

## 사과나무에서 가지검은마름병 억제를 위한 효율적 가지치기

## Controlling by Effective Pruning of Twigs Showing Black Shoot Blight Disease Symptoms in Apple Trees

한규석<sup>1</sup> · 유지강<sup>2</sup> · 이한별<sup>2</sup> · 오창식<sup>2</sup> · 예미지<sup>3</sup> · 이종호<sup>3</sup> · 박덕환<sup>1\*</sup><sup>1</sup>강원대학교 생물자원과학부 응용생물학전공, <sup>2</sup>경희대학교 원예생명공학과, <sup>3</sup>농림축산검역본부Kyu Suk Han<sup>1</sup>, Ji-Gang Yu<sup>2</sup>, Han-Beoyl Lee<sup>2</sup>, Chang-Sik Oh<sup>2</sup>, Mi Chi Yea<sup>3</sup>,  
Jong-Ho Lee<sup>3</sup>, and Duck Hwan Park<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Applied Biology Program, Division of Bioresource Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea<sup>2</sup>Department of Horticultural Biotechnology, Kyung Hee University, Yongin 17104, Korea<sup>3</sup>Animal and Plant Quarantine Agency, Gimcheon 39660, Korea

## \*Corresponding author

Tel: +82-33-250-6432

Fax: +82-33-259-5558

E-mail: dhp@kangwon.ac.kr

Black shoot blight disease caused by *Erwinia pyrifoliae* have damaged economic loss to apple and pear growers until now since it was firstly reported in 1995 in Korea. This study was performed to reduce economic loss by mandatory eradication of all infected trees in case of more 10% disease incidence per orchard as official control. It also aims to set up effective management protocol for this disease by examining how far bacterial pathogen is present from the border of symptomatic and asymptomatic regions in infected apple twigs. Colony-PCR using isolated bacterial cells instead of genomic DNA was used to identify bacterial pathogen, EpSPF/EpSPR primer designed in enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) region was selected as specific for *E. pyrifoliae*. As results of monitoring of this disease during April to October in 2014–2015 by colony-PCR, occurrence of this disease was frequent from mid-May to early-July, when daily average temperature was around 25°C. Moreover, bacterial cells were continuously detected only in symptomatic regions and also asymptomatic regions of less than 20 cm from symptomatic regions. Therefore, we concluded that pruning of infected twigs at the region of more than 20 cm from symptomatic regions might be effective to manage black shoot blight disease in apple trees.

**Keywords:** Apple, Black shoot blight, Colony-PCR, *Erwinia pyrifoliae*, Management

Received 0 00, 2016

Revised 0 00, 2016

Accepted 0 00, 2016

## 서 론

과수 가지검은마름병(black shoot blight)은 1995년 강원도 춘천근교의 배(*Pyrus pyrifolia* cv. 'Shingo') 과원에서 최초로 관찰되었다. 병징은 엽면의 흑갈색 반점형성과 괴사증상, 잎의 주맥을 따라 흑갈색 줄무늬가 형성되었으며, 이러

한 증상은 줄기전체로 확산되어 개화기와 착과기에는 각각 꽃과 미성숙과에 마름 및 괴사증상이 나타났다. 이는 사과 및 배 화상병(fire blight)의 병징과 매우 유사하여, 당시에는 국내에서 화상병이 발생한 것으로 오인되어 많은 논란을 야기시켰던 대표적 세균성 과수병해이다. 그러나 병원세균의 배양적, 혈청학적 및 유전학적 특성을 분석한 결과, 화상병의 병원세균인 *Erwinia amylovora*와는 특성이 완전히 다른 병원세균으로 확인되었으며(Rhim 등, 1999), 1999년

## Research in Plant Disease

pISSN 1598-2262, eISSN 2233-9191

www.online-rpd.org

©The Korean Society of Plant Pathology

©This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Kim 등(1999)에 의해 새로운 신종인 *Erwinia pyrifoliae*로 명명되어 국내에서 발생하는 사과 및 배 가지검은마름병의 원인세균으로 공시되었다.

이후 농림축산식품부 및 농촌진흥청에서 1995년부터 2016년까지 지속적인 모니터링을 실시한 결과, 2007년과 2010년을 제외한 매년 가지검은마름병 발생이 조사되었다(농림축산식품부, 가지검은마름병 발생경과 및 조치사항 참조). 특히 2016년에도 강원도 춘천, 홍천 및 횡성 그리고 경기도 포천 사과과원에서 발생이 확인되었다. 이러한 주기적 모니터링 이외 가지검은마름병에 대한 발병원인, 전염경로 및 억제기술 등에 관한 연구는 사실 전무한 실정이다. 반면 화상병의 경우 개화시기 화분매개충에 의해 꽃을 통해 발병하고(Bayot와 Ries, 1986; Hildebrand 등, 2000), 이병 가지 제거에 의한 구체적 관리방안 등에 관한 연구가 다수 수행되었다(Johnson, 2000; Sundin, 2014; Wilcox, 1994).

