

항혈청 기반 진단 스트립을 이용한 과수 화상병 현장진단

On-Site Diagnosis of Fire Blight with Antibody-Based Diagnostic Strips

허광일¹ · 신두산¹ · 손수형¹ · 오창식² · 박덕환³ · 이영기⁴ · 차재순^{1*}

¹충북대학교 응용생물공학부 식물의학전공, ²경희대학교 원예생명공학과,

³강원대학교 생물자원과학부 응용생물학전공, ⁴농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부

Gwang-Il Heo¹, Doo-San Shin¹, Soo-Hyeong Son¹, Chang-Sik Oh², Duck Hwan Park³, Young-Kee Lee⁴, and Jae-Soon Cha^{1*}

¹Major in Plant Medicine, School of Applied Plant Science & Biotechnology, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea

²Department of Horticultural Biotechnology, Kyung Hee University, Yongin 17104, Korea

³Applied Biology Program, Division of Bioresource Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

⁴Department of Agro-food Safety and Crop Protection, National Institute of Agriculture Sciences, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea

*Corresponding author

Tel: +82-43-261-2554

Fax: +82-43-271-4414

E-mail: jscha@cbnu.ac.kr

Recently fire blight occurred in the Republic of Korea and eradication program for the disease has been executed since then. Specificity and detection sensitivity of the 2 antibody-based diagnostic strips to Korean isolates of *Erwinia amylovora* (Ea) and their application for on-site diagnosis were evaluated in this study. Ea AgriStrip, a commercial diagnostic kit, and EB strip, developed in this study, reacted positively to the all tested Korean Ea strains and also to most of *Erwinia pyrifoliae* (Ep) strains causing black shoot blight. They reacted negatively to all *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Pss) strains that cause shoot blight on apple. Detection sensitivity was similar between the 2 strips. For on-site diagnosis, the two strips reacted positively only to the extractions of the fire-blighted samples on all fire blight occurred orchards except one orchard at which on-site diagnosis was carried out at winter time. In addition, they reacted positively to the black-shoot blighted extractions from the black shoot blight occurred apple orchard. These results suggest that both EB strip and Ea AgriStrip would be useful for on-site diagnosis of fire blight in Korea.

Keywords: Ea AgriStrip, EB strip, Fire blight, On-site diagnosis, Plant quarantine pathogen

Received July 17, 2017

Revised August 17, 2017

Accepted August 17, 2017

서론

과수 화상병(fire blight)은 병원세균 *Erwinia amylovora*에

의해 넓은 기주식물에서 발생하는 병으로, 특히 사과나무와 배나무에서 매우 심각한 경제적 피해를 가져온다. 병원균 *E. amylovora*는 꽃(blossom), 잎(leaf), 새순 및 가지(shoot, twig), 큰 줄기(trunk), 지체부(collar or crown) 등 지상부의 모든 부위에서 마름(blight) 증상을 유발하여 과일생산 감소, 수세약화, 나무고사를 일으킨다(EPPO, 2013; van der Zwet 등, 2012). 이

Research in Plant Disease

pISSN 1598-2262, eISSN 2233-9191

www.online-rpd.org

병에 의한 피해가 매우 심하고, 병원균의 위험도가 높아 국내에서는 식물검역상 도입 금지병원균으로 지정하여 관리하고 있다(농림축산검역검사본부, www.qia.go.kr).

과수 화상병은 1780년 뉴욕에서 처음 발생이 보고된 이후 현재는 북미, 유럽, 뉴질랜드, 중앙아시아 등 세계의 많은 지역에서 발생하고 있다(van der Zwet 등, 2012). 국내에서 이 병은 사과나무와 배나무에서 1928년에 발행된 조선총독부 권업모범장 연구보고에 기록이 있으나, 당시에 이 병과 유사한 *Erwinia pyrifoliae*에 의한 가지검은마름병(black shoot blight) 혹은 *Pseudomonas syringae*에 의한 가지마름병(shoot blight)의 잘못된 동정으로 추정된다(The Korean Society of Plant Pathology, 2009). 사과나무와 배나무에서 국내에서 보고된 과수 화상병과 유사한 병으로는 *P. syringae* pv. *syringae*에 의한 가지마름병(shoot blight)과 *E. pyrifoliae*에 의한 가지마름병(shoot blight) 또는 가지검은마름병(black shoot blight)이 보고되어 있다(Han 등, 2016; The Korean Society of Plant Pathology, 2009). *E. pyrifoliae*에 의한 가지마름병(shoot blight) 또는 가지검은마름병(black shoot blight)은 1995년 춘천근교의 배 과수원에서 최초로 발견되어 처음에는 화상병과 그 증상 및 병원균이 매우 유사하여 화상병으로 오인되기도 하였다. 병원균이 화상병 병원균인 *E. amylovora*와는 다른 *E. pyrifoliae*로 확인되어 화상병과는 다른 병으로 확정되었으며(Han 등, 2016; Kim 등, 1999; Rhim 등, 1999), 현재까지 세계에서 국내에서의 발생만 보고된 병이다. 과수 화상병과 가지검은마름병은 병원균은 다르지만 병징은 매우 유사하여 발생 포장에서 병징으로는 이 2가지 병의 구분이 어렵다.

