

완결과제 최종보고서

일반과제(○), 보안과제()

(과제번호 : PJ010197)

배검은별무늬병균의 병원형 분포조사 및 살균제 저항성 관리 기술개발

(Investigation of pathological specialization and development of strategy for fungicide resistance management in *Venturia nashicola* causing pear scab)

국립원예특작과학원

연구수행기간
2014.02 ~ 2016.12

농촌진흥청

제 출 문

농촌진흥청장 귀하

본 보고서를 “배 검은별무늬병군의 병원형 분포조사 및 살균제 저항성 관리 기술개발”(개발 기간 : 2014. 2. ~ 2016. 12.) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

제1세부연구과제 : 배검은별무늬병군의 살균제 저항성 모니터링 및 약효증진 기술 개발

제1협동연구과제 : 배검은별무늬병군의 병원형 분화 조사

제2협동연구과제 : 배검은별무늬병군의 약제저항성 마커개발

제3협동연구과제 : 배검은별무늬병을 위한 약제 저항성 예측 및 방제 프로그램 개발

제4협동연구과제 : 배검은별무늬병 방제를 위한 전신저항성 활성제 이용연구

2017. 2.

제1세부연구기관명 : 국립원예특작과학원 배연구소

제1세부연구책임자 : 송 장 훈

참 여 연 구 원 : 조영식, 임경호, 최장전

제1협동연구기관명 : 순천대학교

제1협동연구책임자 : 고 영 진

참 여 연 구 원 : 정재성, 최으뜸, 김경희, 손경인

제2협동연구기관명 : 충북대학교

제2협동연구책임자 : 김 흥 태

참 여 연 구 원 : 민지영, 이수민, 백동민, 김신화, 김기윤, 윤세나

제3협동연구기관명 : 순천대학교

제3협동연구책임자 : 강 의 성

참 여 연 구 원 : 소원호, 최지훈, 오상혁, 김지성, 이은빈, 서희, 홍성결

제4협동연구기관명 : 전남대학교

제4협동연구책임자 : 양 광 열

참 여 연 구 원 : 김수현, 이인성, 김진솔

주관연구책임자 : 송 장 훈

주관연구기관장 : 국립원예특작과학원장

농촌진흥청 농업과학기술 연구개발사업 운영규정 제51조에 따라 보고서
열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제번호	PJ010197		연구기간	2014.2.1.~2016.12.31.
연구사업명	단위사업명	공동연구사업		
	세부사업명	FTA대응 경쟁력향상기술개발		
	내역사업명	원예특용작물경쟁력제고사업		
연구과제명	주관과제명	배 검은별무늬병균의 병원형 분포조사 및 살균제 저항성 관리 기술개발		
	세부(협동) 과제명	(1세부) 배검은별무늬병균의 살균제 저항성 모니터링 및 약효증진 기술 개발 (1협동) 배검은별무늬병균의 병원형 분화 조사 (제2협동) 배검은별무늬병균의 약제저항성 마커개발 (제3협동) 배검은별무늬병을 위한 약제 저항성 예측 및 방제 프로그램 개발 (제4협동) 배검은별무늬병 방제를 위한 전신저항성 활성제 이용연구		
연구책임자	구분	연구기관	소속	성명
	1세부	국립원예특작과학원	배연구소	송장훈
	1협동	국립순천대학교	식물의학과	고영진
	2협동	국립충북대학교	농업생명환경대학	김홍태
	3협동	국립순천대학교	컴퓨터교육과	강의성
	4협동	국립전남대학교	식물생명공학부	양광열
총 연구기간 참여 연구원 수	총: 25명 내부: 4명 외부: 21명	총 연구개발비	정부: 120백만원 민간: 480백만원 계: 600백만원	
위탁연구기관명 및 연구책임자			참여기업명	
국제공동연구	상대국명:		상대국 연구기관명:	
<ul style="list-style-type: none"> - 배검은별무늬병균의 연차적 저항성 분석 및 약효증진 기술개발 - 배검은별무늬병균의 병원형 및 계통학적 유연관계 분석 - 각 살균제의 저항성 모니터링 및 살균제 저항성 문자 지도 작성 - 배검은별무늬병을 위한 약제 저항성 예측 및 방제 프로그램 개발 - 방제효율 증진을 위한 전신저항성 활성제 활용기술 개발 			보고서 면수 55	

〈 국 문 요 약 문 〉

연구의 목적 및 내용	<p>배검은별무늬병균의 살균제 약제저항성을 모니터링하고, 약효증진을 위한 방제기술을 개발한다. 배나무 검은별무늬병균의 균학적 특성을 조사하고, 분생포자 생성배지를 선발하고, 국내에서 분포하는 배나무 검은별무늬병균의 병원형 분화를 조사하고, 계통학적 유연관계를 분석한다. 또한 살균제에 대한 저항성분석 분자마커를 개발하고 전신저항성활성제에 대한 활용기술을 개발한다. 배 검은별무늬병의 효과적 방제를 위한 방제 설명서, 약제 혼용 전자책 개발, 및 약제 저항성 예측 프로그램 개발한다</p>				
연구개발성과	<p>배나무 검은별무늬병균의 분생포자 생성배지를 선발하였고, 국내에서 분포하는 배나무 검은별무늬병균 세 가지 병원형(race) 분화를 조사하였다. 배 검은별무늬병 방제 설명서와 약제 혼용을 위한 전자책과 배 검은별무늬병 약제 저항성 예측 프로그램을 개발하였다.</p>				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<p>살균제 약제저항성을 신속하게 분석하고, 약제저항성 진전을 경감할 수 있도록 보호살균제 및 전신저항성활성물질을 이용한 안정적 약제방제체계가 정착될 것이다. 이 연구에서 개발된 2% 당근 배지에서 배나무 검은별무늬병균 <i>Venturia nashicola</i>의 분생포자 생성 방법은 배나무 검은별무늬병균 병원형 조사, 저항성 품종의 육성, 신규 약제 개발, 저항성 균주 탐색 연구 등에 폭넓게 활용할 수 있을 것이다. 배 검은별무늬병 방제 설명서, 약제 혼용 전자책, 약제 저항성 예측 프로그램 개발을 통하여 배 검은별무늬병을 효과적으로 방제함으로써 농가의 소득을 향상시킬 수 있을 것으로 기대한다.</p>				
중심어 (5개 이내)	<i>Venturia nashicola</i>	검은별무늬 병	약제저항성	마커	병원형

〈 Summary 〉

Purpose& Contents	Fungicide resistance was monitored with agar media mixed by 4 fungicides and molecular markers. To enhance chemical control practice, systemic resistance inducers were applied to make chemical control effective. Mycological characteristics of <i>Venturia nashicola</i> , conidia-producing medium, race-specialization and phylogenetic relationships were investigated. We develop ebook-based fungicide control and mixing guides, and a software of fungicide resistance prediction for pear scab.					
Results	<i>Venturia nashicola</i> produced conidia on 2% carrot medium and 3 races of <i>V. nashicola</i> were detected to be distributed in Korea. ---An ebook for pear scab management was designed and implemented. Also, the fungicide mixing guide was developed, and the software of fungicide resistance was successfully implemented for pear scab. Fungicide resistance was monitored with agar media mixed by 4 fungicides and molecular markers. To enhance chemical control practice, systemic resistance inducers were applied to make chemical control effective.					
Expected Contribution	The development of the carrot medium suitable for efficient conidia production of <i>V. nashicola</i> will contribute to control pear scab through its utilization for screening of new fungicides and breeding of resistant cultivars in the future.---Fungicides in pear farming should be carefully chosen and applied to pear scab because it is very destructive. The ebooks and the software developed in this study can be utilized to effectively control pear scab.					
Keywords	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 20%; padding: 5px;"><i>Venturia nashicola</i></td> <td style="width: 20%; padding: 5px;">pear scab</td> <td style="width: 20%; padding: 5px;">fungicide resistance</td> <td style="width: 20%; padding: 5px;">marker</td> <td style="width: 20%; padding: 5px;">race</td> </tr> </table>	<i>Venturia nashicola</i>	pear scab	fungicide resistance	marker	race
<i>Venturia nashicola</i>	pear scab	fungicide resistance	marker	race		

〈 목 차 〉

제 1 장 연구개발과제의 개요	8
제 2 장 국내외 기술개발 현황	10
제 3 장 연구수행 내용 및 결과	12
제 4 장 목표달성을 및 관련분야에의 기여도	42
제 5 장 연구결과의 활용계획 등	44
제 6 장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	46
제 7 장 연구개발성과의 보안등급	47
제 8 장 국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비현황	48
제 9 장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	49
제 10 장 연구개발과제의 대표적 연구실적	50
제 11 장 기타사항	51
제 12 장 참고문헌	52

제 1 장 연구 개발 과제의 개요

제1절 연구 개발 목적

배 검은별무늬병은 자연재해를 제외하고 병해충 피해 중 가장 큰 영향을 주고 있는데 2011년 전국 과수원 검은별무늬병 피해조사 결과, 하동의 경우 과수원 피해율 50% 이상인 농가가 60%로 심각성을 보여주었다. 피해 농가의 대부분은 초기 방제시기를 놓쳐 심하게 발생한 사례가 많다. 따라서 검은별무늬병을 방제하기 위해 다양한 재배적인 방제방법도 필요하지만 가장 현실적으로 효과적인 방법은 살균제를 사용하여 방제하는 방법이다. 본 연구에서는 살균제의 방제효율을 높이기 위해 약제저항성을 대비하고 약제의 방제효율을 높이기 위해 병원균의 감염특성에 따라 살포시기와 보완살포를 해 주었을 때의 방제효과를 확인하고자 하였다.

배나무 검은별무늬병균의 균학적 특성 및 병원형 분화를 조사하고 국내에 분포하는 검은별무늬병균의 계통학적 유연관계를 분석한다.

농가에서는 경험에 의해서 약제를 살포하는 경향이 있고 약제 저항성에 대한 인식 부족으로 무분별하게 살균제를 사용하는 측면이 있다. 약제 살포 전에 약제 저항성 알림 프로그램을 이용하여 약제별 저항성 위험을 알림으로써 약제 저항성에 대한 경각심을 불러일으켜서 살균제 선택에 신중을 기하도록 할 수 있다. 또한, 약제 저항성 위험이 적은 대체 약제를 사용할 것을 권장함으로써 배 검은별무늬병 방제를 효과적으로 할 수 있다[1]-[3]. 선진국에서는 이미 스마트 기기를 병충해 방제에 활용하여 안정적인 생산을 도모하고 경제적 피해를 줄이려는 시도가 이루어지고 있다. 배 검은별무늬병을 위한 방제 설명서와 약제 혼용 지침을 개발하여 농가에서 사용할 수 있도록 함으로써 농민들이 언제 어디서나 손쉽게 방제를 위한 정보를 얻을 수 있다. 배 검은별무늬병을 위한 방제 프로그램은 농가의 방제 이력이 필요하다. 따라서 농가의 약제 방제 이력을 기록할 수 있는 방제 이력 기능을 구현하고, 약제 방제시 약제 혼용 정보 기능을 구현하여 제공함으로써 농가에서 유용하게 사용할 수 있다[4],[5].

제2절 연구 개발의 필요성

배검은별무늬병 방제노력은 봄철 기상여건에 따라 매년 다르지만 보통 15회 전후로 이뤄지고 있으며 잦은 강우조건에는 강우 전과 후로 2회 살포하여 최종 25회가 상회하는 경우도 있다. 따라서 방제노력에 비해 방제효과가 일정하지 않은 것은 약제저항성 및 약제선정 문제와 적기방제에 대한 실용적 정보가 부재한 까닭으로 판단된다. 그래서 이런 제반 문제를 극복하고 방제효과를 높이기 위해서는 살균제 작용점별 약제저항성 수준과 약제저항성을 극복하는 대체 방제기술의 효과, 그리고 접촉성 살균제(contact fungicides) 및 보호살균제(protectants)의 처리조건별 방제효과와 초기감염 저해반응을 조사할 필요가 있다. 배나무 검은별무늬병은 국내에서 재배되는 배나무에 가장 큰 피해를 주는 병해이지만 배나무 검은별무늬병을 일으키는 배나무 검은별무늬병균이 인공배지에서 잘 자라지 않을 뿐만 아니라 분생포자를 형성하지 않기 때문에 배나무 검은별무늬병균에 대한 균학적 특성 및 병원형 분화 등을 조사하고 국내에 분포

하는 검은별무늬병균의 계통학적 유연관계를 분석함으로써 배나무 검은별무늬병에 대한 저항성 품종 육성이나 새로운 약제 개발 등 효율적인 방제연구의 기초자료를 제공하고자 한다.

약제 혼용 프로그램, 약제 혼용시 주의점 등과 같은 것은 배 검은별무늬병을 위한 방제 프로그램에도 필요하지만 다른 작물을 위해서도 유용하다. 약제 혼용 지침을 스마트폰 앱 외에도 전자책으로 개발하면 스마트폰 뿐만 아니라 필요에 따라서 스마트패드, 데스크톱 PC 등 더 큰 화면 볼 수 있어서 다양한 용도로 유용하게 이용될 수 있다.

배 검은별무늬병을 방제 설명서 전자책과 약제 혼용 지침 전자책을 스마트폰, 데스크탑 PC 등 의 기기에서도 볼 수 있도록 전자책 표준이라고 할 수 있는 EPUB 포맷으로 개발하면 우리가 접하는 대부분의 기기에서 읽을 수 있다.

본 연구에서 진행하는 프로그램 개발 과정에 가장 중요한 것 중의 하나는 사용법이 직관적이고 쉬워야 한다는 것이다. 프로그램을 사용할 사용자들이 주로 중장년층임을 고려하여 프로그램 화면 가독성과 시인성 향상을 위해서 많은 노력이 요구된다.

제3절 연구 개발 범위

<제1세부과제>에서는 배검은별무늬병균의 살균제 저항성을 모니터링하기 위해 배 농가에서 주로 이용되고 있는 베노밀 등 4종에 대해 반수치사농도를 구하고 지역별 저항성 수준을 비교하고자 한다. 또한 약효증진을 위해 강우 전에 보호살균제를 살포하여 초기 방제효과와 강우수준 및 적습기간을 고려하여 치료효과를 포장에서 발생되는 병발생율에 준하여 분석하고자 한다. 또한 약제 살포 후 약적 부착량을 수형별로 비교하고 만코제브 등 접촉성 살균제에 대해 제형을 달리하였을 때 초기감염 저해효과를 해석하고자 한다. <제1협동과제>에서는 배나무 검은별무늬병균의 균학적 특성을 조사하고, 분생포자 생성배지를 선발하고, 국내에서 분포하는 배나무 검은별무늬병균의 병원형 분화를 조사하고, 계통학적 유연관계를 분석한다.

방제 설명서를 위한 전자책을 개발하기 위해서 배 검은별무늬병 관련 방제 정보 수집하고 중장년층의 농민들의 사용편의성, 가독성, 시인성을 고려한 전자책 설계한다. 이를 바탕으로 스마트폰, PC 등 어디서나 사용할 수 있는 표준 EPUB 포맷의 전자책을 제작한다. 약제 혼용 지침을 위한 전자책을 개발하기 위하여 약제별 혼용 정보 관리를 위한 데이터 구조 설계하고 사용하기 쉽고 읽기 쉬운 전자책 설계한다. 크고 명확한 글꼴과 그림을 사용하여 시인성이 좋도록 하고 스마트폰, PC 등 어디서나 사용할 수 있는 표준 EPUB 포맷의 전자책을 제작한다. 또한 배 검은별무늬병 약제 저항성 예측 및 방제 프로그램 개발을 위해 살포하려는 약제를 쉽게 선택하여 방제 이력을 기록할 수 있는 프로그램을 개발한다. 약제를 혼용할 때 혼용 가능 여부를 고려하여 약제를 선택할 수 있도록 한다. 방제 이력을 바탕으로 약제의 저항성을 예측하는 프로그램을 개발한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

국내 육성 배 품종에 대한 병 저항성 수준을 검정하여 감천, 만황, 만풍배 등이 저항성을 나타내고, 신고, 한아름, 황금배 등이 감수성을 확인하였다(2007년, 신 등). 저항성 품종을 적용하는 것 외에 기존 감수성 품종에 대해 효과적인 검은별무늬병 약제방제를 위해 적습시간, 평균 온도 등을 고려하여 감염위험도를 예측하는 경보시스템 Pearscab을 개발하고 농가에 보급하였다(2002년, 박 등). 이와 더불어 제주도는 기상변화에 따른 농작물피해를 줄이기 위해 자동기상 관측시스템 운영하고, 경기도에서는 병해충 관련 컨설팅이 가능한 앱 프로그램 ‘스마트농업인’ 운영하고 있다. 살균제 약제저항성에 관한 연구는 인삼에서 분리한 *Botrytis cinerea*에서 benzimidazole계에 속하는 carbendazim과 역상관 교차저항성 관계인 diethofencarb와 혼합제에 대한 저항성 발현되었고(2009년, 김 등), 배검은별무늬병균의 살균제 저항성에 대한 모니터링이 실시된 바 있다(2010년, 송 등). 또한 울산과 나주의 배검은별무늬병균의 EBI제제 살균제 저항성이 보고되었다(2010년, 엄 등). 배나무는 2,000 이상의 재배역사를 가지고 있으며 전 세계 50여개국에서 재배되고 있는 주요 과수다(Bell, 1990). *Pyrus species*는 지리적 기원에 따라 동양종과 서양종으로 구분하는데(Bailey, 1917), 현재는 형태와 분자적 특징을 조사하여 유럽배(*Pyrus communis* L.)와 일본배(*Pyrus pyrifolia* Nakai), 중국배(*Pyrus bretschneideri* Rehd.와 *Pyrus ussuriensis* Maxim.)로 분류하고 있다(Iketani et al., 1998).

배나무 검은별무늬병은 두 가지 병원균에 의해 발생하는데, *Venturia nashicola*는 중국배와 일본배에 병원성을 나타내고, *V. pirina*는 유럽배에 병원성을 나타낸다(Sivanesan 과 Waller, 1974; Tanaka와 Yamamoto, 1964). Sivanesan(1977)은 *V. nashicola*를 *V. pirina*의 동의어로 보았지만, Ishii와 Yanase(2000)는 *V. nashicola*와 *V. pirina*는 병원성도 차이가 있을 뿐만 아니라 *V. pirina*의 자낭포자는 were longer and wider than those of *V. nashicola*보다 길이가 더 길고 폭이 더 넓고 *V. nashicola*의 분생포자는 were significantly shorter than those of *V. pirina*보다 길이가 훨씬 짧기 때문에 *V. nashicola*는 *V. pirina*와 다르다는 결론을 내렸다.

*V. nashicola*는 생장이 느리기 때문에 배양이 어렵고 때로는 장기간 배양할 때에는 빠르게 생장하는 다른 곰팡이들이 덮어버려 분리가 매우 어렵다(Koh et al., 2013). 특히, *V. nashicola*는 갑자한천배지에서 배양할 때 2개월 동안 배양해도 균총이 불과 10 mm 내외 정도밖에 자라지 않을 뿐만 아니라 분생포자를 형성하지 않기 때문에 인공배양이 매우 어렵다. 비록 Ryu 등(2014)이 배즙 또는 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 를 첨가한 배지에서 2개월 동안 배양하면 균총 직경이 25 mm 정도 자라도록 *V. nashicola*의 생장을 촉진시키는 방법은 개발했지만 여전히 분생포자는 생성되지 않았다. Maruyama 등(2014)은 인공배지에서 분생포자를 잘 형성하지 않는 *Sphaceloma species*가 분생포자를 잘 형성하는 새로운 배지를 선발하기 위하여 다양한 식물추출물을 배지에 첨가시켜 분생포자를 형성시킨 바 있지만 국내에서는 아직 이런 연구가 시도된 바 없다. 또한 일본에서는 *V. nashicola*의 유전적 유연관계를 분석한 보고가 있지만(Ishii와 Yanase, 2000), 국내에 분포하는 *V. nashicola*의 분포, 교배형, 병원성 분화, 병원형을 비롯하여 계통학적 유연관계 분석 등에 관한 연구가 국내외적으로 미진한 실정이다.

제주도는 한라산의 영향으로 기상 변화가 심하여 봄철 늦서리, 여름 긴 장마와 태풍, 겨울폭설 등으로 해마다 많은 농작물 피해를 입고 있다. 제주도는 기상변화에 따른 농작물 피해에 신속하게 대처하기 위해서 2008년부터 자동기상관측시스템을 도입하였다. 이 시스템에 의해서 관측된 가뭄정보, 봄철 서리(저온) 관측 정보, 태풍 등의 기상정보 등을 실시간으로 제공하기 위해서 제주영농정보라는 스마트 앱 프로그램을 개발하였다[6]. 농사와 밀접하게 관련된 다양한 기상 정보 외에 제주 지역 작물을 위한 작물 보호제 지침, 작물에 따른 병충해 도감 등을 제공하고 있다. 스마트폰 보급이 일반화되면서 농민들로부터 많은 호응을 얻고 있다. 경기도 지역에서 거주하는 농민들이 스마트폰을 이용하여 병해충에 대해서 문의할 수 있는 앱 프로그램이다. 작물을 재배하는 농민이 알 수 없는 병에 걸렸을 때 병징 사진을 첨부하여 농업기술원에 문의할 수 있는 스마트폰 앱 프로그램이다[7]. Spray Guide는 Plant Health Technologies에서 개발한 스마트폰 앱으로서 약제 혼용 순서, 약제 살포 기록, 약제 혼용시 주의점 등과 같은 정보를 농부들이 손쉽게 쓸 수 있도록 하기 위한 앱 프로그램이다. 약제를 살포하는데 도움이 되도록 바람의 방향과 속도와 같은 기상 정보도 제공이 된다. PHT의 spary guide 프로그램은 약제 정보, 혼용 정보뿐만 아니라, 약제 방제와 관련된 유튜브 비디오 링크 등 다양한 정보로 구성되어 있다. Spray guide의 버전이 3.5에 이를 정도로 안정적이다. 특히, 아이폰(iOS) 환경에서 안정적으로 동작했다. 그런데, 국내에서 주로 사용하는 안드로이드 폰에서는 실행 도중 앱이 멈추는 일이 간혹 발생되었다[4]. IPM Toolkit은 위스콘신 대학의 IPM 프로그램에 의해서 만들어진 앱이다. 최신의 농업 정보를 IPM Toolkit을 통하여 볼 수 있는데 전문가가 트위터를 통하여 올리는 글을 볼 수도 있다. 또한 병충해가 발생한 것을 찍은 방대한 양의 사진이나 비디오를 볼 수 있으며, 자신이 알게 된 정보를 이메일을 통하여 다른 사람들과 공유할 수 있다. 위스콘신 대학의 IPM 프로그램에 의해서 제작되는 문현들을 PDF 등의 형태로 저장 할 수도 있다. 이러한 IPM Toolkit을 활용함으로써 병충해를 미연에 방지하여 경제적 손실이나 환경적인 위험 요소를 줄이도록 하고 있다[5]. FMC/Ag PhD의 Field Guide 프로그램 역시 농가에서 사용되고 있으며, 잡초나 해충 방제를 위한 안내서 역할을 하고 있다. 잡초의 이름을 입력하여 잡초 정보를 볼 수 있으며 사진으로 잡초를 확인할 수도 있다. 또한, 포장의 상태를 기록하여 리포트할 수 있으며, 잡초나 해충 방제를 위한 뉴스레터를 받아 볼 수도 있다.

제 3 장 연구 수행 내용 및 결과

<제1세부과제 : 배검은별무늬병균의 살균제 저항성 모니터링 및 약효증진 기술 개발>

제1절 연구 수행 내용

1. 배 검은별무늬병균의 지역별 약제 저항성 모니터링

군주 및 약제방제력 수집은 나주, 울산, 남원 등 전국 배 재배지역 5개소를 대상으로 지역당 30군주와 살균제 방제이력을 수집하였다. 대상약제는 베노밀, 아족시스트로빈, 디페노코나졸, 펜코나졸 등 4종을 대상으로 농도별로 0, 0.032, 0.16, 0.8, 4.0, 20, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 수준으로 희석하여 PDA배지에서 암조건 20°C로 30일간 배양한 후 균사생장량을 측정하였다(그림1). 조사내용은 반수치사농도(EC₅₀)와 90% 치사농도(EC₉₀)를 농도별 선형모형을 근거로 산출하고 지역 및 군주간 약제저항성 변화를 확인하였다. 연차적으로 살균제 계통을 벤지미다졸계, DMI계, 스트로빌루린계 등으로 확대해 가면서 위와 동일하게 조사하고 반수치사농도(EC₅₀)를 산술하여 지역 및 군주간 저항성 변화를 확인하였다.



