기내 검정법을 이용한 국내 과수 화상병 방제제 선발

In Vitro Screening of Antibacterial Agents for Suppression of Fire Blight Disease in Korea

이민수¹ · 이인경¹ · 김삼규¹ · 오창식² · 박덕환^{1*}

¹강원대학교 생물자원과학부 응용생물학전공, ²경희대학교 원예생명공학과

***Corresponding author**

Tel: +82-33-250-6432

Fax: +82-33-259-5558

E-mail: dhp@kangwon.ac.kr

Min Su Lee¹, Inyeong Lee¹, Sam Kyu Kim¹, Chang-Sik Oh², and Duck Hwan Park^{1*}

¹Applied Biology Program, Division of Bioresource Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

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

Since fire blight disease on apple and pear was produced in Korea in 2015, there were no registered chemicals to control against this disease. Instead, several antibacterial chemicals that were registered for other bacterial diseases such as soft rot and bacterial spot have been authorized by Rural Development Administration (RDA). However, these chemicals are not tested efficacy for fire blight disease except damage by those treatments on apple and pear in Korea. Thus, we evaluated efficiency using *in vitro* and *in planta* assays of antibacterial chemicals such as antibiotics and copper compounds including kasugamycin, oxytetracycline, oxolinic acid and streptomycin, and copper hydroxide, copper sulfate, oxine copper and tribasic copper sulfate, respectively. We also tested two kinds of biological agents. As expected, significant antibacterial effect was observed *in vitro* test of both antibiotics and copper-based chemicals. *In planta* test based on disease severity including ooze and water-soaked formation on immature pears, bacterial populations on blooms, and blight lesion formation in artificially inoculated shoots, kasugamycin, oxytetracycline and streptomycin have been shown the most efficiency among tested antibiotics. Four copper-based chemicals tested in this study, control effects are little bit lower than agricultural antibiotics but they seem to be available to use in terms of winter season. Biocontrol agents were also shown possibility to treat in eco-friendly farms. In addition, there are no antibiotic resistance genes in Korean isolates against antibiotics, which were selected for suppression of fire blight in this study.

Keywords: Antibiotics, Control agents (CAs), Copper compounds, *Erwinia amylovora*, Fire Blight (FB)

Received January 22, 2018

Accepted February 9, 2018

서 론

과수 화상병(Fire blight disease)은 식물병원세균 *Erwinia amylovora* (Burrill 1882)에 의해 발생하는 과수병해로, 사과,

배, 살구, 자두, 라즈베리 등 장미과에 속하는 과수나무들을 기주로 하여 매우 큰 손실을 초래하는 대표적 식물병원세균 병해이다(van der Zwet 등, 2012). 화상병의 발생은 1780년 미국 동부 지역에서 최초로 보고된 이래, 지중해 연안 나라들을 포함한 다수의 유럽국가에서 발생하였으며, 최근에는 중국과 경제지역인 중앙아시아 카자흐스탄과 키르기스스탄에서도 발생된 것으로 최종 확인되었다(Drenova 등, 2012). 국내의 경우 2015년

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.

이전까지는 과수 화상병과 유사한 병징을 나타내는 이병체로부터 화상병원세균으로 최종 확인된 사례는 전무하였으며, 이에 농림축산검역본부는 식물방역법에 근거하여 화상병원세균을 금지병해충으로 지정하여 관리하여 왔다. 그러나 2015년 5월 초 안성시 배나무 과원에서 발생한 유사 병징의 이병체로부터 화상병원세균의 존재가 최종 확진 판정을 받았으며, 이를 토대로 *E. amylovora*에 의한 국내 배나무 화상병이 국내 최초로 보고되었다(Park 등, 2016). 이와 비슷한 시기에 최초 발생지와 근접한 천안시에서도 화상병의 발생이 확인되었으며, 또한 충청북도 제천시에서는 안성과 천안시의 발생시기보다 늦은 여름에 사과나무에서도 화상병이 확인되었다(Myung 등, 2016).

한편 과수 화상병 발생에 의한 경제적 피해는 피해과수를 제거하지 않는 한, 최종적으로는 이병과수는 고사하기 때문에 농가소득 감소 등 피해액의 급증은 당연한 것이다. 일례로 2000년대 초반 미국에서 발생한 과수 화상병에 의해 1억 달러 이상의 경제적 피해가 발생하는 것으로 조사되었으며, 특히 이 시기에 미시건주에서만 한해 400,000 만주의 사과나무를 제거하여 약 4천 2백만 달러와 워싱턴주 및 북부 오래곤주에서는 핵과류 화상병에 의한 6천 8백만 달러의 경제적 손실을 초래하였다(Longstroth, 2001; Stockwell 등, 2002). 국내에서도 2015년 안성, 천안 그리고 제천의 총 46 과원에서 화상병이 최종 확진되어 이병나무는 매몰처리와 동시에 전체 과원을 폐원하고 이에 대한 보상비로 약 60억 이상의 경제적 피해가 발생하였다. 또한 2016년 안성과 천안에서 17 과원 및 2017년 동일지역으로부터 36 과원에서 지속적으로 화상병이 확진되었으며, 식물방역법에 따른 화상병 관리방안을 박멸(eradication) 프로그램을 운영하는 현재의 입장에서는 경제적 손실 또한 지속적으로 증가할 것으로 보인다.

