

참다래 궤양병의 간편한 병원성 검정법 개발

고숙주* · 이용환 · 차광홍 · 박기범¹ · 박인진 · 김영철²

전남농업기술원 시험연구국, ¹신젠타코리아, ²전남대학교 응용식물학부

An Improved Method for Testing Pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* Causing Bacterial Canker of Kiwifruit

Sug-Ju Ko*, Yong-Hwan Lee, Kwang-Hong Cha, Ki Beum Park¹,
In-Jin Park and Young Cheol Kim²

Jeonnam Agricultural Research and Extension Services, Naju 520-715, Korea

¹Syngenta Korea Co. Gwangju 502-280, Korea

²Applied Plant Science Division and Agricultural Plant Stress Research Center,

College of Agriculture and Life Science, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

(Received on November 26, 2002)

This research was conducted to develop a simple and effective method for pathogenicity assay of the causal agent of bacterial canker on kiwifruit. The developed method is a modified version of syringe-infiltration method that is used in the assay for the hypersensitive response assay. Bacterial cell suspensions in 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.5) were infiltrated using a plastic syringe with 25G needle into primary leaves of five-year-old kiwifruit. Typical symptoms of bacterial canker were observed five days after infiltration. Symptoms developed on the leaves were detected in these inocula that treated above 10⁴ cfu/ml or above. Using this technique, host range of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and three other plant pathogenic pseudomonads were investigated for 25 different plant species. The various symptoms were showed depending on different plant species and inoculated pathogen combinations. This method has the advantage that symptoms can be showed faster compared to other methods and high humid conditions are not required.

Keywords : bacterial canker, injection method, kiwifruits, pathogenicity test, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*

참다래(*Actinidia deliciosa* C. F. Liang et A. R. Ferguson)는 중국남부가 원산지인 아열대과수이기 때문에 남해안 지역에서 재배되고 있으며 그 재배면적은 전남지역이 전국 57%를 차지하고 있다. 참다래 궤양병(*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*)은 미국, 일본, 이탈리아, 이란 등에서 보고되었고(Opgenorth 등, 1983; Takikawa 등, 1989; Scortichini, 1994; Mazarei & Mostofipour, 1994), 고 등 (1992, 1994)이 1987년 제주도 증산간지에서 국내에서는 최초 발생을 보고하였고, 1990년대 이후 전남 해남, 완도, 고흥지역 등 남해안 재배지역에서 발병이 확산되고 있다고 보고하였다. 참다래 궤양병은 일부 재배주산지에서 치

명적인 병으로서 가장 큰 피해를 주어 전남에서는 22.8 ha가 폐원되었다(고 등, 2002).

이 병의 발생은 월동 후인 2-4월에 격심하게 나타나 가지나 줄기에 피해를 주는 경우와 그 후 잎이나 신초에 발생하는 경우로 나눌 수 있으나(家城, 1992; Opgenorth 등, 1983; 芹澤·市川, 1993b,c; Serizawa 등, 1989), 줄기나 가지에서 병원균의 분리가 어렵고 병원성 검정법도 줄기접종법(Opgenorth 등, 1983)은 *In vitro* 실험으로 시험관내에서 줄기에 상처접종하며 많은 시간과 노력이 필요하다. 참다래 잎에 침 접종 및 분무접종(Takikawa 등, 1989; 芹澤·市川, 1993a)은 *In vivo* 실험이지만 접종 후 높은 습도가 요구되어 까다로운 실험조건을 필요로 한다. 따라서 이 연구는 참다래 궤양병의 간편한 병원성 검정법을 개발하였으며, 새로 개발된 방법과 기존 사용되고 있는 방법을 비교하였으며, 새로운 방법을 이용하여 참다래 궤양

*Corresponding author
Phone)+82-61-330-2686, FAX)+82-61-336-4076
E-mail)kosj@jares.go.kr

병의 기주범위를 조사하였다.

