일한 조상에서 출발하여 환경 및 생태적 조건에 맞추어 진화되었음을 알 수 있다 (그림 23, 24, 25).

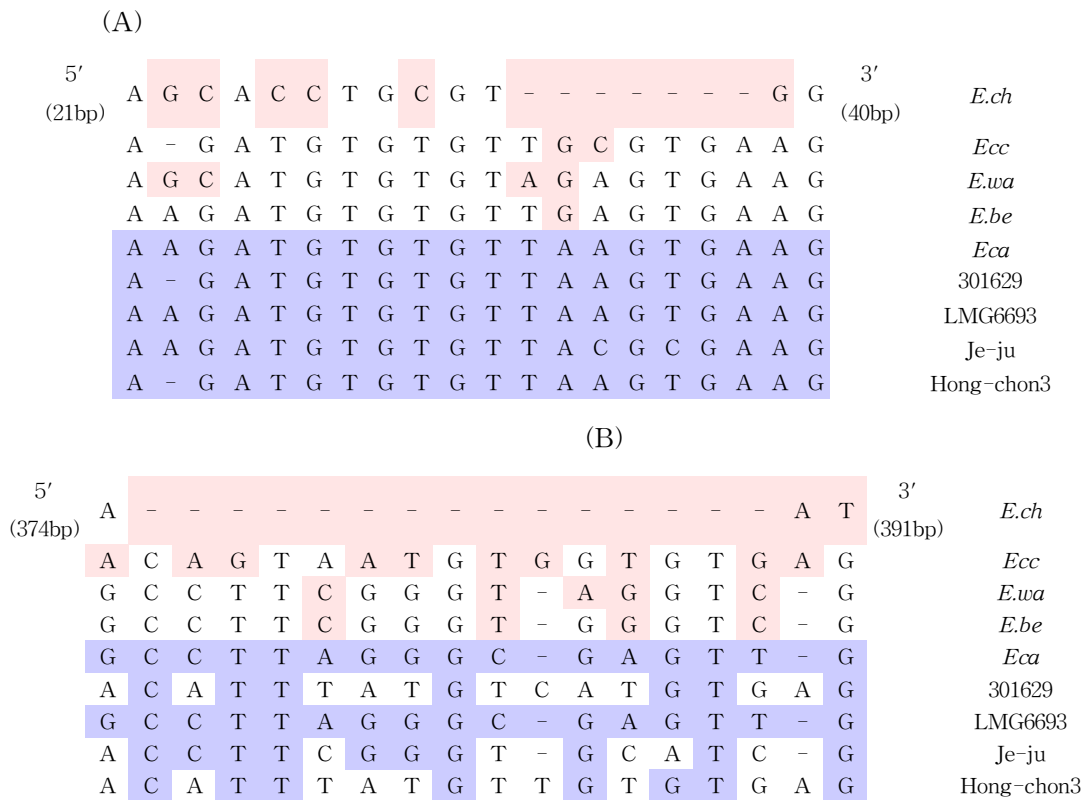


Fig. 22. Alignment of ITS region coding tRNA^{Glu} of Korean strains with Genbank data of *Erwinia* soft-rot group. A : forward region, B : reverse region, *E.ch* : *Erwinia chrysanthemum*, *Ecc* : *E. carotovora* subsp. *carotovora*, *E.wa* : *E. carotovora* subsp. *wasabiae*, *E.be* : *E. carotovora* subsp. *betavescolorum*, *Eca* : *E. carotovora* subsp. *atroseptica*.

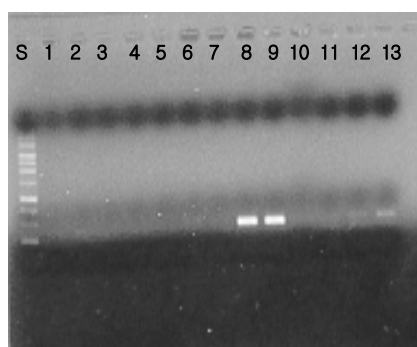


Fig. 23. PCR amplification of ITS tRNA^{glu} region by using specific primer prepared from the *E. carotovora* subsp. *atroseptica*. 1 : Hong-potato, 2 : LMG2375 (U.K) , 3 : Pyung-chang, 4 : Hong-chon3, 5 : 301629 (Jap), 6 : Je-ju, 7 : 301630 (Jap), 8 : *E. carotovorum* subsp *atrosepticum* (ATCC33260^T), 9 : LMG6693 (Sweden), 10 : *E. carotovorum* subsp. *carotovorum* (ATCC15713^T), 11 : *E. chrysanthemi* (ATCC11663^T), 12 : *E. carotovorum* subsp. *wasabiae* (ATCC43316^T), 13 : *E. carotovorum* subsp. *betabvescutorum* (ATCC43762^T).

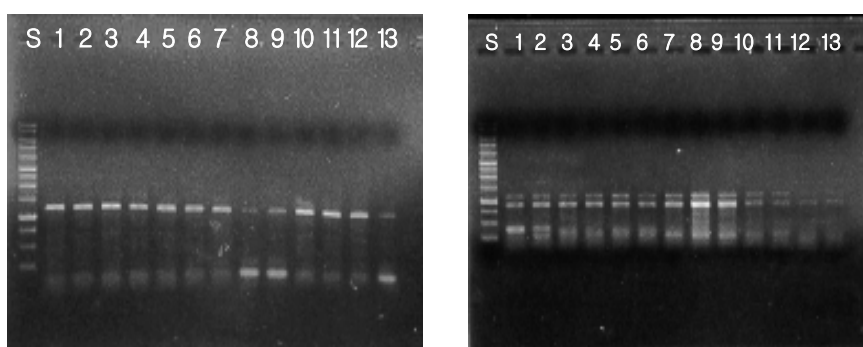


Fig. 24. PCR amplification of ITS tRNA^{Ile} and tRNA^{Ala} region by using specific primer prepared from the *E. carotovora* subsp. *atroseptica*. 1 : Hong-potato, 2 : LMG2375 (U.K) , 3 : Pyung-chang, 4 : Hong-chon3, 5 : 301629 (Jap), 6 : Je-ju, 7 : 301630 (Jap), 8 : *E. carotovorum* subsp *atrosepticum* (ATCC33260^T), 9 : LMG6693 (Sweden), 10 : *E. carotovorum* subsp. *carotovorum* (ATCC15713^T), 11 : *E. chrysanthemi* (ATCC11663^T), 12 : *E. carotovorum* subsp. *wasabiae* (ATCC43316^T), 13 : *E. carotovorum* subsp. *betabvescutorum* (ATCC43762^T).

4. 결과 요약

가. 강원도 고령지는 우리나라 감자재배 및 종서생산의 중심지 역할을 하고 있으나, 최근 5년 간 조사결과 감자흑각병의 발생이 매우 심각한 실정이다. 따라서 감자흑각병원균의 특성분석 및 분류체계를 확립하고, 조기진단 기술을 이용한 무병종서 생산을 목표로 본 연구를 실시하였다.

나. 국내에서 분리한 감자흑각병원균(*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*)의 특성 및 분류체계를 확립하기 위하여 국외 감자흑각병원균 및 감자무름병원균(*E. carotovora* subsp. *carotovora*), 그리고 *Erwinia* soft-rot 그룹과의 유연관계를 알아보았다. 그 결과 국내 감자흑각병원균은 일본 감자흑각병원균과 매우 높은 유사도를 보였으며 감자무름병원균과도 높은 유사도를 보이는 것으로 본 연구결과 확인되었다. 이는 국내 감자흑각병원균의 경우, 유전적으로도 다양성을 가진다는 것을 간접 시사하며, 진화적으로 모든 *carotovora* 그룹의 병원세균들은 동일한 조상에서 출발하여 환경 및 생태적 조건에 맞추어 진화되었음을 알 수 있다.

다. 국내의 감자흑각병원균은 유전적으로 매우 다양한 특성을 가지고 있었다. 특히 감자무름병원균과는 높은 유연관계를 가지고 있었으므로 본 연구진이 개발한 specific primer를 이용하면 감자흑각병원균 뿐만 아니라 다른 *carotovora* 그룹의 병원균까지 밝혀낼 수 있었다.

본 연구를 통하여 국내 감자흑각병원균의 특성분석과 분류체계를 확립하였고, 본 연구수행 중에 개발된 분자생물학적 조기진단기술을 이용한 무병종서 생산이 가능하게 되었다.

제 2 절 살균제를 이용한 감자흑각병의 화학적 방제

1. 서 론
2. 재료 및 방법
3. 결과 및 고찰
4. 결과요약

1. 서 론

감자(Potato, *Solanum tuberosum* L.)는 세계적으로 중요한 식량작물로서 원산지는 남미 안데스산맥지방이며 잉카 원주민이 기원전 200년에 처음으로 재배하였다. 현재까지 알려진 감자병해는 200여종으로서 많은 병에 이병성을 나타낸다.