화상병이 최초 확인된 2015년 이래 현재까지 안성과 천안의 사과 및 배나무 과원에서는 화상병이 계속 발생되고 있는 실정임에도 불구하고, 화상병의 확산을 억제하고 감염주에서 *E. amylovora*의 농도를 억제할 수 있는 관리방안에 대해서는 크게 고려되지 않고 있다. 다만, 미국 등 화상병의 발생이 만연하여 기타 다른 식물병해처럼 화상병을 일반방제의 개념으로 하고 있는 나라에서는 항생제와 구리 합성 화합물을 포함한 약제의 사용을 권고하고 있다(Jamar와 Lateur, 2007; Stockwell 등, 2008). 따라서 국내에서도 농촌진흥청 직권으로 미국 등 외국의 사례를 바탕으로 하여 항생제와 구리합성 화합물의 단제 또는 혼합제를 대상으로 총 16개의 약제를 직권등록시켜 농가에 보급하고 있다. 그러나 직권등록이란 약해를 나타내지 않는 것만을 보장하고 약효에 대해서는 어떠한 검증도 이루어지지 않았다는 것을 의미함으로, 미국 등 외국과 환경조건 및 재배품

종의 상이성 등 다양한 차이점이 있다는 것을 감안한다면, 직권등록의 한계를 인정할 수 밖에 없다. 특히 안성과 천안지역에서만 발생되고 있는 화상병의 제한적 발생지역, 우리나라 주요 재배 배 품종인 “신고”는 꽃가루가 없어서 화분 매개충에 의한 전파의 낮은 가능성, 한 과원에서 감염주의 발생양상이 배나무에서는 국부적이지만 사과나무에서는 과원전체에서 발생함 등의 현재까지 화상병 발생지역에서 나타난 국내만의 특수성을 고려하면, 외국에서의 사용 약제를 무조건적으로 직권등록하여 사용하는 것은 적절치 않은 관리방안으로 여겨진다.

따라서 본 논문은 농촌진흥청 직권으로 화상병 방제약제로 직권 등록된 16개의 단제 및 혼합제의 주성분 약제에 대한 화상병 억제효과를 규명하고 이를 활용한 적극적 화상병 대응방안을 마련하기 위하여 수행되었다. 다만 화상병 자체가 식물방역법 기준 금지병해충으로 지정된 관계로 포장검증은 실시할 수 없었으며, 이를 대신하여 실내에서 검증하였다. 또한 최근 미국에서 화상병 방제약제의 문제점으로 대두되고 있는 약제저항성 균주의 출현여부도 확인하여, 화상병 미발생 및 발생능가에 대한 약제 선택의 가능성을 폭넓게 하기 위함도 본 연구의 목적이다.

재료 및 방법

국내 분리 화상병원세균 및 방제제. 국내 분리된 화상병원세균(*E. amylovora*) 8 균주(TS3128, TS3133, TS3240, TS3241, TS3315, TS3325, TS3371, TS3373)를 농촌진흥청으로부터 분양 받았으며, 이중 TS3128 균주를 대표 균주로 활용하였다. 기내 검정을 위한 대표 균주의 배양은 mucoid하며 유백색의 균총 색깔 등 전형적인 화상병원세균의 성상을 잘 나타내는

Table 1. Lists of antibacterial agents for suppression against *E. amylovora* used in this study

Antibacterial class	Active ingredients	Contents (%)
Antibiotic	Kasugamycin	10
	Oxytetracycline	17
	Streptomycin	20
	Oxytetracycline+Streptomycin	18.8
Quinolone	Oxolinic acid	20
Copper	Copper hydroxide	77
	Copper sulfate basic	58
	Oxine copper	50
	Tribasic copper sulfate	15
Microbe	<i>Bacillus subtilis</i>	5×10 ⁹ *

*cfu/g.

MGY (Mannitol Glutamate Yeast extract; D-mannitol 10 g, L-glutamic acid 2 g, KH_2PO_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) 배지를 이용하였다. 화상병 억제제를 위한 기내 검정법에서 사용된 약제는 직권등록 약제의 주성분들을 위주로 하여 선발하였으며, 목록은 Table 1과 같다.

방제제의 최소억제농도(Minimum Inhibitory Concentration) 검정. 방제제들에 대한 최소억제농도 검정은 고체 및 액체배지 모두에서 수행하였다. 고체배지 검정은 방제제를 MGY 배지에 주성분함량이 각각 10, 50, 100, 500 ppm이 되도록 첨가하고 TS3128 균주의 농도를 $\text{O.D.}_{600\text{nm}}$ 에서 0.1로 현탁하여 도말배양 24시간 후 생장하는 균총수에 따라 최소억제농도를 나타내었다. 액체배지에서는 TS3128 균주를 $\text{O.D.}_{600\text{nm}}$ 에서 0.025 농도로 현탁하고 방제제를 각각 주성분함량 10, 50, 100, 250, 500 ppm이 되도록 첨가하여 spectrophotometer (DU®730; Beckman Coulter, Brea, CA, USA)를 이용하여 2시간 간격으로 흡광도를 조사하여 생장여부에 따라 최소억제농도를 나타내었다.

방제제의 *in planta* 억제력 검정. 방제제들에 대한 화상병 억제여부 기내 검정은 사과 및 배나무에서 초기 병징이 주로 관찰된 꽃(bloom), 신초(shoot) 및 미성숙과(immature fruit) 세 부위를 대상으로 하였으며, 국내의 경우 병징이 과원전체에서 나타난 사과를 대상으로 하였다. 꽃은 강원도 지역에서 만개기인 4월 25일부터 29일까지 꽃자루가 포함되도록 수집하였고, 수집된 꽃은 20% sucrose 용액이 담긴 플라스틱 rack에 꽃자루가 담기도록 올려놓았다. TS3128 균주를 1.0×10^8 cfu/ml 농도로 분무 접종한 1시간 후, 모든 방제제의 최소억제농도보다 높은 농도인 권장사용량 기준으로 각 방제제들을 분무처리 하여 플라스틱 밀폐용기(660 mm×380 mm×160 mm)에서 28°C, 100% 상대습도로 6일 보존 후 꽃잎을 제외한 암술, 수술, 씨방,

배, 꽃받기를 모두 멸균수에 마쇄하여 MGY 배지에서 도말배양하여 균총수를 측정하였다. 한편 Kunz와 Donat (2014)에 의하면 꽃에서 최초 병징을 발생하는 화상병인 blossom blight를 효율적으로 억제하는 것으로 보고된 Blossom Protect™를 포함하여 후보 방제제들의 효과여부 판정에 신뢰성을 제고하였다.