그림1. 살균제 저항성 검정을 위한 균사배양

2. 배 검은별무늬병의 약효증진 기술개발

시험장소는 전남 나주에 위치한 국립원예특작과학원 배연구소 시험포장에서 고속분무기를 이용하여 Y자 수형(7×3m)의 10년생 신고품종에 구당 12주씩 난괴법 3반복으로 처리하였다. 처리내용은 만코제브(수), 디티아논(수) 등 성분별 2수준을 두고, 디티아논(입상), 디티아논(액상), 디티아논(수) 등 제형별 3수준으로 하였다. 또한 약제저항성을 고려한 포장적용 종합관리를 위해 표준방제구와 농가방제구를 두어 약제저항성 진전상황의 모니터링을 실시하였다. 강우 전 보호살균제를 처리하고 처리직후, 3, 6, 9, 12, 15일 등 6처리구를 두어 검은별무늬병균의 기주조직 내

포자발아 특성, 부착기 형성수준, 발아균사의 길이 등 침입특성을 형태학적으로 분석하였다. 약제투하량별로 약제부착량이 어떻게 변화하는지 확인하고자 10a당 200 ± 10 , 300 ± 10 , 400 ± 10 , 500 ± 10 L 수준으로 동일 송풍량을 장치한 고속분무기로 처리하고 감수지의 변색반응을 해석함으로써 방제효과를 높이고자 하였다. 조사내용은 처리 후 검은별무늬병이 결린 잎과 과실을 대상으로 방제효과를 조사하고, 약제처리별 배 조직의 약제 부착 수준과 병원균의 침입 전 형태학적 특성을 조사하였다. 표준방제구의 약제저항성 변화는 시험(1)과 동일한 방법으로 배지조건하에서 균사체 생장도를 측정하였다. 2016년에는 전남 나주에 위치한 국립원예특작과학원 배연구소 시험포장에서 고속분무기를 이용하여 Y자 수형(7×3 m)의 12년생 신고품종에 구당 12주씩 난괴법 3반복으로 처리하였다. 적용약제는 만코제브(수) 등 보호살균제 3종과 디페노코나졸 등 치료제 4종으로 하여 강우조건에 따라 살포하였다. 처리방법은 강우 전에 보호살균제를 살포하고 강수량 수준과 적습온도합(degree hours)을 기준으로 보완살포 처리를 하는 보호살균제 연용구, 강우 전 보호살균제를 살포하고 적습온도합에 따라 강우 후 치료살균제를 보완살포하는 보호살균제 및 치료살균제 혼합구, 전남 나주지역 인근 농가 3개소를 대상으로 하는 관행 처리구, 전체 생육기간에 걸쳐 전혀 방제를 하지 않은 무방제구를 두어 검은별무늬병 발생도와 처리시기별 적습온도합을 조사하였다. 또한 배 품종별 가을철 인공접종에 의한 병발생량을 확인하기 위해 황금배, 신고, 추황배, 조이스킨, 화산, 만풍배, 한아름, 진황, 신일 품종을 대상으로 낙엽 후에 인편노출율을 조사하였다. 인편 감염률을 확인하기 위해서 인편이 노출된 눈을 골라 인공접종하여 접종후 2일후에 광학현미경하에서 발아와 부착기형성을 조사하였다.

표 1. 약효증진을 위한 시험처리 내용(2016년)

처리내용	살포횟수 (회)	방제기준
보호제 연용구	11	- 강우 전 필수 : 디티아논/아족시스트로빈 교호살포 - 강우 후 선택 : 강우량 $20/100$ mm초과시 만코제브(300~900DH)살포
보호제+치료제A	11	- 강우 전 필수 : 디티아논/아족시스트로빈 교호살포 - 강우 후 선택 : 강우량 $20/100$ mm초과시 디페노코나졸 등 3종(750~900DH)살포
보호제+치료제B	8	- 살포주기 : 4월 7일간격, 5~6월은 12일 간격 강우 전 살포 - 방제약제 : 디티아논, 아족시스트로빈, 사이프로디닐, 디페노코나졸 순으로 교호살포
관행농가	12, 14, 20	- 강우전후 혼합방제
무방제	0	- 15년간 무방제살포구 운영

제2절 연구 결과

1. 배 검은별무늬병균의 지역별 약제 저항성 모니터링

* 지속오염으로 인해 반복시험을 하고 있으며 시험성적은 이 후 공문을 통해 변경수록 예정

표 2. 지역별 배검은별무늬병균의 베노밀에 대한 약제저항성

조사지역	균주수	EC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			EC ₅₀ 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 균주율(%)
		평균	최소치	최대치	
울 산	30				
하 동	30				
음 성	30				
나 주	30				
종합방제구	30				
5지역 계	150				

표 3. 지역별 배검은별무늬병균의 아족시스트로빌루린에 대한 약제저항성

조사지역	균주수	EC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			EC ₅₀ 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 균주율(%)
		평균	최소치	최대치	
울 산	30				
하 동	30				
음 성	30				
나 주	30				
종합방제구	30				
5지역 계	150				

표 4. 지역별 배검은별무늬병균의 디페노코나졸에 대한 약제저항성

조사지역	균주수	EC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			EC ₅₀ 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 균주율(%)
		평균	최소치	최대치	
울 산	30				
하 동	30				
음 성	30				
나 주	30				
종합방제구	30				
5지역 계	150				

표 5. 지역별 배검은별무늬병균의 펜코나졸에 대한 약제저항성

조사지역	균주수	EC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			EC ₅₀ 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 균주율(%)
		평균	최소치	최대치	
울 산	30				
하 동	30				
음 성	30				
나 주	30				
종합방제구	30				
5지역 계	150				

2. 배 검은별무늬병의 약효증진 기술개발

수형별 살포물량에 따른 약적 부착면적률을 조사한 결과 210ℓ /10a 처리구에서 평덕식과 Y자수형 모두 부착면적이 50%이하이며, 300ℓ /10a에서도 평덕식59.2%, Y자수형 70.3%으로 방제효과를 보기에는 크게 미흡한 수준이었다. 그러나 510ℓ /10a에서는 100%에 이르는 부착면적을 보임에 따라 향후 400ℓ /10a수준의 부착면적률을 확인하여 적정 물량을 구체화하는 것이 필요하다. 이 시험으로 보아 보호살균제의 경우 기존 살포물량인 200~300ℓ /10a의 수준에서는 초기 방제효과가 미흡할 것으로 판단된다(표6)(그림2).

표 6. 수형별 살포물량에 따른 약적 부착면적률

수형	살포물량 ^z (ℓ /10a)	약적 부착면적률 ^y (%)		
		단파지	도장지	전체
평덕식	510	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a
	300	74.7±5.8 b	65.9±10.0 b	70.3±4.5 b
	210	48.9±6.8 c	47.7±10.3 bc	48.3±7.7 c
Y 자	510	100.0±0.0 A	100.0±0.0 A	100.0±0.0 A
	300	67.6±7.1 AB	50.7±1.6 BC	59.2±3.5 BC
	210	51.6±9.4 C	41.5±6.9 C	46.5±5.5 C

^z 고속분무기(한아 A-550), 압력 2.0 bar, 분판 내경 φ 1.0mm

^y 적용 S/W : Access 2.0

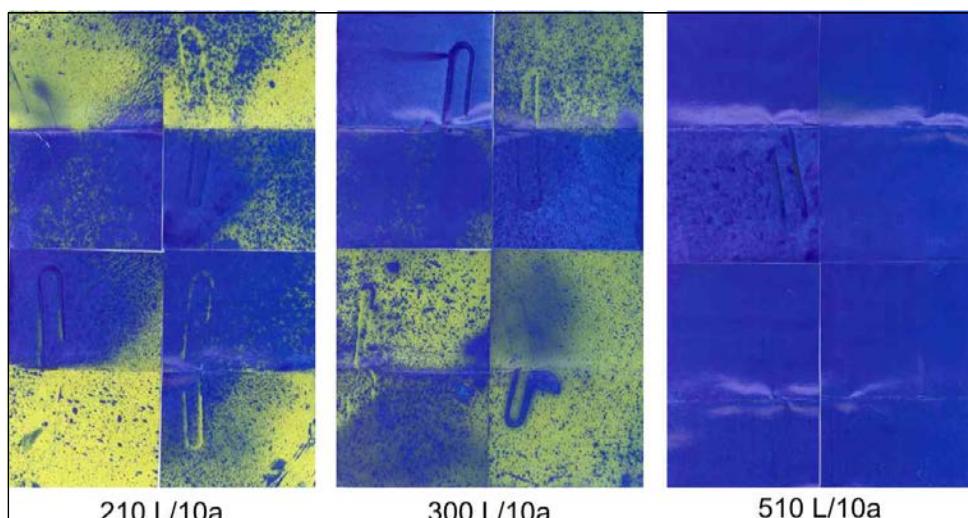


그림2. 고속분무기에 의한 살포물량별 약적 부착면적

보호살균제를 살포 후 경과 시간별 검은별무늬병균의 초기 병진전도를 확인하기위하여 약제는 만코제브와 디티아논을 이용하고, 제형별로 수화제, 입상수화제, 액상수화제를 처리한 결과 4일간 경과해도 포자발아율은 7.3%이하 였으며 약제별 및 제형별로 약효의 차이를 확인할 수 없었고 부착기 형성은 모든 처리구에서 발견되지 않았다(표7).

표 7. 처리후 경과일수에 따른 약제 제형별 검은별무늬병균의 초기 병진전도(2014년)

약제명(제형)	포자발아율(%)			부착기형성율(%)			균사길이(μm)		
	0 DAT [♪]	2 DAT	4 DAT	0 DAT	2 DAT	4 DAT	0 DAT	2 DAT	4 DAT
만코제브(수)	0.0±0.0	2.46±1.29 ^{NS}	5.66±1.93 ^{NS}	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	12.13±9.14 ^{NS}	31.42±1.36 ^{NS}
디티아논(수)	0.0±0.0	1.96±1.29	7.30±1.78	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	15.25±8.86	32.06±9.25
디티아논(액상)	0.0±0.0	3.59±1.61	6.83±1.04	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	26.17±8.86	33.31±1.15
디티아논(입상)	0.0±0.0	1.85±0.98	2.65±1.39	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	17.63±10.24	26.75±2.98

♪ DAT : Day After Treatment(보호살균제 처리 후 일수)

* 처리일 9.20, 6DAT~14DAT는 접종균의 발아율이 10%이하로써 미조사

디티아논 입상과 액상은 수화제에 비해 살포 후 15일에 발아억제율이 현저하게 저하되었으며, 특히 입상수화제는 살포 후 12일부터 효과가 급감되었다. 반면에 디티아논(수)와 만코제브(수)는 살포 후 9일까지 발아억제율과 부착기형성억제율이 80%이상 유지되었다(그림3). 이처럼 디티아논의 경우 살포 후 경과기간이 길어지면 길어질수록 약효가 떨어지는 것은 신초의 자람에 따른 영향으로 판단되며 제형에 따라서 초기 균 진전이 다른 것은 제형 자체의 의향과 유효함량의 차이에 의한 것으로 생각된다. 이에 반하여 유효함량이 높은 만코제브는 12일까지 80%수준의 발아억제율을 보여서 디티아논 수화제와 더불어 안정적 방제효과가 기대되었다.

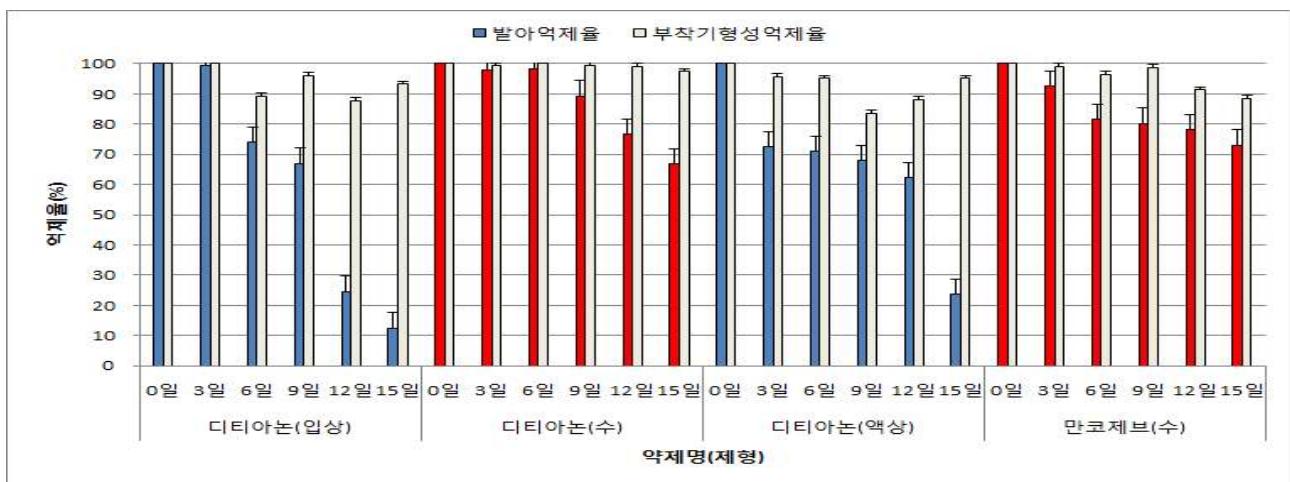


그림3. 보호살균제 제형 및 경과시간별 검은별무늬병균의 발아 및 부착기형성억제효과(2015년)

포장조건의 배나무 잎에 약제를 직접 1회 90%이상 부착면적이 되도록 충분히 살포하고, 병원균을 3일 간격으로 배 잎에 감염시킨 후 초기 병원성진전 특성을 검증한 것이다. 수화제 제형에서 디티아논과 만코제브가 안정적 반응을 보였지만, 약효가 손실되는 과정에 있어 광분해되는 요인보다는 강우에 의한 유실과 조직생장속도에 따라 약효에 영향을 많이 줄 것으로 판단된다. 따라서 약제부착량 개념보다는 강우요인과 생육단계와 연계하여 접촉성 보호살균제의 최적 사용기술을 개발해야 한다(그림4).

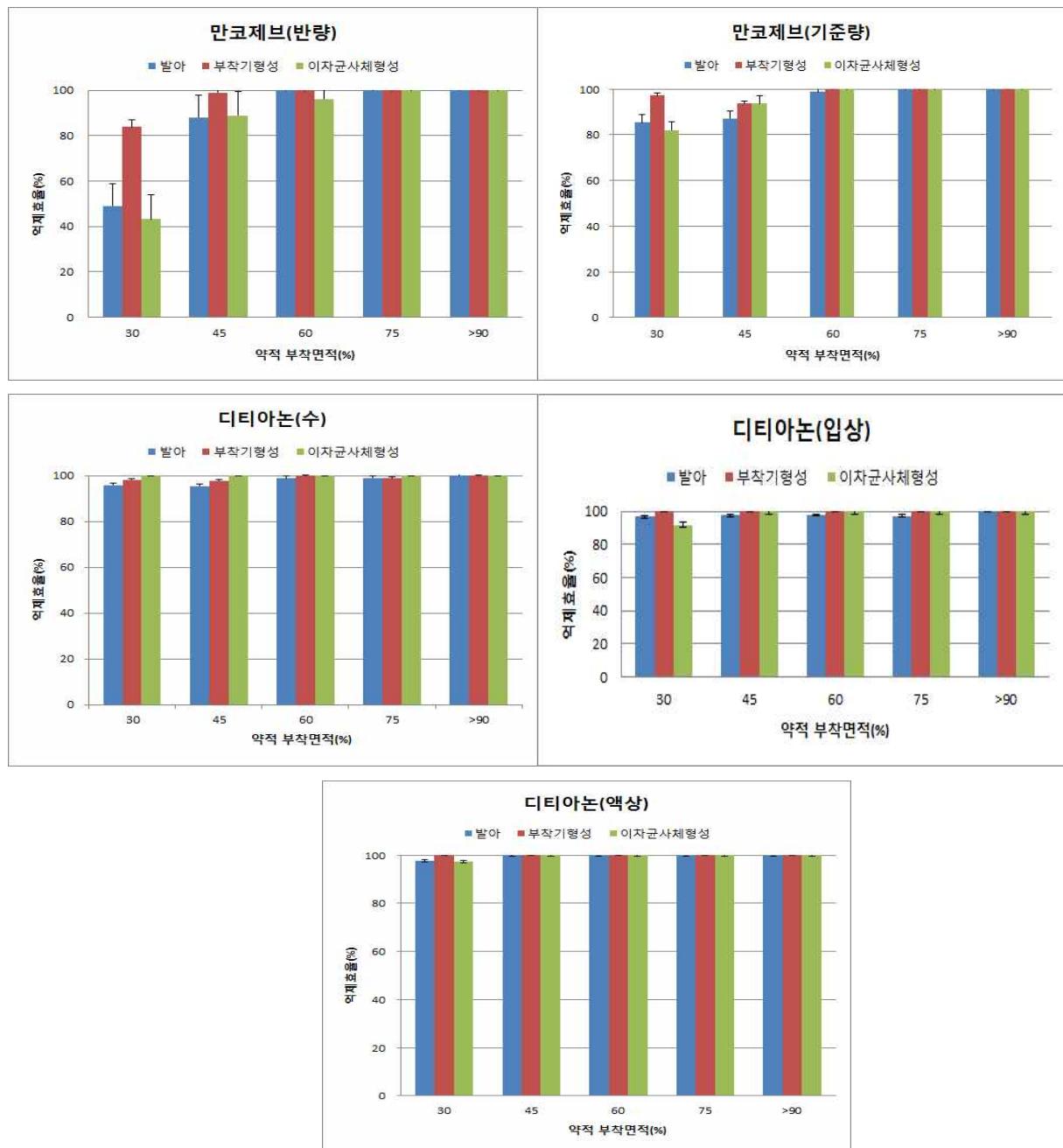


그림4. 접촉성 살균제 제형별 약제 부착량에 따른 초기 군 발육 특성(2014년)

국내외에서 만코제브(수)에 대해 반량으로 침투성 살균제와 혼용하는 사례가 많아 이를 증명하기 위해 본 시험을 추가 실시하였는데, 기준량의 반량으로 하고 부착면적을 60%이상으로 살포할 경우에도 초기균발육을 효과적으로 억제할 수 있었다. 이는 강우 직전에 살포할 경우 부착량이 적더라도 매우 우수한 병진전 억제효과가 있음을 시사한다. 만코제브에 비해 디티아논은 약제 부착면적이 45%이하가 되더라도 안정적으로 검은별무늬병균의 초기 진전을 억제할 수 있었다. 만코제브와 디티아논은 제형에 관계없이 부착면적이 60% 이상일 경우에 잎조직 내부로 침입하여 생성되는 과정 즉, 일차균사체 → infection vesicle → 이차균사체로 전개되는 과정을 억제할 수 있었다(그림5).

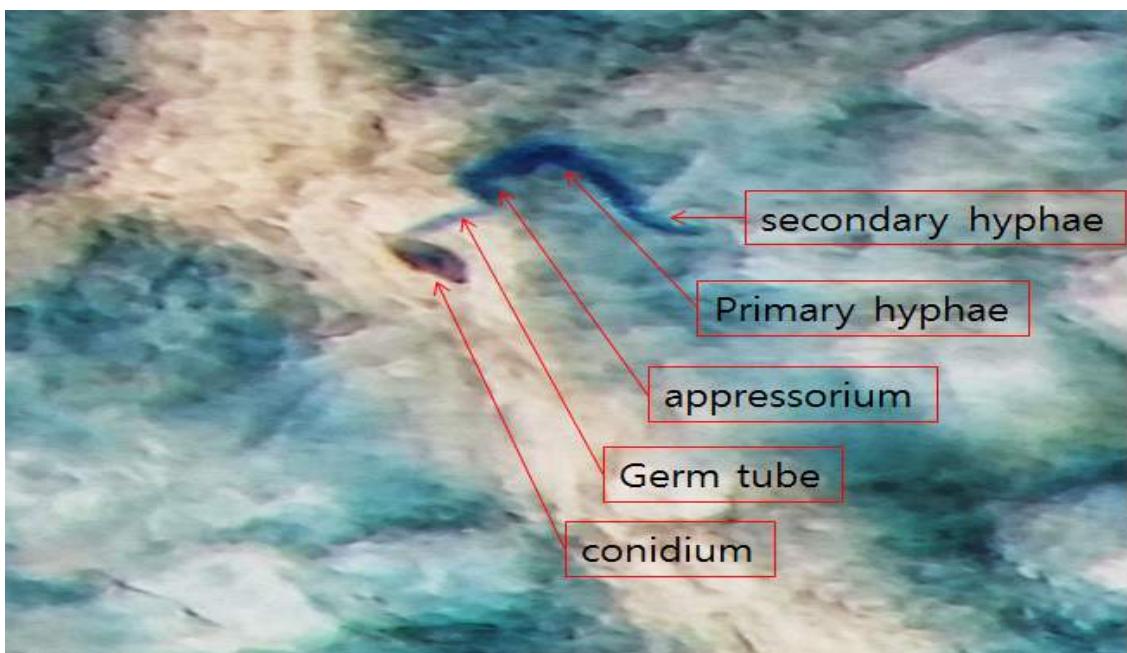


그림5. 배 검은별무늬병균의 이차균사체 생성(2015년)

평덕식 수형의 경우, 봉지 씌우기 전 10a당 살포물량별 약제 부착량을 보면 400L와 500L는 차이가 없이 88.8%이상 부착되었으며, 200L와 300L는 부착량에 있어 10.5%의 차이를 확인하였다(표8). 또한 봉지 씌운 후 8월의 약제 부착량을 보면 300L와 400L에서 6월에 비해 공히 10%로 부착도가 저하되었다. Y자 수형의 경우 평덕식 수형에 비해 300L에서 과총엽과 도장지에서 공히 10% 이상 약제가 더 부착되었다(그림6). 따라서 접촉성 보호살균제는 부착면적에 있어 60%를 상회하는 조건이라면 안정적 초기 병진전 반응을 억제하는 것으로 보이며, 봉지씌우기 전후로 부착량에 차이가 있어서 생육초기엔 200L, 봉지씌운 후에는 300L/10a로 살포해도 가능할 것으로 추정된다. 또한 침투이행성 약제와 만코제브 반량 혼합살포는 효과적인 병진전 억제 전략으로 활용가능 할 것으로 생각된다. 효과적인 포장적용시험은 외국의 최근 기술동향과 누적강우량에 의한 washing effect를 고려하여 추가적으로 실증할 필요가 있다.