국내에서 발생하지 않았던 과수 화상병이 2015년 5월에 안성과 천안의 배 과수원에서, 그리고 한 달 후에는 제천의 사과 과수원에서 발생하였다(Myung 등, 2016; Park 등, 2016). 정부에서는 발생이 확정된 직후 이 병의 국내 정착을 막기 위한 박멸 조치를 시행하고 있다. 현재 이 병이 발생한 과수로부터 직경 100 m 이내의 모든 나무를 베어 매몰하고, 주변 2 km까지 화학적 방제를 실시하며, 5 km 주변까지 병 발생을 주기적으로 모니터링하고 있다(Park 등, 2017). 본 병은 발생 첫해인 2015년에 43개의 과수원에서 발생하였고, 2016년에는 안성과 천안의 2015년 발생지역 근처의 17개 과수원에서 발생이 확인되었다.

과수 화상병은 곤충이 매개하는 병으로 이 병의 확산방지 및 성공적인 박멸을 위해서는 발생 후 빠르게 방역조치를 시행하는 것이 필요하다. 이를 위해서는 이 병의 병징 또는 유사한 병징이 관찰되는 즉시 빠르고 정확한 진단이 필수적이다. EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization)에서 발행하는 과수 화상병 진단 프로토콜에서는 화상

병의 정확한 진단을 위해서 DNA를 기초한 분자생물적 검출법과 함께 항혈청을 기초한 검출법을 같이 사용하도록 하고 있다(EPPO, 2013). 현재 유럽에서는 화상병을 빠르게 진단할 수 있는 *E. amylovora* 균주들의 다클론항체(polyclonal antibody)를 이용한 스트립(strip) 형태의 진단키트가 상업화되어 있다(Ea AgriStrip, BIOREBA AG, Switzerland).

본 연구에서는 국내에서 분리된 *E. amylovora* 균주들을 이용하여 스트립 형태의 진단키트를 만들고, 이 진단키트와 이미 유럽에서 상용화된 진단키트의 국내 화상병 병원균에 대한 특이성, 민감성을 확인하고, 과수 화상병 발생 현장에서 진단에 적용하여 이들 항혈청 진단 스트립의 과수 화상병의 현장진단에 적용 가능성을 검증하였다.

재료 및 방법

세균 균주. 본 연구에서는 농촌진흥청 작물보호과에서 분양받은 *E. amylovora* (Ea) 8 균주와 *E. pyrifoliae* (Ep) 5 균주, 한국농업미생물자원센터(KACC)에서 분양받은 *E. pyrifoliae* 6 균주, 안동대학교로부터 분양받은 사과나무 분리 *P. syringae* pv. *syringae* (Pss) 8 균주를 사용하였다(Table 1). 사용한 모든 세균은 순수분리하여 NA (nutrient agar; Becton, Dickinson & Co. Sparks, MD, USA)에서 배양하였고, -80°C 의 초저온냉동고에 보관하며 사용하였다. Ea와 Ep는 국내에서 식물검역병원균이므로 농림축산검역검사본부의 관리규정에 따라 관리하였다.

진단 스트립. *E. amylovora* 검출용 Ea AgriStrip (Cat. No. 153081, BIOREBA AG)은 제작회사로부터 complete kit를 구입하여 사용하였다. 본 연구에서 제작한 EB (*Erwinia* blight) strip은 (주)메디안 디노스틱(Chuncheon, Korea)에 의뢰하여 제작하였다. 농촌진흥청에서 분양받은 2 균주(YKB 12316, YKB 12320)와 2016년 안성시 서운면 사과나무의 화상병 병징으로부터 분리한 CBNU 2155 균주를 항원으로 사용하였으며, 항혈청의 조제 및 스트립의 제작은 Braun-Kiewnick 등(2011)의 방법에 따랐다.

과수원의 선정 및 시료 채집. 농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 작물보호과로부터 화상병이 확인된 직후 통보를 받아 매몰 전에 해당과수원을 방문하여 현장진단을 수행하였다. 현장진단을 수행한 과수원 및 수행한 날짜는 Table 3에 정리되어 있다. 해당 과수원을 방문하여 다양한 시료를 채취하고, 그 시료로부터 세균추출액을 조제하여 항혈청 스트립 검정을 수행하였다. 현장진단 후에 검정에 사용한 세균추출액

Table 1. Bacterial strains used in this study and their reaction to Ea AgriStrip and EB strip