신초의 경우 낙화 후 1년생 신초가 약 20 cm 생장하는 5월 22일부터 6월 26일까지 수집하였으며, 꽃의 경우와 동일한 농도로 신초의 뒷면 잎자루에 주사기를 이용하여 화상병원세균 현탁액을 접종하였다. 접종 1시간 후 권장사용량 기준농도의 방제제들을 분무처리 하여 밀폐 유리병($\varnothing 10.8$ cm×36 cm)에 넣어 28°C, 100% 상대습도로 8일 후 억제여부를 발병도로 나타내었다. 또한 화상병원세균 현탁액 접종과 방제제 처리 순서를 바꾸어 선처리에 의한 방제제의 억제효과를 조사하였다. 발병도는 신초 뒷면 잎자루에 형성되는 병징의 길이를 백분율에 따라 0–5등급으로 나누었다(Table 2).

미성숙과의 직경이 1–2 cm 생장한 5월 26일부터 6월 18일까지 수집된 과를 1% 차아염소산나트륨으로 표면 살균 후 중앙부를 절단하여 반쪽씩 멸균된 petri dish에 filter paper를 깔고 잘린 단면이 아래로 향하도록 올려놓았다. 미성숙과의 잘리지 않은 볼록한 단면에 No. 1 cork borer로 구멍을 낸 후, 여기에 화상병원세균 현탁액을 위 실험과 동일농도로 20 μl 치상 접종 후 1시간 뒤 권장사용량 농도의 방제제들을 분무처리 하여 petri-dish를 밀봉하여 28°C, 100% 상대습도에서 6일 후 발병도를 조사하였다. 또한 화상병원세균 현탁액 접종과 방제제 처리 순서를 바꾸어 선처리에 의한 방제제의 억제효과를 조사하였다. 발병도는 미성숙과 내부 및 표면에 나타나는 병징을 세 종류로 구분하여 각각 0–5등급으로 나누어 조사하였다(Table 3). 발병도를 결정하는 세 종류의 기준은 첫째, 접종부위 주변의 수침상 정도, 둘째 접종부위 주변 갈변화 정도, 그리고 세번째는 수침상 및 갈변조직에 형성되는 세균성 ooze의 개수를 말한다.

Table 2. Index of disease severity based on producing necrosis symptoms on abaxial vein in leaves

Index	0	1	2	3	4	5
Disease severity	0%	1–15%	16–30%	31–50%	51–75%	76–100%
Representative symptoms

Table 3. Index of disease severity based on producing three kinds symptoms on immature fruits

Index	Disease severity			Representative symptoms
	Water soaking	Browning	No. of bacterial oozes	
0	0%	0%	0
1	1–5%	1–3%	1–30
2	6–15%	4–10%	31–50
3	16–50%	11–30%	51–70
4	51–70%	31–60%	71–100
5	71–100%	61–100%	100~

항생제 저항성 유전자 검정. 본 연구에서 국내 화상병 억제제를 위한 항생제 계열 방제제들에 대한 저항성 유전자의 존재유무를 확인하여, 국내 화상병원세균의 항생제 저항성 여부를 검정하였다. Streptomycin 저항성 유전자 확인은 6.7 kb의 transposable element인 Tn5393에 의한 수평적 유전자 교환방식에 의해 획득하게 되는 *strA* (5'-TGA CTGGTTGCCTGT-CAGAG-3'; 5'-CGGTAAGAAGTCGGGATTGA-3') 및 *strB* (5'-ATC-GCTTTGCAGCTTTGTTT-3'; 5'-CGTTGCTCCTCTTCTCCATC) 유전자를 증폭하여 각각 406 및 403 bp PCR 산물로 확인하였다 (Tancos 등, 2016). 또한 streptomycin 저항성 발생의 빈도는 낮지만 돌연변이 발생 시 매우 강한 streptomycin 저항성을 유도하게 되는 S12 ribosomal 단백질을 코딩하는 *rpsL* 유전자의 43

번째 코돈에서 point mutation에 의한 spontaneous 돌연변이가 알려져 있다 (Chiou와 Jones, 1995). 이를 확인하기 위하여 5'-GCAAAAGCAAATCCAGGAGC-3'와 5'-GGCCTTACTTAACG-GAGAACCA-3' 프라이머를 이용하여 PCR 산물을 얻고, 염기서열분석을 통해 돌연변이 여부를 확인하였다 (de León Door 등, 2013). Kasugamycin 저항성 검정은 *ksgA* 유전자 염기서열상의 spontaneous 돌연변이 여부를 5'-ATCAGGGGCTTCCGGTGC-TAAAT-3'와 5'-AATATGCGGCTGTTCTCCACAC-3' 프라이머를 이용하여 1,232 bp 산물을 얻고 염기서열을 확인하여 돌연변이 여부를 검정하였다 (McGhee와 Sundin, 2011).