따라서 본 연구에서는 2년간의 정기적 모니터링을 통해, 가지검은마름병의 발생온도 및 시기 규명과 병징이 나타나는 이병조직으로부터 건전조직 내 병원세균의 존재를 확인하여 이병주의 무조건적인 제거가 아닌 병원세균 검출 부위만을 제거하는 효율적 가지치기 방법을 통한 관리방안을 마련하기 위하여 수행되었다.

## 재료 및 방법

**이병체 수집 및 병원세균 분리.** 농림축산식품부 “가지검은마름병 발생경과 및 조치사항”에 따라 2013년 가지검은마름병 발생이 최초 확인되고 이후 2015년까지 지속적으로 병 발생이 확인된 경기도 포천시 소재 사과나무 과수원에서 이병체를 수집하였다. 수집기간은 2014년과 2015년 총 2년에 걸쳐 실시하였고 개화직전 단계인 4월부터 수확기인 10월까지였으며, 2014년은 7회(4월 29일, 6월 5일, 6월 19일, 7월 1일, 8월 5일, 8월 21일 및 10월 2일), 2015년은 13회(4월 17일, 5월 1일, 5월 15일, 5월 29일, 6월 12일, 6월 26일, 7월 10일, 7월 27일, 8월 7일, 8월 21일, 9월 4일, 9월 18일 및 10월 2일) 수집하였다. 수집 시 4월과 5월은 사과나무에서 어떠한 유사 증상도 관찰할 수가 없어 건전 줄기 및 잎을 채취하였으며, 이후에는 전형적인 마름증상의 이병조직이 관찰되어 이를 중심으로 수집하였고, 9월 이후는 수확 및 출하시기로 성숙과실만을 대상으로 하였다.

병원세균의 분리는 수집된 시료를 ice box에 보관하여 실험실로 이동한 후, 24시간 이내에 수행하였다. 각 수집된 꽃, 가지, 잎 그리고 과실은 멸균된 면도칼을 이용하여 직경 3

mm로 잘라 70% 에탄올에서 5분, 멸균수 각 5분 3회 세척하여 건조 후, 각 조직을 멸균수에서 마쇄한 후, 10배 희석법으로  $10^{-3}$ 까지 희석하여 mannitol glutamate yeast extract (MGY; D-mannitol 10 g, L-glutamic acid 2 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 g, NaCl 0.2 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g, yeast extract 1 g, agar 15 g/l, pH 7.0) 배지에 도말하여 28°C에서 24시간 배양하였다. 이때 성숙과실은 과실자루와 과실표면 및 내부로 나누어 분리하였다. 배양 24시간 후 형성되는 모든 균총들은 크기, 색 및 모양 등의 성상에 따라 동일 배지에 순수분리하여 가지검은마름병원세균의 성상과 비교하였다.

**Colony-PCR을 위한 특이 프라이머 선발.** 수집된 시료로부터 가지검은마름병원세균의 신속한 검출을 위하여, genomic DNA 추출과정 없이 각 균총들로부터 직접 PCR 반응을 통한 검출로 수행되었다. 이에 성상이 다른 단일 균총들 중에서 가지검은마름병원세균과 가장 유사한 성상을 나타내는 균총들을 이용하여 colony-PCR용 프라이머를 선발하였다. Colony-PCR용 프라이머 후보균들은 기존에 genomic DNA를 이용한 PCR 반응에서 가지검은마름병 특이 프라이머로 보고된 것과 본 연구에서 병원성 및 house-keeping 유전자를 활용하여 개발된 프라이머들을 대상으로 가지검은마름병 검출 특이 colony-PCR용 프라이머들을 선발하였다(Table 1) (Bereswill 등, 1995; Kim 등, 2001a, 2001b; Park 등, 2010; Shrestha 등, 2005b, 2007). 또한 가지검은마름병원세균의 균총 특성은 화상병원세균과도 매우 유사하기에, 이를 구별할 수 있는 화상병원균 특이 프라이머도 포함시켰다(Table 1). Colony-PCR 조건은 멸균수 36.5  $\mu\text{l}$ 에 단일 균총을 이주시개를 이용하여 소량 현탁하고 100°C에서 3분간 가열한 후, 10x buffer (1 M KCl, 1 M Tris-HCl, pH 8.0, 1 M  $\text{MgCl}_2$ ) 5  $\mu\text{l}$ , 30% DMSO 5  $\mu\text{l}$ , 20 mM dNTP 0.5  $\mu\text{l}$ , 각 10  $\mu\text{M}$  forward 및 reverse 프라이머 1  $\mu\text{l}$ , Taq polymerase (handmade type) 1  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 총 50  $\mu\text{l}$  부피에서 수행되었다. 반응시간은 95°C 2분 후, 94°C 15초, 각 프라이머 종류별 annealing conditions (Table 1), 68°C 1분 30초 조건으로 총 35회 반응하였으며, 최종 68°C 10분으로 extension을 완성하였다. Colony-PCR 산물의 확인은 1% agarose gel 전기영동을 수행하여 ethidium bromide (1 mg/ml)에 염색시킨 후 UV transilluminator에서 각 특이 프라이머 종류별 예상 크기의 밴드생성 유무를 확인하였다. 각 프라이머 종류별 특이 밴드 검출 생성 여부는 1995년 춘천에서 분리된 WT3 균주(Shrestha 등, 2003) 및 1996년 분리균주인 Ep1 (Kim 등, 1999)을 대조균주로 활용하였으며, 화상병원균주는 type strain인 ATCC15580을 사용