Bacterial species	Strain	Disease / Host ^a	Strip ^b		Source ^c
			Ea Agri	EB	
<i>Erwinia amylovora</i>	YKB 12316	FB / pear	+	+	RDA
	YKB 12317	FB / pear	+	+	RDA
	YKB 12318	FB / apple	+	+	RDA
	YKB 12319	FB / apple	+	+	RDA
	YKB 12320	FB / pear	+	+	RDA
	YKB 12321	FB / pear	+	+	RDA
	YKB 12322	FB / apple	+	+	RDA
	YKB 12323	FB / apple	+	+	RDA
<i>Erwinia pyrifoliae</i>	KACC 13945	BSB / nk	+	+	KACC
	KACC 13947	BSB / nk	+	+	KACC
	KACC 13948	BSB / nk	+	+	KACC
	KACC 13949	BSB / nk	+	-	KACC
	KACC 13951	BSB / nk	-	-	KACC
	KACC 13952	BSB / nk	+	+	KACC
	YKB 12324	BSB / apple	+	+	RDA
	YKB 12325	BSB / apple	+	+	RDA
	YKB 12326	BSB / apple	+	+	RDA
	YKB 12327	BSB / apple	+	+	RDA
YKB 12328	BSB / apple	+	+	RDA	
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	SHPS 005	SB / apple	-	-	ANU
	SHPS 007	SB / apple	-	-	ANU
	SHPS 022	SB / apple	-	-	ANU
	SHPS 0056	SB / apple	-	-	ANU
	WSPS 039	SB / apple	-	-	ANU
	WSPS 042	SB / apple	-	-	ANU
	WSPS 048	SB / apple	-	-	ANU
	WSPS 050	SB / apple	-	-	ANU

^aFB, Fire blight; BSB, Black shoot blight; SB, Shoot blight; nk, not known.

^bEa Agri strip (BIOREBA AG, Switzerland); EB (*Erwinia* blight) strip (this study). +, positive detection; -, negative detection.

^cKACC, Korean Agricultural Culture Collection, Rural Development Administration, Rep. of Korea; RDA, Rural Development Administration; ANU, Andong National Univ.

은 실험실로 옮겨 병원균을 분리하고, 동정하여 현장진단 결과를 확인하였다. 확진된 과수원을 방문할 경우 방제복 및 장갑을 착용하고 모든 작업을 수행하였다. 2016년 12월과 2017년 1월에 진단한 경우를 제외하고 과수 생육기의 과수원에서는 다양한 병징으로부터 시료를 채집하였다. 가지나 열매에 생긴 세균 ooze, 마름증상을 가진 신초 가지(shoot), 조금 굵은 가지의 껍질(stem canker), 병든 유과(fruit), 병징이 진행 중인 잎과 잎자루(leaf), 그리고 나무의 큰 줄기의 껍질부위(trunk canker)로부터 시료를 채취하였다(Fig. 1). 또한 비교하기 위해 병징을 보이지 않은 건전한 나무의 신초가지나 줄기를 채취하였다. 2016년

12월 21일에 수행한 세종시 부강면의 과수원의 경우 화상병 발생 의심신고가 접수되어 화상병 발생이 확진되기 전에 방문하여 다양한 시료를 채취하여 현장진단을 실시하였다. 방제복을 포함한 과수원 현장에 사용한 모든 물품은 멸균백(autoclave bag)에 넣어 실험실로 가져온 후 멸균하여 폐기하였다.

세균추출액의 조제 및 스트립 검정. 세균현탁액과 병징을 가진 다양한 시료로부터 병원균을 추출하여 스트립 검정에 사용하였다. Ea AgriStrip 검정을 위해서는 BIOREBA AG사가 제공하는 추출완충액을 모든 시료조제에 사용하였다. EB strip 검정



Fig. 1. Fire blight symptoms used for strip assays. Bacterial ooze (1), shoot blight (2), stem canker (3), fruitlet (4), leaf and leafstalk (5), trunk canker (6).

을 위해서는 Gorris 등(1996)의 항산화마쇄완충액(antioxidant maceration buffer)을 사용하였다. NA에서 배양한 세균 콜로니를 추출완충액에 현탁 후 분광광도계를 사용하여 세균의 밀도를 조정 후 검정에 사용하였다. 병반 시료 중에서 세균 ooze는 ooze 자체를 일회용 플라스틱 스틱 백금으로 얻어 추출완충액에 현탁하여 검정에 사용하였다. 병반을 가진 시료의 경우 마른증상의 새순의 잔가지(shoot, 올해 신초로 성장한 가지 선단부위)의 경우 절단한 가지 자체를 사용하고, 가지의 직경이 조금 굵은 가지(stem)의 경우 껍질의 경계부위를 면도칼로 벗겨낸 수피를, 잎(leaf)의 경우 잎자루와 변색이 진행되는 부위를, 열매(fruit)의 경우 열매 자체를, 굵은 직경의 수간부위(trunk)의 껍질의 경우 껍질질을 벗겨낸 후 안쪽의 갈색으로 변색된 형성층 조직을 얻었다. 이렇게 얻은 조직 0.1–0.2 g을 플라스틱 백에 넣고 추출완충액 5 ml를 넣은 후 백(bag)의 바깥을 고무망치로 가볍게 두드려 추출액을 얻었다. 이 세균추출액은 스트립 검정에 직접 사용하고, 실험실로 옮겨 병원균 분리에 사용되었다. 건전한 조직에서 세균추출액의 조제는 병징이 보이지 않은 시료를 얻어 병징을 가진 시료와 동일한 방법으로 추출액을 얻었다.