부생균들에 대한 항생제 저항성 검정. Streptomycin 저항

성 균주의 출현은 앞서 설명하였듯이 transposable element 내 포함된 저항성 유전자를 수평적 유전자 교환방식에 따라 손쉽게 획득하게 된다. 화상병원세균과 사과 잎 표면을 공동 서식처로 하고 있는 부생균들이 streptomycin 저항성 유전자를 내재하고 있다면, 수평 유전자 교환방식에 의해 streptomycin 저항성 유전자를 화상병원세균으로 전이할 수 있는 확률이 매우 높을 수 있다. 이에 사과 잎 표면으로부터 분리한 부생균들로부터 *strA* 및 *strB* 유전자 유무를 동일한 방법으로 검출하였다.

방제제의 화분매개충에 대한 독성 검정. 국외에서의 과수 화상병의 발생은 개화기 화분매개충에 의한 발생빈도가 높은 것으로 보고되고 있다(Norelli 등, 2003). 이에 국내 과수 화상병의 발생원인 및 경로에 대한 연구가 아직까지 미흡한 실정에서는 국외의 보고에 따라 방제제 처리시기를 개화기로 권유하고 있으나, 재배농민들은 개화기 수분력 감소원인으로 각종 방제제 살포를 말하고 있는 실정에서 무조건적인 화상병 방제제 살포를 유도할 수만은 없는 실정이다. 본 연구에서는 국내 과수 화상병 방제제로 선발된 후보 방제제들을 대상으로 대표적 화분매개충인 꿀벌(*Apis mellifera*)에 대한 접촉 및 경구 독성검사를 실시하여, 이러한 재배농민들의 불안감을 해소하고자 하였다. 독성 검정은 각 방제제별 꿀벌 10개체를 1,000 ppm 농도로 분무처리하거나, 먹이에 혼합하여 45 cm×35 cm×40 cm 플라스틱 박스에서 각각 노출과 섭식을 유도하면서 처리 30분부터 24시간까지 2시간 간격으로 사충률을 조사하였으며, 총 3회 반복하여 실시하였다.

통계분석처리. 방제제의 *in planta* 억제력 검정결과는 처리 간 비교를 위해 SAS (ver. 9.4. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 프로그램을 이용하여 ANOVA (Analysis of variance)와 DMRT (Duncan's multiple range test, $P=0.05$)를 통해 유의성성을 검정하였다.

결과 및 고찰

과수 화상병 후보 방제제들의 억제효과. 고체 및 액체배지에서의 기내(*in vitro*) 검정을 통한 최소억제농도는 항생제들의 경우, 유효성분에 따른 권장사용량 기준(ppm 기준; kasugamycin 100; oxytetracycline 170; streptomycin 160; oxytetracycline + streptomycin 15+150)보다 매우 낮은 10–50 ppm 농도가 최소억제농도로 나타났다(data not shown). Quinolone계의 oxolinic acid는 권장사용량이 200 ppm인 반면, 고체 및 액체배지 모두에서 최소억제농도는 10 ppm이었으며, 구리합성

화합물의 경우도 마찬가지로 각각 권장사용량 기준(copper hydroxide 1,540, copper sulfate basic 1,160, oxine copper 1,000; tribasic copper sulfate 150)보다 낮은 50 ppm 수준에서 최소억제농도가 결정되었다(data not shown). 다만 예외적으로 copper hydroxide의 경우 고체배지보다 액체배지에서 높은 농도의 최소억제농도를 나타내었는데, 이는 구리 특유의 뭉침(aggregation) 현상 때문으로 사료되며, copper sulfate basic의 고체배지에서의 높은 최소억제농도는 이 물질의 확산력이 감소하기 때문으로 판단되었다. 따라서 권장사용량 기준농도보다 최소억제농도가 모두 낮은 농도로 조사되었기에, 후보 방제제의 과수 화상병 억제여부를 실질적으로 판단하는 *in planta* 검정에서는 모든 방제제의 권장사용량 기준농도로 억제효과 여부를 검정하였다.

사과의 꽃, 신초, 그리고 미성숙과 3종류를 이용한 *in planta* 검정에서는 예상대로 aminoglycoside 항생제인 streptomycin과 kasugamycin이 꽃의 암술, 수술 및 꽃자루 내 풍부한 당을 이용하여 증식하는 화상병원세균을 사멸시키는 효과가 크게 나타났으며(Fig. 1A), 이는 미국에서 꽃마름병(blossom blight)을 억제하기 위해 가장 효율적인 항생제가 streptomycin과 kasugamycin으로 보고된 사실과 유사한 결과였다(Cox 등, 2013; Russo 등, 2008; Sundin 등, 2009). 또한 신초 뒷면 주맥에 접종된 화상병원세균의 병징 확산의 억제효과도 매우 우수하였으며(Fig. 1B), 미성숙과의 접종부위로부터 수침상 및 갈변증상의 확산과 세균성 ooze 형성 억제능력도 뛰어났다(Fig. 1C). 이는 2종류의 aminoglycoside 항생제인 streptomycin과 kasugamycin이 신초 및 미성숙과 조직내로 잘 흡수됨과 동시에 조기에 분해되는 등의 부작용은 없기 때문인 것으로 사료된다. 기내 *in planta* 검정의 조건상 방제제 처리조건의 전처리와 후처리의 차이점이 접종 전, 후 1시간의 간격이었지만, 이 2종류의 항생제는 전, 후처리 모두 효과를 나타내었다(Fig. 1B, 1C). Streptomycin은 치료효과를 갖는 항세균 억제 기작의 특성과 동일 가격대비 가장 유효한 억제효과를 나타내는 항생제로 이용되고 있다(Russo 등, 2008; Sundin 등, 2009; Tancos 등, 2016; van der Zwet 등, 2012). 이에 스위스 등 유럽국가에서는 원칙적으로 화상병 방제를 위한 항생제 사용을 금하고 있으나, 대발생의 경우 1회 처리를 한시적으로 허용하고 있다(Gusberti 등, 2015). 현재까지 국내 화상병 관리는 식물방역법 이하 공적방제 체계하에 정부가 농민에게 방제제를 무상공급하고 있으며, 여기에는 streptomycin이 가장 대표적 공급약제로, 본 논문의 연구결과는 현행 streptomycin의 공급에 무리가 없음을 증명한다. 그러나 streptomycin 저항성 화상병원세균 균주의 출현은 streptomycin 사용의 가장 큰 저해요인으로 작용하고 있다