표 8. 살포물량에 따른 약제 부착면적률(2015년 6월, 평덕식 수형)

살포물량 (L/10a)	약제 부착면적률(%)		
	과총엽	도장지	전체
200	66.4 b	56.5 c	61.6 c
300	73.0 b	69.1 b	71.1 b
400	88.1 a	89.4 a	88.8 a
500	86.9 a	92.3 a	89.6 a
C.V	32.7	29.4	31.2

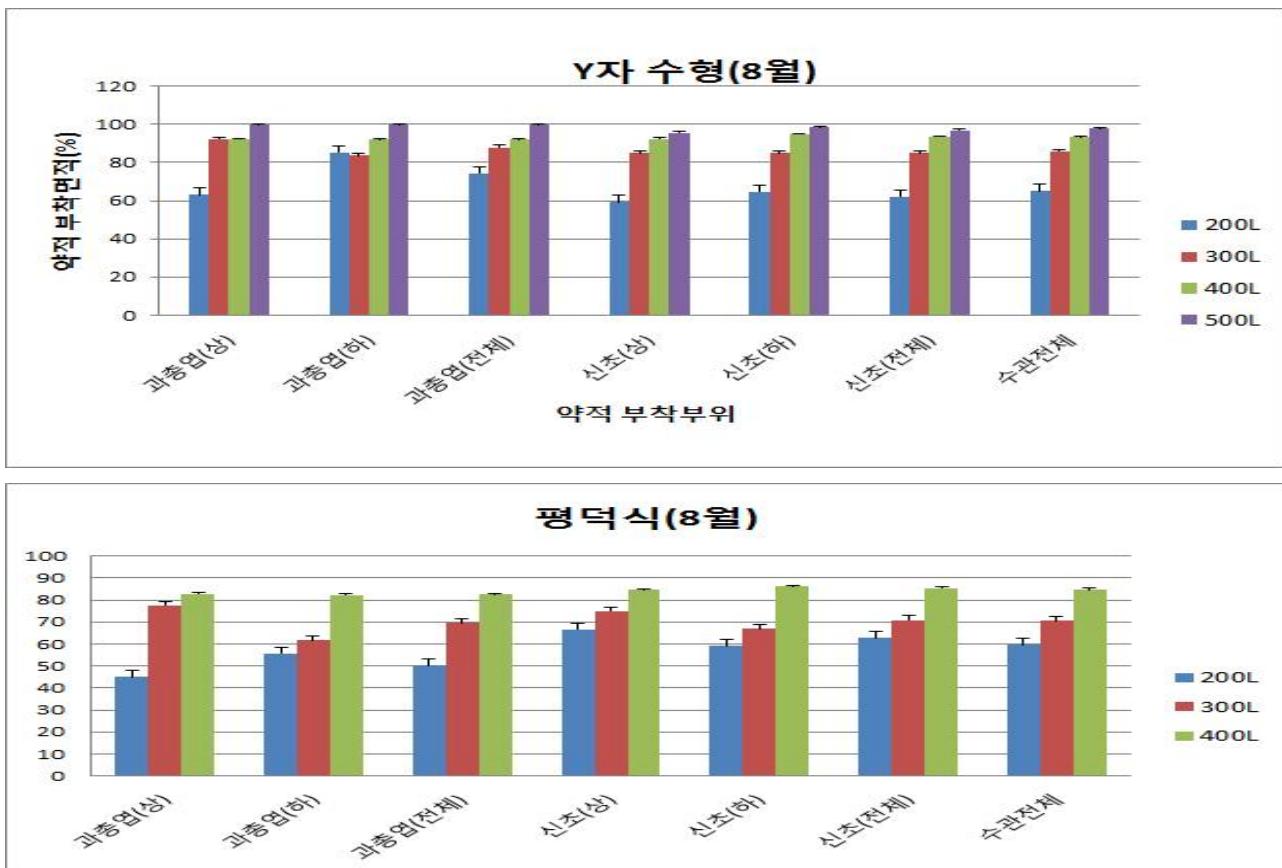


그림6. 수형과 살포량별 약제부착량(2015년 8월)

처리방법에 따른 검은별무늬병의 병발생율을 보면 앞에서는 차이를 보이지 않았으나 과실에서 보호살균제 연용처리와 농가식 강우 전후 방제처리가 우수한 방제효과를 확인할 수 있었다(표9). 실제 농가의 약제살포력을 보면 접촉성 보호살균제를 강우 전과 후에 침투이행성 약제와 혼용하기 때문에 약제 사용량과 살포량이 증가하는 사례가 많으나 과실 감염율을 경감시키기 위해서는 접촉성 및 침투이행성 보호살균제를 예상 강우량에 기준하여 살포하는 것이 병방제에 효과적일 것으로 판단된다.

표 9. 처리방법에 따른 검은별무늬병과 붉은별무늬병 발병율(2016년 6월)

처리구	검은별무늬병			붉은별무늬병 병든잎률(%)
	병든잎률 (%)	과실병반수 (개)	병든과율 (%)	
보호살균제 연용구	1.52 b	0.21 b	10.95 d	1.52 b
보호제+치료제 A	0.25 b	0.39 b	23.80 bc	1.10 b
보호제+치료제 B	1.01 b	0.66 b	28.57 b	2.28 b
관행농가	2.20 b	0.20 b	13.43 cd	1.18 b
무방제	33.60 a	5.17 a	73.81 a	19.50 a

- DMRT $p < 0.001$

배 품종별 가을철 인공접종에 의한 병발생량을 보면, 황금배, 신고, 추황배, 조이스킨 등이 인편감염율이 높은 편이었다. 또한 꽃눈의 인편노출율을 보면 신고에서 타 품종에 비해 5.90% 수준으로 유의하게 많이 노출되는 특성을 보였다(표10). 황금배의 경우 검은별무늬병에 감수성 품종으로 분류되고 있는데 인편 노출면에서 신고 품종에 비해 적은 수준이지만 유전적으로 가을철 인편감염율이 높은 것이 포장에서 실제 병발생 측면에 영향을 많이 주는 것으로 판단된다. 또한 신고 품종은 가을철 인편감염 수준이 황금배에 비해 적지만 구조적으로 인편 노출률이 높아 경제적 재배를 위해서는 가을철 인편감염을 차단하는 조치가 필수적이라고 판단한다.

표 10. 품종별 가을철 인편감염율과 꽃눈 인편 노출율(2016년)

품종	인편 감염률 (%)	인편 노출률 (%)
황금배	25.30a	2.11 b
신 고	7.85 b	5.90 a
추황배	7.53 b	-
조이스킨	2.59 bc	2.11 b
화 산	0.00 c	1.27 b
만풍배	0.00 c	1.59 b
한아름	0.00 c	0.00 b
진 황	0.00 c	0.23 b
신 일	0.00 c	0.70 b



그림1. 눈 인편의 가을철 분생포자 감염 및 노출수준(2016년)

<제1협동과제 : 배나무 검은별무늬병균의 병원형 분화 조사>

제1절 연구 수행 내용

1. 배나무 검은별무늬병균의 균학적 특성 조사

배나무 검은별무늬병에 감염된 병반에서 배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola*의 분생포자의 특징을 광학현미경하에서 조사하였으며, 자낭 및 자낭포자를 관찰하기 위하여 가을철에 병든 낙엽들을 모아 쌓아 놓고 월동을 시킨 후 이듬해봄에 낙엽 표면에 생성된 위자낭각과 자낭 및 자낭포자의 특징을 광학현미경하에서 조사하였다. 또한 이 실험에서 균학적 특징에 의해 동정된 균주들이 배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola*와 일치하는지를 분자생물학적 진단마커 (Na11F/Na11R)를 이용하여 PCR에 의해 235bp 크기의 특이적 밴드를 증폭시켜 확인하였다 (표1). PCR 반응액은 10 ng의 주형DNA, 2 units의 *Taq* polymerase(Bioneer, Korea), 1X buffer(10mM Tris-HCl(pH 9.0), 1.5mM MgCl₂, 40mM KCl), 0.2mM의 deoxyribonucleoside triphosphates, 10 pmol의 primer를 넣은 뒤 중류수로 최종 반응용액의 부피를 25μl가 되게 하였다. PCR 조건은 94°C에서 5분간 denaturation한 후, 94°C에서 30초간 denaturation과정, 37°C에서 1분간 annealing과정, 72°C에서 1분간 polymerization과정을 40회 반복하고 마지막으로 연장반응은 72°C에서 5분간 실시하였다. PCR이 끝난 후 반응물을 2% agarose gel에서 전기영동 한 후 ethidium bromide로 염색하여 밴드패턴을 확인하였다.

표 1. 배나무 검은별무늬병균 *Venturia nashicola* 검출용 특이적 primer의 염기서열

Primer	Nucleotide sequence	Expected size(bp)	Species-specificity
Na11F	CAC CAC CAG GTC AGA TTT CG	235	<i>Venturia nashicola</i>
Na11R	GGT ATT ATC TAC TCG ATC AG		

2. 배나무 검은별무늬병균 분생포자 생성유도 선택배지 선발

배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola*는 인공배지에서 생장이 느릴 뿐만 아니라 분생포자를 형성하지 않기 때문에 분생포자 생성을 유도할 수 있는 선택배지를 선발하기 위하여 시판하고 있는 20종류의 식물추출가루를 이용한 배지를 1ℓ 당 식물추출가루 10g과 한천 20g을 함유하도록 조제하였으며(표2), 대조배지로 감자한천배지를 사용하였다.

표 2. 배나무 검은별무늬병균 분생포자 생성 시험용 배지 조제에 사용한 식물추출가루

식물종류	학명	추출부위
Cheongah Carrot 50% Apple 22% Mandarin 14% Onion 14% Ginger 14% Glucose 14% Dextrin 14%	<i>Daucus carota</i> <i>Malus pumila</i> <i>Citrus reticulata</i> <i>Allium cepa</i> <i>Zingiber officinale</i> - -	Root Fruit Fruit Bulb Root - -
Gourd	<i>Cucurbita moschata</i>	Fruit
Pine tree	<i>Pinus densiflora</i>	Leaf
Asiatic plantain	<i>Plantago asiatica</i>	Leaf
Tea plant	<i>Camellia sinensis</i>	Leaf
Mandarin	<i>Citrus reticulata</i>	Fruit
Maca	<i>Lepidium meyenii</i>	Root
White mulberry	<i>Morus alba</i>	Leaf
Tumeric	<i>Curcuma longa</i>	Root
Kuzu vine	<i>Pueraria thunbergiana</i>	Root
Cinnamon vine	<i>Dioscorea batatas</i>	Root
Lotus	<i>Numbo nucifera</i>	Leaf
Lotus	<i>Numbo nucifera</i>	Seed
Jerusalem artichoke	<i>Helianthus tuberosus</i>	Tuber
Burdock	<i>Arctium lappa</i>	Root
Common reed	<i>Phragmites communis</i>	Root
Oat	<i>Avena sativa</i>	Seed
Barley	<i>Hordeum vulgare</i>	Seed
Unpolished rice	<i>Oryza sativa</i>	Seed
Rice	<i>Oryza sativa</i>	Seed

시험균주는 생물자원센터에서 분양받은 *V. nashicola* KCTC6484와 일본에서 분양받은 *V. nashicola* MAFF615002, MAFF615003, MAFF615023, MAFF615029 등 5균주를 사용하였다(표3). *V. nashicola* 균주를 각 배지에서 20°C 암상태로 30일동안 배양한 후 *V. nashicola*의 균사 생장 및 분생포자 생성 여부를 조사하였다.

표 3. 배나무 검은별무늬병균의 분생포자 생성 시험에 사용한 균주목록

병원균	균주	채집지	채집년도
<i>Venturia nashicola</i>	KCTC6484	국내	-
	MAFF615002	Ibaraki, Japan	1979
	MAFF615003	Shizuoka, Japan	1980
	MAFF615023	Kouchi, Japan	1981
	MAFF615029	Fukuoka, Japan	1993

또한 배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola* 분생포자가 청아배지에서만 생성되었으므로 *V. nashicola* 분생포자 생성량을 극대화시키는 청아가루 함량을 찾기 위하여 청아가루 0.25, 0.5,

1, 2%가 함유된 배지를 조제하여 *V. nashicola* 균주를 20°C 암상태로 60일 동안 배양한 후 *V. nashicola* 균총의 직경과 분생포자 생성량을 조사하였다. 청아가루 조성은 당근가루가 50%, 사과가루가 22%, 진피가루가 14%, 그리고 나머지 14%는 양파가루, 생강가루, 포도당과 텍스트린으로 조성되어 있기 때문에 어느 성분이 *V. nashicola* 분생포자 생성을 유도하는지를 파악하기 위하여 청아가루를 조성하고 있는 단일 성분을 1%씩 함유한 배지를 조제하여 *V. nashicola* 균주를 20°C 암상태로 30일동안 배양한 후 *V. nashicola*의 균사 생장 및 분생포자 생성 여부를 조사하였다. 청아가루 성분 중에서 당근가루만으로 조제한 배지에서 *V. nashicola*의 분생포자 생성량이 가장 많았으므로 *V. nashicola*의 분생포자 생성 유도에 가장 적합한 당근함량을 파악하기 위하여 0.5%, 1%, 2%, 및 5%로 달리한 당근배지에서 *V. nashicola* 균주를 20°C 암상태로 60일 동안 배양한 후 *V. nashicola*의 균사 생장 및 분생포자 생성량을 조사하였다.

3. 배나무 검은별무늬병균 균주 혼합배양에 의한 교배형 분석

배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola* 균주들끼리 혼합배양에 의한 교배형 분석을 위하여 배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola* 9균주를 갑자한천배지배지에서 2개씩 균주를 혼합하여 20°C 암상태로 배양하면서 분생포자 생성 유무를 조사하였다. 또한 배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola* 9균주를 갑자한천배지상에서 2개의 균주씩 혼합하여 5°C 암상태로 장기간 배양하면서 자낭포자 형성 유무를 조사하였다(표4).

표 4. 배나무 검은별무늬병균의 혼합배양에 사용한 균주목록

병원균	균주	채집지	채집년도
<i>Venturia nashicola</i>	KCTC6484	Korea	-
	MAFF615002	Ibaraki, Japan	1979
	MAFF615003	Shizuoka, Japan	1980
	MAFF615023	Kouchi, Japan	1981
	MAFF615029	Fukuoka, Japan	1993
	NJBH1325	Naju, Korea	2013
	NJGC1319	Naju, Korea	2013
	NJGC1340	Naju, Korea	2013
	NJGC1341	Naju, Korea	2013

4. 배나무 검은별무늬병균의 병원성 분화 조사

2014년도 국립원예특작과학원 배연구소에 있는 18개 배나무 품종에서 분리한 배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola*의 분생포자 혼탁액을 1×10^4 spores/ml 농도로 준비하여 2015년 4월 15일 동일한 품종의 건전한 잎에 접종하여 비닐봉지를 씌워 습윤상태로 24시간동안 암상태를 만들었다가 자연상태로 환원시켜 검은별무늬병 발병을 유도하였으며 5월 20일 검은별무늬병 발병 유무와 발병 정도를 조사하여 병원성 분화 정도를 파악하였다(그림 1).



그림 1. 배나무 검은별무늬병균 분생포자 혼탁액의 배나무 잎 접종 후 습실처리

또한 2015년도 경기도 화성에 있는 배연구소 품종포에 있는 17개 배나무 품종에서 분리한 배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola*의 분생포자 혼탁액을 1×10^4 spores/ml 농도로 2015년 5월 13일 동일한 품종의 건전한 엽병에 접종하여 쿠킹호일로 감싸 습윤상태를 유지시켜 발병을 유도한 후 5월 29일 발병 유무와 발병 정도를 조사하여 병원성 분화 정도를 파악하였다(그림2).



그림 2. 배나무 검은별무늬병균 분생포자 혼탁액을 엽병에 접종하고 쿠킹호일로 습실처리

5. 배나무 검은별무늬병균의 병원형(race) 조사

18개 배나무 품종에서 분리한 배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola*의 분생포자 혼탁액(분생포자농도 $10^4/\text{ml}$)을 행수, 건착, 콩배 등 세 가지 판별품종의 잎과 엽병에 접종하여 온실에서 습윤상태를 유지시켜 발병을 유도한 후 발병 유무와 발병 정도를 조사하여 병원형(race) 분화를 조사하였다(그림3). 판별품종이 세 가지 품종인 경우에 병원형(race) 수는 2^n ($n=$ 판별품종 수)개이기 때문에 표5처럼 배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola*의 병원형(race)은 최대 8개까지 분화되어 분포할 가능성이 있다.



그림 3. 배나무 검은별무늬병균 *Venturia nashicola* 분생포자 혼탁액을 배나무 잎과 엽병에 접종하고 습실처리하는 온실 모습과 잎과 엽병에 발현된 검은별무늬병 병징.

표 5. 배나무 검은별무늬병균 *Venturia nashicola*의 병원형(race) 판별 기준.

<i>Venturia nashicola</i> race	판별품종에 대한 병원성			판별품종의 반응			비고
	행수	콩배	건착	행수	콩배	건착	
Race A	+	-	-	S	R	R	+ : 병원성 - : 비병원성 S : 감수성 반응 R : 저항성 반응
Race B	-	+	-	R	S	R	
Race C	-	-	+	R	R	S	
Race D	+	+	-	S	S	R	
Race E	+	-	+	S	R	S	
Race F	-	+	+	R	S	S	
Race G	+	+	+	S	S	S	
Race H	-	-	-	R	R	R	

6. 배나무 검은별무늬병균의 계통학적 유연관계 및 유전적 분화 조사

배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola*의 계통학적 유연관계 및 유전적 분화를 조사하기 위하여 rDNA-ITS(Internal transcribed spacer), β -tubulin 유전자, Random Amplified Polymorphic DNA(RAPD) 패턴을 분석하였다. 우리나라에서 재배하는 동양배나무에 검은별무늬병을 일으키는 *V. nashicola* 45균주를 전라남도 나주와 경기도 화성에 있는 국립원예특작과학원 배 품종보존포와 기타 주요 배나무 재배단지에서 채집하였다(그림 4)(표 6). 대조균주로 생물자원센터에서 분양받은 동양배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola* KCTC6484와 일본에서 분양받은 *V. nashicola* MAFF615002, MAFF615003, MAFF615023, MAFF615029 등 4균주를 사용하였으며, 서양배나무에 검은별무늬병을 일으키는 *V. pirina* 38995와 38996 2균주와 사과나무에 검은별무늬병을 일으키는 *V. inaequalis* HIR-2와 Ibaraki1 2균주를 사용하였다.

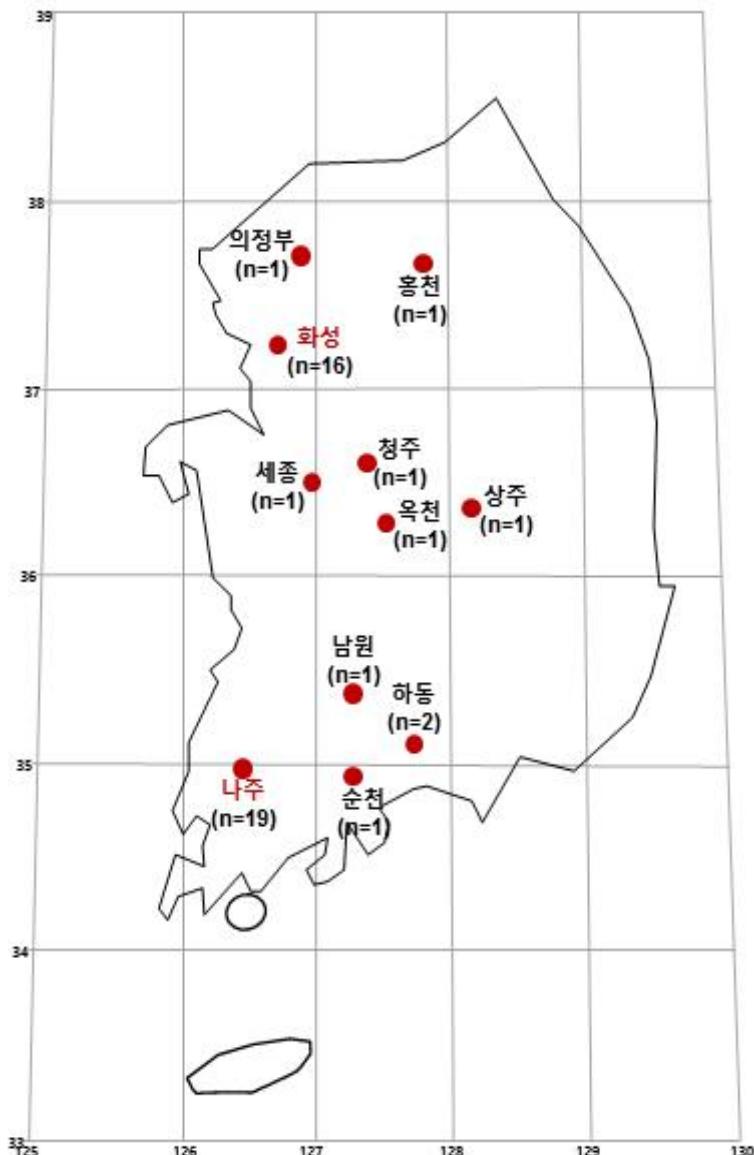


그림 4. 배나무 검은별무늬병균 *Venturia nashicola* 균주 채집 장소(n=균주수)

(1) 배나무 검은별무늬병균의 rDNA-ITS(Internal transcribed spacer) 분석

배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola*의 ITS염기서열 분석에는 ITS1 primer(TCCGTAGGTGAACCTGCGG)와 ITS4 primer(TCCTCCGCTTATTGATATGC)를 사용하였다. PCR 반응액은 AccuPower®PCR Premix (Bioneer. Co)를 사용하여 조제하였으며, gDNA 1 μ l, ITS1 primer와 ITS4 primer를 각각 1 μ l씩 넣고 중류수로 최종 반응용액의 부피를 50 μ l로 조절하였다. PCR 조건은 94°C에서 3분간 denaturation한 후, 94°C에서 50초간 denaturation과정, 55°C에서 50초간 annealing과정, 72°C에서 2분간 polymerization과정을 30회 반복하고 마지막 연장반응은 72°C에서 10분간 실시하였다. PCR 산물은 1.5% agarose gel에 Dyne LoadingSTAR(DYNE BIO Co.)를 사용하여 제조사가 제시한 농도에 맞추어 100V에서 30분간 전기영동을 실시한 후 증폭된 산물은 AccuPrepTM PCR purification Kit(Bioneer Co.)를 이용하여 제조사가 제시한 방법에 따라 정제하였다. 정제된 산물의 염기서열 분석은 COSMO GENTECH사에 의뢰하였다. 분석된 유전자 염기서열은 GenBank 데이터베이스 (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)의 BLAST 검색을 통해 동정하였다.

(2) 배나무 검은별무늬병균의 β -tubulin 유전자 증폭과 염기서열 분석

배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola*의 β -tubulin 유전자를 Btub14F primer(AACCAAATTGGTGCTGCCTTCTG)과 BtubR primer(TGGAGGACATCTTAAGACCACG)를 사용하여 증폭시켰다. PCR 반응액은 AccuPower®PCR Premix (Bioneer. Co)를 사용하여 조제하였으며, gDNA 1 μ l, Btub14F primer와 BtubR primer를 각각 1 μ l씩 넣고 중류수로 최종 반응용액의 부피를 50 μ l로 조절하였다. PCR 조건은 94°C에서 5분간 denaturation한 후, 94°C에서 1분간 denaturation, 58°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분간 polymerization과정을 35회 반복하고 마지막 연장반응은 72°C에서 7분간 실시하였다. PCR 산물은 1.5% agarose gel과 Dyne LoadingSTAR(DYNE BIO Co.)를 사용하여 제조사가 제시한 농도에 맞추어 100V에서 30분간 전기영동을 실시한 후 증폭된 산물은 AccuPrepTM PCR purification Kit(Bioneer Co.)를 이용하여 제조사가 제시한 방법에 따라 정제하였다. 정제된 산물의 염기서열 분석은 COSMO GENTECH사에 의뢰하였다. 분석된 유전자 염기서열은 GenBank 데이터베이스 (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)의 BLAST 검색을 통해 동정하였다.