국내의 경우 감자병해에는 바이러스에 의한 12종, 세균에 의한 8종, 곰팡이에 의한 15종, 그리고 기타 비병원성에 의한 10여종 등 총 45종 병해로 나뉘어져 있다. 이 중 감자흑각병은 병원세균인 *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Eca)에 의하여 25℃ 이하의 비교적 저온 조건에서 감자의 지상부 및 피경에서 발생한다.

흑각병원세균은 감자, 양배추, 흰꽃양배추, 파, 샐러리, 배추 외 43가지의 채소류와 화훼류 그리고 과일에서 병원성을 나타내며, pectate lyase, cellulase 등을 생산하여 식물세포의 1차 세포벽과 중층을 분해시켜 다른 병원세균에 대한 식물의 저항성을 저하시키고 조직팽창을 증가시켜 결과적으로 식물조직의 연화, 부패를 유도시킨다고 보고되었는데, 특히 pectate lyase가 가장 중요한 병원성결정요인으로 작용하고 있다(김 등, 1993; 이와 김, 1996).

병원세균에 의한 감염은 감자종서에 의하거나 종서 절단도의 전염에 의하여 이루어지며, 토양전염은 하지 않으나 재감염 경로로서 세균연무질에 의한 지상부 감염의 가능성이 있다. 빗방울이나 관수 시 물방울이 이병체에 부딪칠 때 병원세균을 함유한 물방울이 공중으로 비산 연무질이 되어 병원세균의 확산이 이루어져 발병되며, 감자의 종서나 식물체 뿐 만 아니라 운반이나 저장시에도 병을 일으켜 피해를 준다. 발병지역은 주로 온도가 비교적 낮은 고랭지나 준 고랭지로서, 특히 강우가 많을 때 흑각병 발생이 심하다(장, 1997).

1976년 미국에서 흑각병원세균(Eca)에 의하여 1,400만달러의 피해를 가져왔다고 보고되어 있으며(Kennedy, 1980), 국내의 경우 감자 주 생산지인 강원도에서만 연간 50억원 이상의 피해를 가져온다고 보고되었다(허, 1999). 감자흑각병은 주로 남부 시설재배지대(겨울과 봄), 고냉지 여름재배지대에서 최고 15%의 발병율을 보이고 있으나, 일부 외국에서의 높은 피해사례를 볼 때 국내에서도 감자흑각병에 대한 발생상태 및 방제법에 대한 연구가 필요한 실정이다(함, 2000).

현재 국내에서 검역대상 병원세균으로 관리되고 있는 Eca는 1997년 제주지역

에서 최초 발견된 이래, 최근에는 강원, 전북, 경북지역의 시설재배지와 고랭지대 재배지로 확산되고 있으나 체계적인 방제법이 개발되어 있지 못하여 농민들은 미등록 농약인 농용신(streptomycin)과 일품(oxolinic acid)을 불법적으로 사용하고 있는 형편이다(박 등, 1999; 이, 1999). *Erwinia* 속 세균들은 streptomycin, ganamycin, agrimycin과 같은 농용항생제를 사용하여 방제할 수 있다고 몇몇 연구자들이 보고하였으나(김 등, 1993; 이와 김, 1996), 감자흑각병을 유발하는 병원 세균인 *Erwinia. carotovora* subsp. *atroseptica*에 대해서는 효과가 낮다는 연구 결과도 보고된바 있다(Lund, 1979; 김 등, 1993).

본 연구에서는 환경친화적인 감자흑각병의 방제를 위하여 기존의 살균제로 많이 쓰이는 항생제와 구리화합물을 이용하여 병원세균에 대한 저해효과와 내성 조사를 선발하며, 선발된 약제의 포장방제효과를 검증하여 적은 약량으로 높은 방제효과를 나타내는 감자흑각병 화학적 방제제를 선발하여 환경친화적으로 감자 흑각병을 방제하기 위하여 수행하였다.

2. 재료 및 방법

1) 우수 살균제 선발 및 특성분석

공시 약제

세균병 방제에 많이 이용되고 있는 직접살균제인 7종 항생제와 oxolinic acid, 그리고 보호살균제인 4종 구리제를 실험에 사용하였으며, 그들의 일반명, 화학명 및 순도는 표 6과 같다.

공시 균주 및 배양조건

강원도 홍천군 화촌면 군업리 감자경작지에서 흑각병 증상을 보이는 감자줄기를 채집하였고, 4°C에 보관하며 실험에 사용하였다. 감자의 이병부위를 절단한 후, 0.25% sodium hypochloride solution에 1분간 표면살균하였다. 절단부위를 멸균수로 세척한 후, 멸균수가 채워져 있는 1 ml micro tube에 넣고 마쇄한 다음, 이를 멸균수를 이용하여 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} 배로 희석하였다. 희석액을 Mannitol Glutamate Yeast extract (MGY) agar 배지 (mannitol 10 g, glutamic acid 0.25 g, NaCl 0.2 g, KH_2PO_4 0.5 g, yeast extract 0.25 g, agar 15 g, 증류수 1 l) 에 도말하여, 28°C에서 24시간동안 배양한 후 형성된 콜로니를 수집하였다. 병원세균을 동일한 배지에 3회 연속 계대배양하여 순수배양하였으며, 콜로니를 동결건조한 후 4°C에서 보존하며 실험에 사용하였다.

대조균주로는 감자흑각병원세균의 type strain인 ATCC33260^T를 American Type Culture Collection(Manassaa, U.S.A.)으로부터 분양받아 4°C 저온저장고에 보존하며 실험에 사용하였다.

Table 6. Bactericides used in the study

Bactericides	Chemical name	Purity (%)
Antibiotic		
Kasugamycin	3- <i>O</i> -[2-amino-4-[(carboxyiminomethyl)amino]-2,3,4,6-tetraeoxy- α -D-arabino-hexopyranosyl]-D- <i>chiro</i> -inositol	92.0
Streptomycin	<i>O</i> -2-deoxy-2-(methylamino)- α -L-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- <i>O</i> -5-deoxy-3- <i>C</i> -formyl- α -L-lyxofuranosyl-(1 \rightarrow 4)- <i>N,N</i> -bis(aminoiminomethyl)-D-streptamine	77.1
Streptomycin sulfate	<i>O</i> -2-deoxy-2-(methylamino)- α -L-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- <i>O</i> -5-deoxy-3- <i>C</i> -formyl- α -L-lyxofuranosyl-(\rightarrow 4)- <i>N,N'</i> -bis(aminoiminomethyl)-, sulfate (2:3) (salt);	98.0
Polyoxin-D	5-[[2-amino-5- <i>o</i> -(aminocarbonyl)-2-deoxy-L-xylonoyl]amino]-1-(5-carboxy-3,4-dihydro-2,4-dioxo-1-(2 <i>H</i>)-pyrimidinyl)-1,5-dideoxy-D-allofuranuronic acid	94.0
Polyoxin-B	5-[[2-amino-5- <i>o</i> -(aminocarbonyl)-2-deoxy-L-xylonoyl]amino]-1,5-dideoxy-1-[3,4-dihydro-5-(hydroxymethyl)-2,4-dioxo-1(2 <i>H</i>)-pyrimidinyl]- β -B-allofuranuronic acid	88.0
Blasticidin-S	(s)-4-[[3-amino-5-[(aminoiminomethyl)methylamino]-1-oxopentyl]amino]-1-[4-amino-2-oxo-1(2 <i>H</i>)-pyrimidinyl]-1,2,3,4-tetra deoxy- β -D-erythro-hex-2-enopyranuronic acid	91.0
Validamycin -A	[1 <i>s</i> -(1 <i>a</i> ,4 <i>a</i> ,5 <i>β</i> ,6 <i>a</i>)]-1,5,6-trideoxy-4- <i>O</i> - β -D-glucopyranosyl-5-(hydroxymethyl)-1-[[4,5,6-trihydroxy-3-(hydroxymethyl)-2-cyclohexen-1-yl]-D- <i>chiro</i> -inositol	92.0
quinoline		
Oxolinic acid	5-ethyl-5,8-dihydro-8-oxo-1,3-dioxolo-[4,5- <i>g</i>]quinoline-7-carboxylic acid	98.0
Copper		
Copper hydroxide	Copper hydroxide	90.0
Copper oxide	Copper oxide	85.0
Copper sulfate	Sulfuric acid copper(2+) salt (1:1)	99.0
Cupric sulfate, basic	Cupric sulfate, Basic	95.0

공시 감자

감자는 1976년에 미국으로부터 수입한 감자인 수미품종을 강원도 고랭지 농업시험장에서 분양받아 사용하였다.

약제 및 혼합제의 저해효과

MGY agar 배지 1 L가 들어 있는 2 L의 삼각플라스크를 121°C, 1.2 기압 조건의 autoclave에서 20분간 멸균한 후, 멸균상에서 55~60°C로 식힌 다음, 살균제 단제 혹은 혼합제를 첨가하여 각각의 농도를 조제한 후, 멸균된 petri dish에 20 ml씩 분주하였다.