**Table 1.** Primers used in this study

Primers	Sequences 5'-3'	Expected size (bp)	Target species	Annealing condition*	Source or reference
AMSbL	GCTACCAGCAGGGTGAG	1,600	Ea	49°C, 2 min	Bereswill 등, 1995
AMSbR	TCATCACGATGGTGATG				
P29A	CGGTTTTTAACGCTGGG	1,000	Ea	52°C, 2 min	Kim 등, 2001a
P29B	GGGCAAATACTCGGATT				
EP16A	AGATGCGGAAGTGCTTCG	730	Ep	52°C, 2 min	Kim 등, 2001a
EPIG2c	ACCGTTAAGGTGGAATC				
EpERF	GCGGTCATAGTGGCAATGAT	638	Ep	58°C, 30 sec	Park 등, 2010
EpERR	GCACCTGCGATGCAAAGATG				
EpSPF	AAAGGCGCAGGGCCTGATGA	573	Ep	55°C, 30 sec	Shrestha 등, 2007
EpSPR	GCACCTGCGATGCAAAGATG				
hrpNEpF1	GTGGTTTAACGGGGCTGCTG	1,100	Ep	64°C, 15 sec	Shrestha 등, 2005b
hrpNEpR1	AGCTTAAGCCGCGCCAG				
CPS1	CGCGGAAGTGGTGAGAA	1,200	Ep	52°C, 15 sec	Kim 등, 2001b
CPS2c	GAACAGATGTGCCGAGTA				
recAF	CAATTTGGCATCGATTCGTT	565	Ep	55°C, 30 sec	This study
recAR	AGGGGCAGTAGATGTCATCA				
dspEF	ATGCCAGCTTTTGCAGGCTGT	449	Ep	55°C, 30 sec	This study
dspER	TTTCACCTCTGGCGAGTTTG				
gyrAF	GCTGCAGACCTCTTTTGTA	1,099	Ep	55°C, 30 sec	This study
gyrAR	GCTACCGCTAGTCAGCGAAA				

Ea, *Erwinia amylovora*; Ep, *Erwinia pyrifoliae*.

\*Annealing conditions are modified for colony-PCR rather than genomic PCR condition as described on original references.

하여 비교 분석하였다.

**발생지 온도 측정.** 가지검은마름병의 발생과 온도와 관계 분석하기 위해 시료수집 장소에 Humidity/Temp. data recorder (MHT-381SD; Lutron Electronic Enterprise Co., Taipei, Taiwan)를 설치하여 10분 간격으로 온도를 측정하였다. 일일 평균온도=[(일 최고기온+일 최저기온)/2]로 산정하여 일 평균온도에 따른 가지검은마름병 발생상황을 분석하였다.

**이병조직으로부터 거리에 따른 가지검은마름병원세균 검출.** 2014-2015년 동안 이병조직으로부터 가지검은마름병원세균이 검출된 기간 내의 시료들 중에서, 2014년 6월 5일, 6월 19일 및 7월 1일, 그리고 2015년 6월 12일 수집된 이병줄기는 이병조직과 건전조직을 명확히 구분할 수 있었다. 이에 건전조직 내 이병조직으로부터 거리에 따라 병원세균의 존재유무를 확인하였다. 이 시기에 수집된 줄

기는 모두 2년생 이상 줄기로 직경이 1 cm 이상이어서 병원균 분리를 위한 마쇄가 용이하지 않아, 멸균된 면도칼을 이용하여 잘게 분쇄 후 멸균수에 침지하여 10분간 정치하고 vortexing한 후, 다른 조직으로부터의 분리과정과 동일하게 배양하여 성장하는 단일 균총을 순수분리하였다.