본 연구에서 개발된 주사접종 방법을 기존에 보고된 참다래 궤양병의 접종법인 침접종, 분무접종법, 도말법으로 참다래 잎에 접종하여 검정효율을 비교하였다. 이 연구에서는 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* KACC 10754 균주를 peptone sucrose agar(PSA : peptone 20 g, sucrose 20 g, agar 15 g per liter) 평판배지에서 25°C, 48시간 배양한 것을 접종원으로 사용하였다. 대형 포트에 식재하여 무가온(無加溫) 하우스에서 길러온 5년생 참다래 Hayward 품종을 실험재료로 사용하였다. 새로 개발된 주사접종법은 담배 과민성반응 검정법을 변형한 방법으로 참다래 잎 뒷면에 주사기를 이용하여 10⁸ cfu/ml 농도의 세균현탁액을 엽육에 주입하였다. 침접종(Takikawa 등, 1989)은 침으로 잎에 상처를 준 후 현탁액을 30 µl 적하하였다. 또한, 분무접종은 잎에 현탁액을 살포한 후 비닐백으로 24시간 밀봉하여 습도를 유지시켰으며, 도말법은 현탁액을 잎에 적하한 후 노란 피펫팁(200 µl 전용)으로 문질러서 상처를 주면서 도말접종하였다.

주사접종은 접종 2일 후부터 병반이 나타나기 시작하였고 병반주위에 다각형 갈색반점을 동반한 대형 괴사병반을 형성하였으며, 잎 뒷면에는 수침 증상을 보였다. 대조구로서 세균 현탁액 조제시 사용된 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.5)을 주사한 부위에는 아무 병반이



Fig. 1. Bacterial canker symptoms on primary leaves of kiwifruit inoculated with 10⁸ cfu/ml of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* KACC 10754 by various inoculation methods: (A) Injection, (B) Spraying, (C) Pin-prick, (D) Rubbing. Each challenge was with 10⁸ cfu/ml of bacterial suspension by: (A) injection with a 25 gauge needle into the leaf intercellular space of kiwifruit, cv. 'Hayward'; (B) spraying to run-off; (C), placement of droplets on the wound site in the leaf made by pricking with a number five needle; (D) rubbing by yellow pipette tip on the leaf surface that had been dropped a 200 µl of bacterial suspension.

Table 1. Effect of cell densities of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on bacterial canker development by injection method^a

Replications	Inoculated bacterial densities (cfu/ml)							
	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
Trial I	++	++	++	+	-	-	-	-
Trial II	++	++	++	+	+	-	-	-

^aDefined concentrations of *P. syringae* pv. *actinidiae* KACC 10754 were inoculated into the leaf intercellular space of kiwifruit, cv. 'Hayward' with a 25 gauge needle with syringe. The presence of brown necrotic symptoms was scored two days after injection. ++: symptom developed at 4 days after inoculation, +: symptom developed at 10 days after inoculation, -: no symptoms developed at 10 days after inoculation.

형성되지 않았다. 침접종은 접종 5일후부터 접종부 주변에 황색 달무리를 동반한 괴사병반을 형성하였다. 도말접종은 접종 5일후부터 다각형 갈색반점을 형성하였으나 분무접종은 7일후부터 다각형 갈색반점을 형성하였다. 4가지 방법 중 주사접종법은 접종한 모든 부위에 거의 대부분 궤양병의 병징을 보였으나, 나머지 방법은 접종 부위에 형성되는 궤양병 병징 형성이 떨어지는 경향이 있었다 (Fig. 1). 또한 주사접종법은 습도조건과 온도에 영향을 받지 않고 병징이 2일후부터 보이기 시작하여 4일후면 병원성을 판정할 수 있어 검정기간이 짧은 장점이 있었다. 하지만 다른 3가지 방법은 대체적으로 5일후부터 병징을 보였으며 8일이 경과한 후에 병징을 판단할수 있었다 (Table 1). 주사접종을 이용하여 병반 형성에 필요한 최소 병원균 접종 농도를 알아보기 위해 10¹~10⁸ cfu/ml의 궤양병균을 2회에 걸쳐 접종해 본 결과 10⁴ cfu/ml과 10⁵ cfu/ml이 병징 형성에 필요한 최소한의 병원균의 밀도였고, 10⁶ cfu/ml이하에서는 병징이 10일후에 나타나 다소

Table 2. Comparison of the various inoculation methods for pathogenicity assay of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*

Inoculation method ^a	Factors involved in pathogenicity test		
	High moisture condition	Times required for symptom development (days)	Development of symptoms ^b
Injection	not required	2-4	+++
Spray	required	7-10	+
Pin-prick	required	5-8	++
Rubbing	required	5-8	++

^aInoculation methods were followed as described in Fig. 1 In spray, pin-prick, and rubbing method, inoculated leaves were sealed with vinyl bag for 24 hours to maintain high humid.