Eca를 MGY agar 배지에서 24시간 배양한 후, 590 nm에서 흡광도가 0.6이 되도록 멸균수 10 ml에 희석하였다. 희석된 병원세균을 약제가 처리된 배지에 5 μ l 접종한 후, petri dish를 28°C 항온배양기에서 24시간 배양한 다음, Eca의 성장 여부를 조사하였다.

처리된 약제로는 보호살균제와 직접살균제로, 보호살균제인 4종의 구리제는 1, 3, 5, 7 mM의 농도로, 직접살균제인 7종의 항생제와 oxolinic acid는 0.1, 0.5, 0.9, 1.3 mM의 농도로 병원세균의 성장여부에 준하여 처리하였으며, 각 약제의 Eca에 대한 저해는 MIC를 기준으로 결정하였다.

혼합제는 직접살균제의 Eca에 대한 MIC의 100%, 80%수준에서 다양한 농도의 구리제를 혼합하여 Eca의 성장여부를 조사하여 저해효과를 관찰하였다.

약제 및 혼합제의 내성조사

‘약제 저해효과’에서 언급한 바와 같이 Eca를 590 nm에서 흡광도가 0.6이 되도록 멸균수 10 ml에 희석하였다. 이 희석액을 각각의 약제가 첨가된 MGY agar 배지에 100 μ l씩 plating하여 배양하였다.

Eca에 대한 MIC를 기준으로 1배, 1.3배로 희석된 각각의 살균제와 ‘약제 및 혼합제의 저해효과’에서 언급된 혼합제를 MGY agar 배지에 첨가한 다음, petri dish를 28°C 조건의 인큐베이터에서 72시간 배양하였다. 병원세균에 대한 내성조사는 생성된 콜로니 수로 결정하였다.

2) 선발 약제의 흑각병에 대한 방제효과

이병종서에 대한 방제효과

2001년에 강원도 평창군 도암면 횡계리에서, 2002년에는 강원도 춘천시 신북읍 소재 강원대학교 농장에서 수행하였다. 실험은 난괴법 3반복으로 실시하였고, 재배방법은 농가관행법에 따라 수행하였다. 흑각병원세균은 국내균주인 홍천종을 10^8 cells/ml로 조제하여 건전종서를 30분간 침지처리 한 후, 약제를 실내실험농도의 3배, 7배 2가지 농도로 조제하여 감자종서를 침지처리한 후 파종하였다. 병원세균을 침지처리한 무처리구(+)를 대조구로 하였으며 실험에 사용된 감자는 수미품종을 사용하였고, 파종한지 30일 후 출묘율을 조사하여 방제효과를 알아보았다.

이병식물체에 대한 방제효과

2001년에 강원도 평창군 도암면 횡계리에서, 2002년에는 강원도 춘천시 신북읍 소재 강원대학교 농장에서 수행하였다. 실험은 난괴법 3반복으로 실시하였고, 재배방법은 농가관행법에 따라 실시하였다. 건전종서를 파종한지 한달 후에 감자 지상부 (지제부 및 줄기)에 상처를 내어 국내균주인 홍천종을 10^8 cells/ml로 조제하여 상처부위에 상처접종을 하였으며, 또한 발병의 유도를 위해 습실처리를 하였다. 약제를 실내실험농도의 3배, 7배로 조제하여 식물체에 흑각증상이 나타난 후 7일 간격으로 3회 엽면 살포하였다. 대조구는 병원세균만 침지처리한 무처리구(+)를 대조구로 하였으며, 실험에 사용된 감자는 수미품종을 사용하고 최종 약제 처리일로부터 10일후 감자 식물체의 이병주율을 조사하여 방제효과를 알아보았다.

$$\text{방제효과(\%)} = \frac{(\text{무처리 이병주수} - \text{처리구 이병주수})}{\text{무처리 이병주수}} \times 100$$

토성에 따른 약제 방제효과

이병종서에 방제효과가 높은 약제인 streptomycin(0.14 mM)와 streptomycin sulfate(0.042 mM)를 토성이 상이한 토양에 파종하여 토성에 따른 방제효과를 알아보았다. 실험에서는 원제 대신 streptomycin을 함유한 농용신(streptomycin 20%, 수화제), streptomycin sulfate를 함유한 아그리마이신(streptomycin sulfate

18.8%, 수화제)으로 조제하여 사용하였다. 실험은 처리구 당 5반복으로 실시하였으며, 실험에 사용된 토양은 토양 1—강원도 춘천시 우두동 강원도 농업 기술원 시험포장과 토양 2 - 강원도 춘천시 유포리 강원대학교 부속농장의 토양을 이용하였으며 토성은 표 2와 같다. 병원세균을 침지처리한 무처리구(+)를 대조구로 하였으며 실험에 사용된 감자는 수미 품종을 사용하였고, 파종한지 30일 후 출묘율을 조사하여 방제효과를 알아보았다.

Table 7. List of soil physical and chemical properties

Soil	pH(1:5)	O.M(%)	C.E.C. ¹⁾ (cmol/kg)	Sand	Silt (%)	Clay	Texture
1	7.06	3.23	8.00	67.4	8.63	22.7	SLC ²⁾
2	6.83	1.49	3.75	86.9	3.56	8.42	LS ³⁾

¹⁾ C.E.C. : Cation exchange capacity, ²⁾ SCL : Sand clay loam, ³⁾ LS : Loamy sand.

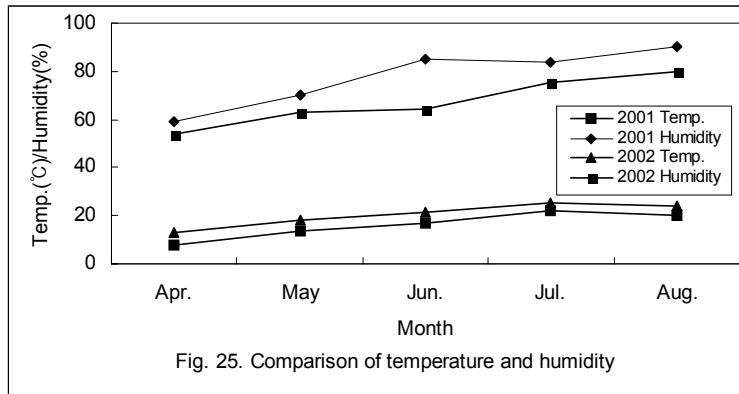
흑각병원균의 농도에 따른 약제 방제효과

2002년에 강원대학교 비닐하우스에서 포트를 이용하여 흑각병원균의 농도에 따른 약제 방제효과실험을 수행하였다. 실험은 5반복으로 실시하였고, 국내균주인 홍천종을 10^6 , 10^8 , 10^{10} cells/ml 3가지 농도로 조제하여 건전종서를 30분간 침지처리한 후, 이병종서에 방제효과가 높은 약제를 농도별로 조제하여 감자종서를 침지처리한 후 파종하였다. 병원세균을 침지처리한 무처리구(+)를 대조구로 하였으며 실험에 사용된 감자는 수미 품종을 사용하였고, 파종한지 30일 후 출묘율을 조사하여 방제효과를 알아보았다.

기상환경변화에 따른 약제의 방제효과

2001년에 강원도 평창군 도암면 횡계리에서, 2002년에는 강원도 춘천시 신복읍 소재 강원대학교 농장에서 이병식물체의 기상환경에 따른 선발약제의 방제효과를 알아보았으며 온도와 습도는 그림 25와 같다. 실험은 난괴법 3반복으로 실시하였고, 재배방법은 농가관행법에 따라 실시하였다. 건전종서를 파종한지 한달 후에 감자지상부 (지제부 및 줄기)에 상처를 내어 국내균주인 홍천종을 10^8 cells/

ml로 조제하여 상처부위에 상처접종을 하였으며, 또한 발병의 유도를 위해 습실 처리를 하였다. 약제를 농도별로 조제하여 식물체에 흑각증상이 나타난 후 7일 간격으로 3회 엽면 살포하였다. 대조구는 병원세균만 침지처리한 무처리구(+)를 대조구로 하였으며 실험에 사용된 감자는 수미품종을 사용하고 최종 약제 처리일로부터 10일 후 감자 식물체의 이병주율을 조사하여 방제효과를 알아보았다.



3. 결과 및 고찰

1) 우수 살균제 선별 및 특성분석

약제 저해 효과

직접살균제인 항생제 7종과 oxolinic acid가 Eca의 생장에 미치는 영향을 조사하였다. Eca의 생장은 0.9 mM의 kasugamycin, blasticidin-S, streptomycin, streptomycin sulfate, oxolinic acid 처리시 완전 억제되었지만, 1.3 mM의 polyoxin-B, polyoxin-D, validamycin-A 처리 시는 전혀 억제되지 않았다(표 8). 보호살균제인 4종의 구리제 중 copper hydroxide, copper oxide, copper sulfate는 3 mM 수준에서 Eca의 생장을 완전 억제하였다. 그러나 이러한 생장억제효과는 동일한 농도의 cupric sulfate 처리 시에는 나타나지 않았다(표 8).