표 6. 배나무 검은별무늬병균의 계통학적 유연관계 및 유전적 분화 조사에 사용한 균주 목록

	균주명	기주	채집장소	Race
1	NJJS1	장수	Naju, Korea	A
2	NJGC1	공주청실리	Naju, Korea	A
3	NJHC-1	해남참배	Naju, Korea	A
4	NJBR-1	백리	Naju, Korea	A
5	NJSJ-1	신고	Naju, Korea	C
6	NJCB-1	칠보	Naju, Korea	C
7	NJAP-1	사과배	Naju, Korea	E
8	NJJS2	장수	Naju, Korea	A
9	NJJS3	장수	Naju, Korea	A
10	NJJS4	장수	Naju, Korea	A
11	NJJS5	장수	Naju, Korea	A
12	NJGC2	공주청실리	Naju, Korea	A
13	NJGC3	공주청실리	Naju, Korea	A
14	NJGC4	공주청실리	Naju, Korea	A
15	NJGC5	공주청실리	Naju, Korea	A
16	HSPB1	<i>Pyrinus bretschneider</i>	Hwasung, Korea	C
17	HSPB2	<i>Pyrinus bretschneider</i>	Hwasung, Korea	C
18	HSPB3	<i>Pyrinus bretschneider</i>	Hwasung, Korea	C
19	HSPB4	<i>Pyrinus bretschneider</i>	Hwasung, Korea	C
20	HSPB5	<i>Pyrinus bretschneider</i>	Hwasung, Korea	C
21	HSHJ1	황현장파	Hwasung, Korea	E
22	HSHJ2	황현장파	Hwasung, Korea	E
23	HSHJ3	황현장파	Hwasung, Korea	E
24	HSHJ4	황현장파	Hwasung, Korea	E
25	HSHJ5	황현장파	Hwasung, Korea	E
26	HSSK1	신세기	Hwasung, Korea	E
27	HSSK2	신세기	Hwasung, Korea	E
28	HSSK3	신세기	Hwasung, Korea	E
29	HSSK4	신세기	Hwasung, Korea	E
30	HSSK5	신세기	Hwasung, Korea	E
31	HSJS-1	청서리	Hwasung, Korea	E
32	NJGC1340	신고	Naju, Korea	-
33	NJBH1325	신고	Naju, Korea	-
34	ABM-1	-	Naju, Korea	-
35	KGB-1	-	Naju, Korea	-
36	NHD-1	-	Hadong, Korea	-
37	15VNGNHD2-7	-	Hadong, Korea	-
38	NHC-1	-	Hongcheon, Korea	-
39	NNW-1	-	Namwon, Korea	-
40	NUJB-1	-	Uijeongbu, Korea	-
41	15VNCHJNS-1	-	Cheongju , Korea	-
42	15VNOCOC-1	-	Okcheon, Korea	-
43	15VNJNSC3-19	-	Sunchun, Korea	-
44	15SAJ-P-4	-	Sangju, Korea	-
45	15VNSJ4-1	-	Sejong, Korea	-
46	KACC6484	-	Korea	-
47	MAFF615002	-	Ibaraki, Japan	-
48	MAFF615003	-	Shizuoka, Japan	-
49	MAFF615023	-	Kouchi, Japan	-
50	MAFF615029	-	Fukuoka, Japan	-

(3) 배나무 검은별무늬병균의 Random Amplified Polymorphic DNA(RAPD) 분석

배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola*의 균주들의 유연관계를 분석하기 위하여 시판하고 있는 10-mer oligonucleotide primer 120(Operon kit; USA)을 사용하였다(표 7). PCR 반응액은 AccuPower®PCR Premix (Bioneer. Co)를 사용하여 조제하였으며, gDNA 1 μ l, Btub14F primer와 BtubR primer를 각각 1 μ l씩 넣고 증류수로 최종 반응용액의 부피를 50 μ l로 조절하였다. PCR 조건은 94°C에서 5분간 denaturation한 후, 94°C에서 30초간 denaturation, 37°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 polymerization과정을 40회 반복하고 마지막 연장반응은 72°C에서 7분간 실시하였다. PCR 산물은 1.5% agarose gel과 Dyne LoadingSTAR(DYNE BIO Co.)를 사용하여 제조사가 제시한 농도에 맞추어 100V에서 30분간 전기영동을 실시한 후 밴드 패턴을 확인하였다.

표 7. 배나무 검은별무늬병균 *Venturia nashicola*의 유전적 분화 조사에 사용한 primer

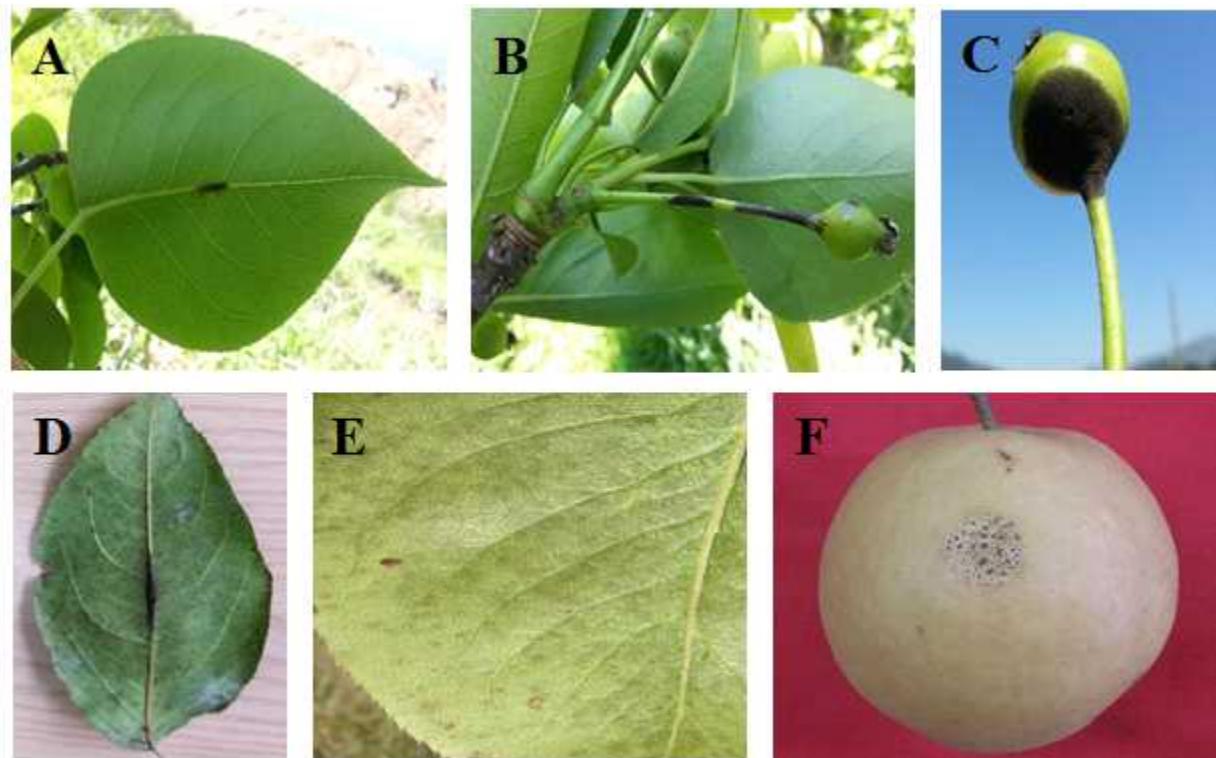
Primer	Sequences(5' → 3')
OPB-04	GGA CTG GAG T
OPB-17	AGG GAA CGA G
OPC-04	CCG CAT CTA C
OPD-16	AGG GCG TAA G
OPF-01	ACG GAT CCT G
OPJ-20	AAG CGG CCT C
OPL-10	TGG GAG ATG G

제2절 연구 결과

1. 배나무 검은별무늬병의 병징

배나무 검은별무늬병은 배나무에 잎이 나온 직후부터 봄비가 내리거나 잎에 습윤이 지속될 만큼 다습한 환경조건에서 발병이 시작되었다. 가장 흔한 검은별무늬병 증상은 잎 중륵 부위에 검은색 병징으로 나타나는데 손으로 만져보면 검은색 분생포자가 묻어나왔다(그림 1A). 개화기 무렵부터 과경지에도 검은별무늬병 병징이 많이 나타났고(그림 1A), 어린 열매 표면에서도 전형적인 검은별무늬병 병징을 많이 관찰할 수 있었다(그림 1A).

여름철 고온기에는 검은별무늬병이 새롭게 발생하는 경우는 극히 드물고 봄철에 이미 발생한 병반들에서도 분생포자들이 비바람에 모두 씻겨 없어져 흔적만 남았다. 그러나 가을철에 가을비가 자주 내리거나 온습한 기상조건이 유지될 경우에 잎의 중륵 부위나 엽육 부위에 검은별무늬병 병반이 출현했고(그림 1D, E), 성숙한 열매가 비대해짐에 따라 봄철 유과에 감염되었던 병반이 쪼개지는 병징을 관찰할 수 있었다(그림 1F).



<그림 1> 배나무 검은별무늬병의 병징. A; 이른 봄 배나무 잎 병징, B; 이른 봄 배나무 과경지 병징, C; 어린 열매 병징, D; 가을철 잎 병징, E; 늦가을 잎 병징, F; 수확과실 병징.

2. 배나무 검은별무늬병균의 균학적 특성

배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola*는 감자한천배지에서 생장이 매우 느려 20°C 암상태로 30일간 배양한 경우에도 균총 직경이 28mm 정도에 불과했고(그림 2A, B), 분생포자는 생성되지 않았다.

따라서 자연감염된 배나무 병반에서 분생포자를 채취하여 관찰한 결과 분생포자경은 암갈색으로 여러 개가 모여 똑바로 서있는 형태였으며 길이는 10–15μm였다(그림 2D). 분생포자경에 생성된 분생포자 형태는 암갈색 장타원형이거나 방추형이었으며 크기는 8.2–21.9×5.1–7.1μm였다(그림 2C).

이른 봄에 낙엽 더미에 있는 낙엽 표면에서 위자낭각이 생성되었는데, 구형 암갈색 위자낭각의 크기는 55–122×59–140μm였다(그림 2E). 위자낭각에 들어있는 자낭은 투명하고 긴 곤봉모양이었고 크기는 38–63μm였다(그림 2F). 자낭에 들어있는 자낭포자는 2-세포로 된 투명하거나 담갈색의 발바닥 모양이었으며 크기는 12.0–15.0×3.0–4.5μm였다(그림 2G, H).

이러한 배나무 검은별무늬병균의 특징은 Tanaka & Yamamoto(1964)가 기술한 *V. nashicola*의 특징과 일치하였으며, 요약하면 표 1과 같다.

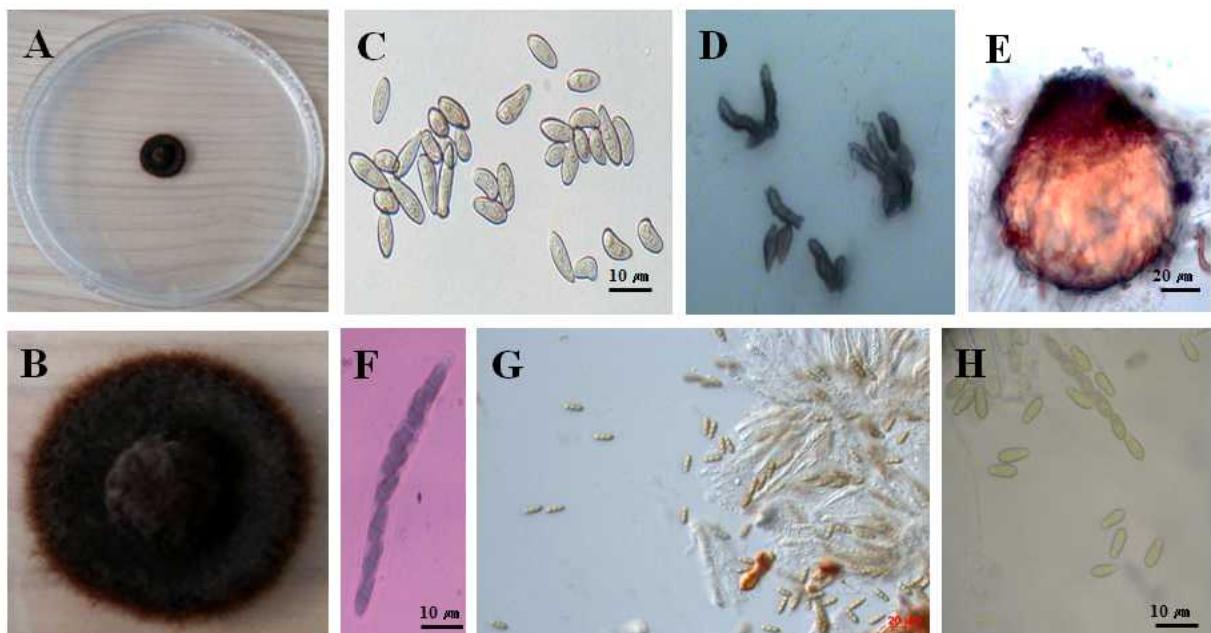


그림 2. 배나무 검은별무늬병균 *Venturia nashicola*의 균학적 특성. A, B; 감자한천배지에서 20°C 암상태로 30일간 배양한 배나무 검은별무늬병균 *Venturia nashicola*의 균총, C; 분생포자, D; 분생포자경, E; 위자낭각, F; 자낭, G; 자낭 및 자낭포자, H; 자낭포자.

표 1. 배나무 검은별무늬병균 *Venturia nashicola*의 균학적 특성

Characteristics		Present isolates	<i>Venturia nashicola</i> ^a
Conidia	Shape	dark brown, long oval or fusiform	dark brown, long oval or fusiform
	Size	8.2-21.9×5.1-7.1 μm	7.5-22.5(14.4)×5.0-7.5(6.0) μm
Conidiophores	Shape	dark brown, clustered, erect	brown, clustered, erect, simple
	Size	10-15 μm	10-20 μm
Pseudothecia	Shape	wall dark colored, brownish cells, globoid	wall dark colored, brownish cells, depressed, conic, globoid
	Size	55-122×59-140 μm	50.0-150×53-138 μm
Asci	Shape	hyaline, club-shaped	hyaline, clavate or long ovate
	Size	38-63 μm	35-60×5-10 μm
Ascospore	Shape	hyaline or light brown, two-celled, shoesole-shaped	hyaline or light brown, two-celled, shoesole-shaped
	Size	12.0-15.0×3.0-4.5 μm	10-15×3.8-6.3 μm

^a Tanaka & Yamamoto(1964).

또한 배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola*를 특이적으로 검출할 수 있는 primer(Na11F/Na11R)를 이용하여 이 실험에서 동정된 균주들에서 추출한 genomic DNA를 PCR에서 증폭시킨 결과 235bp 크기의 랜드가 증폭된 반면에 대조균주로 사용한 서양배나무 검은별무늬병균 *V. pirina*에서 추출한 genomic DNA는 전혀 증폭되지 않아 이 실험에서 동정된 균주들이 *V. nashicola*임이 증명되었다(그림 3).

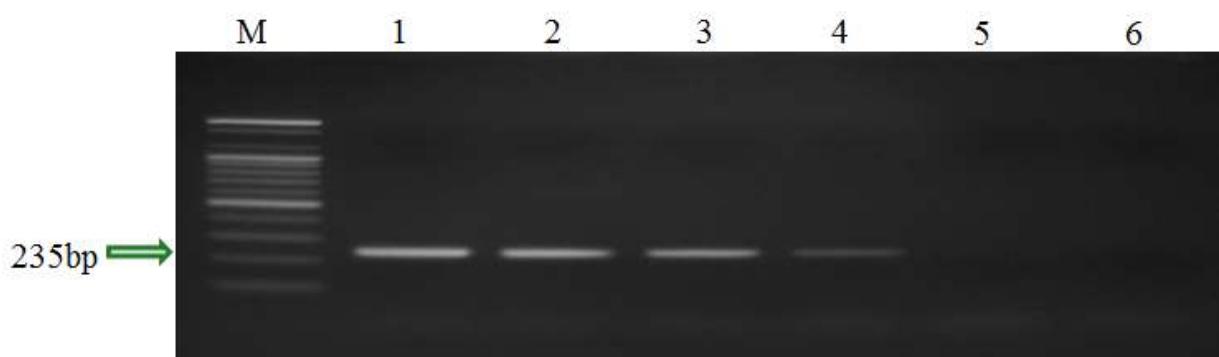


그림 3. 배나무 검은별무늬병균 *Venturia nashicola* 특이적 primer를 이용하여 PCR로 증폭된 genomic DNA 산물. M, 100bp DNA ladder (Bioneer); 1-4, *Venturia nashicola* strains; lane 5-6, *V. pirina* strains.

3. 배나무 검은별무늬병균 분생포자 생성유도 선택배지

배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola*는 감자한천배지에서 생장이 대단히 느렸다(그림 4). 뿐만 아니라 *V. nashicola*는 분생포자를 형성하지 않기 때문에 분생포자 생성을 유도할 수 있는 선택배지를 선발하기 위하여 시판하고 있는 20종류의 식물추출가루를 이용한 배지를 조제하여 20°C 암상태에서 30일 동안 배양한 후 생장한 *V. nashicola* 균총의 길이를 조사하였다.

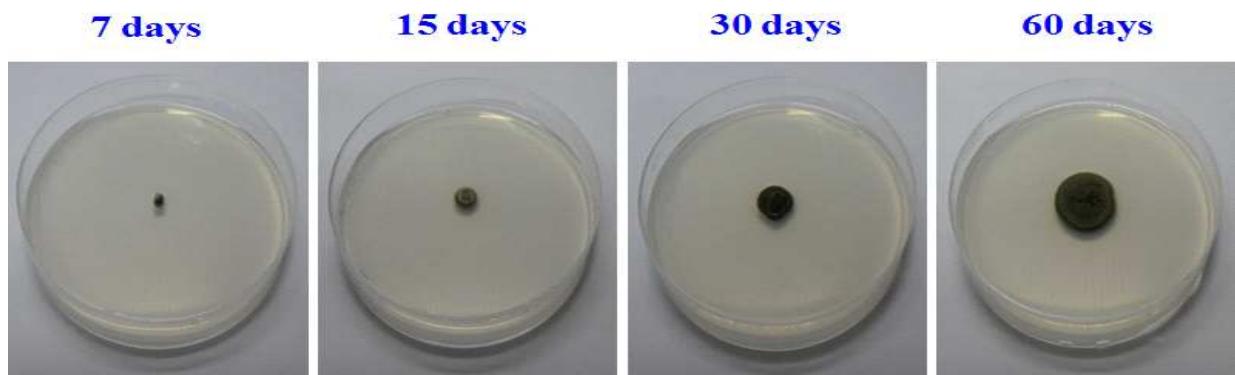


그림 4. 감자한천배지에서 20°C 암상태로 배양할 때 배양기간에 따른 배나무 검은별무늬병균 *Venturia nashicola* 균총의 생장.

감자한천배지에서 생장한 *V. nashicola* 균총의 직경이 가장 길어 28mm였다. 반면에 20종류의 식물추출가루를 이용하여 조제한 배지에서 생장한 *V. nashicola* 균총의 직경은 10~25mm 범위로 감자한천배지에서 보다 균총 생장이 불량하였다. 20종류의 식물추출배지에서 생장한 *V. nashicola* 균총의 직경은 우엉배지와 아티초크배지에서 약 25mm로 가장 양호하였으며, 울금배지에서 10mm로 가장 불량하였다(그림 5, 6).

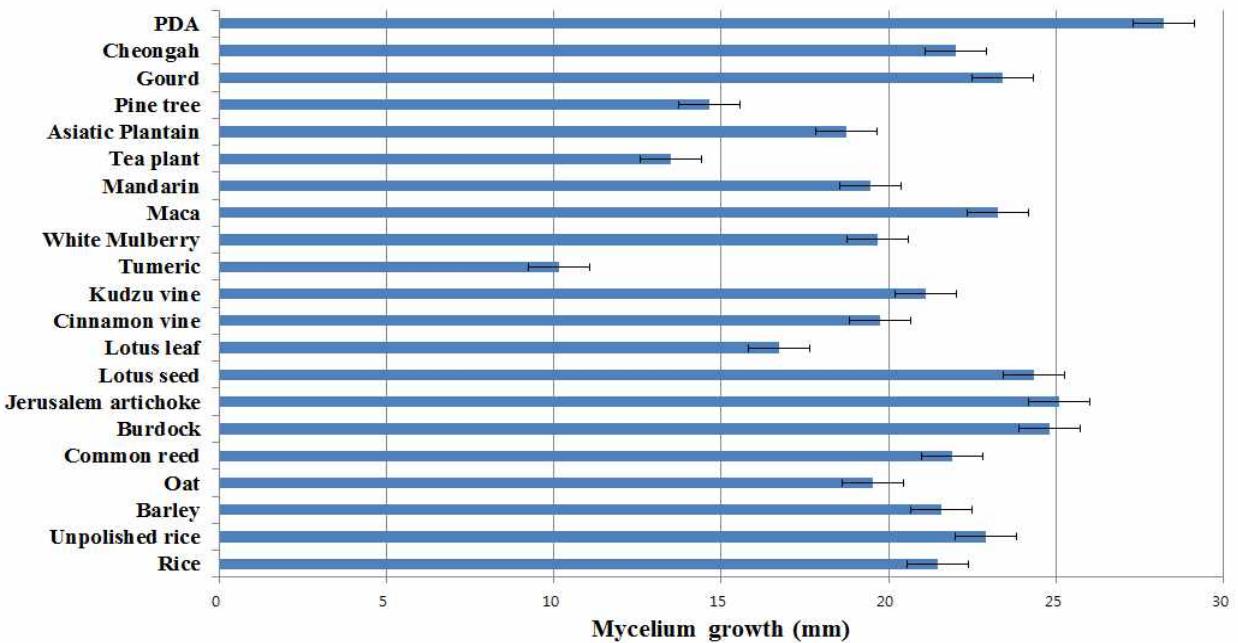


그림 5. 감자한천배지와 20종류의 식물추출배지에서 20°C 암상태로 30일 동안 배양한 후 측정한 배나무 검은별무늬병균 *Venturia nashicola* 균총의 직경.

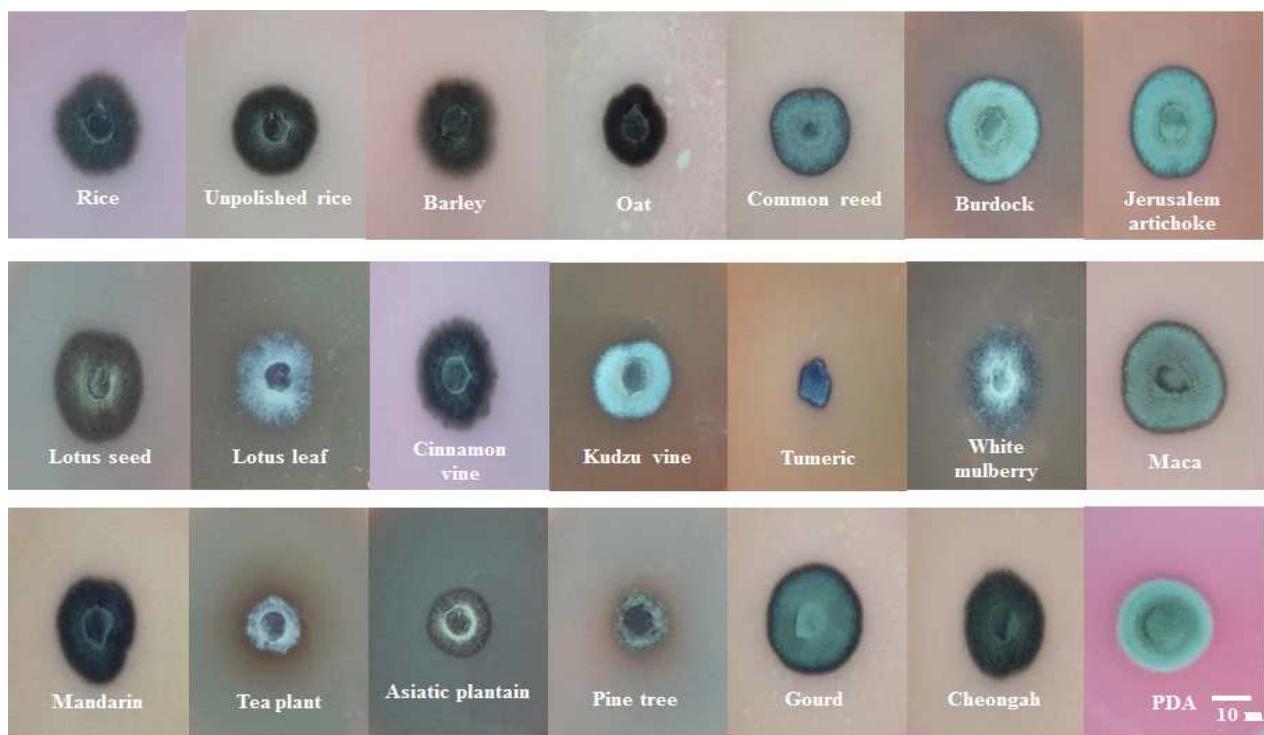


그림 6. 감자한천배지와 20종류의 식물추출배지에서 20°C 암상태로 30일 동안 배양한 배나무 검은별무늬병균 *Venturia nashicola* 균총 모습.

감자한천배지와 시험에 사용한 20종류의 식물추출배지 중에서 청아배지에서만 *V. nashicola* 분생포자가 생성되었는데(그림 7), 청아배지에서 생성된 *V. nashicola* 분생포자의 특징은 검은

별무늬병에 자연감염된 배나무에 생성된 *V. nashicola* 분생포자의 특징과 일치하였다.