Ea AgriStrip 검정은 일회용 플라스틱 큐벳(cuvette)에 세균현탁액 또는 추출액 200 μ l을 넣고 스트립을 그 큐벳에 세워 검정하였고, EB strip의 경우 추출액 100 μ l을 스트립의 아래 부분의

시료처리 부위에 점적하여 검정하였다. 검정 시작 후 각 스트립의 control line과 test line에 반응밴드가 나타나는지 관찰하고, 검정 30분 후 최종 판정하였다.

병원균의 분리 및 동정. 각 시료의 세균추출액은 실험실로 가져와 10배 희석법으로 희석하여 10^{-1} – 10^{-3} 희석액 100 μ l를 Levan 배지 (Yeast extract 2 g, Bactopeptone 5 g, NaCl 5 g, Sucrose 50 g, Agar 20 g/l)에 도말하고, levan 형성 콜로니를 MGY (Mannitol 10 g, Glutamic acid, monosodium salt 2 g, Yeast extract 0.25 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, NaCl 0.2 g, KH_2PO_4 0.5 g, 1 N NaOH 2.4 ml, Agar 15 g/l)에 그어 배양하였다. 그 후 Ea 또는 Ep와 유사한 콜로니로부터 세균을 얻어 Ea 특이 프라이머인 PEANT1/2 (Powney 등, 2011)와 Ep 특이 프라이머인 EpSPF/EpSPR (Shrestha 등, 2007)를 이용한 PCR을 수행하여 동정하였다.

결 과

스트립의 국내 분리 Ea와 Ep에 대한 특이성 및 검출민감도. Ea AgriStrip과 EB strip의 국내에서 분리된 화상병균(Ea), 가지검은마름병균(Ep), 그리고 사과나무 가지마름병균(Pss)에

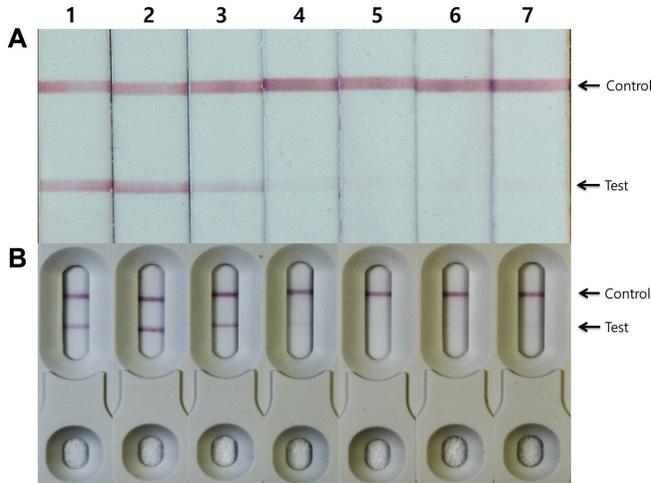


Fig. 2. Detection sensitivity of strips, Ea AgriStrip (A) and EB strip (B). *Erwinia amylovora* suspension, 10^8 cells/ml (1), 10^7 cells/ml (2), 10^6 cells/ml (3), 10^5 cells/ml (4), 10^4 cells/ml (5), 10^3 cells/ml (6), and 10^2 cells/ml (7) were used.

대한 특이성을 세균현탁액을 이용하여 확인하였다. 가지검은마름병균(Ep) KACC 13951는 2가지 스트립 모두에 음성반응을 보였으며, KACC 13949는 EB strip에 대해서 음성으로 나타났다. 나머지 실험에 사용한 가지검은마름병균(Ep)과 화상병균(Ea) 모든 균주들은 두가지 스트립에 대해 양성반응을 보였다 (Table 1). 두 스트립 모두 사과나무 가지마름병 병원균인 Pss에 대해서는 모두 음성반응을 보였다 (Table 1). 검출민감도를 조사한 결과 Ea AgriStrip과 EB strip 모두 세균밀도가 10^6 cells/ml까지 선명한 양성반응의 밴드를 보여주었고, 10^5 cells/ml에 의해서는 매우 희미한 양성밴드가 나타났다 (Fig. 2).