Eca 생장억제효과가 뛰어난 살균제들을 홍천균주와 국제표준균주인 ATCC33260^T을 대상으로 MIC를 구한 결과, 2 종 균주의 살균제에 대한 반응은 유사하였으며, 살균제의 살균효과는 oxolinic acid > streptomycin sulfate > streptomycin > kasugamycin > blasticidin-S > copper sulfate > copper oxide > copper hydroxide의 순으로 직접살균제의 MIC가 보호살균제의 MIC보다 낮았다(표 9). 이와 같은 결과는 직접살균제는 식물체내에서 Eca의 생장, 병반형성 또는 병반의 포장형성과정을 직접 저해하는 기작을 갖는 반면, 보호살균제는 Eca의 생장을 억제하거나 병발생을 억제하는 작용기작이 갖는 (정 등, 2000) 차이에 기인된 것이라 추론된다.

Table 8. Effect of Eca strain on bactericides

Bactericides	Eca strain	Concentration of bactericides(mM)			
		0.1	0.5	0.9	1.3
Kasugamycin	Hongchon	+	-	-	-
	ATCC33260 ^T	+	-	-	-
Blasticidin-S	Hongchon	+	-	-	-
	ATCC33260 ^T	+	-	-	-
Streptomycin	Hongchon	-	-	-	-
	ATCC33260 ^T	-	-	-	-
Streptomycin sulfate	Hongchon	-	-	-	-
	ATCC33260 ^T	-	-	-	-
Oxolinic acid	Hongchon	-	-	-	-
	ATCC33260 ^T	-	-	-	-
Polyoxin-D	Hongchon	+	+	+	+
	ATCC33260 ^T	+	+	+	+
Polyoxin-B	Hongchon	+	+	+	+
	ATCC33260 ^T	+	+	+	+
Validamycin-A	Hongchon	+	+	+	+
	ATCC33260 ^T	+	+	+	+

		Concentration of bactericides(mM)			
		1	3	5	9
Copper hydroxide	Hongchon	+	-	-	-
	ATCC33260 ^T	+	-	-	-
Copper oxide	Hongchon	+	-	-	-
	ATCC33260 ^T	+	-	-	-
Copper sulfate	Hongchon	-	-	-	-
	ATCC33260 ^T	-	-	-	-
Cupric sulfate, basic	Hongchon	+	+	-	-
	ATCC33260 ^T	+	+	-	-

+ : growth

- : inhibition

Table 9. Mimium inhibitory concentrations of bactericides on Eca Hongchon strain

Bactericides	MIC ^{a)} (mM)
Oxolinic acid	0.0002
Kasugamycin	0.15
Blasticidin-s	0.3
Streptomycin	0.02
Streptomycin sulfate	0.006
Copper hydroxide	3.0
Copper oxide	2.0
Copper sulfate	1.0

^{a)} : The mimium inhibitory concentrations of ATCC33260^T strain are similar to those of Hongchon strain

약제 내성

직접살균제 중 저해효과가 높은 oxolinic acid, streptomycin, streptomycin sulfate 와 보호살균제 중 저해효과가 높은 3종의 copper hydroxide, copper oxide, copper sulfate를 대상으로 병원세균에 대한 내성을 조사하였다.

무처리구에서 홍천균주의 수와 국제표준균주의 수는 각각 1.3×10^6 cells/plate와 1.8×10^6 cells/plate이었다(표 10). 두 균주는 MIC 수준의 살균제 처리로 99.9% 이상 저해되었는데, 특히 보호살균제가 직접살균제보다는 더 높은 살균효과를 나타내었다.

홍천균주는 실험에 사용된 살균제 중 oxolinic acid에 대하여 더 높은 내성을 나타내었다. 즉, $1.3 \times$ MIC 수준의 oxolinic acid 처리시 홍천균주의 생존수는 53.7인데 반해, 국제표준균주의 생존수는 1이었다. 이러한 결과는 홍천균주가 다른 약제보다는 oxolinic acid에 대하여 내성을 나타내고 있음을 보여준다. 홍천균주가 국제표준균주에 비해 oxolinic acid에 대한 내성이 높은 이유로는 홍천지

Table 10. Effect of bactericides on Eca Hongchon and ATCC33260^T strains

Bactericides	Eca strain	Survival No. of Eca	
		1 × MIC	1.3 × MIC
Oxolinic acid	Hongchon	353.7	53.7
	ATCC33260 ^T	3.7	1.0
Streptomycin	Hongchon	12.0	1.0
	ATCC33260 ^T	4.0	1.0
Streptomycin sulfate	Hongchon	128.3	2.7
	ATCC33260 ^T	93.7	0
Copper hydroxide	Hongchon	4.0	0
	ATCC33260 ^T	4.0	0
Copper oxide	Hongchon	1.7	0
	ATCC33260 ^T	1.0	0
Copper sulfate	Hongchon	1.3	0
	ATCC33260 ^T	0.7	0
Control	Hongchon	1.31×10 ⁶	
	ATCC33260 ^T	1.80×10 ⁶	

역의 농업경작자들이 고약량의 oxolinic acid를 연속적으로 배추무름병의 방제용으로 사용하여 Eca 균주가 노출되었을 가능성을 배제할 수 없다(Personal Comm. 안문섭). 따라서 단제의 사용으로 흑각병원세균을 효과적으로 방제할 수 없는 것으로 판단되었으며, 병원세균에 대하여 높은 약효와 내성유발가능성이 낮은 특성을 가진 혼합제를 선별하기 위하여 약효가 높은 oxolinic acid, streptomycin, streptomycin sulfate 3종 약제의 80%와 100%의 MIC에 준하여 내성유발가능성이 낮은 3종의 구리제를 다양한 농도로 혼합하여 병원세균에 대한 저해효과와 내성조사를 진행하였다.

혼합제 저해효과

‘약제내성’ 실험의 결과 Eca에 대한 살균활성이 높지만 내성발현 가능성이 높았던 3종의 직접살균제와 살균활성은 높지 않지만 내성발현 가능성이 낮았던 3종의 보호살균제를 혼합하여 Eca에 대한 저해 실험을 수행하였다.

Eca의 생장은 80% MIC의 streptomycin (0.016 mM) 혹은 streptomycin sulfate (0.005 mM)에 50% MIC의 copper hydroxide (1.5 mM) 혹은 60% MIC의 copper oxide (1.2 mM) 혼합처리 시; 100% MIC의 streptomycin (0.02 mM)에 30% MIC의 copper hydroxide(0.9 mM)혹은 50% MIC의 copper oxide (1.0 mM) 혼합처리 시; 100% streptomycin sulfate (0.006 mM)에 40% MIC의 copper hydroxide (1.2 mM) 혹은 50% MIC의 copper oxide (1.0 mM) 혼합처리 시 완전 저해되었다(표 11). 그러나 80%와 100% MIC의 oxolinic acid와 보호살균제와의 혼합한 경우, 직접살균제와 copper sulfate를 혼합처리 24시간 후 Eca가 성장하여 살균효과가 없었다. 본 실험의 결과는 Eca의 효과적인 성장저해를 위하여 직접살균제나 보호살균제의 단일 사용하는 경우보다는 혼합 사용 시 더욱 높은 저해효과와 낮은 내성균 유발효과가 있다는 것을 보여주고 있다.

Table 11. Effects of different concentrations of bactericides on the growth of Eca Hongchon and ATCC33260^T strain. The MIC's of Hongchon strain are similar to those of ATCC33260^T strain.

Bactericides		S. ^{a)}		S. S. ^{b)}		O. A. ^{c)}	
		80% MIC	100% MIC ⁾	80% MIC	100% MIC ⁾	80% MIC	100% MIC
Copper hydroxide	(30% MIC)	+ ²⁾	-	+	+	++	++
	(40% MIC)	+	-	+	-	++	++
	(50% MIC)	- ¹⁾	-	-	-	++	++
	(60% MIC)	-	-	-	-	++	++
Copper oxide	(30% MIC)	+	+	++	+	++	++
	(40% MIC)	+	+	+	+	++	++
	(50% MIC)	+	-	+	-	++	++
	(60% MIC)	-	-	-	-	++	++
Copper sulfate	(30% MIC)	++ ³⁾	++	++	++	++	++
	(40% MIC)	++	++	++	++	++	++
	(50% MIC)	++	++	++	++	++	++
	(60% MIC)	++	++	++	++	++	++

a): streptomycin; b): streptomycin sulfate; c): oxolinic acid; 1): inhibition;

2): growth of colony after 72h; 3): growth of colony after 24h.