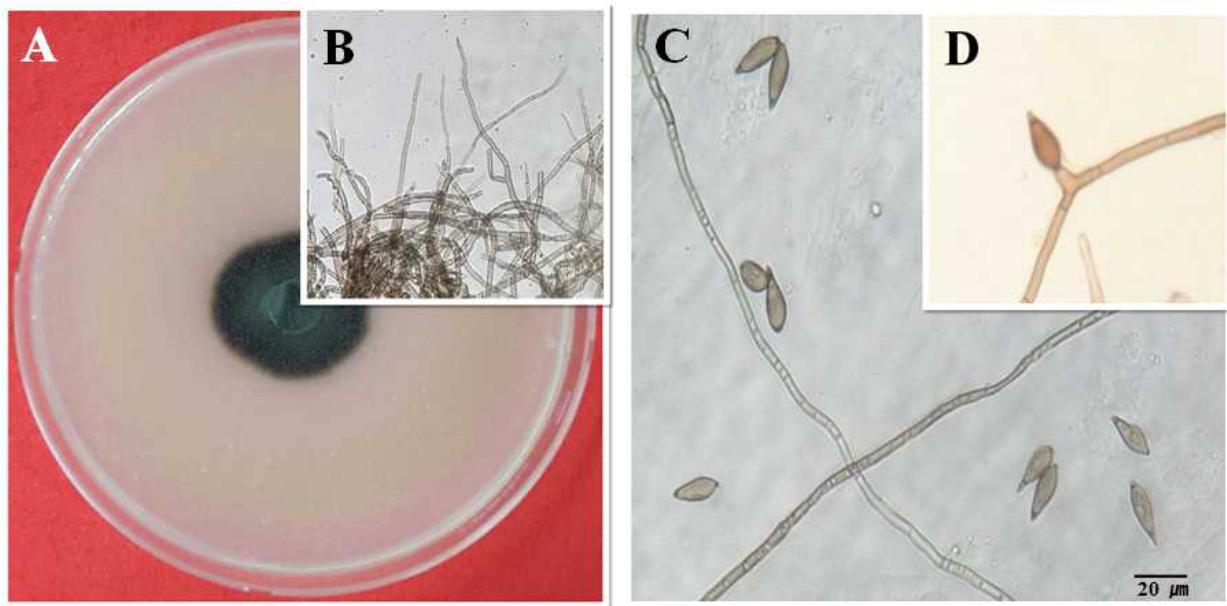


그림 7. 청아배지에서 20°C 암상태로 30일 동안 배양한 후 생장한 배나무 검은별무늬병균 *Venturia nashicola* 균총(A), 균사(B), 분생포자(C) 및 분생포자경(D).

배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola* 분생포자가 생성된 청아배지는 청아가루 1%가 함유된 배지이므로 청아가루 함량에 따라 *V. nashicola* 분생포자 생성량의 차이를 구명하기 위하여 청아가루 0.25, 0.5, 1, 2%가 함유된 배지를 조제하여 20°C 암상태로 60일 동안 배양한 후 *V. nashicola* 균총의 직경을 조사한 결과 43.4~46.1mm 정도로 거의 차이가 없었다(그림 8, 표 2).

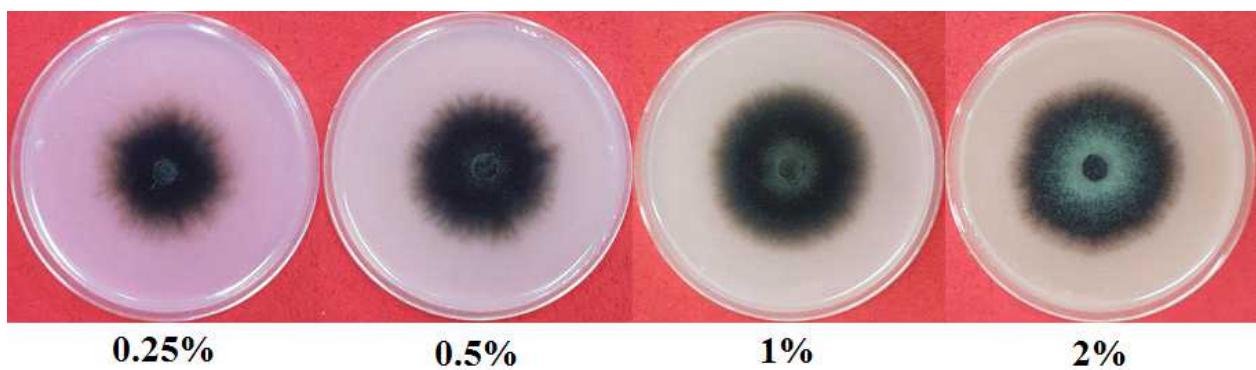


그림 8. 청아가루 함량을 달리한 청아배지에서 20°C 암상태로 60일 동안 배양한 후 생장한 배나무 검은별무늬병균 *Venturia nashicola* 균총.

반면에 청아가루 0.5%와 1%가 함유된 청아배지에서 페트리접시당 *V. nashicola* 분생포자 생성량은 약 5×10^4 개로 비슷한 수준인 반면에 청아가루 함량이 보다 낮은 0.25%가 함유된 청아

배지와 보다 높은 2%가 함유된 청아배지에서 페트리접시당 *V. nashicola* 분생포자 생성량은 약 3×10^4 개로 오히려 분생포자 생성량이 적은 것으로 조사되었다(표 2).

표 2. 청아가루 함량을 달리한 청아배지에서 20°C 암상태로 60일 동안 배양한 후 생장한 배나무 검은별무늬병균 *Venturia nashicola* 균총 직경 및 분생포자 생성량

청아가루 함량	균총직경(mm)	페트리접시당 분생포자 생성량
0.25%	43.4	3.0×10^4
0.5%	45.4	5.0×10^4
1%	45.9	5.1×10^4
2%	46.1	3.2×10^4

청아가루를 구성하는 당근, 사과, 진피, 양파, 생강, 설탕을 각각 1%씩만 함유하는 배지에서 생장한 *V. nashicola* 균총의 직경을 비교해본 결과 1% 당근배지에서는 청아배지에서 생장한 *V. nashicola* 균총의 직경과 비슷했지만 다른 배지에서는 1% 당근배지에 비해 균사생장이 저조하였다(그림 9).

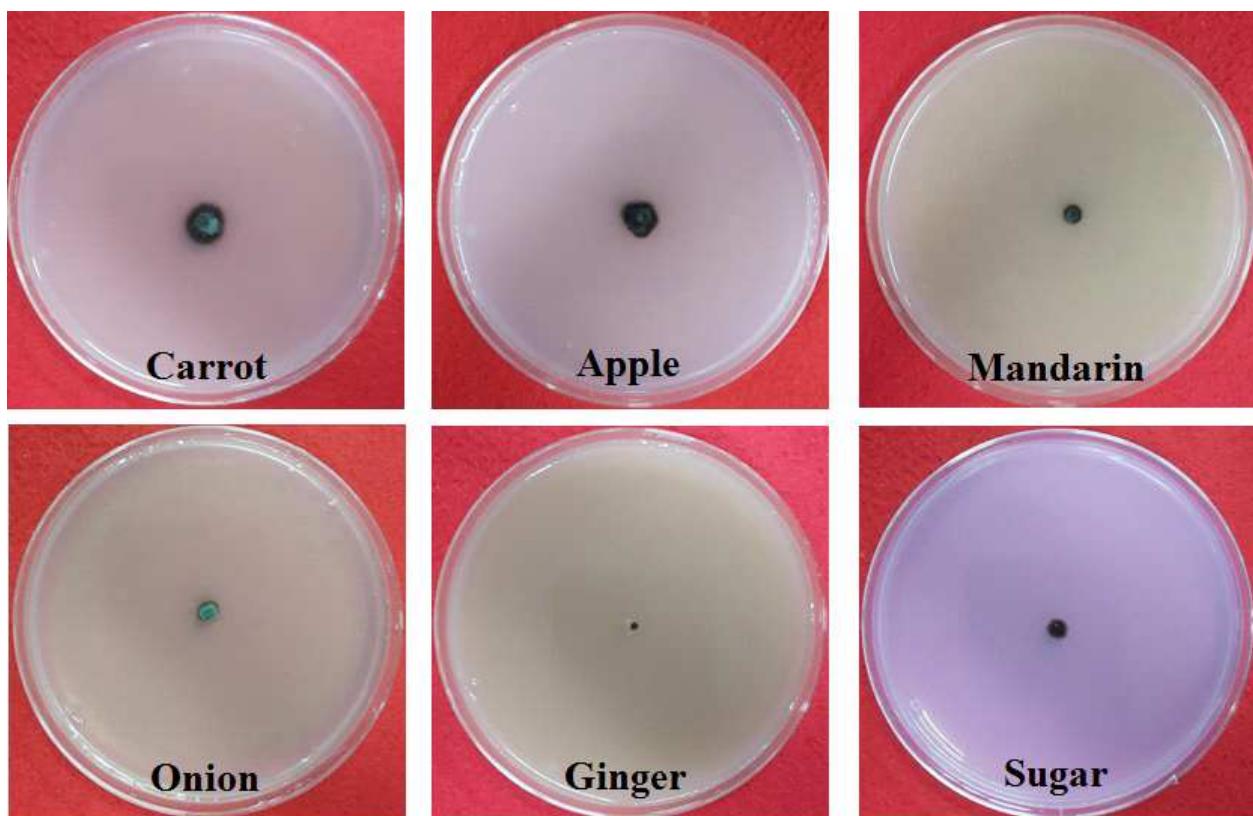


그림 9. 청아가루 단일 성분으로 조제한 배지에서 20°C 암상태로 30일 동안 배양한 후 생장한 배나무 검은별무늬병균 *Venturia nashicola* 균총.

한편 청아가루를 구성하는 당근, 사과, 진피, 양파, 생강, 설탕을 각각 1%씩만 함유하는 배지에서 *V. nashicola*의 분생포자 생성량을 비교해본 결과 1% 당근배지에서 페트리접시당 1.0×10^4 개로 분생포자가 가장 많이 생성되었다. 이어서 1% 사과배지, 1% 양파배지와 1% 설탕배지 순으로 각각 페트리접시당 8.0×10^3 개, 1.6×10^3 개 및 5.0×10^2 개의 분생포자가 생성되었으며, 1% 진피배지와 1% 생강배지에서는 *V. nashicola*의 분생포자가 생성되지 않았다(표 3).

표 3. 청아가루 함량을 달리한 청아배지에서 20°C 암상태로 60일 동안 배양한 후 생장한 배나무 검은별무늬병균 *Venturia nashicola* 균총 직경 및 분생포자 생성량

배지 종류	페트리접시당 분생포자 생성량
1% 당근배지	1.0×10^4
1% 사과배지	8.0×10^3
1% 진피배지	-
1% 양파배지	1.6×10^3
1% 생강배지	-
1% 설탕배지	5.0×10^2

*V. nashicola*의 분생포자 생성 유도에 가장 적합한 당근함량을 파악하기 위하여 0.5%, 1%, 2%, 및 5%로 달리한 당근배지에서 *V. nashicola*의 균총의 직경과 분생포자 생성량을 조사한 결과 2% 당근배지에서 *V. nashicola*의 균사 생장이 가장 왕성하였으며 분생포자 생성량도 페트리접시당 약 4.5×10^5 개로 가장 많이 생성되었다(표 4). 1% 당근배지와 5% 당근배지에서는 1% 당근배지에서 생성된 *V. nashicola*의 분생포자 생성량의 절반정도로 적었으며, 0.5% 당근배지에서는 2% 당근배지에서 생성된 *V. nashicola*의 분생포자 생성량의 1/3 수준이었다.

표 4. 당근가루 함량을 달리한 당근배지에서 20°C 암상태로 60일 동안 배양한 후 생장한 배나무 검은별무늬병균 *Venturia nashicola* 균총 직경 및 분생포자 생성량

당근함량	균총직경(mm)	페트리접시당 분생포자 생성량($\times 10^5$)
0.5%	44.7 ± 0.3	1.5 ± 0.6
1%	45.1 ± 0.2	2.0 ± 0.5
2%	49.2 ± 0.6	4.5 ± 1.3
5%	47.8 ± 1.3	2.4 ± 1.0

이상의 결과로부터 배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola*의 분생포자 생성 유도에 적합한 배지로 2% 당근배지가 선발되었다. 2% 당근배지는 대다수 곰팡이 배양 및 포자형성에 사용되는 감자한천배지에 비해 조성이 간단해서 조제하기도 간편하고 가격도 저렴하기 때문에 배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola*의 분생포자 수확이 손쉽게 가능해져 앞으로 *V. nashicola*의 병원

형 조사, 저항성 품종의 육성, 신규 약제 개발, 저항성 균주 탐색 연구 등이 한층 수월하게 수행될 수 있어 향후 혁신적인 배나무 검은별무늬병 방제전략 수립에 기여할 것으로 전망된다.

4. 배나무 검은별무늬병균 균주 혼합배양에 의한 교배형 분석

배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola* 균주들끼리 혼합배양에 의한 교배형 분석을 위하여 배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola* 9개 균주를 감자한천배지배지에서 2개씩 균주를 혼합하여 20°C 암상태로 배양하면서 분생포자 생성 유무를 조사한 결과 일부 균주 조합에서 분생포자가 형성되었다(그림 10).

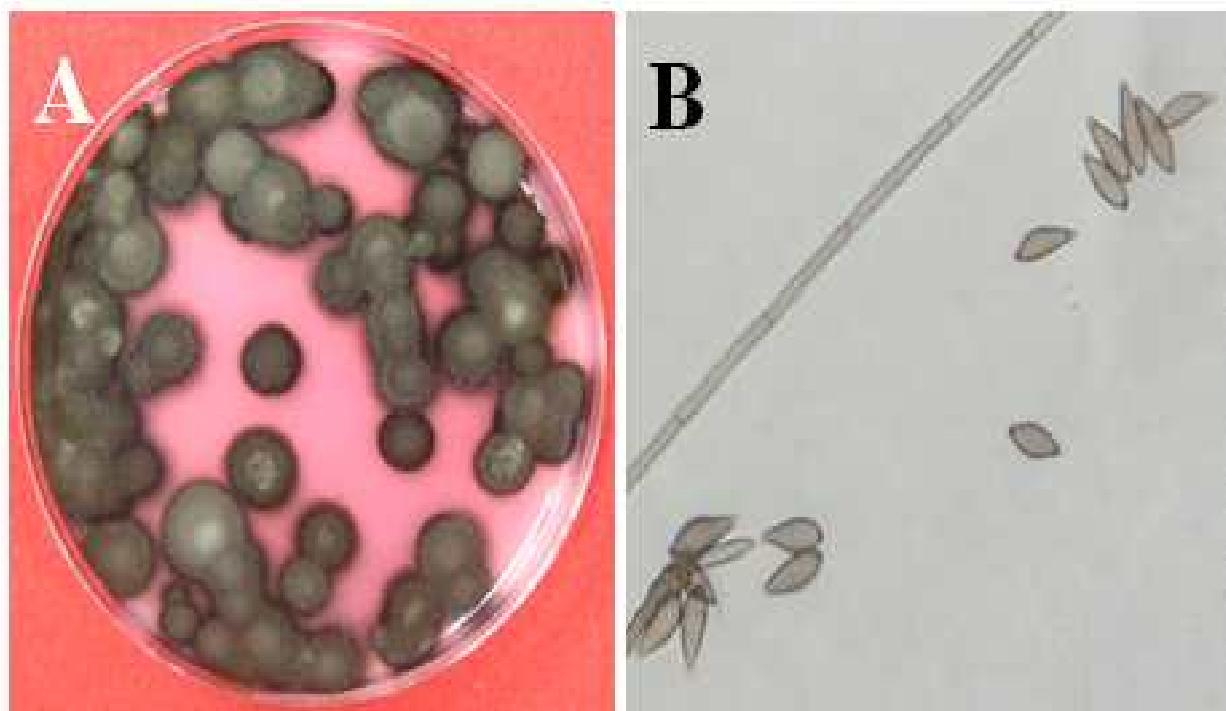


그림 10. 감자한천배지에서 20°C 암상태로 30일 동안 혼합배양한 후 생성된 배나무 검은별무늬병균 *Venturia nashicola* 균총(A) 및 분생포자(B).

배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola* 균주 KCTC6484는 NJGC1340 및 NJGC1341와 혼합배양한 경우에 분생포자가 형성되었으며, MAFF615003은 NJBH1325, NJGC1319, NJGC1340 및 NJGC1341와 혼합배양한 경우에 분생포자가 형성되었으며, MAFF615023은 NJBH1325, NJGC1340 및 NJGC1341와 혼합배양한 경우에 분생포자가 형성되었다(표 5). 그러나 배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola*의 9개 균주를 혼합하여 1년 6개월 이상 배양하면서 관찰했지만 어떤 조합에서도 자낭포자는 생성되지 않았다. 따라서 2개 균주씩 혼합배양 조합 중에서 배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola* 분생포자가 생성된 조합이 교배형일 가능성성이 있지만 자낭포자 생성을 확인하지 못했기 때문에 교배형 여부를 확정할 수 없었다.

표 5. 배나무 검은별무늬병균 *Venturia nashicola* 혼합배양에 의한 분생포자 형성유무

	KCTC 6484	MAFF 615002	MAFF 615003	MAFF 615023	MAFF 615029	NJBH 1325	NJGC 1319	NJGC 1340	NJGC 1341
KCTC 6484	-	-	-	-	-	-	-	+	+
MAFF 615002		-	-	-	-	-	-	-	-
MAFF 615003			-	-	-	+	+	+	+
MAFF 615023				-	-	+	-	+	+
MAFF 615029					-	-	-	-	-
NJBH 1325						-	-	-	-
NJGC 1319							-	-	-
NJGC 1340								-	-
NJGC 1341									-

※ +: 분생포자가 형성됨, -: 분생포자가 형성되지 않음.

5. 배나무 검은별무늬병균의 병원성 분화

18개 배나무 품종에서 분리한 배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola*의 분생포자 현탁액를 동일한 품종의 건전한 잎에 접종하여 발병을 유도한 후 검은별무늬병 병반을 발현시킨 품종수에 따라 병원성 수준을 평가하였을 때 0~11개 품종까지 매우 다양한 스펙트럼을 나타내었다. 따라서 병원성이 강한 수준별로 색의 농도를 질계 표현하여 비교해 보면 배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola* 종류별로 병원성 분화가 폭넓게 발생하고 있음을 시사해 주었다(표 6). 그 중에서 진수 품종에서 분리한 균주는 11개 품종에 병원성을 나타내어 가장 병원성이 강한 반면에 Naspati에서 분리한 균주는 다른 배나무 품종들에서 병을 일으키지 않아 가장 병원성이 약한 것으로 확인되었다.

표 6. 배나무 잎 접종에 의해 판별한 배나무 검은별무늬병균의 병원성 분화 정도

균주명	품종명															병원성 수준		
	진수	안리	황화리	순창 구립	압리	Muangxian- shai-li	신고 조숙	백리	화성 비봉	평창 수향리	S P. Calleryana	단배변 (대과)	공주 사곡	사과배	칠보	R Hawaii X JGR	해남 참배	Naspatti
진수			+	+		+	+++++	+		+		+	+	+	+		++	11
안리	+		+	+			+++	+			+++++	+		+	++			10
황화리	+				+		++++		+		++	+	+	+	+	+++		10
순창구립	+		+			+++	++	++	++	+	++	+						9
압리	+	++		+			++++	++		+		+			+			8
Muangxian-shai-li	+	++	++		+			++						++++	+		+	8
신고조숙	+	++	+		++++			++						+			+	7
백리	+	++	+			++					+		+					6
화성비봉				+		++			+			+				+	+	6
평창수향리	++					++		+			+++			+++				6
S P. Calleryana	+		+			+		++			+					+		6
단배변			++	+		+	++++					+			+			6
공주사곡	++					+		++							+	+		5
사과배	+		+++		+			++										4
칠보				+		++		++										3
R Hawaii X JGR				+		++			++									3
해남참배	++							+										2
Naspatti																		0

※ 병원성 수준: 17개 배나무 품종 중 검은별무늬병균이 병원성을 나타내는 품종 수로 환산한 상대적인 수준.

한편 17개 배나무 품종에서 분리한 배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola*의 분생포자 혼탁액을 동일한 품종의 건전한 엽병에 접종하여 발병을 유도한 후 검은별무늬병 병반을 발현시킨 품종 수에 따라 병원성 수준을 평가하였을 때 0~4개 수준에 머물렀다(표 7). 이러한 결과는 잎 접종을 통하여 얻은 병원성 분화 결과보다는 다양하지 않은 스펙트럼을 보였는데 잎 접종에 사용한 배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola* 종류와 접종 평가한 품종들이 다르고 잎 접종 시 기보다 1개월 늦게 접종하여 결과를 조사하였기 때문에 직접적으로 비교하기는 곤란하다. 그러나 배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola*의 병원성 분화가 발생하고 있음을 잎 접종과 엽병 접종 실험을 통하여 확인할 수 있었다.

표 7. 배나무 엽병 접종에 의해 판별한 배 검은별무늬병균의 병원성 분화 정도.

검은별무늬병균	품종															병원성 수준	
	장수	공주 청실리	산리	P. calleryana	이누 나시	괴산 향배	금리	황현 장파	감추자	거창 청실리	팔달	청서리	신세기	암수 산리	해남 참배	황실리	진수
장수	+					+					+					+	4
공주청실리							+			+						+	3
산리	++					+										+	3
P. calleryana	+											+				+	3
이누나시												+		+		++	3
괴산향배	+						+			+							3
금리	+	+															2
황현장파	++				+												2
감추자	+	+															2
거창청실리	++					+											2
팔달														+		+	2
청서리					+											++	2
신세기	++														+		2
암수산리																++	1
해남참배		+															1
황실리	++																1
진수																	0

※ 병원성 수준: 16개 배나무 품종 중 검은별무늬병균이 병원성을 나타내는 품종 수로 환산한 상대적인 수준.

6. 배나무 검은별무늬병균의 병원형(race)

9개 배나무 품종에서 분리한 배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola*의 분생포자를 행수, 건착, 콩배 등 세 가지 판별품종의 잎에 접종하여 병원성을 조사한 결과 표 8처럼 콩배에는 모두 병원성이 없었지만 행수와 건착에는 다양한 병원성 반응을 나타내었다. 그 중에서 행수에만 병원성을 나타내고 건착과 콩배에는 병원성이 없는 집단을 배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola* 집단을 race A이라고 명명 판별하였으며, 건착에는 병원성이 있지만 행수와 콩배에는 병원성이 없는 배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola* 집단을 병원형 race C라고 명명 판별하였으며, 행수와 건착에는 병원성을 나타내고 콩배에는 병원성이 없는 집단을 배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola* 집단을 병원형 race E라고 명명 판별하였다(표 8). Race A에는 화성비봉, 순창구림, 해남참배, 백리, Muangxian-shai-li에서 분리된 배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola* 균주들이 속하고, 병원형 race C에는 사과배에서 분리된 균주가 속하고, 병원형 race E에는 단배변, 신고조숙, 칠보에서 분리된 균주들이 속하는 것으로 확인되었다(표 8).

표 8. 배나무 잎 접종에 의한 배나무 검은별무늬병균 *Venturia nashicola*의 병원형(race) 판별

균주	판별품종에 대한 병원성			병원형
	행수	콩배	건착	
화성비봉	+++++	-	-	Race A
순창구림	++	-	-	
해남참배	++	-	-	
백리	+	-	-	
Muangxian-shai-li	+	-	-	
사과배	-	-	+	Race C
단배변	++++	-	+	Race E
신고조속	++	-	+	
칠보	+	-	+	

※ +++++; 병원성이 매우 강함, ++; 병원성이 강함, +; 병원성이 있음, -; 병원성이 없음.

배나무 엽병 접종 실험을 통하여 8개 배나무 품종에서 분리한 검은별무늬병균 *V. nashicola* 분생포자를 세 가지 판별품종에 접종하여 병원성을 조사한 결과 표 9에서 볼 수 있듯이 배나무 잎 접종 실험 결과처럼 콩배에는 모두 병원성이 없었지만 행수와 건착에는 다양한 병원성 반응을 나타내면서 race A, race C, race E 등 세 가지 병원형이 확인되었다.