## 결과 및 고찰

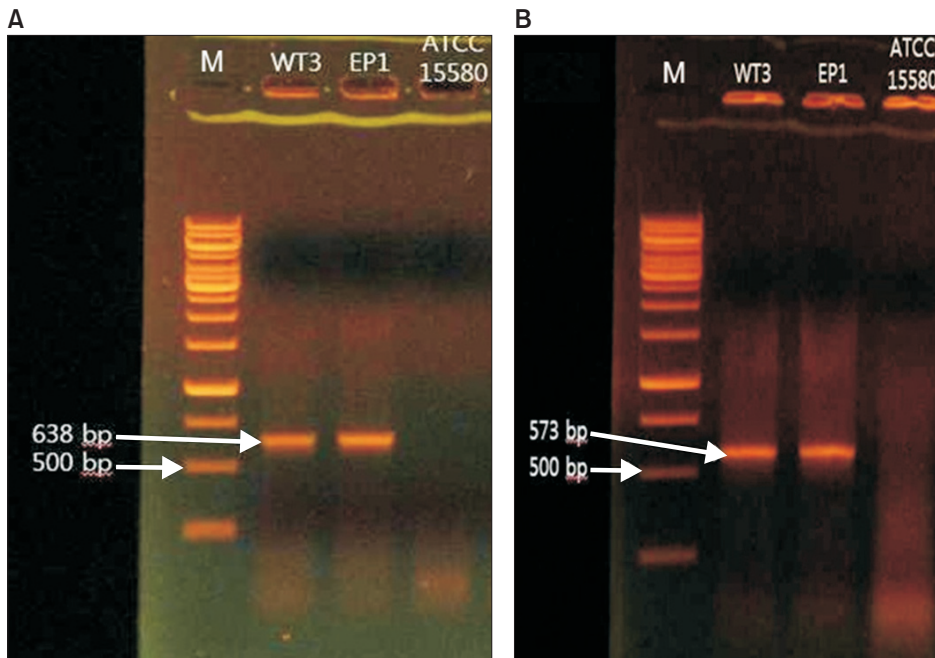
**가지검은마름병 특이 colony-PCR 프라이머.** 이병조직과 건전조직 내의 가지검은마름병원세균의 검출은 순수 세균 DNA 추출과정 없이 수행될 경우, 시간절약과 비용절감 면에서 큰 이익을 얻을 수 있는 절차이다. 그러나 반드시 동반되어야 할 조건은 순수 DNA를 활용하는 것이 아니므로 colony-PCR에서도 이들 프라이머의 특이적 검출능력이 확보되어야만 한다. 이에 본 연구에서 활용된 프라이머들은 기존 보고에서 모두 추출된 genomic DNA를 이용하여 특이성이 검증된 것들로, 세포만을 가지고 수행하는 colony-

PCR에서의 활용성 여부를 검증해야만 할 필요가 있었다. 2종류(WT3 및 Ep1)의 가지검은마름병원세균에서는 특이 밴드를 생성한 반면, 화상병원세균에서는 나타나지 않는 프라이머들로 CPS1/CPS2c, EP16A/EPIG2c, EpERF/EpERR, EpSPF/EpSPR, recAF/recAR, dspEF/dspER, 그리고 gyrAF/gyrAR로 나타났다(data not shown). recAF/recAR, dspEF/dspER 및 gyrAF/gyrAR 프라이머들은 비특이 대상 균주인 ATCC15580에서도 예상 크기의 밴드는 아니지만 다른 크기의 밴드를 생성하여 제외시켰으며, EP16A/EPIG2c 프라이머는 WT3와 Ep1 균주에서의 특이 밴드 생성 강도의 차이가 있었고, CPS1/CPS2c는 특이 밴드의 크기가 1.2 kb로 다소 큰 문제점이 있었다(data not shown). 가장 효율적인 colony-PCR용 가지검은마름병 특이 프라이머는 EpERF/EpERR과 EpSPF/EpSPR의 2종류였다(Fig. 1). 이들은 모두 enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) 부위 유래 특이 염기서열 지역에서 제작된 프라이머들로(Park 등, 2010; Shrestha 등, 2007), colony-PCR에서도 효율적으로 특이성을 나타낼 수 있었다. 이에 최종적으로 이후 실험에서는 EpSPF/EpSPR 프라이머 쌍을 이용하여 가지검은마름병원세균 검출을 수행하였다.