혼합제 내성

혼합제 저해효과 실험에서 선발된 4종 혼합제 (streptomycin + copper oxide, streptomycin + copper hydroxide, streptomycin sulfate + copper oxide, streptomycin sulfate + copper hydroxide)의 Eca에 대한 내성을 조사하였다. 혼합제 저해효과 실험농도의 1배와 1.3배로 MGY agar 배지에 첨가한 다음 Eca를 접종시, 홍천균주와 국제표준균주 공히 처리 72시간 후 내성균이 관찰되지 않았다.

현재 강원도 고랭지대 배추경작지에서 농업경작자들이 사용하고 있는 직접살

균제인 농용신(streptomycin)과 일품(oxolinic acid)은 Eca에 대한 살균효과는 높은 반면 내성유발 가능성도 높아 저항성 균주의 출현이 우려되고 있다. 저항성 균주의 출현을 방지하는 방안으로 비록 살균효과는 높지 않지만 내성유발 가능성이 낮은 구리제를 사용할 수 있다. 그러나 구리제의 경우 많은 양이 투여되어야만 하기에 환경을 오염시키는 문제점이 있다. 이러한 문제점을 해결하는 방안의 일환으로 본 연구에서는 직접살균제(streptomycin과 streptomycin sulfate)와 구리제(copper oxide, copper hydroxide)를 혼합처리한 결과, 이들 혼합제들은 효과적으로 Eca의 성장을 효과적으로 억제함과 동시에 내성유발 가능성도 낮았다.

이러한 혼합제들은 기존에 사용되고 있는 살균제의 낮은 저해효과와 높은 내성유발 가능성의 문제점을 보완할 수 있어, 장기간에 걸쳐 높은 저해효과를 볼 수 있을 뿐만 아니라, 단제 사용시보다 적은 양을 처리할 수 있어 환경오염을 경감시킬 수도 있을 것이라 판단된다.

2) 선발 약제의 감자흑각병에 대한 방제효과

이병종서에 대한 방제효과 및 약해검정

실내실험에서 선발한 저해효과가 높고, 내성유발 가능성이 낮은 살균제인 streptomycin + copper hydroxide, streptomycin + oxide copper, streptomycin sulfate + copper hydroxide, streptomycin sulfate + copper oxide와 그들의 단제인 streptomycin와 streptomycin sulfate를 실험에 사용하였다. 실험에서는 원제 대신 streptomycin을 함유한 농용신 (streptomycin 20%, 수화제), streptomycin sulfate를 함유한 아그리마이신 (streptomycin sulfate 18.8%, 수화제), copper hydroxide를 함유한 코사이드 (copper hydroxide 77%, 수화제), copper oxide를 함유한 신기동 (copper oxide 58%, 수화제)으로 혼합제를 조제하여 사용하였다. 2001년 평창군 횡계리에서의 실험결과, 실내실험에서 선발된 우수 살균제 중 streptomycin과 streptomycin sulfate 2종의 약제는 실내실험농도의 7배 농도로 침지처리 시 각각 66.8%, 75.0%의 방제효과를 나타내었으나, 구리제를 함유한 혼합제는 모두 25% 이하의 낮은 방제효과를 나타내어 구리제에 의한 약해로 판단되었다 (표 12). 따라서 이병종서의 방제 시에는 구리제를 함유한 혼합제보다는 항생제인 streptomycin (0.14 mM)와 streptomycin sulfate (0.042 mM)의 사용이 효과적일 것으로 사료된다.

Table 12. Bactericides effect of selected bactericides on infected seed potatoes

Bactericides	Conc. (mM)	Bactericides effect ^{a)} (%)	
		3×Conc.	7×Conc.
Streptomycin	0.02	0.0 e	66.8 ab
+ copper hydroxide	0.016+1.5	0.0 e	0.0 f
	0.02+0.9	4.1 d	4.1 d
+ copper oxide	0.016+1.2	0.0 e	0.0 e
	0.02+1.0	25.0 c	20.8 c
Streptomycin sulfate	0.006	50.0 b	75.0 a
+ copper hydroxide	0.005+1.5	0.0 e	0.0 e
	0.006+1.2	0.0 e	0.0 e
+ copper oxide	0.005+1.2	0.0 e	0.0 e
	0.006+1.0	0.0 e	0.0 e

a) Values designated by the same letter (column in bactericides) are not significantly different by LSD 0.05 tests.

이 병 식물체에 대한 방제효과 및 약해검정

이 병 종서의 방제 실험에 사용된 약제를 이용하여 이 병 식물체에 대한 방제효과를 검정한 결과, 2001년 평창군 도암면 횡계리에서 지상 30 cm 이상 자란 건전한 감자 식물체에 약제를 경엽처리 시 streptomycin (0.05 mM)에 copper oxide (3.6 mM)를 혼합하여 사용할 경우 56.9%; streptomycin (0.06 mM)에 copper hydroxide (2.7 mM) 또는 copper oxide (3.0 mM)을 첨가 시 각각 65.1%, 58.1%의 방제효과를 나타내었고, streptomycin sulfate (0.015 mM)에 copper hydroxide (4.5 mM)을 첨가 시 64.3%; streptomycin sulfate (0.018 mM)에 copper oxide (3.0 mM) 또는 copper hydroxide (3.6 mM)을 첨가할 경우에는 각각 68.7%, 56.1%로 다른 약제 처리구에 비하여 적은 약량으로 높은 방제효과를 나타내으며, 감자 식물체에 약해를 일으키지 않는 것으로 관찰되었다. 따라서 감자 식물체가 흑

각병원세균에 감염시 이상의 약제를 경엽처리제로 사용하여 효과적으로 방제할 수 있을 것으로 사료된다.

Table 13. Bactericides effect of selected bactericides on infected plants

Bactericides	Conc. (mM)	Bactericides effect ^{a)} (%)	
		3×Conc.	7×Conc.
Streptomycin	0.02	28.2 e	3.6 f
+ copper hydroxide	0.016+1.5	35.2 d	45.5 c
	0.02+0.9	65.1 a	63.9 a
+ copper oxide	0.016+1.2	56.9 b	49.2 c
	0.02+1.0	58.1 b	52.5 c
Streptomycin sulfate	0.006	49.8 c	49.8 c
+ copper hydroxide	0.005+1.5	64.3 a	25.8 e
	0.006+1.2	56.1 b	48.9 c
+ copper oxide	0.005+1.2	36.6 d	55.4 b
	0.006+1.0	68.7 a	47.0 c

a) Values designated by the same letter (column in bactericides) are not significantly different by LSD 0.05 tests.

토성에 따른 약제 방제효과

이병중서에 방제효과가 높은 streptomycin (0.14 mM)와 streptomycin sulfate (0.042 mM)를 토성이 상이한 토양에 파종하여 방제효과를 알아보았다. 실험에서는 원제 대신 농용신(streptomycin 20%, 수화제)과 아그리마이신 (streptomycin sulfate 18.8%, 수화제)을 농도별로 조제하여 사용하였다. 실험결과 토양 1과 토양 2에서 streptomycin과 streptomycin sulfate 2종의 약제는 토양 1에서 각각 60.0%와 73.3%; 토양2에서는 60.0%와 66.7%의 방제효과를 나타내어, 토성이 다른 토양 조건에서 모두 60%이상의 방제효과 나타내어, 다양한 토성에서 streptomycin

(0.14 mM)와 streptomycin sulfate (0.042 mM)를 이용하여 종서소독처리시 감자 흑각병을 방제할 수 있을 것으로 사료된다(표 14).

Table 14. Bactericides effect of selected bactericides on infected potatoes

Bactericides	Conc. (mM)	Bactericides effect ^{a)} (%)	
		토양 1	토양 2
Streptomycin	0.14	60.0 b	60.0 b
Streptomycin sulfate	0.042	73.3 a	66.7 ab

a) Values designated by the same letter (column in bactericides) are not significantly different by LSD 0.05 tests.

흑각병원균의 농도에 따른 약제 방제효과

이병종서에 방제효과가 높은 약제인 streptomycin (0.14 mM)와 streptomycin sulfate (0.042 mM)를 흑각병원균의 농도에 따른 방제효과를 알아보았다. 실험결과, streptomycin과 streptomycin sulfate 2종의 약제는 10^{10} cells/ml, 10^8 cells/ml, 10^6 cells/ml 농도로 침지처리한 처리구에서 각각 60.0%와 66.7%, 60.0%와 73.3%, 60.0%와 73.3%의 방제효과를 나타내었다(표 15). 선발약제의 방제효과는 streptomycin (0.14 mM)의 경우 흑각병원균의 농도에 따른 방제효과의 차이를 나타내지 않았으나, streptomycin sulfate (0.042 mM)의 경우에는 병원균의 밀도가 10^{10} cells/ml시 방제효과가 낮아졌지만 60%이상의 방제효과를 나타내어, 감자 종서의 다양한 오염정도에서 이병종서의 종서소독처리제로 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

Table 15. Bactericides effect of selected bactericides on infected potatoes

Bactericides	Conc. (mM)	Bactericides effect ^{a)} (%)		
		10^{10} cells/ml	10^8 cells/ml	10^6 cells/ml
Streptomycin	0.14	60.0 b	60.0 b	60.0 b
Streptomycin sulfate	0.042	66.7 ab	73.3 a	73.3 a

a) Values designated by the same letter (column in bactericides) are not significantly different by LSD 0.05 tests.