Fig. 1. *In planta* assays of antibacterial agents such as antibiotics, copper compounds and biological control agents for suppression of fire blight disease. (A) Survival of *E. amylovora* TS3128 on apple flowers when the bacteria were inoculated 24 h prior to treatments of antibacterial agents. (B) Disease severity based on index using necrotic lesion size on apple leaves following applications with antibacterial agents prior to inoculation (left), and applications with antibacterial agents after TS3128 inoculation (right). (C) Disease severity based on index using water-soaked and necrotic lesion sizes, and no. of bacterial ooze in immature apple fruits following applications with antibacterial agents prior to inoculation (left), and applications with antibacterial agents after TS3128 inoculation (right). Results shown combined from three experiments. Letters with data indicate the means are significant different if given the different letter ($P=0.05$).

(McGhee 등, 2011; Tancos와 Cox, 2016, 2017; Tancos 등, 2016).

이에 aminoglycoside동일계열 항생제인 kasugamycin의 사용이 streptomycin 대체용으로 미국 등에서 권장되고 있다 (McGhee와 Sundin, 2011). Kasugamycin은 본래 벼 도열병 방제약제로 개발되었고, 1980년대 화상병에 대한 억제효과도 증명되었으나 과수에 약해를 발생시켜 크게 사용되지 않았던 방제제이다(Psallidas와 Tsiantos, 2000). 그러나 가장 효과적이며, 가격대비 효율성이 높은 streptomycin의 저항성 균주 출현에 따른 대체 방제제로서 그 효용가치가 매우 높다고 할 수 있으며, 또한 사용 가능한 농용항생제의 범주가 매우 좁다는 측면에서 더욱 더 kasugamycin의 가치가 높으며, 본 연구결과도 이를 뒷받침하고 있다.

또 다른 항생제인 oxytetracycline은 미국 서부지역과 같은 강수량이 적고 건조한 지역에서 사과나무 화상병 방제에 효과적인 것으로 알려져 있는 반면, 습도가 높은 북동부지역에서는 효과가 감소할 수 있다고 보고되었다(Stockwell 등, 2008). 이는 oxytetracycline의 작용기작이 aminoglycoside 계열 항생제가 가지고 있는 치료효과와는 달리 증식을 억제하는 정균 항생제(bacteriostat)의 특성을 나타내기 때문이다. 그러나 본 연구의 3종류 사과나무 부위를 이용한 기내 검정법에서는 streptomycin보다 우수한 화상병원세균 억제 및 병징확산 효과를 나타내었다(Fig. 1). 또한 신초와 미성숙과에서의 전처리 및 후처리 모든 경우에 효과적이었으며, 특히 oxytetracycline과 kasugamycin이 streptomycin에 비해 통계학적으로 우수한 억제효과를 나타내었는데, 이는 국내 살세균제로 streptomycin이 가장 많이 사용되고 있기에, 국내 화상병원세균의 oxytetracycline과 kasugamycin에 대한 노출이 보다 적기 때문인 것으로 사료된다. 한편 oxytetracycline과 streptomycin의 혼합제는 각 단계에 비해 상승효과가 없는 것으로 조사되었는데(Fig. 1), 재배농민들은 습성적으로 streptomycin 처리에 의한 효과가 감소한다고 느꼈을 때, oxytetracycline+streptomycin 혼합제를 처리하는 경우가 있으므로 농용항생제의 오남용을 방지하기 위해서 본 연구결과를 토대로 홍보를 강화하는 것이 필요하다고 사료된다.

Quinolone계 항생제인 oxolinic acid도 본 연구에서는 화상병을 억제할 수 있는 특성이 나타났다(Fig. 1). 그러나 꽃에서의 세균증식만을 억제하고, 신초와 미성숙과의 병징확산 능력은 기타 항생제들에 비해 낮은 것으로 나타났다. 다만 배추 무름병과 고추 세균점무늬병 등 세균병 전문약제로 등록된 현 상황에서 화상병 방제제로서의 가능성에 대해서는 주의 깊게 고려해야만 할 것으로 판단된다.