병원형 race A에는 장수, 공주청실리, 거창청실리, 괴산향배에서 분리된 배나무 검은별무늬 병균 *V. nashicola* 균주들이 속하고, 병원형 race C에는 황현장파, 암수산리, 청서리에서 분리된 균주들이 속하고, 병원형 race E에는 P. Calleryana에서 분리된 균주가 속하는 것으로 확인되었다(표 9).

표 9. 배나무 엽병 접종에 의한 배나무 검은별무늬병균의 병원형(race) 판별

균주	판별품종에 대한 병원성			병원형
	행수	콩배	건착	
장수	+	-	-	Race A
공주청실리	+	-	-	
거창청실리	+	-	-	
괴산향배	+	-	-	
황현장파	-	-	+	
암수산리	-	-	+	Race C
청서리	-	-	+	
SP. Calleryana	+	-	+	Race E

※ +; 병원성이 있음, -; 병원성이 없음.

이와 같은 결과를 종합하면 국내에서 분포하는 배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola* 균주들은 병원성에 변화를 일으켜 표 10에 요약한 것처럼 행수에만 병원성이 있는 race A, 행수와 건착

에 병원성이 있는 race C, 건착에만 병원성이 있는 race E 등 적어도 세 종류의 race가 우리나라에 분포하고 있는 것으로 확인되었으며, 조사를 확대할 경우 적어도 세 가지 종류 이상의 다양한 race가 존재할 수도 있다는 것을 유추할 수 있으며, 최대 8개 race까지 존재할 가능성이 있다.

일본에서는 표 10에 적시된 것처럼 세 가지 race가 분포하는 것으로 보고되었는데, 일본 race 1은 국내에 분포하는 race A와 동일한 *V. nashicola* 균주들이지만 일본 race 2와 일본 race 3은 국내에 분포하지 않는 *V. nashicola* 균주들이고 race C와 race E는 일본에는 분포하지 않아 우리나라와 일본에 분포하는 *V. nashicola* 균주들에는 유전적으로 많은 차이가 있어 보인다.

표 10. 배나무 검은별무늬병균 *Venturia nashicola*의 병원형(race) 판별 기준

한국 race		일본 race		판별품종에 대한 병원성			판별품종의 반응		
분류	분포	분류	분포	행수	콩배	건착	행수	콩배	건착
Race A	○	Race 1	○	+	-	-	S	R	R
Race B	-	Race 2	○	-	+	-	R	S	R
Race C	○		-	-	-	+	R	R	S
Race D	-	Race 3	○	+	+	-	S	S	R
Race E	○		-	+	-	+	S	R	S
Race F	-		-	-	+	+	R	S	S
Race G	-		-	+	+	+	S	S	S
Race H	-		-	-	-	-	R	R	R

※ +; 병원성이 있음, -; 병원성이 없음, S; 감수성 반응, R: 저항성 반응.

한편 2015년 나주지역과 화성지역에서 채집한 15균주와 화성에서 채집한 16균주들은 병원형(race) 판별한 결과 나주지역에서는 race A, C, E 세 종류가 모두 검출되었지만 race A가 우점종이었다(표 11). 화성지역에서는 race C와 race E 두 종류만 검출되었는데 race E가 우점종이었다. 두 지역을 합해서 보면 race A와 race E가 비슷한 비율이었다. 그러나 균주 채집지역이나 채집 균주수가 제한적이어서 지역별 및 품종별 우리나라에 분포하는 *V. nashicola*의 race의 분포는 더 많은 균주를 수집하여 race를 판별함으로써 파악될 수 있을 것이다.

표 11. 2015년 전남 나주와 경기도 화성지역에 분포하는 배나무 검은별무늬병균 병원형(race)

군주명	기주	채집장소	Race
NJJS1	장수	Naju, Korea	A
NJGC1	공주청실리	Naju, Korea	A
NJHC-1	해남참배	Naju, Korea	A
NJBR-1	백리	Naju, Korea	A
NJSJ-1	신고	Naju, Korea	C
NJCB-1	칠보	Naju, Korea	C
NJAP-1	사과배	Naju, Korea	E
NJJS2	장수	Naju, Korea	A
NJJS3	장수	Naju, Korea	A
NJJS4	장수	Naju, Korea	A
NJJS5	장수	Naju, Korea	A
NJGC2	공주청실리	Naju, Korea	A
NJGC3	공주청실리	Naju, Korea	A
NJGC4	공주청실리	Naju, Korea	A
NJGC5	공주청실리	Naju, Korea	A
HSPB1	<i>Pyrinus bretschneider</i>	Hwasung, Korea	C
HSPB2	<i>Pyrinus bretschneider</i>	Hwasung, Korea	C
HSPB3	<i>Pyrinus bretschneider</i>	Hwasung, Korea	C
HSPB4	<i>Pyrinus bretschneider</i>	Hwasung, Korea	C
HSPB5	<i>Pyrinus bretschneider</i>	Hwasung, Korea	C
HSHJ1	황현장파	Hwasung, Korea	E
HSHJ2	황현장파	Hwasung, Korea	E
HSHJ3	황현장파	Hwasung, Korea	E
HSHJ4	황현장파	Hwasung, Korea	E
HSHJ5	황현장파	Hwasung, Korea	E
HSSK1	신세기	Hwasung, Korea	E
HSSK2	신세기	Hwasung, Korea	E
HSSK3	신세기	Hwasung, Korea	E
HSSK4	신세기	Hwasung, Korea	E
HSSK5	신세기	Hwasung, Korea	E
HSJS-1	청서리	Hwasung, Korea	E

7. 배나무 검은별무늬병균의 계통학적 유연관계

1) rDNA-ITS(Internal transcribed spacer)에 의한 배 검은별무늬병균의 유연관계

우리나라에 분포하는 배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola* 45균주와 대조균주로 사용한 생물자원센터에서 분양받은 동양배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola* KCTC6484와 일본에서 분양받은 *V. nashicola* MAFF615002, MAFF615003, MAFF615023, MAFF615029 등 4균주의 ITS 염기서열을 분석한 결과 서양배나무 검은별무늬병균 *V. pirina*과 사과나무 검은별무늬병균 *V. inaequalis* 균주들과 확연하게 구분되는 cluster를 이루었다(그림 11).

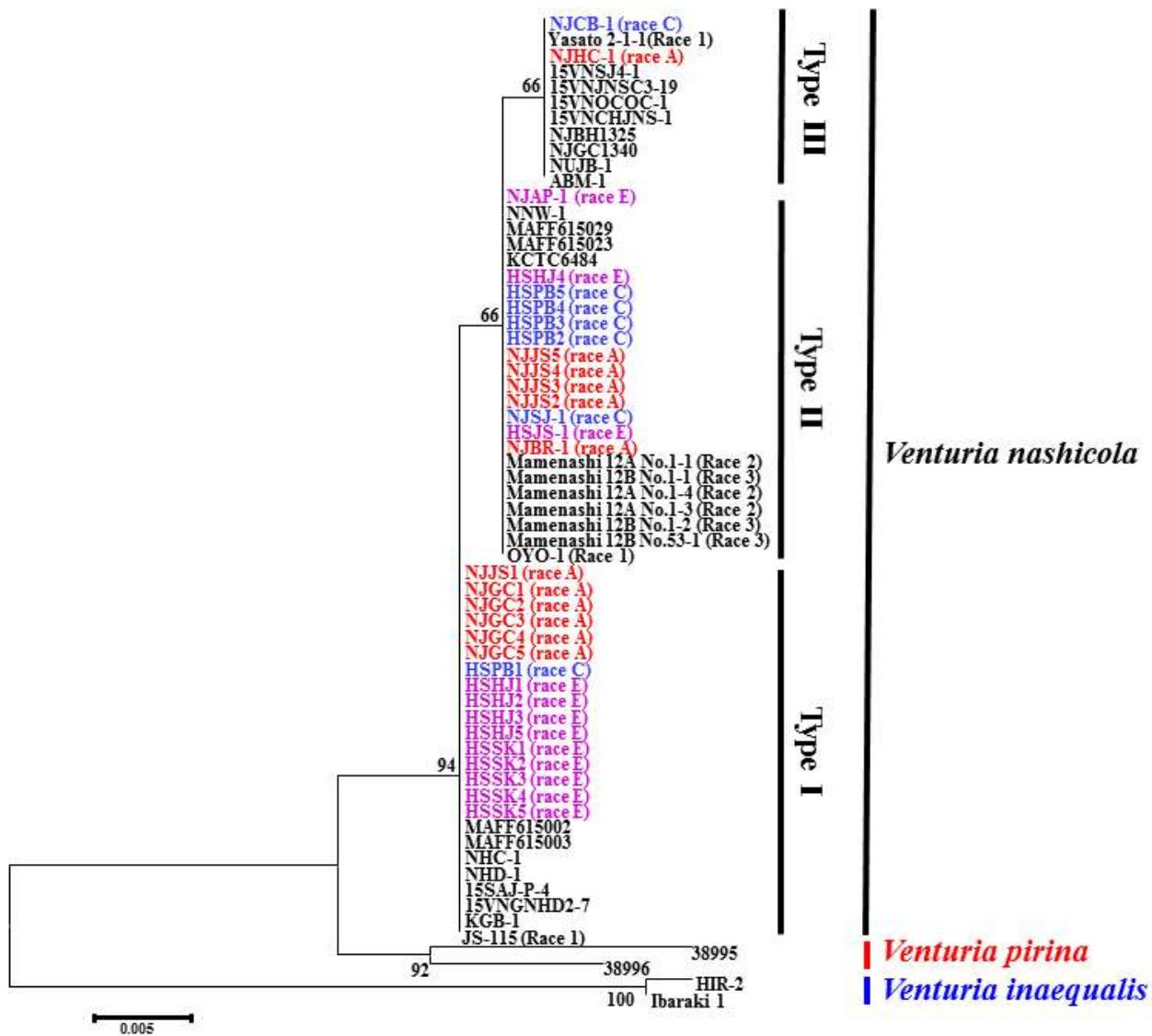


그림 11. 배 검은별무늬병균 *Venturia nashicola*의 rDNA-ITS 염기서열에 의한 유연관계

배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola* 50균주들의 ITS 염기서열을 비교해 보면 세 가지 type으로 구분되었다. 대조균주 MAFF615002과 MAFF615003을 비롯하여 23균주가 type I으로 분류되

었고, 대조균주인 KCTC6484와 MAFF615023과 MAFF615029를 비롯하여 17균주가 type II로 분류되었으며, NJHC-1을 비롯하여 10균주가 type III로 분류되었다.

세 가지 type의 ITS염기서열에서 type I의 443bp의 염기 T가 type II에서는 C로 치환되어 1개의 염기만 다르고, type III에서는 type I의 443bp의 염기 T가 C로 치환되었고 345bp의 염기 G가 A로 치환되어 2개의 염기만 다를 뿐 큰 차이가 없었다(그림 12).

한편 일본에서 배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola*의 race 1로 분류된 3균주(JS-115, OYO-1, Yasato 2-2-1), race 2로 분류된 3균주(Mamenashi12ANo.1-1, Mamenashi12ANo.1-3, Mamenashi12ANo.1-4), race 3으로 분류된 3균주(Mamenashi12BNo.1-1, Mamenashi12BNo.1-2, Mamenashi12BNo.53-1) 등 9균주의 rDNA-ITS 염기서열을 GenBank 데이터베이스에서 찾아 비교해본 결과 race 1에 속하는 3균주는 type I, II, III에 1균주씩 속하는 것으로 분류되었고, race 2와 race 3에 속하는 6균주는 모두 type II에 속하는 것으로 분류되었다. 이러한 결과로 미루어 race와 ITS 사이에 연관성은 낮은 것으로 판단되었다.

Type I rDNA-ITS 염기서열	TAGCCTCCGGCGCAACTCCACCCTTGTAAACCGCGGCCGGATTGGCG CCTGGCGGAGGGCACCCCCCGCTCGCGGGGGCCTCCGCCTGCCGGAATC AGCCAACCCTGCCTGGAAAATCGAAGTCTGAGAACGAGTTAAATCGAAC AAAACTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCAACGATGAAGAACGCA GCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAACATTCACTGAATCATCGAAT CTTGAAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCACACCTGTTCG AGGCCCATTTCTACCCCTGGAGGCCACGCTCTGTGATGGGCCCGTCCTCGC GGACGGGCCGAAACCCGTGGCGCCGTCGCTCCGGGGCTGAGCGTAGCA AGAGAAAATCCCTCGCTCGGAGTGCCTGGCGGCCGGTCGCCCCGAACCCA TTT C ACAAGGTTGGCCTCGGATCAGGTGGGGATACCCGCTGAACCTAAC ATATCAA
Type II rDNA-ITS 염기서열	TAGCCTCCGGCGCAACTCCACCCTTGTAAACCGCGGCCGGATTGGCG CCTGGCGGAGGGCACCCCCCGCTCGCGGGGGCCTCCGCCTGCCGGAATC AGCCAACCCTGCCTGGAAAATCGAAGTCTGAGAACGAGTTAAATCGAAC AAAACTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCAACGATGAAGAACGCA GCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAACATTCACTGAATCATCGAAT CTTGAAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCACACCTGTTCG AGGCCCATTTCTACCCCTGGAGGCCACGCTCTGTGATGGGCCCGTCCTCGC GGACGGGCCGAAACCCGTGGCGCCGTCGCTCCGGGGCTGAGCGTAGCAA AGAGAAAATCCCTCGCTCGGAGTGCCTGGCGGCCGGTCGCCCCGAACCCA TTT C ACAAGGTTGGCCTCGGATCAGGTGGGGATACCCGCTGAACCTAAC ATATCAA
Type III rDNA-ITS 염기서열	TAGCCTCCGGCGCAACTCCACCCTTGTAAACCGCGGCCGGATTGGCG CCTGGCGGAGGGCACCCCCCGCTCGCGGGGGCCTCCGCCTGCCGGAATC AGCCAACCCTGCCTGGAAAATCGAAGTCTGAGAACGAGTTAAATCGAAC AAAACTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCAACGATGAAGAACGCA GCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAACATTCACTGAATCATCGAAT CTTGAAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCACACCTGTTCG AGGCCCATTTCTACCCCTGGAGGCCACGCTCTGTGATGGGCCCGTCCTCGC GGAC A GCCCCGAAACCCGTGGCGCCGTCGCTCCGGGGCTGAGCGTAGCAA AGAGAAAATCCCTCGCTCGGAGTGCCTGGCGGCCGGTCGCCCCGAACCCA TT C ACAAGGTTGGCCTCGGATCAGGTGGGGATACCCGCTGAACCTAAC TATCAA

<그림 12> rDNA-ITS에 의한 배나무 검은별무늬병균의 세 가지 분류군의 염기서열 차이

2) β -tubulin 유전자 염기서열에 의한 배나무 검은별무늬병균의 유연관계

우리나라에 분포하는 배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola* 45균주와 대조균주로 사용한 생물자원센터에서 분양받은 동양배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola* KCTC6484와 일본에서 분양받은 *V. nashicola* MAFF615002, MAFF615003, MAFF615023, MAFF615029 등 4균주의 β -tubulin 유전자의 염기서열을 분석한 결과 서양배나무 검은별무늬병균 *V. pirina*과 사과나무 검은별무늬병균 *V. inaequalis* 균주들과 확연하게 구분되는 cluster를 이루었다(그림 13).

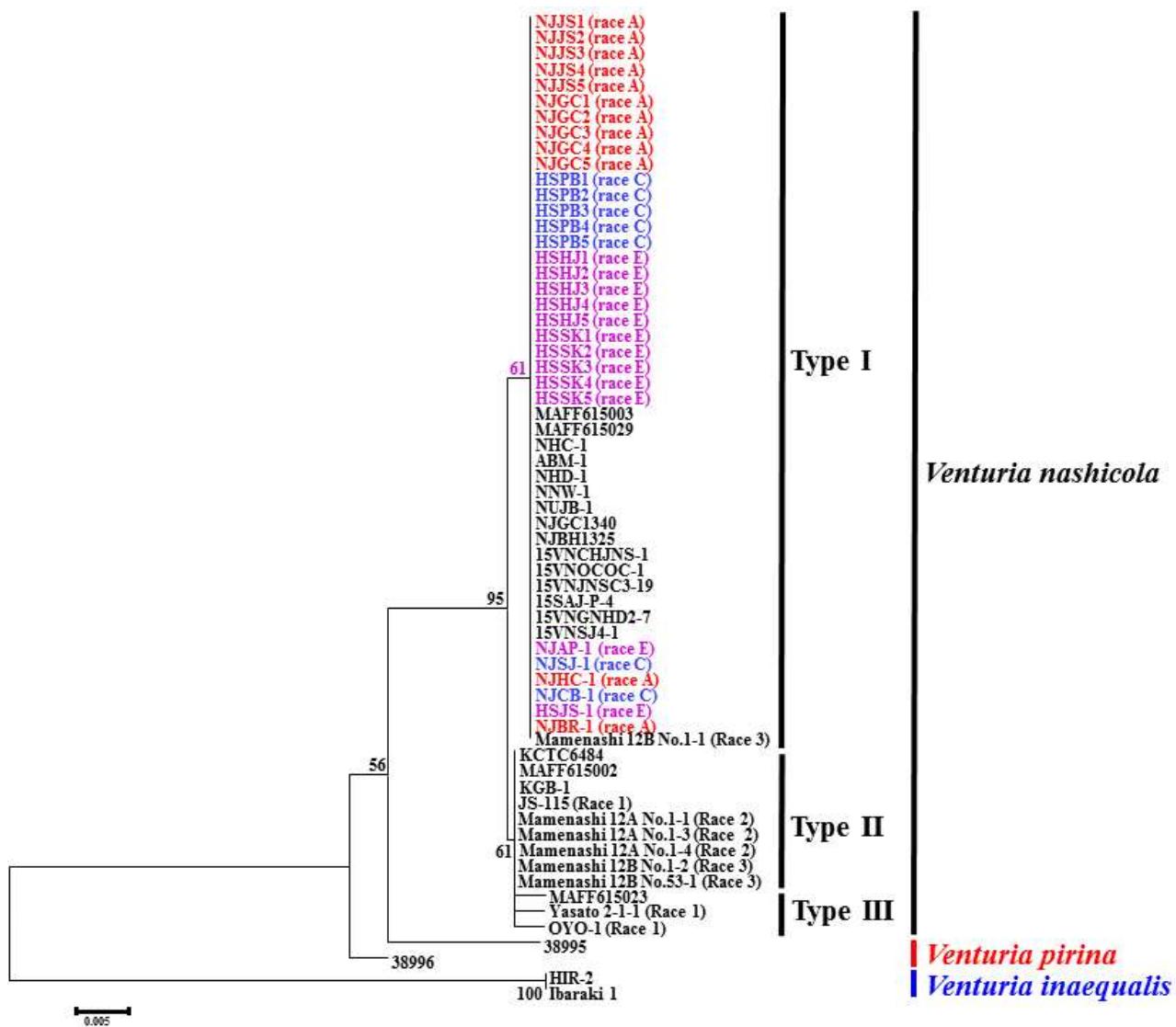


그림 13. 배나무 검은별무늬병균의 β -tubulin 유전자 염기서열에 의한 유연관계

배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola* 50균주들의 β -tubulin 유전자의 염기서열을 비교해 보면 세 가지 type으로 구분되었다. 대조균주인 MAFF615003과 MAFF615029를 비롯하여 46균주가 type I으로 분류되었고, 대조균주인 KCTC6484와 MAFF615002과 KGB-1 등 3균주가

type II로 분류되었으며, 대조군주 MAFF615023은 단독으로 type III로 분류되었다. 그러나 세 가지 type에는 단지 아미노산 codon 1개만 차이가 있었는데, type I에서 GCG(alanine)가 type II에서는 GAG(glutamate)로 치환되었고, type III에서는 AAG(lysine)으로 치환되었을 뿐 큰 차이가 없었다(그림 14).

Type I β-tubulin 염기서열	CTAACCAAGGCAAACCATTCTGGCGAGCACGGTCTCGACGGTCCGGAGGTGAAGCCAATGCTTGGACAAGCATAGCGTGGCGATGCTGATGAGATCCTAGGTACAATGGCACGTCTGACCTCCAGTTGGA GCGCATGAATGTCTACTTCAACGAGGTGAGAACCAGCTCGACCGCCAACGTTACAATTACTAATT CCAAACAGGCATCCGGCAACAAGTTCTGTTCTCGGCCAGCTCTCCGCCGATAACTTCGTCTCGATCTGGAGGCCAGGTACCAT GGACGCTGTCCGTGCCGGTCTTCGGCCAGCTCTCCGCCGATAACTTCGTCTCGACCAAGTTCTT GGTGTGTAACAACTGGGCAAGGGTCATTACACTGAGGGTGCGAGCTTGTGACCAAGTTCTT GATGTTGACCGTCCGGAGGGCGAGGGCTGCGACTGCTCCAGGGTTCCAATACCGCAACTCTT GTGGTGGCACTGGTGTGGTATGGGTACACTTCTTATCTCCAAGATCCCGAGGAATTCCCAGACCG TATGATGCCACATCTGTGTCCTACCAAAAGGTCTCGACACAGTCGTTGAGCCATACAAT GCCACTTGTCCGTTACCAGCTTGTGAGAATTGGACG GAG ACCTCTGCAATTGACAACGAGGC TCTGTACGATATTGATGCGCACGGTGAAGCTCAACAAACCCATCATACGGCGATCTCAACCACCTGG TCTCCGCTGTCATGTCGTGTCACCACCTGCTTGGCTTCCCTGGTCACTGCAACTCCGATCTACGT AATTGGCTGTCAACATGGTGGCTTCCACGGTACATTCTTATCTTGTGCTCCTCTCAC CAGCCGTGGCGCACACTCCTCCGTGCTGTGACCGTCCCTGAGCTCACCCAGCAAAATGTTGACCC AAGAACATGATGGCTGCTTGTGACTTCCGTAACGGACGTTACCTCACTTGCTCCGCTATTGTAAG CCTTTGCAATTCCGATCCATCTCGCATCTGCTAACATCTTCTAGCCGTGGTAAGGTCTCATG AAGGAGGTGAGGACCAAGATGCGCAATGTCCAGAACAGAACACTCGTCTACTTCGTTGAATGG
Type II β-tubulin 염기서열	CTAACCAAGGCAAACCATTCTGGCGAGCACGGTCTCGACGGTCCGGAGGTGAAGCCAATGCTTGGACAAGCATAGCGTGGCGATGCTGATGAGATCCTAGGTACAATGGCACGTCTGACCTCCAGTTGGA GCGCATGAATGTCTACTTCAACGAGGTGAGAACCAGCTCGACCGCCAACGTTACAATTACTAATT CCAAACAGGCATCCGGCAACAAGTTCTGTTCTCGGCCAGCTCTCCGCCGATAACTTCGTCTCGATCTGGAGGCCAGGTACCAT GGACGCTGTCCGTGCCGGTCTTCGGCCAGCTCTCCGCCGATAACTTCGTCTCGACCAAGTTCTT GGTGTGTAACAACTGGGCAAGGGTCATTACACTGAGGGTGCGAGCTTGTGACCAAGTTCTT GATGTTGACCGTCCGGAGGGCGAGGGCTGCGACTGCTCCAGGGTTCCAATACCGCAACTCTT GTGGTGGCACTGGTGTGGTATGGGTACACTTCTTATCTCCAAGATCCCGAGGAATTCCCAGACCG TATGATGCCACATCTGTGTCCTACCAAAAGGTCTCGACACAGTCGTTGAGCCATACAAT GCCACTTGTCCGTTACCAGCTTGTGAGAATTGGACG AAG ACCTCTGCAATTGACAACGAGGC TCTGTACGATATTGATGCGCACGGTGAAGCTCAACAAACCCATCATACGGCGATCTCAACCACCTGG TCTCCGCTGTCATGTCGTGTCACCACCTGCTTGGCTTCCCTGGTCACTGCAACTCCGATCTACGT AATTGGCTGTCAACATGGTGGCTTCCACGGTACATTCTTATCTTGTGCTCCTCTCAC CAGCCGTGGCGCACACTCCTCCGTGCTGTGACCGTCCCTGAGCTCACCCAGCAAAATGTTGACCC AAGAACATGATGGCTGCTTGTGACTTCCGTAACGGACGTTACCTCACTTGCTCCGCTATTGTAAG CCTTTGCAATTCCGATCCATCTCGCATCTGCTAACATCTTCTAGCCGTGGTAAGGTCTCATG AAGGAGGTGAGGACCAAGATGCGCAATGTCCAGAACAGAACACTCGTCTACTTCGTTGAATGG
Type III β-tubulin 염기서열	CTAACCAAGGCAAACCATTCTGGCGAGCACGGTCTCGACGGTCCGGAGGTGAAGCCAATGCTTGGACAAGCATAGCGTGGCGATGCTGATGAGATCCTAGGTACAATGGCACGTCTGACCTCCAGTTGGA GCGCATGAATGTCTACTTCAACGAGGTGAGAACCAGCTCGACCGCCAACGTTACAATTACTAATT CCAAACAGGCATCCGGCAACAAGTTCTGTTCTCGGCCAGCTCTCCGCCGATAACTTCGTCTCGATCTGGAGGCCAGGTACCAT GGACGCTGTCCGTGCCGGTCTTCGGCCAGCTCTCCGCCGATAACTTCGTCTCGACCAAGTTCTT GGTGTGTAACAACTGGGCAAGGGTCATTACACTGAGGGTGCGAGCTTGTGACCAAGTTCTT GATGTTGACCGTCCGGAGGGCGAGGGCTGCGACTGCTCCAGGGTTCCAATACCGCAACTCTT GTGGTGGCACTGGTGTGGTATGGGTACACTTCTTATCTCCAAGATCCCGAGGAATTCCCAGACCG TATGATGCCACATCTGTGTCCTACCAAAAGGTCTCGACACAGTCGTTGAGCCATACAAT GCCACTTGTCCGTTACCAGCTTGTGAGAATTGGACG AAG ACCTCTGCAATTGACAACGAGGC TCTGTACGATATTGATGCGCACGGTGAAGCTCAACAAACCCATCATACGGCGATCTCAACCACCTGG TCTCCGCTGTCATGTCGTGTCACCACCTGCTTGGCTTCCCTGGTCACTGCAACTCCGATCTACGT AATTGGCTGTCAACATGGTGGCTTCCACGGTACATTCTTATCTTGTGCTCCTCTCAC CAGCCGTGGCGCACACTCCTCCGTGCTGTGACCGTCCCTGAGCTCACCCAGCAAAATGTTGACCC AAGAACATGATGGCTGCTTGTGACTTCCGTAACGGACGTTACCTCACTTGCTCCGCTATTGTAAG CCTTTGCAATTCCGATCCATCTCGCATCTGCTAACATCTTCTAGCCGTGGTAAGGTCTCATG AAGGAGGTGAGGACCAAGATGCGCAATGTCCAGAACAGAACACTCGTCTACTTCGTTGAATGG

<그림 14> β-tubulin에 의한 배나무 검은별무늬병균의 세 가지 분류군의 염기서열 차이.