기상환경변화에 따른 약제의 방제효과

이 병식물체에 기상환경변화에 따른 약제의 방제효과를 검정하였다. 실험결과, 2001년에 방제효과가 높았던 6종의 약제(표 13)를 이용하여 2002년에는 실험한 결과 모두 70%이상의 방제효과를 나타냈으며, 그 중 streptomycin (0.05 mM)에 copper oxide (3.6 mM) 혼합 시 84.8%, streptomycin sulfate (0.018 mM)에 copper oxide (3.0 mM) 혼합 시 85.3%로 유의성 있게 높은 방제효과를 나타내었다(표 10). 따라서 다양한 기상환경조건에서 흑각병원세균에 이병된 식물체에 streptomycin (0.05 mM)에 copper oxide (3.6 mM) 첨가한 혼합제, streptomycin sulfate (0.018 mM)에 copper oxide (3.0 mM) 첨가한 혼합제를 경엽처리 시 효과적으로 방제할 수 있을 것으로 사료된다.

Table 16. Bactericides effect of selected bactericides on infected plants

Bactericides	Conc. (mM)	Bactericides effect ^{a)} (%)	
		2001	2002
Streptomycin			
+ copper hydroxide	0.02+0.9	65.1 a	76.8 b
+ copper oxide	0.05+3.6	56.9 b	84.8 a
	0.06+3.0	58.1 b	71.6 c
Streptomycin sulfate			
+ copper hydroxide	0.015+4.5	64.3 a	70.4 c
	0.018+3.6	56.1 b	80.8 b
+ copper oxide	0.018+3.0	68.7 a	85.3 a

a) Values designated by the same letter (column in bactericides) are not significantly different by LSD 0.05 tests.

선발 약제 사용에 따른 안전성 평가

1) Streptomycin (0.14 mM, 81.4 ppm)과 streptomycin sulfate (0.042 mM,

61.2 ppm) 2종의 약제는 흑각병원균에 이병된 감자종서의 종자소독 처리제로 사용 시 60.0~66.8%와 66.7~75.0%의 방제효과를 나타내었으며, 이들의 사용량이 streptomycin의 경우 감귤, 매실, 복숭아, 배추에서의 streptomycin (200~250 ppm) 경엽사용량의 40% 이하 수준이고, streptomycin sulfate의 경우에는 감귤, 매실, 참다래, 복숭아, 고추, 담배에서의 streptomycin sulfate (122~376 ppm) 경엽사용량의 50% 이하 수준이기 때문에 환경에 대하여 안전한 것으로 판단되었다.

2) Streptomycin (0.05 mM, 29.0 ppm)에 copper oxide (3.6 mM, 514.8 ppm)를 첨가한 혼합제와 streptomycin sulfate (0.018 mM, 26.2 ppm)에 copper oxide (3.0 mM, 429.0 ppm)을 첨가한 혼합제는 흑각병원균에 이병된 감자식물체에 경엽처리제로 사용 시 각각 56.9~84.8%와 68.7~85.3%의 높은 방제효과를 나타내었으며, 이들의 사용량은 streptomycin의 경우 감귤, 매실, 복숭아, 배추에서의 streptomycin 권장 경엽사용량(200~250 ppm)의 14.5% 이하 수준이었다. Streptomycin sulfate의 경우에는 감귤, 매실, 참다래, 복숭아, 고추, 담배에서의 권장 경엽 사용량인 122~376 ppm의 21.5% 이하 수준이고, copper oxide의 경우 감귤 경엽사용량(580 ppm)의 88.8%수준으로 사용되고 있어 선발된 모든 약제의 사용이 환경에 대하여 안전할 것으로 판단되었다.

3) 화학살균제를 이용한 감자흑각병의 환경친화적 방제법

포장에서 이병종서에 대한 약제의 방제효과 실험결과, streptomycin (0.14 mM, 81.4 ppm)과 streptomycin sulfate (0.042 mM, 61.2 ppm) 2종의 약제는 각각 66.8%, 75.0%의 방제효과를 나타내어 다른 약제들에 비하여 유의성 있게 높은 방제효과를 나타내었다. 그리고 streptomycin (0.14 mM)과 streptomycin sulfate (0.042 mM) 2종의 약제를 이병종서에 대한 방제효과를 상이한 토성의 토양과 10^6 cells/ml, 10^8 cells/ml, 10^{10} cells/ml의 병원균밀도로 진행한 결과, streptomycin과 streptomycin sulfate 2종의 약제는 상이한 토성을 가진 토양이나, 다양한 농도의 병원균을 처리 시 60.0%와 66.7~73.3%의 방제효과를 나타내었으며, 이들의 사용량이 streptomycin의 경우 감귤, 매실, 복숭아, 배추에서의 streptomycin (200~250 ppm) 경엽사용량의 40% 이하 수준이고, streptomycin sulfate의 경우에는 감귤, 매실, 참다래, 복숭아, 고추, 담배에서의 경엽사용량(122~376 ppm)의 50% 이하 수준으로 사용되고 있어 환경에 대하여 안전할 것으로 판단된다. 따라서 streptomycin (0.14 mM)과 streptomycin sulfate (0.042 mM) 2종의 약제가 흑각병원세균에 감염된 이병종서의 종서소독제로 사용시 안정적으로 방제할 수 있을 것으로 판단된다.

포장에서 이병식물체에 대한 약제의 방제효과 실험결과, streptomycin (0.05 mM)에 copper oxide (3.6 mM)를 혼합하여 사용할 경우 56.9%; streptomycin (0.06 mM)에 copper hydroxide (2.7 mM) 또는 copper oxide (3.0 mM)을 첨가 시 각각 65.1%, 58.1%의 방제효과를 나타내었고, streptomycin sulfate (0.015 mM)에 copper hydroxide (4.5 mM)을 첨가 시 64.3%; streptomycin sulfate (0.018 mM)에 copper oxide (3.0 mM) 또는 copper hydroxide (3.6 mM)을 첨가할 경우에는 각각 68.7%, 56.1%로 다른 약제들에 비하여 높은 방제효과를 나타내었다. 이병식물체에 대한 방제효과를 2001년과 2002년에 다양한 기상환경조건에서 관찰한 결과, streptomycin (0.05 mM, 29.0 ppm)에 copper oxide (3.6 mM, 514.8 ppm)를 첨가한 혼합제와 streptomycin sulfate (0.018 mM, 26.2 ppm)에 copper oxide (3.0 mM, 429.0 ppm)을 첨가한 2종의 혼합제는 각각 56.9~84.8%와 68.7~85.3%의 높은 방제효과를 나타내었으며, 이들의 사용량은 streptomycin의 경우 감귤, 매실, 복숭아, 배추에서의 streptomycin (200~250 ppm) 경엽사용량의 14.5% 이하 수준이고, streptomycin sulfate의 경우에는 감귤, 매실, 참다래, 복숭

아, 고추, 담배에서의 streptomycin sulfate (122~376 ppm) 경엽사용량의 21.5% 이하 수준이고, copper oxide의 경우 감귤 (580 ppm) 경엽사용량의 88.8%수준으로 사용되고 있어 환경에 대하여 안전할 것으로 판단된다. 기상환경변화조건에서 streptomycin (0.05 mM, 29.0 ppm)에 copper oxide (3.6 mM, 514.8 ppm)를 첨가한 혼합제와 streptomycin sulfate (0.018 mM, 26.2 ppm)에 copper oxide (3.0 mM, 429.0 ppm) 첨가한 혼합제를 발병초기 7일간격으로 경엽처리하면 감자흑각병을 안정적으로 방제할 수 있을 것으로 판단된다.

본 연구과제를 통하여 다양한 종류의 살균제를 이용한 3년 간의 실내와 포장 실험을 검정한 결과, 기존의 농약사용량의 비하여 50%이하의 수준에서 감자흑각병을 효과적으로 방제할 수 있어 본 연구결과를 활용할 경우 환경친화적으로 감자흑각병을 방제할 수 있는 것으로 확인되었다.

4. 결과 요약

1) 감자흑각병의 방제 시 이병중서의 경우에는 streptomycin (0.14 mM)과 streptomycin sulfate (0.042 mM) 2종의 약제를 중서소독제로 사용하여 안정적으로 방제할 수 있을 것으로 사료된다.