진단 스트립의 병 발생 현장에서 검증. 2016년-2017년 동안 4곳의 화상병 발생 과수원(배 과수원 2곳, 사과 과수원 2곳), 1곳의 화상병 발병의심 과수원(배 과수원), 그리고 1곳의 가지검은마름병 발생 과수원(사과 과수원)의 총 6개 과수원에서 2가지 스트립의 현장진단 능력을 조사하였다. 현장진단의 예시로 2017년 6월 8일 천안시 서북면(Cheonan, Seobuk)의 화상병이 발생한 사과나무 과수원에서 수행한 현장진단의 결과를 정리하였다. 이 과수원에서 화상병 병징을 가진 사과나무로부터 세균 ooze(bacterial ooze), 잔가지 마름(shoot blight), 줄기 꺾양(stem canker), 잎자루 및 잎(leafstalk)의 4가지 병징 시료와 병징을 가지지 않은 사과나무의 줄기로부터 얻은 1개의 건전 시료로부터 세균추출액을 얻어 검정한 결과 병든 시료로부터 얻은 세균추출액에 대해서만 2가지 스트립이 양성반응을 보였다 (Fig. 3, Table 2). 또한 병든 시료로부터 얻은 세균추출액으로

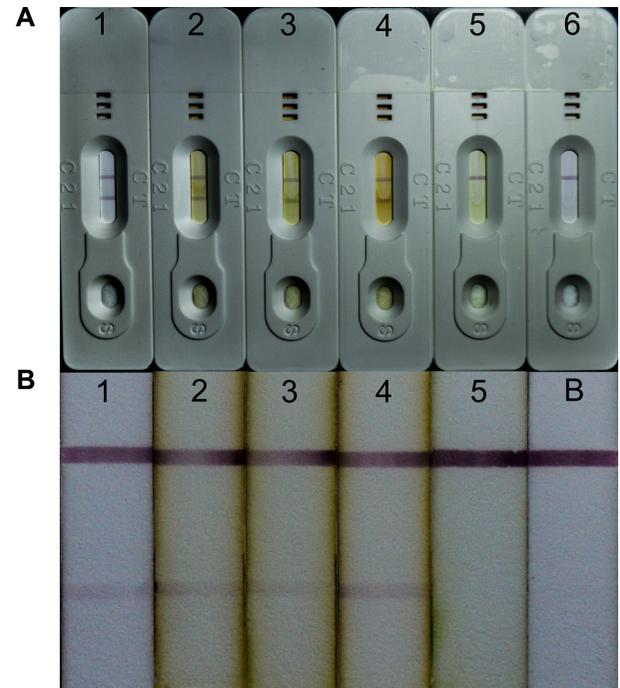


Fig. 3. On-site diagnosis of fire blight with the 2 immuno-strips. EB strip (A) and Ea AgriStrip (B) assays with extracts of bacterial ooze (1), shoot blight (2), stem canker (3), leafstalk (4), stem of healthy tree (5) from fire blight occurred apple orchard at Ipjang, Cheonan on June 8, 2017. B was extraction buffer as negative control and Ea was DNA of *E. amylovora* YKB 12316 as positive control.

Table 2. On-site diagnosis with the immune-strips at the fire-blight occurred apple orchard on Seobuk, Cheonan

Sample	Strip		Ea Isolation ^a
	Ea Agri	EB	
Bacterial ooze	+	+	+
Shoot blight	+	+	+
Stem canker	+	+	+
Leafstalk	+	+	+
Stem of healthy tree	-	-	-
Extraction buffer	-	-	-

^a*Erwinia amylovora* was isolated from the sample extract and PCR identified at laboratory.

부터 Ea가 분리되었다 (Fig. 4).

본 연구에서 현장진단을 수행한 6곳의 결과를 종합 정리하였다 (Table 3). 2016년 12월 13일 확진된 안성시 서운면(Anseong, Seoun 1)의 배 과수원에서 현장진단 결과 2가지 스트립에서 병든 시료의 세균추출액에 대해서만 모두 양성으로 나타났으며, 그 추출액으로부터 Ea가 분리되었다 (Table 3). 2016년 12월 21일에 화상병 발생이 의심되는 세종시 부강면 배 과수원(Sejong,

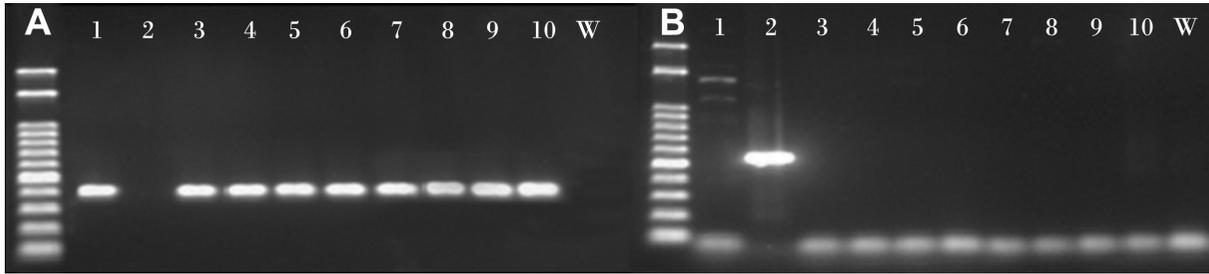


Fig. 4. Amplicons of Ea- and Ep-specific PCR, Ea specific primer PEANT1/2 (A) and Ep specific primer EpSPF/EpSPR (B). DNA of *E. amylovora* YKB 12316 (1) and *E. pyrifoliae* YKB 12324 (2) were used as control. Bacterial colonies isolated from bacterial ooze extract (3, 4), shoot blight extract (6, 7), stem canker extract (8, 9) and leafstalk extract (10) from fire blight occurred apple orchard at Seobuk, Cheonan on June 8, 2017. W was water as negative control.