^b+++; All inoculated sites showed symptoms, ++; 75% of inoculated sites showed symptoms, +; 50% of inoculated sites showed symptoms.

병징 발현이 늦어지는 경향이였다(Table 2). 그러나 10^6 cfu/ml 이상에서는 병징 형성은 2-4일 후에 나타나 차이가 없었다.

주사접종법으로 병원성이 확인된 균주를 Opgenorth 등 (1983)의 방법을 변형하여 수액 이동전(2월중순~하순)에 종방향으로 줄기 수피를 1 cm 절개하여 10^8 cfu/ml 농도의 세균현탁액을 200 μ l 접종 후 랩으로 감싸서 밀봉하여 습도를 유지하였으며 적갈색 수액을 유출하는 수피터짐 증상을 4월까지 관찰하였다. 줄기에서는 수액이 이동하는 3월부터 접종부위에서 적색의 수피터짐 증상을 유발하였다. 이러한 병징은 케양병 발생과원에서 관찰되는 병징과 일치하였고, 주사접종법에 의해 병원성이 발현된 모든 균주에서 적색의 수피터짐 증상을 나타내었다.

기주범위는 사과, 살구, 앵두, 매실, 고추, 콩, 오이 등

9과 25종에 대하여 위와 같은 주사접종법을 이용하여 병징을 조사하였다. 오이, 벼, 옥수수, 강낭콩, 콩, 녹두, 팥, 담배, 고추, 가지는 직경 10 cm 포트에 재식하여 온실에서 접종하였다. 나머지 목본식물은 전남농업기술원내 과수재배포장에서 새로 전개된 신초에 10^8 cfu/ml 농도의 세균현탁액을 주사접종하였다. 감에서는 참다래와 유사한 병징을 보였으며 4일 후에 병징을 보였다. 복숭아, 유자, 가지, 녹두, 강낭콩, 옥수수, 오이에서는 달무리를 동반한 괴저 병징을 형성하였고, 무화과는 달무리 병징을 형성하였다. 사과, 배, 뽕나무, 고추, 토마토, 담배, 콩, 팥, 동부는 괴저 병반을 형성하였다. 반면에 매실, 자두, 체리, 포도, 벼는 병징을 나타내지 않았다. 살구, 유자, 가지, 녹두, 강낭콩, 무화과, 배, 뽕나무, 고추, 토마토, 콩, 팥, 동부, 오이는 담배와 같이 접종 2일 후부터 병징을 나타내 과민

Table 3. Pathogenicity of four pathovars of *Pseudomonas syringae* on various plants using the injection inoculation method

Family	Common name of plant	Types of symptom developed by various <i>P. syringae</i> pathovars ^a			
		<i>actinidiae</i>	<i>syringae</i>	<i>tabaci</i>	<i>tomato</i>
Rosaceae	Apple	N	NH	-	-
	Apricot	NH	NH	NH	-
	Chinese bush cherry	NH	NH	-	-
	Japanese apricot	-	N	-	-
	Plum	-	N	-	-
	Peach	NH	NH	N	-
	Pear	N	N	N	-
	Manchu cherry	N	NH	NH	-
	Cherry	-	-	-	-
Vitaceae	Grapevine	-	J	J	-
Moraceae	Fig	H	N	N	N
Ebenaceae	Persimmon	J	J	J	J
Rutaceae	Citron	NH	NH	NH	-
Solanaceae	Egg plant	NH	N	N	H
	Hot pepper	N	N	N	J
	Tomato	N	NH	N	N
	Tobacco	N	N	N	-
Leguminosaceae	Bean	N	NH	NH	-
	Red-bean	N	J	J	J
	Green-bean	NH	NH	NH	NH
	Cowpea	N	N	N	-
	Kidney-bean	NH	NH	NH	-
Gramineae	Corn	NH	-	-	-
	Rice	-	-	-	-
Cucurbitaceae	Cucumber	NH	NH	NH	-