화상병 방제를 위한 구리 합성 화학물은 지난 세기부터 사용되어져 왔으며, 현재까지도 항생제의 사용이 엄격히 규제되고

있는 많은 유럽국가들에서는 대표적 방제제이다(Anonymous, 1999; van der Zwet와 Keil, 1979). 국내에서도 식물세균병해를 억제하기 위한 대표적 살세균제로 사용되고 있으며, 본 연구에서 기내 검정법을 통해 4종류의 구리 합성 화학물의 화상병 억제여부를 판단한 결과, 꽃에서는 copper hydroxide, 신초 전처리에서는 tribasic copper sulfate와 후처리에서는 검정에 사용한 모든 4종류의 구리 합성 화학물 그리고 미성숙과 전처리는 tribasic copper sulfate 및 copper hydroxide, 후처리에서는 tribasic copper sulfate가 화상병원세균 사멸 및 병징확산 효과를 인정할 수 있는 수준으로 나타났다(Fig. 1). 따라서 본 실험에 사용된 화상병 억제용 구리 합성 화학물 중 가장 효과적인 것은 tribasic copper sulfate와 copper hydroxide로 판단되나, 현재까지 구리이온과 화상병원세균간의 상호관계에 대한 정보가 매우 적은 상황에서는 조심스러운 접근이 필요하다고 사료된다(Ordax 등, 2006). 또한 지속적으로 구리를 처리하여 온 포장에서의 식물병원세균은 구리이온에 대한 자신만의 특수한 생존전략을 구축하여 왔는데, 이는 배양은 되지 않으면서 생존은 확인이 되고 이 기간 동안 병원성은 유지되면서 화상병원세균 확산의 주된 요인으로 생각되는 viable-but-nonculturable state (VBNC) 상태를 의미한다(Ordax 등, 2006, 2010). 특히 본 실험에서도 꽃, 신초 및 미성숙과에 처리된 구리 합성 화학물에 의해 화상병원세균이 스트레스 상태로 진입하면서 VBNC 상태로 전환될 수 있는 가능성은 매우 높으며, 이러한 이유로 사과나무 부위별과 구리 합성 화학물의 구리이온 종류에 따라 서로 다른 억제효과를 보여주는 원인이 될 수도 있다고 고려된다. 따라서 구리 합성 화학물 중, 최적 억제효과를 나타내는 방제제를 선발하기 위해서는 VBNC 상태를 점검하는 과정을 추후 실시할 계획이다.

한편, 생물적 방제제로 등록된 *Bacillus subtilis* (Pusey, 2002)는 꽃과 신초의 병원세균 억제와 병징확산 효과가 인정되는 수준이었으며, 신초와 미성숙과 모두 후처리 보다는 전처리에서 보다 높은 방제효과를 나타내어 생물적 방제제의 특성과 일치하였다(Fig. 1). 또한 작용기작의 특성상 꽃에서 화상병원세균의 증식을 억제하는 Blossom Protect™는 꽃에서 억제효과를 나타내어 이전 보고와 일치하는 결과였다(Kunz와 Donat, 2014) (Fig. 1A).

선발 항생제에 대한 저항성 균주 검정. 본 연구에서 선발된 항생제 중, 저항성 균주의 출현이 미비한 것으로 보고되어 있는 oxytetracycline (Loper 등, 1991)를 제외한 streptomycin과 kasugamycin에 대한 국내 화상병원세균들의 저항성 여부를 판단하였다. 먼저 transposable element에 의해 획득되는

Fig. 2. Confirmation of streptomycin-resistance genes in eight Korean *E. amylovora* isolates. (A) PCR amplification of the *strA* and *strB* genes in eight *E. amylovora* isolates from Korea using primers strA406-F/strA406-R and strB403-F/strB403-R from Tancos et al. (2016). Results shown no bands with the expected the 406 and 403 bp corresponding to *strA* and *strB* genes, respectively. Lanes (1–8) in the gel are loaded of TS3128, TS3133, TS3240, TS3241, TS3315, TS3325, TS3371 and TS3373 isolates from Korea while lanes in the bottom gel are loaded with amplicons of 16s rRNA gene of those isolates. (B) Comparison of the nucleotides and deduced amino acid sequence of *rpsL* gene from eight *E. amylovora* isolates from Korea. The amino acid at codon 43 are lysine (K) and are shown in red box, indicate that there are no alterations at codon 43.

Fig. 3. Comparison of the nucleotides and deduced amino acid sequence of *ksgA* gene from eight *E. amylovora* isolates from Korea. As depicted in the diagram, eight *E. amylovora* isolates had no carrying amino acid change in the translated protein or frameshift corresponding to 7 (change to stop codon), 49 (point mutation), 126 (1 nucleotide deletion; frameshift), 139 (point mutation), and 182–193 (10 nucleotides deletion; frameshift).

streptomycin 저항성 유전자 *strA* 및 *strB*의 존재는 검정에 사용된 국내 화상병원세균 8균주에서는 모두 검출되지 않았다(Fig. 2A). 또한 *rpsL* 유전자 내 43 코돈에 발생하는 point 돌연변이에 의해 아미노산 lysine이 arginine, asparagine 및 threonine으로의 변환여부에서도 모두 본래의 lysine을 코딩하는 것으로 판별되어(Fig. 2B), 본 연구에서 사용된 국내 화상병원세균 8균주는 모두 streptomycin 저항성 균주가 아닌 것으로 최종 판명되었다. 또한 사과 잎 표면으로부터 분리한 부생균 8균주들도 streptomycin 저항성 유전자들을 획득하거나 돌연변이가 발생하지 않은 것으로 검증되었다(data not shown). 한편, McGhee와 Sundin (2011)의 보고에 따르면, 미국 미시건주 실험포장 내 사과나무에서 분리한 3균주가 kasugamycin 저항성 균주로 확인되었으며, 이는 *ksgA* 유전자 염기서열의 spontaneous 돌연변이에 의해 서로 다른 5개의 위치에서 아미노산의 치환 또는 frameshift 현상이 발생하였다. 이에 국내 화상병원세균 8균주의 *ksgA* 유전자 염기서열을 분석한 결과, 5개의 서로 다른 위치의 아미노산 염기서열의 변이는 발생하지 않는 것으로 조사되었다(Fig. 3). 따라서 본 연구에서 사용된 국내 화상병원세균 8균주는 선발 후보 방제제인 streptomycin과 kasugamycin에 대한 저항성 발현이 발생하지 않았으며, 이들 항생제를 사용하여도 무방하다고 판단되었다. 그러나 참다래 꽃색염 병원세균과 감귤 궤양병원세균에서 transposable element에 의한 streptomycin 저항성 유전자가 발견된 사례가 있으므로(Hyun 등, 2012; Park 등, 2007) 향후, 오남용에 대한 대응방안으로 적절한 처리량 및 처리체계 등의 관한 연구가 시급한 실정이다.