한편 GenBank 데이터베이스의 β -tubulin 유전자의 염기서열을 토대로 일본에서 배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola*의 race 1로 분류된 JS-115는 type II에 속하는 것으로 확인된 반면에, OYO-1와 Yasato 2-2-1은 type III에 속하는 것으로 확인되었다. 또한 race 2로 분류된 3균주(Mamenashi12ANo.1-1, Mamenashi12ANo.1-3, Mamenashi12ANo.1-4)는 모두 type II에 속하는 것으로 확인되었으나, race 3으로 분류된 3균주 중에서 Mamenashi12BNo.1-1은 type I에 속하고 Mamenashi12BNo.1-2와 Mamenashi12BNo.53-1은 type III에 속하는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 rDNA-ITS 염기서열 분석에서처럼 race와 β -tubulin 사이에 연관성은 낮음을 시사한다.

3) 배나무 검은별무늬병균의 유전적 분화

우리나라에 분포하는 배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola*의 균주들의 유전적 분화정도를 조사하기 위하여 7가지 10-mer oligonucleotide primer를 이용하여 얻은 RAPD 패턴은 그림 15과 같고, 이것을 바탕으로 그린 dendrogram은 그림 16과 같다.

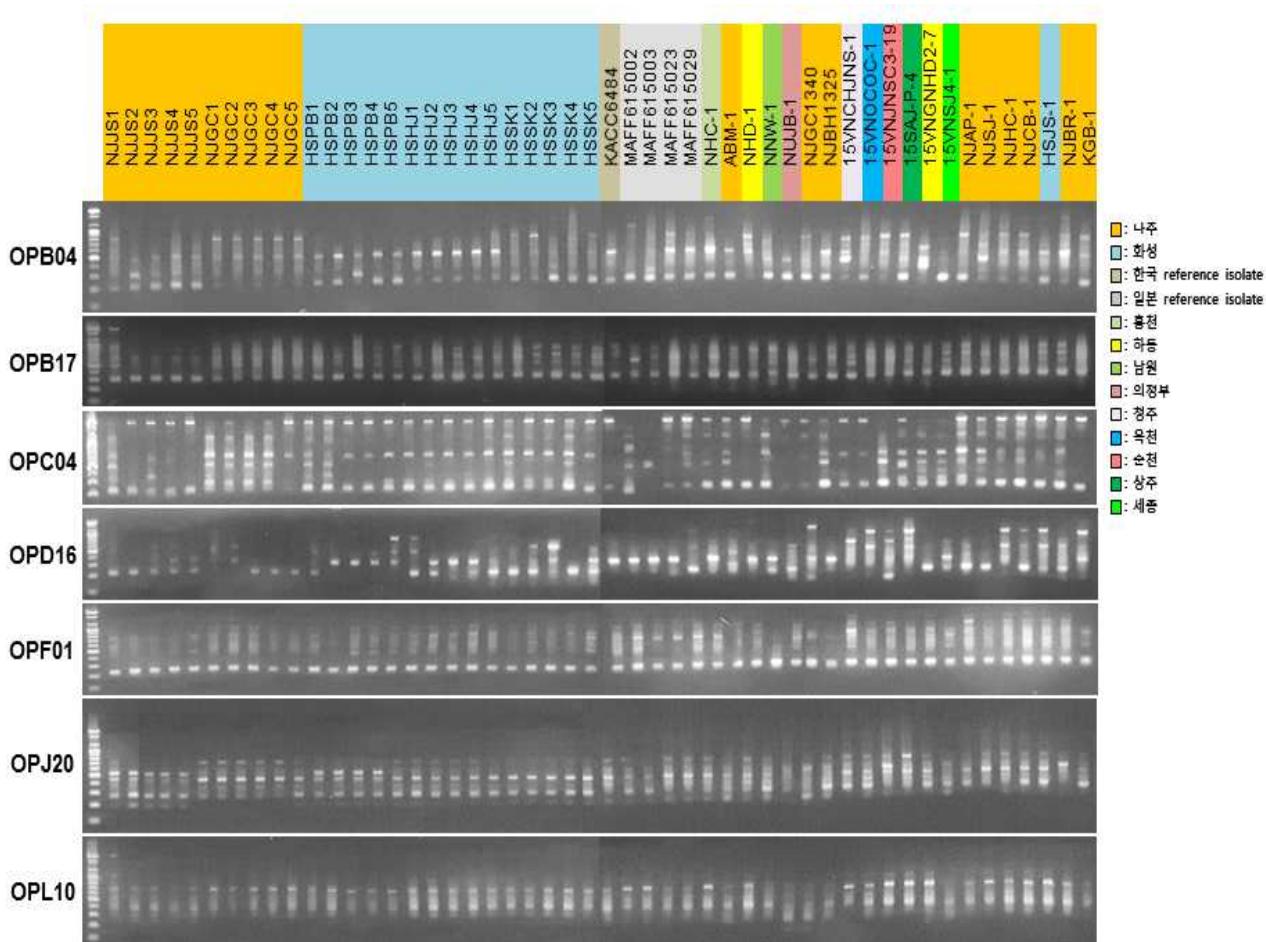


그림 15. 배나무 검은별무늬병균 *Venturia nashicola*의 RAPD 패턴

배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola* 50균주들은 다양한 cluster를 만들었는데 80% 유사도를 기준으로 10가지 subgroup으로 50균주들을 세분할 수 있었다(그림 16). 주로 나주지역에서 채집되었고 race A로 분류되는 다수 균주들이 1, 2, 3, 9군(subgroup)으로 다양하게 세분되었다. 특히 나주지역의 장수품종에서 채집한 5균주 중에서 NJJS1은 다른 4균주(NJJS2, NJJS3, NJJS4, NJJS5)와 확연하게 다른 cluster를 이루는 것을 보면 유전적 분화 폭이 매우 크다는 것을 암시한다. 반면에 화성지역에서 채집되었고 race C와 E로 분류되는 균주들 중에서 HSJS-1만 9군(subgroup)으로 분류되고 나머지 균주들은 모두 4군(subgroup)으로 분류되었다. 비록 1, 2, 3군(subgroup)인 경우에는 각각 race A로만 되어있지만, 4군(subgroup)과 10군(subgroup)에는 race C와 race E가 속하고 9군(subgroup)에는 race A, C, E가 속하는 것으로 보아 RAPD에 의한 race 유별은 불가능했고, 우리나라에 분포하는 배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola* 집단에는 유전적 분화가 왕성하게 일어났음을 시사해준다.

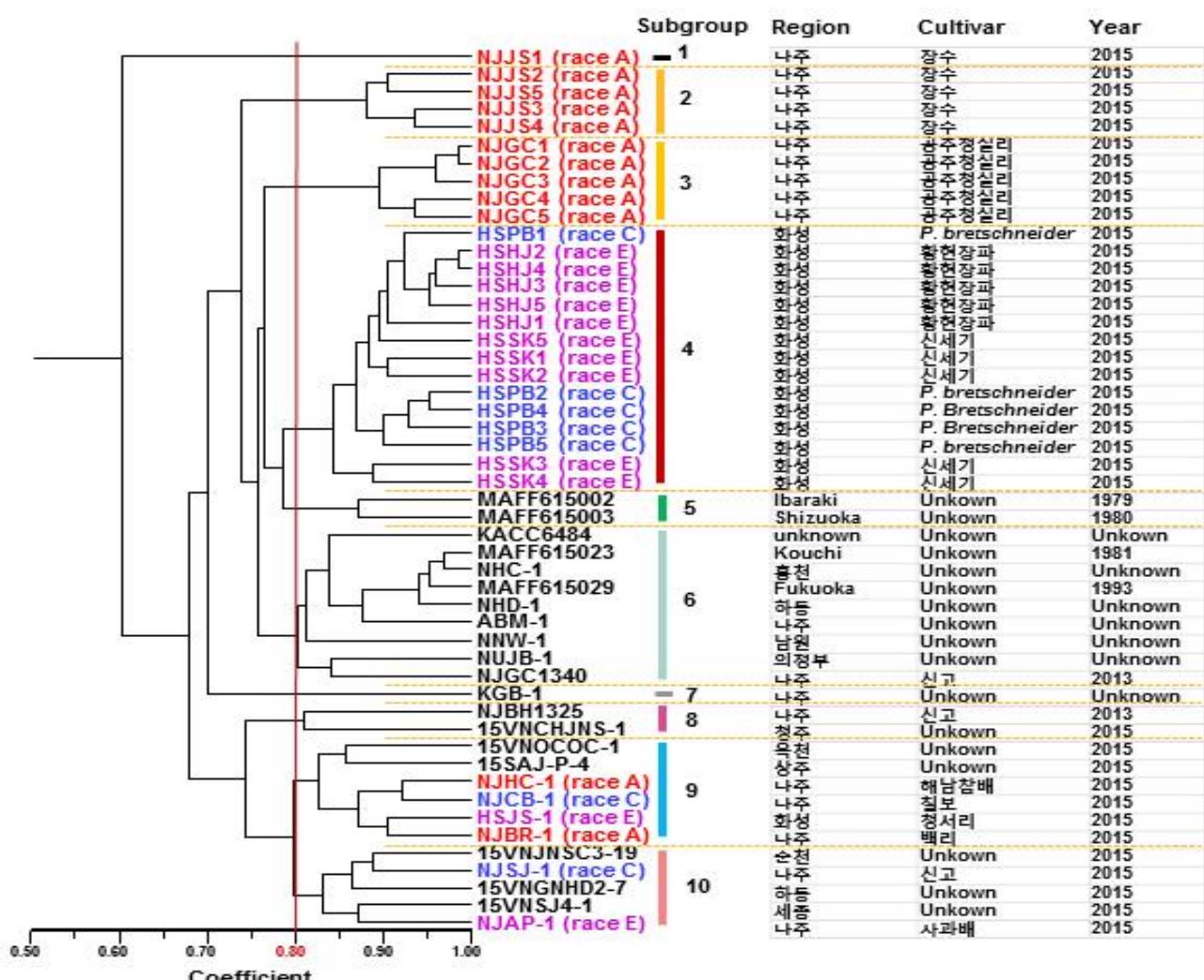


그림 16. 배나무 검은별무늬병균 *Venturia nashicola*의 RAPD 패턴에 따른 dendrogram.

<제2협동과제 : 배검은별무늬병균의 약제저항성 마커개발>

제1절. Benzimidazole계 살균제에 대한 모니터링과 분자마커 개발

1. 재료 및 방법

(1) 실험에 사용한 균주

Benzimidazole계 살균제에 대한 저항성 검정을 위하여 순천대학교에서 분양받은 *Venturia nashicola* 5개의 균주를 사용하였다(Table 1). 실험에 사용한 균주는 20°C의 PDA 배지에 접종하여 암조건에서 2달간 배양한 후, 4°C에서 보관하며 실험에 사용하였다. 실험에 사용하기 위해서는 보관 균주를 새로운 PDA 배지에 접종하여 동일한 조건에서 다시 2달을 배양한 후 살균제 배지에 접종하는 접종원으로 사용하였다.

(2) 실험에 사용한 살균제

Benzimidazole계 살균제인 benomyl(a.i. 50%, WP), carbendazim(a.i. 60%, WP)과 N-phenylcarbamate계인 diethofencarb와 carbendazim의 혼합제(a.i. 25%/25%, WP)를 실험에 사용하였다. 각 살균제는 PDA 배지에서 최종농도가 0.032, 0.16, 0.8, 4.0, 20.0, 100.0 µg/mL가 되도록 첨가하였다.

Table 1. Isolates of *Venturia nashicola* used in this study

Isolates	Isolation region	Isolation time
KCTC 6484	Unknown	-
MAFF 615002	Ibaraki, Japen	1979/07
MAFF 615003	Shizuoka, Japen	1980/07
MAFF 615023	Kouchi, Japen	1981/05
MAFF 615029	Fukuoka, Japen	1993/08

(3) *V. nashicola*에 대한 살균제의 균사생장 억제 효과 조사

실험에 사용한 3종류의 살균제를 살균증류수에 혼탁한 후, PDA 배지에 정해진 농도가 되도록 맞추어 첨가하였다. 세균의 오염을 방지하기 위해서 300 µg/mL의 streptomycin을 배지에 같이 첨가하였다. 접종을 하기 위하여 준비한 *V. nashicola*의 균사 선단에서 균사 조각(가로 x 세로; 1 mm x 1 mm)을 떼어 내어 살균제를 첨가한 PDA 배지에 접종하고, 20°C의 암상태에서 30일간 배양하였다. 살균제의 효과는 30일간 배양한 후 살균제 배지에서 자란 병원균의 균총의 직경과 무처리 배지에서 자란 병원균 균총의 직경을 조사하고, 아래 식에 의해서 균사생장 억제효과를 구하여 비교하였다.

$$\text{균사생장 억제 효과}(\%) = \left(1 - \frac{\text{살균제 배지에서 균총의 직경}}{\text{무처리 배지에서 균총의 직경}} \right) \times 100$$

(4) 병원균의 gDNA 추출

병원균을 PDA 배지에 접종하여 20°C의 암조건에서 30일간 배양한 후, *V. nashicola*의 균사를 수확하여 -70°C에서 12시간 동안 동결건조하였다. 멸균한 유리 막대를 사용하여 동결건조한 균사를 고르게 분쇄하고, DNA 추출 buffer(200 mM Tris-HCl (pH 7.5), 25 mM EDTA (pH 8.0), 0.5% SDS, 250 mM NaCl)를 첨가하여 65°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 완료된 균사의 시료는 4°C에서 13,000 rpm으로 10분간 원심분리하고, 상징액에 동량의 phenol을 처리하여 상온에서 15분간 반응시켰다. 반응이 끝난 추출액은 다시 동일한 조건의 처리를 1회 더 실시하였다. 원심분리 후 얻은 상징액에 동량의 chloroform을 처리하여 잘 혼들어 준 후, 상온에서 10분간 반응시키고 4°C에서 13,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 얻은 상징액에 동량의 isopropyl alcohol을 처리하였다. 이 때 형성된 DNA를 수확하기 위하여 4°C에서 13,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상징액을 버린 후, 침전물에 70% 에탄올을 200 μL 첨가하였다. 침전물은 4°C에서 13,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후, 상징액은 버리고 침전물만을 취하여 건조시켰다. 건조된 침전물은 50 μL의 멸균증류수에 녹인 후 5 mg의 RNase를 처리하여 37°C에서 30분 반응시켜 RNA를 제거하고, 65°C에서 1시간 동안 보관하여 RNase를 불활성화시켰다. 추출된 gDNA는 -20°C의 냉동고에서 보관하며 실험에 사용하였다.

(5) *V. nashicola*의 β-tubulin 유전자 증폭과 염기서열 분석

Btub14F(5'-AAC CAA ATT GGT GCT GCC TTC TG-3')과 BtubR(5'-TGG AGG ACA TCT TAA GAC CAC G-3')를 사용하여 β-tubulin 유전자를 증폭하였다. PCR mixture에는 dNTP 2.5 μL(각 2 mM), 10X Taq buffer 2.5 μL, primer 각각 1 μL(각각 10 pmol), DNA 2 μL(25 ng/μL), Taq polymerase 0.1 μL(5 U/μL) 멸균증류수 15.9 μL가 되도록 하였다. PCR 반응은 1분간 94°C에서 denaturation, 30초간 58°C에서 annealing, 1분간 72°C에서 extantion을 35회 반복하였다. 반응을 완료한 산물은 1.5% TAE agarose gel에서 100 V로 40분간 전기영동한 후 UV illuminator에서 band를 확인하였다. PCR로 얻어진 β-tubulin 유전자의 증폭산물은 Expi TM PCR kit(GeneAll)를 이용하여 정제하였다. 정제된 PCR 산물을 Macrogen사에 염기서열 분석을 의뢰하였다.

(6) β-tubulin 유전자의 염기서열 변화를 이용한 PCR-RFLP

증폭한 β-tubulin 유전자 산물에 제한효소 *Bst*UI과 *Alw*26I를 각각 처리하여 RFLP를 수행하였다(Table 2). 제한효소 *Bst*UI는 증폭한 β-tubulin 유전자 산물 8 μL와 제한효소 buffer 1 μL에 1 μL를 첨가하고 65°C에서 30분간 반응시켰다. 또 다른 제한효소 *Alw*26I은 *Bst*UI과 동일하게 1 μL를 처리하였으나, 반응 조건은 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응이 완료된 산물은 4% TAE agarose gel에서 50 V로 2시간동안 전기영동한 후 UV illuminator에서 전기영동하여 나타난 band의 양상을 확인하였다.

Table 2. Restriction enzymes used for β-tubulin PCR-RFLP

Restriction enzyme	Cutting site
<i>A/W26</i>	5'GTCTC(N) ₁ ↓ 3' 3'CAGAG(N) ₅ ↑ 5'
<i>BstU</i>	5'CG ↓ CG3' 3'GC ↑ GC5'

(7) β -tubulin 유전자의 염기서열 변화를 이용한 allele-Specific PCR(AS-PCR)

Benzimidazole계 살균제에 대한 반응이 서로 다른 검은별무늬병균의 β -tubulin 유전자의 염기서열을 비교하여 살균제에 대한 저항성과 관련이 있는 198번째 아미노산의 codon을 검출할 수 있는 세 종류의 allele-specific primer를 제작하였다. 세 종류의 primer 모두 Vnbt16(5' - AGT TGG AGC GCA TGA ATG - 3')을 forward primer로 사용하였으며, reverse primer로 CSR(5' - TGT CAA TGC AGA AGG TCT - 3'), CRRA(5' - TGT CAA TGC AGA AGG TCG - 3'), CRRG(5' - TGT CAA TGC AGA AGG TCC - 3')을 사용하였다. 각각의 primer들은 β -tubulin 유전자의 198번째 codon인 GAG, GCG, GGG를 검출할 수 있으며, 516 bp의 PCR 산물이 증폭될 수 있도록 제작하였다. PCR 반응액은 2 mM의 dNTP 2.5 μ L, 10X taq buffer 2.5 μ L, 10 pmol의 primer 각각 1 μ L, DNA 2 μ L(25 ng/ μ L), Taq polymerase 0.1 μ L(5 U/ μ L), 멸균증류수 15.9 μ L를 첨가하여 25 μ L가 되도록 하였다. PCR 반응은 4분간 94°C에서 pre-denaturation 한 후, 1분간 94°C에서 denaturation, 30초간 58°C에서 annealing, 1분간 72°C에서 extantion을 35회 반복하였다. 반응을 완료한 산물은 1.5% TAE agarose gel에서 135 V로 35분간 전기영동한 후 UV illuminator에서 band를 확인하였다.

(8) β -tubulin 유전자의 E198A 돌연변이를 이용한 Quantitative sequencing(QS)

① 병원균의 β -tubulin 유전자 증폭

PCR을 이용하여 병원균의 β -tubulin 유전자를 증폭하였다. Primer는 Btub14F(5' - AAC CAA ATT GGT GCT GCC TTC TG - 3')와 BtubR(5' - TGG AGG ACA TCT TAA GAC CAC G - 3')을 사용하였다(Kacie 등, 2010). 증폭된 PCR 산물은 sequencing하여 198번째 codon에 나타나는 peak의 높이를 확인하였다.

② Quantitative Seqeuncing의 민감도 확인

Carbendazim에 감수성인 KCTC6484 균주의 DNA와 carbendazim에 저항성인 MAFF615029 균주의 DNA를 각각 3:0, 2:1, 1:2, 0:3 이 되도록 조정하여 PCR을 수행하였다. PCR mixture의 조성은 dNTP 2.5 μ L, 10X taq buffer 2.5 μ L, primer 각 1 μ L, Taq polymerase 0.1 μ L, DNA 2 μ L(25 ng/ μ L), 멸균증류수 15.9 μ L로 하였고, 94°C에서 1분간 denaturation, 58°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분간 extraction을 35회 반복하였다. 또한 대립유전자간의 최소 검출한계를 확인하기 위하여 KCTC6484 균주의 DNA와 MAFF615029 균주의 DNA를 각각 40ng/ μ L로 정량한 후, 100, 10-1, 10-2으로 희석하였다. 감수성 균주의 DNA 100에 저항성 균주의 DNA를 100, 10-1, 10-2씩 동량으로 혼합하여 PCR하였다. 마찬가지로 저항성 균주의 DNA 100에 감수

성 균주의 DNA를 100, 10-1, 10-2씩 동량으로 혼합하여 PCR하였다. PCR mixture의 조성은 dNTP 2.5 μ L, 10X taq buffer 2.5 μ L, primer 각 1 μ L, Taq polymerase 0.1 μ L, DNA 2 μ L, 멸균증류수 15.9 μ L로 하였고, 94°C에서 1분간 denaturation, 58°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분간 extraction을 35회 반복하였다. 반응이 완료된 산물은 macrogen사에 의뢰하여 sequencing하였고 BioEdit version 7.2.3 을 활용하여 peak의 높이를 비교하였다. peak의 높이를 비교할 때 해당 염기서열에 나타나는 서로 다른 allele의 비율을 사용하였다.

(9) 검은별무늬병균에 감염된 조직을 사용한 살균제 저항성 모니터링

배 검은별무늬병이 발생한 포장에서 병든 식물체를 채집하였다. 병든 식물은 배 과원을 고르게 분할하고 각 지점에서 한 개씩의 병든 유과, 유병, 잎, 엽병 등을 채집하였으며, 각 과원에서는 최소한 10곳 이상의 지점에서 병든 식물을 채집하였다.