Table 3. On-site diagnosis with the immune-strips at the fire-blight or similar-disease occurred orchards

Location/Date	Host	Strip		Pathogen isolated	Diagnosis
		Ea Agri	EB		
Anseong, Seoun 1 Dec. 13, 2016	Pear	+	+	Ea	Fire blight
Sejong, Bugang Dec. 21, 2016	Pear	-	-	-	Unknown
Anseong, Seoun 2 Jan. 11, 2017	Pear	-	-	Ea	Fire blight
Anseong, Miyang May 17, 2017	Apple	+	+	Ea	Fire blight
Cheonan, Seobuk Jun. 8, 2017	Apple	+	+	Ea	Fire blight
Gwangju, Namjong Jun. 14, 2017	Apple	+	+	Ep	Black shoot blight

Bugang)의 경우 채집한 모든 현장시료의 세균추출액에 대해서 2가지 진단 스트립에 음성반응이었으며, 추출액에서 Ea, Ep가 모두 분리되지 않았다. 이 포장은 추후 농진청 작물보호과에서 화상병이 아닌 것으로 확진되었다. 2017년 1월 11일에 확진된 안성시 서운면 배 과수원(Anseong, Seoun 2)의 현장시료의 세균추출액에 대해서 2가지 스트립은 음성반응을 보였는데, 이 추출액으로부터 실험실에서 Ea가 분리되었다. 2017년 5월 17일 확진된 안성시 미양면 사과나무 과수원(Anseong, Miyang)과 천안시 서북면(Cheonan, Seobuk) 사과나무 과수원에서는 병든 시료의 세균추출액에 대해서만 스트립 검정에서 양성반응이었으며, 또한 이 추출액으로부터 병원균 Ea도 분리되었다. 2017년 6월 14일에 가지검은마름병으로 확진된 경기도 광주시 남종면(Gwangju, Namjong) 사과나무 과수원 현장진단 결과, 병든 시료 세균추출액에 대해서 2가지 스트립은 양성반응을 보였고, 이 추출액에서 가지검은마름병 병원균인 Ep가 분리되었다. 현

장진단의 스트립검정에서 화상병 병징 시료의 세균추출액에 따라 Ea AgriStrip과 EB strip 사이에 양성밴드의 질고 열은 정도 차이는 있었지만 양성과 음성이 바뀌는 다른 반응을 보여주는 경우는 없었다.

고 찰

본 연구에서는 병원세균 항혈청을 이용하여 제작한 스트립 형태의 화상병 진단키트의 국내분리 화상병 병원균에 대한 특이성 및 검출민감성을 확인하고, 이 진단키트의 화상병 현장진단 사용 가능성을 조사하였다. Ea AgriStrip과 EB strip은 본 연구에 사용한 모든 Ea 균주에 양성반응을, 모든 Pss 균주에 음성반응을 보여주었고, 11개의 Ep 균주 중에서 1개 균주가 2가지 스트립에서 다른 반응을 보여주었다. Ep 1 균주의 Ea AgriStrip과 EB strip에서 다른 반응은 Ea와 Ep가 매우 유사함에도 불

구하고 2가지 균에 대한 다클론(poyclonal) 항체는 균주 별로 다르다는 것은 보여 주는 것이다. Ea AgriStrip을 개발한 논문 (Braun-Kiewnick 등, 2011)에서 한국에서 분리된 3개의 Ep 균주에 대한 특이성에 대해 +/-로 표기하고, 약한 양성 또는 일관성 없는 검출(weekly positive or unreliable detection)이라고 판정하였다. 따라서 Ea와 Ep 균주들 사이의 표면항원에 차이가 있음이 이미 인지되었는데, 본 연구에서도 Ep 균주들 사이의 표면항원에 차이가 있음을 확인해주고 있다. Ea AgriStrip의 제조사가 제공하는 사용 매뉴얼에는 Ea AgriStrip이 Ea에 뿐만 아니라 Ep에 대해서 양성반응 함을 명시하고 있다. Ea AgriStrip과 EB strip의 Ea 검출민감도는 10^6 cells/ml에 대해서는 확실한 양성밴드를, 10^5 cells/ml에 대해서 매우 희미한 밴드를 보여주었는데, 이 민감도는 Ea AgriStrip 매뉴얼이 제시한 Ea AgriStrip의 검출민감도인 $5 \times 10^5 - 10^6$ cells/ml과 유사한 결과이다.