2) 감자식물체가 이병시에는 streptomycin (0.05 mM, 29.0 ppm)에 copper oxide (3.6 mM, 514.8 ppm)를 첨가한 혼합제와 streptomycin sulfate (0.018 mM, 26.2 ppm)에 copper oxide (3.0 mM, 429.0 ppm)를 첨가한 혼합제를 발병초기 7일간격으로 3번 경엽처리하면 안정적으로 방제할 수 있을 것으로 판단된다.

이상의 결과로부터 감자의 안전생산을 위하여 감자흑각병원균의 조기진단기술을 이용하여 무병중서 및 국제검역체계를 확립하여 감자의 무병중서를 생산하여 높은 생산량을 기대할 수 있다. 그러나 감자에 흑각병원균이 감염 시 이병중서의 경우에는 streptomycin (0.14 mM)과 streptomycin sulfate (0.042 mM) 2종의 약제를 중서소독제로 사용하여 방제할 수 있고, 감자 식물체가 이병시에는 streptomycin (0.05 mM, 29.0 ppm)에 copper oxide (3.6 mM, 514.8 ppm)를 첨가한 혼합제와 streptomycin sulfate (0.018 mM, 26.2 ppm)에 copper oxide (3.0 mM, 429.0 ppm)를 첨가한 혼합제를 발병초기 7일간격으로 3번 경엽처리하면 안정적으로 방제할 수 있을 것으로 판단된다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야의 기여도

1. 연차별 연구개발목표와 내용 및 달성도

구분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위	달성도 (%)
1차년도 (1999)	○ 감자흑각병원균의 특성 분석	- 병원균의 생리 및 생화학적 특성 분석 - 병원균의 지방산 분석 - 병원균의 기주범위 조사 - 병원균의 16S RNA 유전자 및 RAPD분석	100 100 100 100
	○ 우수 세균제 선발 및 특성 분석	- 우수 세균제 선발 - 약제에 대한 흑각병원균의 내성 조사 - 온실에서서의 약제 방제효과(감자중서/식물체)	100 100 100
2차년도 (2000)	○ 감자흑각병원균의 분류체계 확립	- 병원균의 ITS유전자 분석에 의한 분류체계 확립 - 병원균의 단백질 분석에 의한 분류체계 확립 - Numerical taxonomy에 의한 분류체계 확립	100 100 100
	○ 선발 약제의 흑각병에 대한 방제효과	- 단제/혼합제/목적별 처리를 통한 방제효과 검정 - 선발약제에 대한 병원균의 내성 - 식물에 대한 약해검정	100 100 100
3차년도 (2001)	○ 조기진단기술을 이용한 무병중서 생산	- 염색체 특이 유전자를 이용한 진단기술 개발 - ITS specific DNA를 이용한 진단기술 개발 - 식물체내에서의 병원균 검출능력 조사	100 100 100
	○ 화학세균제의 환경친화적 방제법 확립	- 단제/혼합제/목적별 처리를 통한 방제효과 검정 (계속) - 토양, 기상환경 및 병원균 밀도가 약제 방제에 미치는 영향 평가 - 화학세균제 사용에 대한 안전성 평가	100 100 100

2. 연구개발목표의 관련분야의 기술발전에 대한 기여도

감자흑각병의 병원세균인 *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*를 분리, 동정하였으며, 균주에 대한 분류학적연구가 진행되었고, 흑각병원세균의 16S rRNA, ITS, RAPD primers등을 이용한 조기진단기술을 개발하여 무병종서 생산체계를 확립하였다. 이 중 조기진단기술을 강화하여 수입되는 감자에 대한 수입절차를 강화하여 국내 감자의 경제력을 향상시켜 감자재배 농민들의 소득을 향상시킬 수 있다. 또한 본 연구결과로 구축된 *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*에 대한 조기진단기술을 활용하여 농민에게 안전한 무병종서를 공급함으로써 안정적 농가소득이 보장될 수 있도록 일조할 수 있다.

국내의 경우 감자흑각병에 대한 방제약제가 등록되지 않아 농민들의 농약의 오용과 남용으로 인한 환경 및 감자에 대한 잔류와 저항성균주의 출현이 우려되고 있다. 또한 외국균주와 국내균주 간의 유전적 유연관계가 낮아 감자흑각병 방제약제에 대한 자체개발이 필요한 시점으로 인식하고 있다. 흑각병원세균에 감염된 이병종서는 streptomycin (0.14 mM)과 streptomycin sulfate (0.042 mM) 2종의 약제를 이용하여 효과적으로 방제할 수 있을 것으로 사료되며, 흑각병원세균에 감염된 이병식물체는 streptomycin (0.05 mM, 29.0 ppm)에 copper oxide (3.6 mM, 514.8 ppm)를 첨가한 혼합제와 streptomycin sulfate (0.018 mM, 26.2 ppm)에 copper oxide (3.0 mM, 429.0 ppm) 첨가한 혼합제를 발병초기 7일간격으로 경엽처리시 감자흑각병을 효과적으로 방제할 수 있을 것으로 판단된다.

본 연구과제를 통하여 다양한 종류의 살균제를 이용하여 방제효과 실험을 검증한 결과, 타 작물 병해를 방제하기 위하여 사용되는 선발된 농약의 사용량에 비하여 50%이하의 수준만을 사용하면서도 감자흑각병을 효과적으로 방제할 수 있어, 본 연구결과를 통하여 정립된 화학방제법이 환경친화적인 것으로 판단되었다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- 흑각병원세균의 16S rRNA, ITS, RAPD primers등을 이용한 조기진단기술을 개발하여 무병종서 생산체계를 확립
- 조기진단기술을 이용한 무병감자종서 생산을 통하여 감자재배 농민들의 안정적인 농가소득에 기여
- 조기진단기술을 이용하여 이병된 수입감자의 검역으로 국내산 감자의 경쟁력 향상
- 흑각병원세균에 의한 이병종서 종서소독제로 streptomycin과 streptomycin sulfate 2종의 약제를 통한 환경친화적 방제법을 농약산업체와 농민들에게 보급
- 이병식물체에 대한 경엽처리제로 streptomycin에 copper oxide를 첨가한 혼합제와 streptomycin sulfate에 copper oxide첨가한 혼합제를 통한 환경친화적 방제법을 농약산업체와 농민들에게 보급
- 농약살포량을 줄일 수 있어 농약 저항성균주 출현 및 토양환경오염을 줄일 수 있어 청정 강원도 고랭지 농업환경과 농산물 유지에 기여
- 선발된 종서소독처리제와 경엽처리제를 전문 농약산업체에 기술 이전하고 흑각병방제 농약의 품목등록을 유도하여 농민들이 감자흑각병에 방제에 이용할 수 있음

제 6 장 참고문헌

- Alarcon, B., M. T. Gorris, M. Cambra and M. M. Lopez. 1995. Serological characterization of potato isolation of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and subsp. *carotovora* using polyclonal and monoclonal antibodies. *Journal Bacteriology* 6:592~602.
- Brenner, D.J., Steigerwalt, A.G., Miklos, G.V. and Fanning, G.R. 1973. Deoxyribonucleic and relatedness among erwiniae and other enterobacteria. I. The soft-rot erwiniae or *Pectobacterium* group. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 23: 205-216.
- Cappaert, M. R., M. L. Powelson, G. D. Franc and M. D. Harrison. 1988. Irrigation water as a source of inoculum of soft rot erwinias for aerial stem rot of potatoes. *Phytopathology* 78:1668-1672.
- Chun, J.S., Huq, A. and Colwell, R.R. 1999. Analysis of 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1437-1443.
- Cooksey, D. A. 1987. Characterization of a copper resistance plasmid conserved in copper-resistant strains of *Pseudomonas syringae* PV. *tomato. Environmental Microbiology* 53:454~456.
- Cooksey, D. A. 1990. Genetics of bactericide resistance in plant pathogenic bacteria. *Annu Rev. Phytopathol.* 28:201~219.
- Darrasse, A., A. Kotoujansky and Y. Bertheau. 1993. Isolation by genomic subtraction of DNA probes specific for *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:298-306.

- De Bore, S. H., R. J. Copenman and H. Vrugink. 1979. Serogroup of *E. carotovora* potato strains determined with diffusible somatic antigens. *Phytopathology* 69:316~319.
- De Boer, S. H. and M. E. Mcnaughton. 1987. Monoclonal antibodies to the lipopolysaccharide of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* serogroup I. *Phytopathology* 77:828-832.
- De Boer, S. H., L. Verdonck, H. Vrugink, P. Harju, H. O. Bang and D. J. Ley. 1987. Serological variation among potato blackleg causing *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* strains. *Journal Appl. Bacteriol.* 63:487-495.
- Delp, C. J. 1988. Fungicide resistance in *North American*. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minn., 133pp.
- Dye, D. W. 1968. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. I. The amylovora group. *N. Z. J. Sci.* 11:590-607.
- Dye, D. W. 1969. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. II. The carotovora group. *N. Z. J. Sci.* 12:81-97
- Elad, Y., H. Yunis and T. Katan. 1992. Multifungicide resistance to benzimidazoles, dicarboximides and diethofencarb in field isolates of *Botrytis cinerea* in Israel. *Plant Pathology* 41:41~46.
- Elizabeth, A. and K. Arther. 1977. Immunofluorescent stain procedures for detection and identification of *E. carotovora* subsp. *atroseptica*. *Phytopathology* 67:1305~1312.