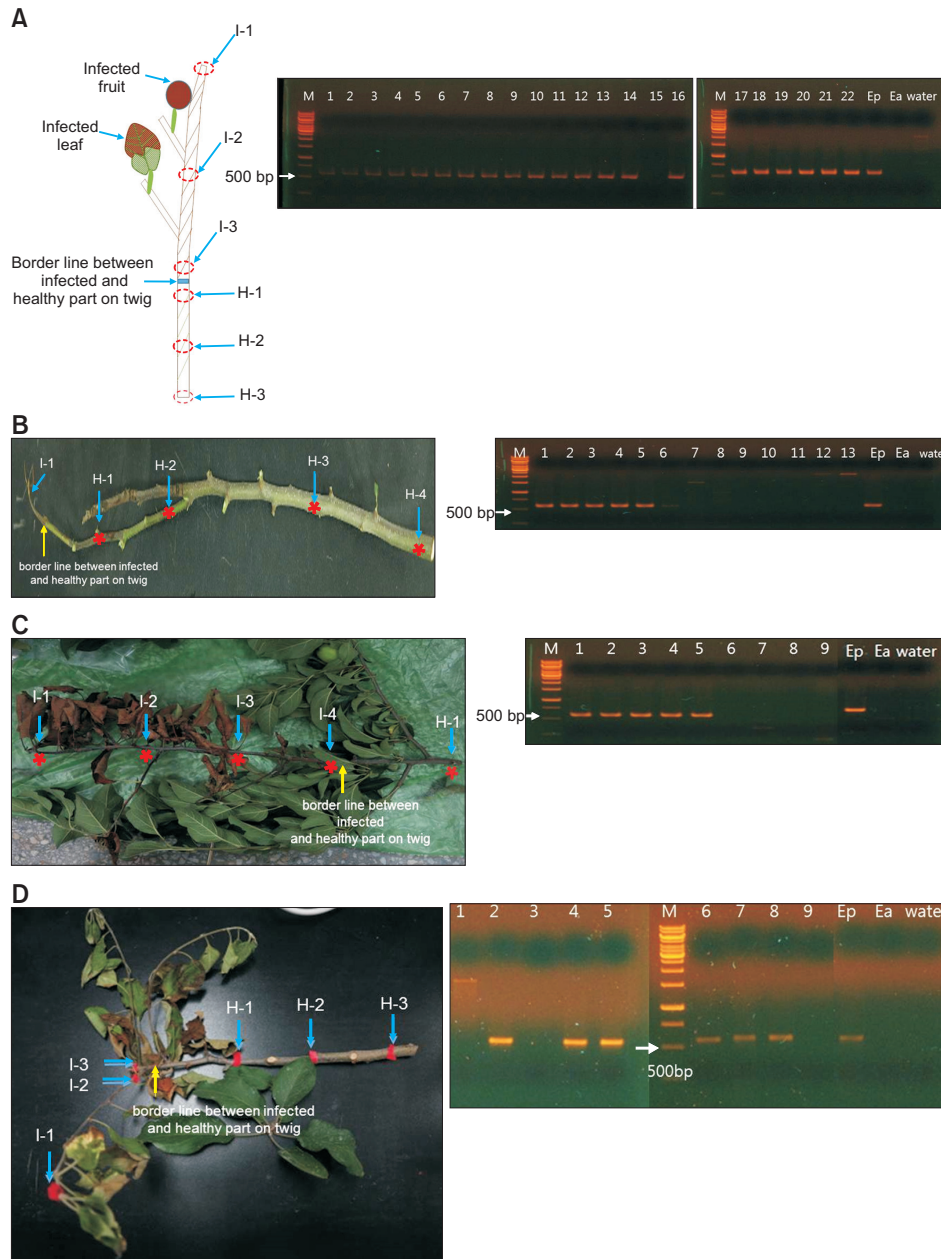
**생육기간 온도에 따른 가지검은마름병 발생 상황.** 2013년 이후 조사기간(2014–2015년) 동안 4월부터 10월까지 수집된 모든 시료로부터 가지검은마름병원세균을 분리하고 colony-PCR 방법으로 병원세균을 검출하였다.

2014년 시료에서는 6–7월 시료(6월 5일, 6월 19일, 7월 1일)에서만 가지검은마름병원세균이 검출되었는데, 이는 일 평균온도 20°C–25°C 범위였다. 2015년은 5월 말(5월 29일)부터 6월 중순(6월 12일)에만 병원세균이 검출되었으며, 온도범위는 25°C–30°C였다. 한편 7월 중순 이후 병징이 관찰된 줄기와 잎이 제거되지 않고 그대로 보존되어 있는 이병 사과나무에서 이병체를 수집하여 검출한 결과, 2014년과 2015년 모두 병원세균의 존재는 분리 및 colony-PCR 모두에서 확인할 수 없었다. 따라서 가지검은마름병의 최적 발생 평균온도는 25°C 내외로 생각되어 Shrestha 등(2005a)이 보고한 내용과 유사하였으며, 이후 일 평균온도가 30°C 이상 유지될 경우에는 가지검은마름병원세균은 온도적응 능력이 감소하고, 이는 밀도감소의 원인이 되는 것으로 판단되었다. 이러한 고온조건에서의 병원세균의 생존전략 및 월동과 하동을 위한 이동전략 그리고 장소에 대해서는 향후 더 심도 깊은 연구가 이루어져야만 한다고 생각된다.