화상병 발생 과수원에서 현장진단에 적용한 결과 화상병이 확진된 4 곳의 과수원 중에서 2017년 1월 11일에 수행된 현장진단(안성시 서운면, Anseong, Seoun 2)을 제외하고는 다양한 병징 세균추출액에서 검정시작 30분 이내에 양성반응을 보여주었다. 2017년 1월 11일에 조사한 안성시 서운면의 배 과수원의 경우 건전한 배나무의 모든 잎은 낙엽되었고, 화상병이 걸린 가지의 잎은 낙엽되지 않고 가지에 붙어 있었으며, 모든 가지는 말라 있었다. 가지에 나타난 궤양병반으로부터 얻은 세균추출액으로부터 실험실에서 Ea가 분리되었지만, 사용한 2가지 스트립에서는 모두 음성반응을 보여주었다. 이 결과는 진단 스트립 검정에 사용한 가지 궤양병반의 세균추출액에 존재하는 Ea의 밀도가 항혈청 스트립의 검출민감도보다 낮았기 때문에 추측된다. 선행연구 결과들은 겨울 동안 가지의 궤양에서 월동하는 Ea의 생존율은 매우 낮은 것으로 조사되었다. 즉 화상병 궤양을 가진 가지의 27%에서만 살아있는 Ea가 확인이 되었고(van der Zwet 등, 2012), 또한 Ea의 분리 성공률은 계절별로 매우 다르다는 것이 잘 알려져 있다(EPPO, 2013). 따라서 2017년 1월 11일에 조사한 배나무의 경우 조사한 가지의 궤양에 병원균이 존재하였지만, 그 밀도가 진단 스트립의 검출한계보다 낮았다고 추측된다. 약 한달 앞서 2016년 12월 13일에 근처의 배 과수원에서 진행된 현장진단에서는 2가지 스트립이 화상병 병반 추출액에 모두 양성반응을 보여주었는데, 이 경우에는 가지 궤양조직으로부터 얻은 세균추출액에 병원균의 밀도가 스트립에 의해 검출될 수 있을 만큼 높았을 것으로 추측된다.

양성반응이 나타나는데 소요되는 시간, 양성밴드의 강도, 그리고 검정 스트립의 배경색은 병든 시료의 종류와 추출액에 들어있는 Ea의 밀도와 관계 있는 것으로 나타났다. 즉 세균 ooze를 희석한 추출액의 경우 배경 색이 매우 깨끗하고 비교적 양성

밴드의 강도가 높고, 빠르게 나타났다. 그러나 오래된 조직 추출액에서는 배경의 색이 강하게 나타났다(Fig. 3). 이러한 병반 시료 별 차이가 있음에도 불구하고 다양한 화상병 병징 세균 추출액에 대해서는 본 연구에 사용한 2가지 스트립은 모두 양성반응을 보여주었다.

화상병과 유사한 가지검은마름병이 발생한 경기도 광주의 포장에서는 병반 추출액에 대해 2가지 진단 스트립 모두 양성반응을 나타내었지만, 병원균 분리에서 Ep가 분리되었는데, 이 결과는 본 연구에 사용한 2가지 진단 스트립으로는 화상병과 가지검은마름병을 구분할 수 없음을 보여주었고 있다.

본 연구의 결과는 이미 상업화되어 사용 중인 Ea AgriStrip과 본 연구에서 개발한 EB strip 사이에 사용한 모든 균주에 대한 특이성, 검출민감도 및 현장진단에서 진단 결과에서 큰 차이가 없음을 보여주었고 있다. 본 연구에 사용한 항혈청을 이용한 2가지 진단키트의 낮은 검출민감도와 Ea와 Ep를 구별하지 못하는 특이성의 한계는 이 병의 현장진단에 추가적인 수단이 필요함을 의미한다. 즉 검출민감도가 혈청 스트립보다 월등하게 우수하고, Ea와 Ep를 구별할 수 있는 LAMP법이 현장진단에 추가로 사용된다면 화상병과 가지검은마름병을 훨씬 더 정확하게 진단할 수 있을 것으로 생각된다. Buhlmann 등(2013)은 Ea와 Ep를 구별할 수 있으며, 검출민감도가 매우 우수한 Ea 특이적 LAMP를 보고하였다. 한편 진단 스트립을 이용한 현장진단의 경우 특별한 기구없이 발생의심 과수원에서 1시간 이내에 진단이 가능한 장점이 있다. 본 연구의 전체 결과는 Ea AgriStrip과 EB strip이 겨울철 병원균의 밀도가 낮은 시료에서 병원균을 검출하지 못하는 경우가 있음에도 불구하고 과수 생육기에 화상병의 현장진단을 위해 충분히 사용될 수 있음을 보여주고 있다. 또한 가지검은마름병에 대한 양성반응의 경우 이 병이 아직까지 병든 나무를 매몰해야 하는 법적 관리병으로, 이 병원균에 대한 양성반응이 이들 진단 스트립의 화상병 현장진단에 사용의 제약이 될 수 없을 것으로 판단된다.

화상병의 국내 정착에 의해 발생하는 방제비용, 농산물 수출입의 어려움 등은 이 병이 국내에서 정착하지 못하도록 박멸하는 것이 최우선 목표가 되어야 함을 의미한다. 현재 발생의심 시료를 농촌진흥청에 보내고, 농촌진흥청으로부터 확진공문 수령 후 매몰처분을 하고 있는데, 의심 병징의 발견과 확진 사이 시간이 소요된다. 항혈청 기반 스트립의 현장진단에서 양성반응은 확진 전에 즉시에 임시조치를 취할 수 있도록 해주어 병징 발견과 확진 사이에 생길 수 있는 이 병의 전반을 차단할 수 있게 해주며, 또한 많은 의심시료가 농촌진흥청으로 보내지기 전에 1차로 스크린(screen)하는데 매우 유용할 것으로 판단된다.