- Fahy, P. C. and G. J. Persley. 1983. Plant bacterial disease a diagnostic guide. *Academic Press*. pp.87~101.
- Fujimura, M. 1993. A new fungicide diethofencarb to cope with benzimidazole resistance. *Japan Plant Protection* 47:26~29.
- Gallois, A., Samson, R., Ageron, E. and Grimont, A. A. D. 1992. *Eriwinia carotovora* subsp. *oderifera* subsp. nov., associated with odorous soft rot of chicory (*Cochorium intybus* L.) *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42:582-588.
- Garcia-Martinez, J., Martinez-Murica, A. J. and Rodriguez-Val-era, F. 1996. Comparison of the small 16S to 23S intergenic spacer region (ISR) of rRNA operon of some *Escherichia coli* strains of ECOR collection and *E.coli* K-12. *J. Bacteriol.* 178:6374-6377.
- Gorris, M. T., B. Alarcon, M. M. Lopez and M. Cambra. 1994. Characterization of monoclonal antibodies specific for *E. carotovora* subsp. *atroseptica* and comparison of serological methods for its sensitive detection on potato tubers. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(6):2076~2085.
- Goto, M. and Matsumoto, K. 1987. *Eriwinia carotovora* subsp. *wasabiae* subsp. nov. isolated from diseased rhizomes and fibrous roots of Japanese horseradish (*Eutrema wasabiae* Maxim). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37:130-135.
- Jean, G. P., D. P. Lacroix and L. Vezina. 1996. Identification of *Erwinia carotovora* from soft rot diseased plants by random amplified polymorphic DNA(RAPD) analysis. *Plant Disease* 80:494~499.

- Josepovis, G., M. Gasztonyi and G. Mikite. 1992. Negative cross-resistance to *N*-phenylanilines in benzimidazole-resistant strains of *Botrytis cinerea*, *Venturia* and *Venturia inaequalis*. *Pestic. Sci.* 35:237~242.
- Kennedy, B.W. 1980. *Plant Disease* 64:674~676.
- Kumar, s., Tamura, K. and Nei, M. 1993. MEGA: molecular evolutionary genetics analysis, version 1.0. The Pennsylvania State University, University Park.
- Kwon, S. W., Go, S. J., Kang, H. W., Ryu, J. C. and Jo, J. K. 1997. Phylogenetic analysis of *Eriwinia* species based on 16S rRNA gene sequences. *Int. j. Syst. Bacteriol.* 47:1061-1067.
- Kwon, S. W., Go, S. J., Kang, H. W., Cheun, M. S. and Ryu, J. C. 1998. Phylogenetic analysis of fluorescent *Pseudomonas* spp. isolated the cultivated mushrooms on the basis of ITS I region. *Korean J. Plant Pathol.* 14:350-357.
- Kwon, S. W., Cheun, M. S., Kim, S. H. and Lim, C. K. 2000. Phylogenetic analysis of *Pectobacterium* species using the 16S-23S rRNA intergenic spacer regions. *Plant pathol. J.* 16(2): 98-104.
- Leroux, P. and M. Gredt. 1989. Negative cross-resistant of benzimidazole-resistant strains of *Botrytis cinerea*, *Fusarium nivale* and *Pseudocercospora herpotrichoides* to various pesticides. *Neth. Journal Plant Pathol.* 95 Supplement 1:121~127.
- Lund, B. M. 1979. Bacterial soft rot of potatoes. In *Soc. Appl. Bacteriol tech. Ser. 12. Plant Pathogens*, eds., D. W. Lovelock, and R. Davies, pp.14~49. London: Academic.

- McDougal, J. ed. 1996. In Agrochemical service. *Wood Mackenzie*, Scotland.
- Mellano, M. A. and D. A. Cooksey. 1988. Induction of the copper resistance operon from *Pseudomonas syringae*. *Journal of Bacteriol.* 170:4399~4401.
- Meneley, J. C. and M. E. Stanghellini. 1976. Isolation of soft-rot *Erwinia* spp. from agricultural soils using an enrichment technique. *Phytopathol.* 66:367-370.
- Michel, C. M. P. and K. Arthur. 1980. Ecology of the soft rot *Erwinia*. *Ann. Rev. Phytopathol.* 18:361~387.
- Molina, J. J. and M. D. Harrison. 1977. The role of *Erwinia carotovora* in potato blackleg. Relationship of *E. carotovora* var. *carotovora* and *E. carotovora* var. *atroseptica* to potato blackleg in Colorado. *Am. Potato J.* 54:587-591.
- Perombelon, M. C. M. 1980. Ecology of the soft rot erwinias. *Annu. Rev. Phytopathol.* 18:361-387.
- Perombelon, M. C. M. and A. Kelman. 1987. Blackleg and other potato diseases caused by soft rot erwinias: proposal for revision of terminology. *Plant Dis.* 71:283-285.
- Pollastro, S. and F. Faretra. 1992. Genetic characterization of *Botryotinia* (*Botrytis cinerea*) field isolates coupling high resistance to benzimidazoles to insensitivity toward the N-phenylcarbamate diethofencarb. *Phytopath. Medit.* 31:148~153.

- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
- Schaad, N. W., Jones, J. B. and Chun, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, Third edition. p56-72.
- Smith, C. and J. A. Bartz. 1990. Variation in the pathogenicity and aggressiveness of strains of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* isolated from different hosts. *Plant Dis.* 74:505-509.
- Stanghellini, M. E. and J. C. Meneley. 1975. Identification of soft-rot *Erwinia* associated with blackleg of potato in Arizona. *Phytopathology* 65:86-87.
- Stommel, J. R., R. W. Goth, K. G. Haynes and K. H. Seong. 1996. Pepper (*Capsicum annuum*) soft rot caused by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Plant Disease* 80:1109~1112.
- Thomson, S. V., Hildebrand, D. C. and Schroth, M. N. 1981. Identification and nutritional differentiation of the erwinia sugar beet pathogen from members of *Erwinia carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. *Phytopathology* 71:1037-1042
- Vernon-Shirley, M. and R. Burns. 1992. The development and use of monoclonal antibodies for detection of *Erwinia*. *Journal Appl. Bacteriol.* 72(2):97~102.
- Ward, L. J. and S. H. De Boer. 1989. Characterization of a monoclonal antibody against active pectate lyase from *Erwinia carotovora*. *Can. J. Microbiol.* 35:651-655.

- Ward, L. J. and S. H. De Boer. 1993. Specific detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* with a digoxigenin-labeled DNA probe. *Phytopathology* 84:180-186.
- Yakrus, M. and Schaad, N. W. 1979. Serological relationships among strains of *Erwinia chrysanthemi*. *Phytopathology* 69:517-522
- 김덕규. 1998. 치커리 세균성 무름병원균(*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*)의 항혈청 생산 및 ELISA 검정. 석사학위논문. 강원대학교.
- 김영철, 송동엽, 조백호, 정갑채, 김기청. 1993. 식물 세균성 연부병균 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*의 Tn5 유발 약병원성 돌연변이주의 선발. 한국식물병리학회지 9:63~69.
- 농약공업협회. 2002. 농약사용지침서.
- 박덕환. 1997. 대관령 원예작물에 발생하는 세균성 무름병에 관한 연구. 석사학위논문. 강원대학교.
- 박덕환, 김준섭, 이흥구, 함영일, 임춘근. 1999. *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*에 의한 감자 흑각병. 식물병과 농업 5(1):64~66.
- 이승돈. 1999. 한국의 주요 식물세균병 발생 및 특성. 박사학위논문. 서울대학교.
- 이영근, 김령희. 1996. *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*에 의한 메론의 세균성무름병 발생. 한국식물병리학회지 12(1):116~120.
- 장병호. 1997. 감자백과.

조용섭, 박창석, 이순구, 이영근, 임춘근, 차재순, 최용철, 최재을, 허성기, 황인규.
1999. 식물세균병학 pp.25~28.

주영철. 2002. 감자흑각병의 환경친화적 화학적방제법 연구. 석사학위논문. 강원대
학교.

함영일. 1996. 감자 바이러스의 발생과 방제대책. 식물병과 농업 2(1):1~14.

함영일. 1998. 고령지 주요 재배작물 병해 종류조사. 1998년 시험연구사업보고서.
고령지농업시험장. pp.236~242.

허장현. 1999. 환경친화적 기술에 의한 고령지 감자흑각병의 종합적 방제. 농림수
산특정연구과제(신청)계획서. pp.2~3.

주 의

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