**효율적 가지치기를 위한 이병체 제거.** 병징을 육안으로 관찰할 수 있는 이병조직과 건전조직 간의 병원세균의 존재유무를 관찰한 결과, 2014년 6월 15일 시료에서는 모든 이병조직 내의 가지검은마름병원세균과 유사한 성상을 나타내는 균총들은 573 bp의 가지검은마름병원세균 특이 밴드를 생성하였다. 또한 이병조직과 건전조직 경계면으로부터 10 cm 및 20 cm 거리의 건전조직 내에서 분리된 가지검은마름병 유사 균총들 모두 특이 밴드를 나타내어, 이병



**Fig. 1.** Confirmation of expected size by colony-PCR assay with EpERF/EpERR (A) and EpSPF/EpSPR (B) primer sets. WT3 and Ep1, and ATCC15580 are representative strains for *Erwinia pyrifoliae* and *Erwinia amylovora*, respectively, tested in this study. M, marker of 1 kb ladder DNA. Expected band sizes are shown at the left.



**Fig. 2.** (A: left panel) The diagram of collected sample at June 5th, 2014, to determine distance of existing *Erwinia pyrifoliae* from infected region on twig. I-1: 60 cm infected distance from border line between symptomatic and asymptomatic regions as specialized form of shoot blight and canker formation with crack. I-2: 30 cm infected distance from border line. I-3: nearby region of symptom from margin. H-1: nearby asymptomatic region from margin. H-2: 10 cm healthy distance from border line. H-3: 20 cm healthy distance from border line. (A: right panel) Detection of *E. pyrifoliae* by colony-PCR with EpSPF/EpSPR primer pair. Lanes 1–3, colonies isolated from I-1; lanes 4 and 5, colonies isolated from I-2; lanes 6–8, colonies isolated from I-3; lanes 9–13, colonies isolated from H-1; lanes 14 and 15, colonies isolated from H-2; lanes 16–19, colonies isolated from H-3; lanes 20–22, colonies from infected fruit. (B: left panel) Sites for determining *E. pyrifoliae* from collected sample at June 19th, 2014. I-1: Infected region. H-1: 13 cm healthy distance from border line. H-2: 26 cm healthy distance from border line. H-3: 55 cm healthy distance from border line. H-4: 81 cm healthy distance from border line. (B: right panel) Lanes 1–4, colonies isolated from I-1; lane 5, colony isolated from H-1; lanes 6 and 7, colonies isolated from H-2; lanes 8–10, colonies isolated from H-3; lanes 11–13, colonies isolated from H-4. (C: left panel) Sites for determining *E. pyrifoliae* from collected sample at July 1st, 2014. I-1: 60 cm infected distance from border line. I-2: 40 cm infected distance from border line. I-3: 20 cm infected distance from border line. I-4: nearby region of symptom from margin. H-1: 26 cm healthy distance from border line. (C: right panel) Lanes 1 and 2, colonies isolated from I-1; lane 3, colony isolated from I-2; lane 4, colony isolated from I-3; lane 5, colony isolated from I-4; lanes 6–9, colonies isolated from H-1. (D: left panel) Sites for determining *E. pyrifoliae* from collected sample at June 12th, 2015. I-1: 20 cm infected distance from border line. I-2 and I-3: nearby region of symptom from margin. H-1: 10 cm healthy distance from border line. H-2: 20 cm healthy distance from border line. H-3: 30 cm healthy distance from border line. (D: right panel) Lane 1, colony isolated from I-1; lane 2, colony isolated from I-2; lane 3, colony isolated from I-3; lanes 4–6, colonies isolated from H-1; lanes 7 and 8, colonies isolated from H-2; lane 9, colony isolated from H-3. Ep, *E. pyrifoliae* Ep1; Ea, *E. amylovora* ATCC15580; water, negative control. M, marker of 1 kb ladder DNA with 500 bp size at the left.