요 약

최근 한국에서 화상병이 발생하였으며, 그 이후로 이병에 대한 박멸프로그램이 가동되고 있다. 본 연구에서는 2가지 항혈청기반 진단 스트립의 국내 분리 화상병균 *Erwinia amylovora* (Ea)에 대한 특이성과 검출민감도 그리고 현장진단에 적용을 평가하였다. 상업화된 Ea AgriStrip과 본 연구에서 개발한 EB strip은 검정에 사용한 모든 한국 Ea 균주들과 가지검은마름병을 일으키는 대부분의 *Erwinia pyrifoliae* (Ep)에 양성반응을 보여주었다. 사과나무 가지마름병을 일으키는 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Pss)의 사용한 모든 균주에 음성반응을 보여주었다. 2 스트립 사이에 검출민감도는 유사하였다. 현장진단의 경우, 2가지 스트립은 화상병이 발생한 모든 과수원에서 채취한 화상병징 세균추출액에 대하여 양성반응을 보였다. 그러나 겨울철에 진행된 한 곳의 화상병 현장진단에서는 화상병징 세균추출액에 음성반응을 보였다. 또한 2가지 스트립은 가지검은마름병이 발생한 과수원에서 채집한 가지검은마름병징 세균추출액에 대해서 양성반응을 보여주었다. 이상의 결과는 Ea AgriStrip과 EB strip이 화상병 현장진단에 유용할 것으로 암시한다.

Conflicts of Interest

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

Acknowledgement

This work was supported by a grant from "Cooperative Research Program for Agriculture Science & Technology Development (Project No. PJ0117582017)" Rural Development Administration, Republic of Korea. We thanks Prof. Yong Ho Jeon for providing *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains from apple tree.

References

- Braun-Kiewnick, A., Altenbach, D., Oberhänsli, T., Bitterlin, W. and Duffy, B. 2011. A rapid lateral-flow immunoassay for phytosanitary detection of *Erwinia amylovora* and on-site fire blight diagnosis. *J. Microbiol. Methods* 87: 1-9.
- Buhlmann, A., Pothier, J. F., Rezzonico, F., Smits, T. H. M., Andreou, M., Boonham, N., Duffy, B. and Frey, J. E. 2013. *Erwinia amylovora* loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid pathogen detection and on-site diagnosis of fire blight. *J. Microbiol. Methods* 92: 332-339.
- EPPO. 2013. PM 7/20 (2) *Erwinia amylovora*. *Bull. OEPP/EPPO Bull.* 43: 21-45.
- Gorris, M. T., Cambra, E., Paulin, J. P., Chartier, R., Cambra, M. and Lopez, M. M. 1996 Production and characterization of monoclonal antibodies specific for *Erwinia amylovora* and their use in different serological techniques. *Acta Hort.* 411: 47-52.
- Han, K. S., Yu, J.-G., Lee, H.-B., Oh, C.-S., Yea, M.-C., Lee, J.-H. and Park, D. H. 2016. Controlling by effective pruning of twigs showing black shoot blight disease symptoms in apple trees. *Res. Plant Dis.* 22: 269-275.
- 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.
- Myung, I.-S., Lee, J.-Y., Yun, M.-J., Lee, Y.-H., Lee, Y.-K., Park, D. H. and Oh, C.-S. 2016. Fire blight of apple, caused by *Erwinia amylovora*, a new disease in Korea. *Plant Dis.* 100: 1774.
- Park, D. H., Lee, Y.-G., Kim, J.-S., Cha, J.-S. and Oh, C.-S. 2017. Current status of fire blight caused by *Erwinia amylovora* and action for its management in Korea. *J. Plant Pathol.* doi: 10.4454/jpp.v99i0.3918/ (In press)
- Park, D. H., Yu, J.-G., Oh, E.-J., Han, K. S., Yea, M. C., Lee, S. J., Myung, I.-S., Shim, H. S. and Oh, C.-S. 2016. First report of fire blight disease on Asian pear caused by *Erwinia amylovora* in Korea. *Plant Dis.* 100: 1946.
- Powney, R., Beer, S., Plummer, K., Luck, J. and Rodoni, B. 2011. The specificity of PCR-based protocols for detection of *Erwinia amylovora*. *Australas. Plant Pathol.* 40: 87-97.
- Rhim, S. L., Volksch, 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., 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.
- The Korean Society of Plant Pathology. 2009. List of Plant Diseases in Korea. 5th ed. Suwon, Korea. 853 pp.
- van der Zwet, T., Orolaza-Halbrecht, N. and Zeller, W. 2012. Fire Blight, History, Biology, and Management, pp. 15-36. APS Press, St. Paul, MN, USA.