선발 방제제의 화분매개충에 대한 영향평가. 본 연구를 통하여 국내 화상병 방제제로서 활용가치가 높다고 여겨지는 항생제 3종과 구리 합성 화학물 2종의 대표적 화분매개충인 꿀벌

에 대한 영향평가를 실시하였다. 이 때 대표적 침투 이행성 살충제로 다른 계통 살충체에 대해 저항성이 생긴 해충에도 우수한 효과를 나타내는 thiamethoxam과 물만을 처리하여 각각 positive 및 negative 비교구로 설정하였다. 화분매개충에 대한 접촉독성은 살충제 thiamethoxam이 100% 사충률인 반면, 꿀벌 영향평가에 사용된 모든 방제제는 접촉 24시간까지 독성이 나타나지 않았다(Table 4). 또한 섭식 후 발생하는 경구독성에서도 뚜렷한 positive 비교구 thiamethoxam이 섭식 1시간 후 100% 사충률을 나타내었지만, 후보 방제제들은 영향이 없는 것으로 조사되었다(Table 4). 다만 oxolinic acid와 구리 합성 화학물 copper sulfate basic 및 oxine copper에서 총 3반복 30마리의 꿀벌 중, 1반복에서만 1마씩 섭식 24시간 후 사멸하였다. 그러나 이는 독성에 의한 영향은 아니라고 판단되며, 실험 상 오류로 사료되었다.

요 약

국내 과수 화상병은 2015년 사과 및 배에서 발생하여 큰 피해를 주고 있으나, 이에 대한 적절한 방제제는 등록되어 있지 않다. 다만 농촌진흥청은 무름병과 세균점무늬병 등 다른 식물세균병에 등록되어 있는 살세균제들을 직권등록 시켜놓은 상태이다. 그러나 직권등록이란, 약효는 보증하지 않으면서 약해만을 보증하는 제도로, 국내에서 과수 화상병이 지속적으로 발생되고 있는 상황에서는 적절한 방제제를 선발하는 것이 요구되어지기에 본 연구를 수행하였다. 직권등록 국내 과수 화상병 방제제 중, 각각 4종의 농용항생제와 구리 합성 화학물 그리고 생물학적 방제제 2종에 대한 기내 검정법을 통하여 국내 과수 화상병원세균 억제 및 병징확산 억제효과를 검증하였다. Kasugamycin, Oxytetracycline 및 streptomycin의 항생제는 효과가 우수하였으며, oxolinic acid는 꽃에서의 억제효과는 우수하였지만 신초 및 미성숙과 기내검정에서는 다소 효과가 감소하였다. 4종의 구리 합성 화학물은 항생제만큼의 억제효과는 나타내지 않았지만, 사용가능한 수준으로 조사되었다. 또한 2종의 생물적 방제제는 처리시기 등을 고려할 경우, 친환경 재배지에서는 사용 가능할 것으로 판단되었다. 한편 국내 과수 화상병원세균은 선발 방제제 중 항생제 저항성 유전자들을 가지고 있지 않고, 화분매개충에 대한 영향도 없는 것으로 조사되었다.

Conflicts of Interest

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

Table 4. Toxicity tests of selected antibacterial agents against honeybee

Antibacterial agent	Acute toxicity		Oral toxicity	
	Death in 24 h		Death in 24 h	
	No.	Dead time	No.	Dead time
Water	0	—	0	—
Oxytetracycline	0	—	0	—
Streptomycine	0	—	0	—
Oxytetracycline+Streptomycin	0	—	0	—
Oxolinic acid	0	—	1	24 h
Copper sulfate basic	0	—	1	24 h
Oxine copper	0	—	1	24 h
Thiamethoxam	30	30 m	30	1 h

Acknowledgement

This work was supported by the "Cooperative Research Program for Agriculture Science & Technology Development (Project No. PJ0117582018)" of the Rural Development Administration, Republic of Korea.