조직으로부터 건전조직 내 20 cm까지 가지검은마름병원세균이 존재할 수 있음이 증명되었다(Fig. 2A). 그러나 20 cm 이상의 건전조직 내에서의 검출은 이루어지지 않아, 6월 19일과 7월 1일 시료를 이용하여 경계면으로부터 20 cm 이상의 거리에서도 병원세균의 존재유무를 검정하였다. 먼저 6월 19일 시료에서는 경계면으로부터 최장 81 cm까지 검정하였는데, 이병조직과 건전조직 경계면으로부터 13 cm 건전조직 내에서는 6월 5일 시료와 마찬가지로 병원세균이 검출되었으며, 20 cm 이상의 간격인 26 cm, 55 cm 및 81 cm 간격의 조직에서는 가지검은마름병원세균이 검출되지 않았다(Fig. 2B). 또한 7월 1일 시료에서도 이병조직에서는 병원세균이 검출된 반면, 경계면으로부터 26 cm 간격의 건전조직에서는 가지검은마름병원세균이 검출되지 않아 유의성 있는 결과를 보여 주었다(Fig. 2C). 2015년 시료에서도 이병조직과 건전조직 경계면으로부터 20 cm 이내의 건전조직 내에서는 병원세균이 검출되었으며, 이상의 간격인 30 cm 건전조직 내에서는 가지검은마름병원세균이 검출되지 않았다(Fig. 2D). 2014년 6월 5일 시료에서 경계면으로부터 10 cm 간격의 건전조직 내에서 분리된 균총(Fig. 2A)과 2015년 6월 12일 시료의 이병조직 내에서 분리된 균총(Fig. 2D)에서는 colony-PCR 검출방법에 의해서 특이 밴드를 형성하지 않았는데, 이는 사과나무 잎과 줄기 내외부에 존재하는 부생성 세균 중에서 가지검은마름병원세균과 유사한 성상을 나타내는 균총이 다수 분리되었기 때문이다. 한편 수확기에 성숙과로부터 분리된 세균들은 병원세균과 성상이 매우 다르고, colony-PCR 검출방법에 의해서도 특이 밴드가 검출되지 않아, 감염 사과나무에서 수확한 성숙 사과에서는 병원세균이 존재하지 않는 것으로 생각된다(data not shown).

결론적으로 가지검은마름병원세균은 육안으로 병징이 관찰되는 이병조직(잎, 유과 및 줄기) 내에서 검출되었으며, 이병조직과 건전조직 경계면으로부터 건전조직 내 20 cm 이상의 간격에서는 검출되지 않았다. 따라서 사과나무 생육 초중기에 해당하는 5월 말부터 7월 초순 시기에 가지검은마름병이 발생할 경우 이병조직과 건전조직 경계면으로부터 건전조직 20 cm 이상의 간격을 두고 가지치기를 한다면 효율적으로 병의 확산을 억제할 수 있다고 판단되었다. 이는 가지검은마름병과 유사한 병징을 나타내는 화상병의 확산 방지 및 병원세균의 밀도를 감소시키기 위해 전략으로, 이병가지로부터 건전조직 내 20–30 cm 이상을 제거할 경우 매우 효율적으로 관리할 수 있다는 보고와 유사한 결과이다(Johnson, 2000; Sundin, 2014; Wilcox, 1994). 또한 화상

병의 경우 10% 락스 용액 또는 에탄올을 이용하여 전정도구를 소독하고, 가지치기 시기는 병원세균이 휴면기에 있는 2–3월이 가장 적합하며 생육기에는 강우 24시간 후가 효율적이라는 보고에 따라서, 가지검은마름병의 이병체 제거 또한 유사한 시기와 방법에 따라 수행되는 것이 바람직하다고 생각된다.

따라서 가지검은마름병의 발생 시 이병체로부터 건전조직 줄기로 20 cm 이상에서 가지치기의 경종적 관리방법은, 2015년 농촌진흥청 과수 가지검은마름병 예찰방제사업 지침에 따라 사과는 이병주가 10% 이상일 경우 폐원하고 10% 이하일 때는 이병주 및 인접 8주를 제거해야만 하는 손실을 줄이면서 동시에 효율적으로 가지검은마름병을 관리할 수 있는 방안으로 제안하는 바이다.

## 요 약

*E. pyrifoliae*에 의한 과수 가지검은마름병은 국내에서 1995년 최초 발생 이래 2016년까지 꾸준히 발생하여 과수농가에 피해를 주고 있는 세균병해이다. 가지검은마름병 발생 농가의 폐원조치 및 공적방제로 인한 경제적 피해 감소를 위하여, 병징이 관찰되는 이병조직 및 건전조직 내의 병원세균을 검출하여 효율적 관리방안을 마련하고자 본 연구를 수행하였다. 가지검은마름병원세균의 검출은 genomic DNA 추출과정을 생략한 순수 균총만을 이용하는 colony-PCR을 이용하였으며, 이를 위해 ERIC 지역에서 제작된 가지검은마름병원세균 특이 프라이머 EpSPF/EpSPR 프라이머 쌍을 선발하였다. 특이 프라이머를 활용한 colony-PCR 방법으로 2014–2015년 4–10월까지 사과나무 생육기간 동안 가지검은마름병 발생상황을 모니터링한 결과, 25°C 일 평균 온도 기간인 5월 중순부터 7월 초순까지 발병이 가장 빈번하였다. 발병가지 내 병원세균의 존재유무 검정 결과 병징 부위와 이로부터 20 cm 내 건전조직에서만 병원세균이 지속적으로 검출되었다. 따라서 이미 발생한 가지검은마름병을 효율적으로 관리하기 위해 이병조직과 건전조직 경계 부위로부터 20 cm 이상에서 가지치기를 하는 것이 매우 적절할 것으로 판단된다.