^aSymptom was investigated four days after inoculation. J : Brown water-soaked symptoms with halo, NH : Necrotic symptoms with halo, N : Necrotic symptoms, H : Brown spot with halo, - : No symptom.

성반응으로 추정되었다(Table 3). 그러나 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*의 접종에 의해 괴저병반이나 황색 달무리가 형성된 식물이 이 병원균의 기주라는 것을 의미하는 것은 아니며, 앞으로 Koch's postulate에 의해 각 식물에 대한 참다래 궤양병균의 병원성을 제고해 볼 필요가 있을 것으로 사료된다. 본 연구에서 개발한 주사접종방법은 참다래 잎에 궤양병균을 주사하여 간편하게 병원성을 확인할 수 있는 방법으로 추천하고자 한다.

요 약

참다래 궤양병의 간단하고 효율적인 병원성 검정법을 개발하고자 수행하였다. 이 검정법은 과민성반응(hypersensitive reaction) 검정법을 변형한 것으로 병원균을 50 mM 인산 완충액(pH 7.5)에 현탁하여 5년생 참다래 상위엽에 주사기를 이용하여 엽육세포에 주입하였다. 병징은 접종 2일 후부터 보이기 시작하여 4일 후에 판정이 가능하였으며 검정한계 농도는 10^4 cfu/ml이었다. 주사접종법을 이용하여 25종에 대한 기주범위를 검정하였을 때 병원균과 기주에 따라 여러 가지 병징을 보였다. 이 검정법은 습도와 관계 없이 빠르게 병징을 나타내는 효과적인 방법이었다.

참고문헌

家城洋之. 1992. わが國で發生しているキウイフルーツの病害. 植物防疫 46: 287-290.
고숙주, 이용환, 차광홍, 이승돈, 김기청. 2002. 참다래 궤양병

발생상황과 시설재배에 의한 방제. 식물병연구 8(3): 179-183.
고영진, 차병진, 정희정, 이동현. 1994. 참다래 궤양병의 격발 및 확산. 한국식물병리학회지 10: 68-72.
고영진, 이동현. 1992. *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*에 의한 키위궤양병. 한국식물병리학회지 8: 119-122.
Mazarei, M. and Mostofipour, P. 1994. First report of bacterial canker of kiwifruit in Iran. *Plant Pathology* 43: 1055-1056.
Opgenorth, D. C., Lai, M. and White, J. B. 1983. *Pseudomonas* canker of kiwifruit. *Plant Disease* 67: 1283-1284.
Scortichini, M. 1994. Occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on kiwifruit in Italy. *Plant Pathology* 43: 1035-1038.
芹澤拙夫, 市川 健. 1993a. キウイフルーツかいよう病の發生生態 1. 新梢への傳染方法および病原細菌の組織内移行. 日植病報 59: 452-459.
芹澤拙夫, 市川 健. 1993b. キウイフルーツかいよう病の發生生態 2. 新梢における主要感染時期と發病環境. 日植病報 59: 460-468.
芹澤拙夫, 市川 健. 1993c. キウイフルーツかいよう病の發生生態 3. 新梢の病斑における細菌密度および飛散の時期的變化. 日植病報 59: 469-476.
Serizawa, S., Ichikawa, T., Takikawa, Y., Tsuyumu, S. and Goto, M. 1989. Occurrence of bacterial canker of kiwifruit in Japan: Description of symptoms, isolation of the pathogen and screening of bactericides. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*. 55: 427-436.
Takikawa, Y., Serizawa, S., Ichikawa, T., Tsuyumu, S. and Goto, M. 1989. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* pv. nov.: The causal bacterium canker of kiwifruit in Japan. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*. 55: 437-444.