References

- Anonymous. 1999. Opinion of the scientific steering committee on antimicrobial resistance, Unit B3 – management of scientific committees II, amount of antimicrobial used, European Commission. In: Directorate General XXIV Consumer Policy and Consumer Health Protection, pp. 44-45. European Commission, Brussels, Belgium.
- Chiou, C. S. and Jones, A. L. 1995. Molecular analysis of high-level streptomycin resistance in *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 85: 324-328.
- Cox, K. D., Aldwinckle, H. S., Villani, S. M. and Bekoscke, K. A. 2013. Evaluation of bactericide programs for the management of fire blight on 'Idared' apples in NY, 2012. *Plant Dis. Manage. Rep.* 7: PF001.
- de León Door, A. P., Chacón, A. R. and Muñiz, C. A. 2013. Detection of streptomycin resistance in *Erwinia amylovora* strains isolated from apple orchards in Chihuahua, Mexico. *Eur. J. Plant Pathol.* 137: 223-229.
- Drenova, N. V., Isin, M. M., Dzhamurzina, A. A., Zharmukhamedova, G. A. and Aitkulov, A. K. 2012. Bacterial fire blight in the Republic of Kazakhstan. *Plant Health: Research and Practice* 1: 44-48.
- Gusberti, M., Klemm, U., Meier, M. S., Maurhofer, M. and Hunger-Glaser, I. 2015. Fire blight control: the struggle goes on. A comparison of different fire blight control methods in Switzerland with respect to biosafety, efficacy and durability. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 12: 11422-11447.
- Hyun, J.-W., Kim, H.-J., Yi, P.-H., Hwang, R.-Y. and Park, E.-W. 2012. Mode of action of streptomycin resistance in the citrus canker pathogen (*Xanthomonas smithii* subsp. *citri*). *Plant Pathol. J.* 28: 207-211.
- Jamar, L. and Lateur, M. 2007. Strategies to reduce copper use in organic apple production. *Acta Hort.* 737: 113-120.
- Kunz, S. and Donat, C. 2014. Field results for the efficacy of fire blight control agents in the last fifteen years in Germany. *Acta Hort.* 1056: 101-106.
- Longstroth, M. 2001. The 2000 fire blight epidemic in southwest Michigan apple orchards. *Compact Fruit Tree* 34: 16-19.
- Loper, J. E., henkels, M. D., Roberts, R. G. Grove, G. G., Willet, M. J. and Smith, T. J. 1991. Evaluation of streptomycin, oxytetracycline, and copper resistance of *Erwinia amylovora* isolated from pear orchards in Washington State. *Plant Dis.* 75: 287-290.
- McGhee, G. C., Guasco, J., Bellomo, L. M., Blumer-Schuette, S. E., Shane, W. W., Irish-Brown, A. et al. 2011. Genetic analysis of streptomycin-resistant (Sm^R) strains of *Erwinia amylovora* suggests that dissemination of two genotypes is responsible for the current distribution of Sm^R *E. amylovora* in Michigan. *Phytopathology* 101: 182-191.
- McGhee, G. C. and Sundin, G. W. 2011. Evaluation of kasugamycin for fire blight management, effect on nontarget bacteria, and assessment of kasugamycin resistance potential in *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 101: 192-204.
- Myung, I.-S., Lee, J.-Y., Yun, M.-J., Lee, Y.-H., 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.
- Norelli, J. L., Jones, A. L. and Aldwinckle, H. S. 2003. Fire blight management in the twenty-first century: using new technologies that enhance host resistance in apple. *Plant Dis.* 87: 756-765.
- Ordax, M., Marco-Noales, E., López, M. M. and Biosca, E. G. 2006. Survival strategy of *Erwinia amylovora* against copper: Induction of the viable-but-nonculturable state. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 3482-3488.
- Ordax, M., Marco-Noales, E., López, M. M. and Biosca, E. G. 2010. Exopolysaccharides favor the survival of *Erwinia amylovora* under copper stress through different strategies. *Res. Microbiol.* 161: 549-555.
- Park, S. Y., Han, H. S., Lee, Y. S., Koh, Y. J. and Jung, J. S., 2007. Streptomycin resistant gene of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, the causal agent of bacterial blossom blight of kiwifruit. *Res. Plant Dis.* 13: 88-92. (In Korean)
- Park, D. H., Yu, J.-G., Oh, E.-J., Han, K. S., Yea, M. C., Lee, S. J. et al. 2016. First report of fire blight disease on Asian pear caused by *Erwinia amylovora* in Korea. *Plant Dis.* 100: 1946.
- Psallidas, P. G. and Tsiantos, J. 2000. Chemical control of fire blight. In: Fire Blight; the Disease and Its Causative Agent, *Erwinia amylovora*, ed. by J. L. Vanneste, pp. 199-234. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, UK.
- Pusey, P. L. 2002. Biological control agents for fire blight of apple compared under conditions limiting natural dispersal. *Plant Dis.* 86: 639-644.
- Russo, N. L., Burr, T. J., Breth, D. I. and Aldwinckle, H. S. 2008. Isolation of streptomycin-resistant isolates of *Erwinia amylovora* in New York. *Plant Dis.* 92: 714-718.
- Stockwell, V. O., Johnson, K. B., Loper, J. E., Lindow, S. E., Hecht-Poinar, E., I. and Elliott, V. J. 2002. Biological control of fire blight: understanding interaction among introduced and indigenous microbial communities. In: Phyllosphere Microbiology, eds. by S. E. Lindow, E. I. Hecht-Poinar, and V. J. Elliot, pp. 225-239. APS Press, St. Paul, MN, USA.
- Stockwell, V. O., Temple, T. N., Loper, J. E. and Johnson, K. B. 2008. Integrated control of fire blight with antagonists and oxytetracycline. *Acta Hort.* 793: 383-390.
- Sundin, G. W., Werner, N. A., Yoder, K. S. and Aldwinckle, H. S. 2009. Field evaluation of biological control of fire blight in the Eastern United States. *Plant Dis.* 93: 386-394.

- Tancos, K. A. and Cox, K. D. 2016. Exploring diversity and origins of streptomycin-resistant *Erwinia amylovora* isolates in New York through CRISPR spacer arrays. *Plant Dis.* 100: 1307-1313.
- Tancos, K. A. and Cox, K. D. 2017. Effects of consecutive streptomycin and kasugamycin applications on epiphytic bacteria in the apple phyllosphere. *Plant Dis.* 101: 158-164.
- Tancos, K. A., Villani, S. M., Borejsza-Wysocka, E., Kuehne, S., Breth, D., Aldwinckle, H. S. et al. 2016. Prevalence of streptomycin-resistant *Erwinia amylovora* in New York apple orchards. *Plant Dis.* 100: 802-809.
- van der Zwet, T. and Keil, H. I. 1979. Fire Blight-a Bacterial Disease of Rosaceous Plants. USDA Agriculture Handbook 510. U. S. Department of Agriculture, Washington, DC, USA.
- van der Zwet, T., Orolaza-Halbrendt, N. and Zeller, W. 2012. Fire Blight History, Biology, and Management. APS Press, St. Paul, MN, USA.