## Conflicts of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

## Acknowledgement

This work was supported by a grant from the Animal and Plant Quarantine Agency (2014–2015), Republic of Korea and also “Cooperative Research Program for Agriculture Science & Technology Development (Project No. PJ011758032016)” Rural Development Administration, Republic of Korea.

## References

- Bayot, R. G. and Ries, S. M. 1986. Role of motility in apple blossom infection by *Erwinia amylovora* and studies of fire blight control with attractant and repellent compounds. *Phytopathology* 76: 441-445.
- Bereswill, S., Bugert, P., Bruchmüller, I. and Geider, K. 1995. Identification of the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*, by PCR assays with chromosomal DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2636-2642.
- Hildebrand, M., Dickler, E. and Geider, K. 2000. Occurrence of *Erwinia amylovora* on insects in a fire blight orchard. *J. Phytopathol.* 148: 251-256.
- Johnson, K. B. 2000. Fire blight of apple and pear. *Plant Health Instr.* Online publication. doi: 10.1094/PHI-I-2000-0726-01.
- Kim, W. S., Gardan, L., Rhim, S. L. and Geider, K. 1999. *Erwinia pyrifoliae* sp. nov., a novel pathogen that affects Asian pear trees (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49(Pt 2): 899-905.
- Kim, W. S., Hildebrand, M., Jock, S. and Geider, K. 2001a. Molecular comparison of pathogenic bacteria from pear trees in Japan and the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Microbiology* 147(Pt 11): 2951-2959.
- Kim, W. S., Jock, S., Paulin, J. P., Rhim, S. L. and Geider, K. 2001b. Molecular detection and differentiation of *Erwinia pyrifoliae* and host range analysis of the Asian pear pathogen. *Plant Dis.* 85: 1183-1188.
- Park, D. H., Thapa, S. P., Kim, W. S., Hur, J. H. and Lim, C. K. 2010. Species-specific detection of *Erwinia pyrifoliae* by PCR assay using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) primers. *Plant Pathol. J.* 26: 267-270.
- Rhim, S. L., Völksch, B., Gardan, L., Paulin, J. P., Langlotz, C., Kim, W. S. and Geider, K. 1999. *Erwinia pyrifoliae*, an *Erwinia* species different from *Erwinia amylovora*, causes a necrotic disease of Asian pear trees. *Plant Pathol.* 48: 514-520.
- Shrestha, R., Koo, J. H., Park, D. H., Hwang, I., Hur, J. H. and Lim, C. K. 2003. *Erwinia pyrifoliae*, a causal endemic pathogen of shoot blight of Asian pear tree in Korea. *Plant Pathol. J.* 19: 294-300.
- Shrestha, R., Lee, S. H., Hur, J. H. and Lim, C. K. 2005a. The effects of temperature, pH, and bactericides on the growth of *Erwinia pyrifoliae* and *Erwinia amylovora*. *Plant Pathol. J.* 21: 127-131.
- Shrestha, R., Lee, S. H., Kim, J. E., Wilson, C., Choi, S. G., Park, D. H., Wang, M. H., Hur, J. H. and Lim, C. K. 2007. Diversity and detection of Korean *Erwinia pyrifoliae* strains as determined by plasmid profiling, phylogenetic analysis and PCR. *Plant Pathol.* 56: 1023-1031.
- Shrestha, R., Tsuchiya, K., Baek, S. J., Bae, H. N., Hwang, I. G., Hur, J. H. and Lim, C. K. 2005b. Identification of *dspEF*, *hrpW*, and *hrpN* loci and characterization of the *hrpN<sub>ep</sub>* gene in *Erwinia pyrifoliae*. *J. Gen. Plant Pathol.* 71: 211-220.
- Sundin, G. W. 2014. Fire blight. In: Compendium of Apple and Pear Diseases and Pests. 2nd ed., eds. by T. B. Sutton, H. S. Aldwinckle, A. M. Agnello and J. F. Walgenbach, pp. 87-89. APS Press, St. Paul, MN, USA.
- Wilcox, W. F. (1994 onwards). Tree Fruit Crops. Disease Identification Sheet No. D3 (Revised). URL <http://hdl.handle.net/1813/43095> [31 August 2016].