① 감염된 배 조직에서 DNA 추출

채집한 식물체에서 병징 부분만 메스로 도려내어 막자사발에 담고 액체질소를 부어 동결시킨 후 조직을 고르게 갈았다. 고르게 갈은 조직을 microtube에 옮겨 담고 lysis buffer(400 mM Tris-HCl(pH8.0), 60 mM EDTA(pH8.0), 150 mM NaCl, 1 % SDS)를 1 mL 첨가하여 가볍게 흔들어 섞은 후 상온에서 10분간 반응시켰다. 반응시킨 시료에 potassium acetate(pH4.8)를 300 μ L첨가하고 13,000 rpm으로 1분간 원심분리 하였다. 상정액만을 취하여 다시 동일한 조건에서 원심분리하고 얻은 상정액에 동량의 isopropanol을 첨가하여 혼합한 후, 다시 2분간 원심분리하였다. 상정액을 버리고 남은 침전물에 70% 무수에탄올을 첨가하여 13,000 rpm으로 2분간 원심분리한 후, 침전물을 건조시켰다. 건조한 DNA는 TE buffer에 용해시킨 후 -20°C에서 냉동보관하며 실험에 사용하였다.

② 병징으로부터 β -tubulin 유전자 증폭

배 과원에서 채집한 배의 병든 조직으로부터 추출한 gDNA를 이용하여 병원균인 *V. nashicola*의 β -tubulin 유전자를 증폭하였다. PCR mixture는 dNTP 2.5 μ L, 10X Taq buffer 2.5 μ L, primer 각 1 μ L, Taq polymerase 0.1 μ L, DNA 5 μ L, 멸균증류수 12.9 μ L로 조정하였고, 94°C에서 1분간 denaturation, 58°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분간 extantion을 35회 반복하여 반응을 완료하였다. 사용한 primer는 Btub14F(5' - AAC CAA ATT GGT GCT GCC TTC TG - 3')와 BtubR(5' - TGG AGG ACA TCT TAA GAC CAC G - 3')을 사용하였다 (Kacie 등, 2010). PCR을 통해 얻어진 산물은 1.5% agarose gel에 135 V로 35분간 전기영동하였고, UV illuminator를 사용하여 PCR 증폭 산물의 밴드를 확인하였다.

③ 포장 집단에 대한 모니터링

2015년 배 과원에서 채집한 배의 병든 조직으로부터 추출한 gDNA를 이용하여 병원균의 살균제 저항성 발현을 모니터링하였다. Primer Btub14F와 BtubR을 사용하여 β -tubulin 유전자를 증폭하였다. PCR mixture에 dNTP 2.5 μ L, 10X Taq buffer 2.5 μ L, primer 각 1 μ L, Taq polymerase 0.1 μ L, DNA 5 μ L, 멸균증류수 12.9 μ L를 넣고, 94°C에서 1분간 denaturation, 58°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분간 extantion을 35회 반복하여 PCR 반응을 완료하였다. PCR 증폭산물은 ExpiinTM PCR kit(GeneAll)로 정제하여 Macrogen사에 염기서열 분석을 의뢰하였다. 병원균의 β -tubulin 유전자의 198번째 codon 부분에 나타나는 염기서열 peak의 높

이를 비교하여 병원균의 포장 집단내에 감수성균과 저항성균의 비율을 계산하였다. 또한, 포장 집단에 존재하는 병원균의 β -tubulin 유전자에서 benzimidazole계 살균제에 대한 저항성 발현과 관계가 깊은 198번째 아미노산 codon의 유전자형을 검정하기 위해서 병원균에서 분리한 gDNA를 가지고 allele-specific PCR을 수행할 때와 동일하게, forward primer로 Vnbt516을 사용하였고 reverse primer로 CSR, CRRA, CRRG를 각각 사용하였다. PCR mixture는 dNTP 2.5 μ L, 10X taq buffer 2.5 μ L, primer 각 1 μ L, taq polymerase 0.1 μ L, PCR product 1 μ L, 멸균 증류수 16.9 μ L를 넣고, 94°C에서 1분간 denaturation, 58°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분간 extantion을 35회 반복하여 반응을 완료하였다. 반응을 완료한 PCR 산물을 1.5% TAE agarose gel에서 135 V로 35분간 전기영동하고 UV illuminator를 사용하여 PCR 산물을 확인하였다.

2015년 전국 15개 지역의 총 35개 포장에서 병든 배의 유파, 과병, 잎, 엽병 등을 채집하여 분자마커를 이용한 대량 모니터링을 실시하였다.

2. 연구결과

(1) 살균제 저항성 분자마커를 이용한 모니터링 방법 확립

① 한천희석법을 통한 benzimidazole계 살균제의 효과 검정

순천대학교에서 분양받은 *V. nashicola* 5균주를 사용하여 carbendazim과 carbendazim/diethofencarb합제에 대하여 한천희석법으로 약제모니터링을 실시하였다(Fig. 1, Fig. 2). 그 결과, *V. nashicola* KCTC6484와 MAFF615002는 carbendazim과 합제에 대하여 모두 감수성, *V. nashicola* MAFF615003과 MAFF615023은 carbendazim에는 저항성이거나, 합제에 대하여 감수성, 그리고 *V. nashicola* MAFF615029는 carbendazim과 합제에 대하여 모두 저항성 반응을 보였다. Carbendazim과 합제에 대하여 모두 감수성인 KCTC6484와 MAFF615002의 EC50값은 각각 0.008과 0.812 μ g/mL이었다. 두 균주 모두 4 μ g/mL의 carbendazim을 처리한 배지에서 균사의 생장이 완전히 억제되었다. MAFF615003과 MAFF615029 균주는 carbendazim에 대해서는 50 μ g/mL의 EC50값을 보였으나, 합제에 대해서는 각각 0.327과 0.150 μ g/mL의 낮은 EC50값을 보였다. 하지만 carbendazim과 합제 모두에 대해서 저항성을 보였던 MAFF615029는 두 가지 살균제 모두에 대해서 EC50값이 100 μ g/mL 이상으로, 4 μ g/mL 처리 구에서 무처리구의 균사생장에 비해서 전혀 균사생장이 억제되지 않았다. Carbendazim과 같이 benzimidazole계 살균제에 속하는 benomyl에 대한 반응 역시 *V. nashicola* KCTC6484와 MAFF615002는 감수성, *V. nashicola* MAFF615003과 MAFF615023, MAFF615029는 저항성을 나타내어, 두 살균제는 교차 저항성 관계가 있음을 알 수 있었다(Fig. 1, Fig. 2).

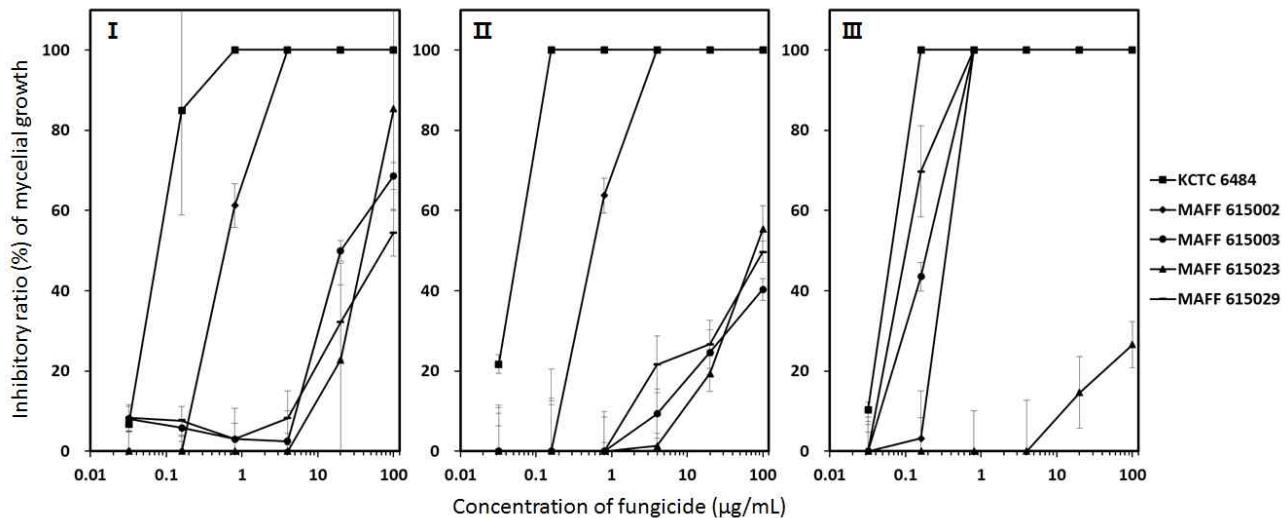


Fig. 1. Inhibitory effect on the mycelial growth of *Venturia nashicola* of 3 fungicides, as benomyl (I), carbendazim (II) and the mixture of carbendazim and diethofencarb (III). Each fungicide was amended on PDA in accordance with indicated concentrations. After incubating at 20°C for one month, it was measured the diameter of colony.

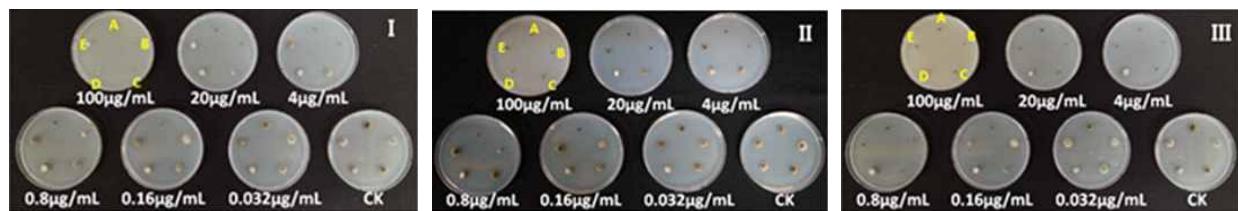


Fig. 2. Agar dilution method for investigating the inhibitory ratio of 3 fungicides, as benomyl (I), carbendazim (II) and the mixture of carbendazim and diethofencarb (III), on the mycelial growth of *Venturia nashicola*. (A) KCTC6484, (B) MAFF615002, (C) MAFF615003, (D) MAFF615029 and (E) MAFF615023.

② β -tubulin 염기서열 분석

Primer Btub14F와 BtubR을 가지고 PCR을 수행한 결과, 1,264 bp의 증폭산물을 얻었다(Fig. 3). PCR 산물을 정제하여 macrogen 사에 염기서열 분석을 의뢰하였고, 그 결과를 가지고 benzimidazole계 살균제에 대해 저항성 발현과 연관성이 높은 아미노산이 치환된 부분을 탐색하였다. 그 결과 198번째 codon의 변이가 benzimidazole계 살균제에 대하여 저항성을 가지고 록 하는 것을 확인하였다. Carbendazim과 합제(carbendazim과 diethofencarb) 모두에 감수성인 균주(*V. nashicola* KCTC6484와MAFF615002)는 β -tubulin 유전자의 198번째 아미노산과 codon이 glutamate와 GAG였는데, carbendazim에만 저항성인 균주(*V. nashicola* MAFF615003과 MAFF615023)는 아미노산의 codon이 GCG로 바뀌어 alanine으로 치환되어 있었다. 두 가지 살균제 모두에 저항성을 보였던 *V. nashicola* MAFF615029는 해당 부위의 codon이 AAG로 바뀌어서 lysine으로 치환되어 있었다(Fig. 4).

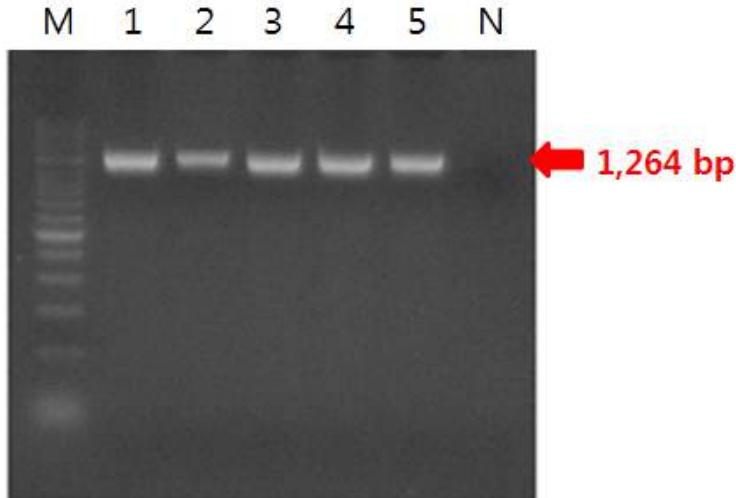


Fig. 3. Amplified β -tubulin gene in 5 isolates of *Venturia nashicola* by using primer Btub14F/BtubR. M: marker, Lane 1: KCTC6484, 2: MAFF615002, 3: MAFF615003, 4: MAFF615029, 5: MAFF615023, N: negative control.

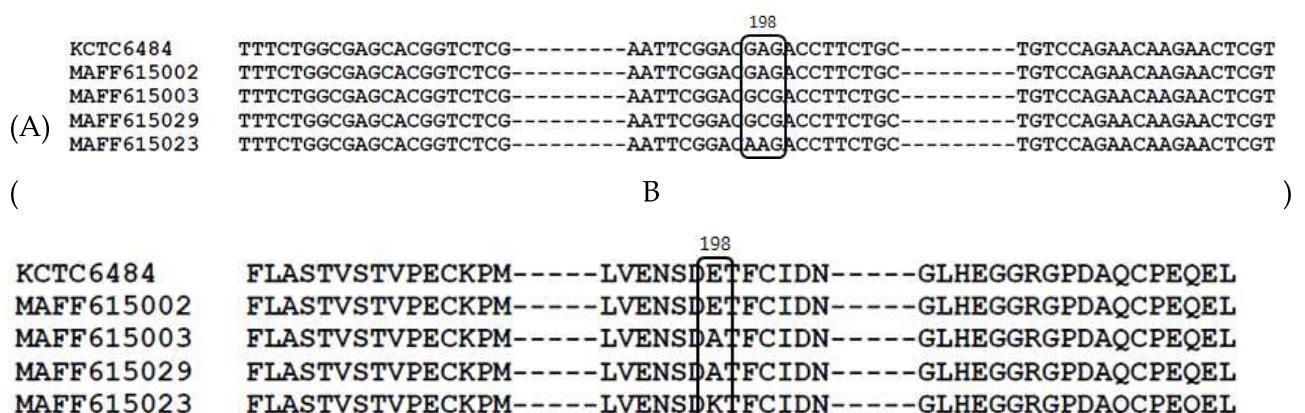


Fig. 4. Comparison of deduced amino acid sequences of β -tubulin of 5 isolates of *Venturia nashicola*. Isolates are identified as either sensitive (*V. nashicola* KCTC6484 and MAFF615002) or resistant (*V. nashicola* MAFF615003, MAFF615029 and MAFF615023) to carbendazim on the basis of in vitro tests. Boxing residues show the codon (A) of 198th amino acid and abbreviation (B) of the 198th amino acid. The abbreviation of amino acid has indicated that E, A and K is glutamate, alanine and lysine, respectively.

③ β -tubulin 유전자를 이용한 PCR-RFLP

PCR을 통해 β -tubulin 유전자를 증폭하였고, 해당 산물을 이용하여 PCR-RFLP를 실시하였다. RFLP에 사용한 제한효소로는 Alw26I과 BstUI를 사용하였다. 두 종류의 제한효소를 사용하여 β -tubulin 유전자를 절단하여 나타나는 DNA 가닥의 수와 크기를 가지고서, 실험에 사용한 5개 군주를 carbendazim과 합제에 대한 반응으로 나눌 수 있었다(Fig. 5). 감수성 반응을 보이는 *V. nashicola*의 β -tubulin 유전자의 증폭 산물에 Alw26I를 제한효소로 처리하였을 때, 1,264 bp의 β -tubulin 유전자는 이론적으로 57, 101, 104, 130, 331, 540 bp의 6개 DNA 단편으로 나누어져야 한다. 하지만 57 bp의 DNA 단편은 너무 작아서 Fig. 3에서 나타나지 않았고, 101과

104 bp의 단편이 구별되지 않았기 때문에 4개의 단편만이 확인되었다. 반면 carbendazim에 대해서 저항성을 보이던 MAFF615003과 MAFF615029, 그리고 합제에 대해서까지 저항성을 보였던 MAFF615023은 이론적으로 101, 130, 162, 331, 540 bp의 5개 단편이 확인되어야하는데, Fig. 5에서도 5개의 단편이 모두 확인되었다. 제한 효소로 BstUI을 사용하였을 때는 carbendazim 감수성 균주와 Carbendazim과 합제에 대해서 저항성을 보이는 균주의 절단된 단편의 크기와 수가 102, 237, 241, 684 bp로 같아야 하는데, Fig. 5에서는 237 bp와 241 bp의 단편이 크기 면에서 비슷하여 구별되지 않은 관계로 3개의 단편을 확인할 수 있었다. 하지만 carbendazim 저항성 균주는 102, 115, 237, 241, 559 bp의 5개 단편이 나타나야하지만, 감수성 균주에서처럼 237과 241 bp의 단편이 구별되지 않은 관계로 4개의 단편을 확인할 수 있었다. 결국 제한효소 Alw26I과 BstUI을 사용하여 *V. nashicola*에서 증폭한 β -tubulin의 유전자 산물을 절단하여 나타나는 DNA 단편의 수와 크기를 가지고서, 포장에서 분리한 *V. nashicola* 균주의 carbendazim과 합제에 대한 반응을 장시간이 소요되는 한천희석법을 통하지 않더라도 단시간 내에 정확하게 구별할 수 있었다.

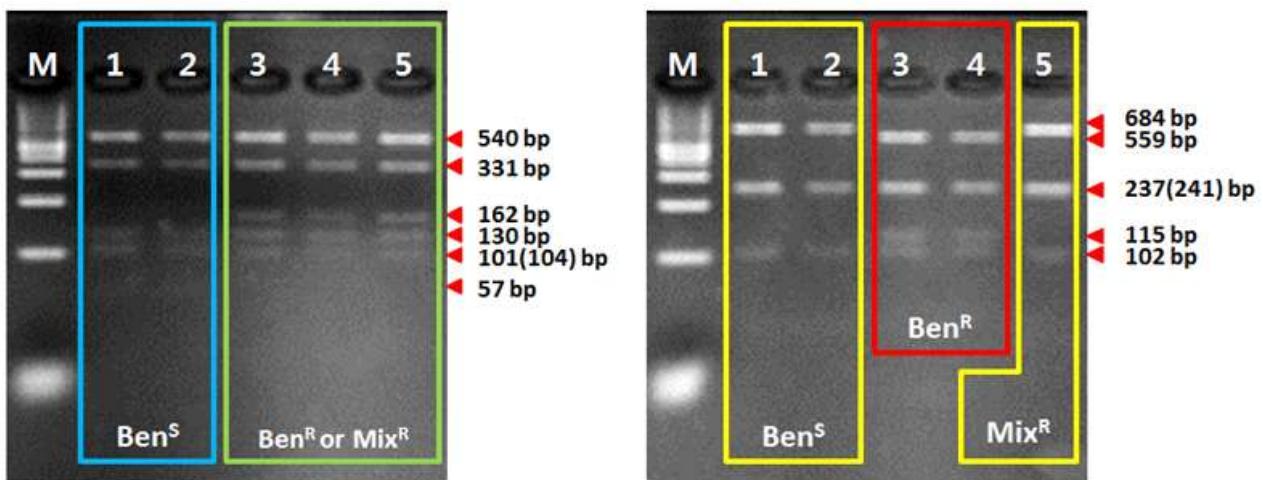


Fig. 5. Digestion profiles of amplified β -tubulin gene fragment of benzimidazole-sensitive and resistant isolates. Left: digested with Alw26I; Right: BstUI. M indicates the marker lane. Lane 1; KCTC6484, 2; MAFF615002, 3; MAFF615003, 4; MAFF615029, 5; MAFF615023. BenS; carbendazim and carben/diethofen-sensitive, BenR; carbendazim-resistant and carben/diethofen-sensitive, MixR; carbendazim and carben/diethofen-resistant.

④ β -tubulin 유전자를 이용한 allele-specific PCR (AS-PCR)

포장에서 분리한 균주들의 β -tubulin 유전자를 분석한 결과, 198번째 아미노산의 codon이 감수성 균주에서는 GAG, carbendazim에 대해서 저항성이지만 합제에 대해서는 감수성인 균주는 GCG로 나타났다. 특이한 것은 carbendazim에 대해서는 저항성이지만 합제에 대한 반응이 감수성 균주보다 더 감수성인 균주가 발견되었고, 이런 균주들의 198번째 codon의 염기서열은 GGG로 나타났다(Fig. 6). 하지만 *V. nashicola* MAFF615023과 같이 carbendazim과 합제 모두에 대해서 저항성을 보이는 균주는 포장에서 분리할 수 없었다. 따라서 *V. nashicola*의 β -tubulin 유전자 중에서 돌연변이가 발생하며 이로 인하여 carbendazim과 합제에 대한 살균제 반응이 달라지는 198번째 codon의 돌연변이를 검정할 수 있는 allele-specific PCR 방법을 확립

하였다. 본 실험에서 1,263 bp의 크기로 증폭된 *V. nashicola*의 β -tubulin 유전자에서 forward primer를 Vnbt516(5'-AGT TGG AGC GCA TGA ATG - 3')로, 그리고 감수성인 균주와 E198A 와 E198G의 돌연변이 균주를 검정할 수 있는 reverse primer로 CSR(5'-TGT CAA TGC AGA AGG TCT-3'), CRRA(5'-TGT CAA TGC AGA AGG TCC-3'), CRRG(5'-TGT CAA TGC AGA AGG TCG-3')로 제작하여 유전자를 증폭한 결과, 모든 primer에서 516 bp의 증폭 산물을 얻었다(Fig. 7.). 또한 각각의 primer는 *V. nashicola*의 β -tubulin 상에서의 돌연변이를 인식하여, Vnbt516/CSR는 감수성 균주에서만, Vnbt516/CRRA는 E198A 돌연변이가 발생한 carbendazim 저항성 균주에서, 그리고 Vnbt516/CRRG는 E198G 돌연변이가 발생한 carbendazim에 대해서 저항성이지만 합제에 대해서는 감수성 균주보다 더 감수성인 균주에서만 PCR 산물이 증폭되었다.

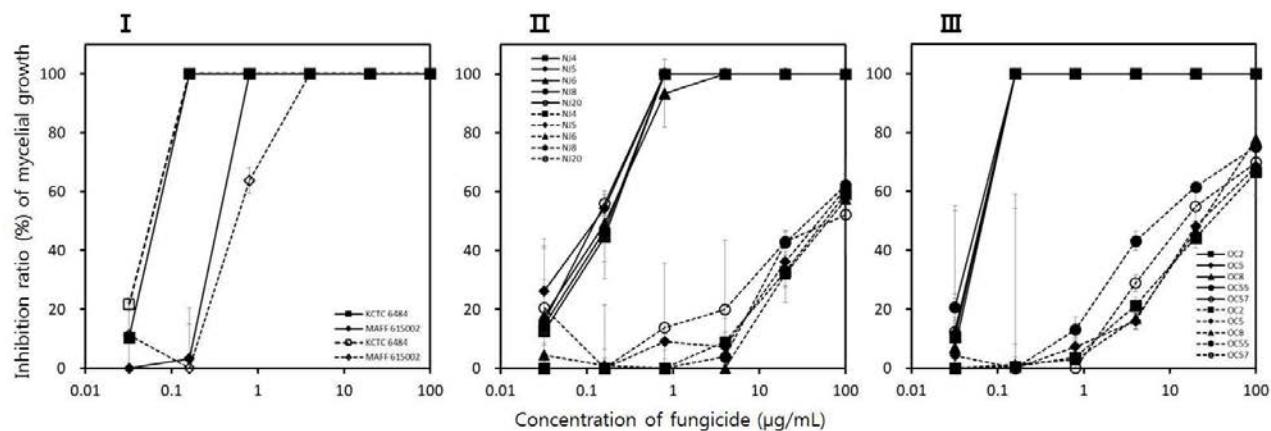


Fig. 6. Resistant response to benzimidazole fungicides according by the 198th codon type of β -tubulin. I, GAG(E, glutamate); II, GCG(A, alanine); III, GGG(G, glycine). A dotted line, response to carbendazim; a solid line, response to carbendazim/diethofencarb

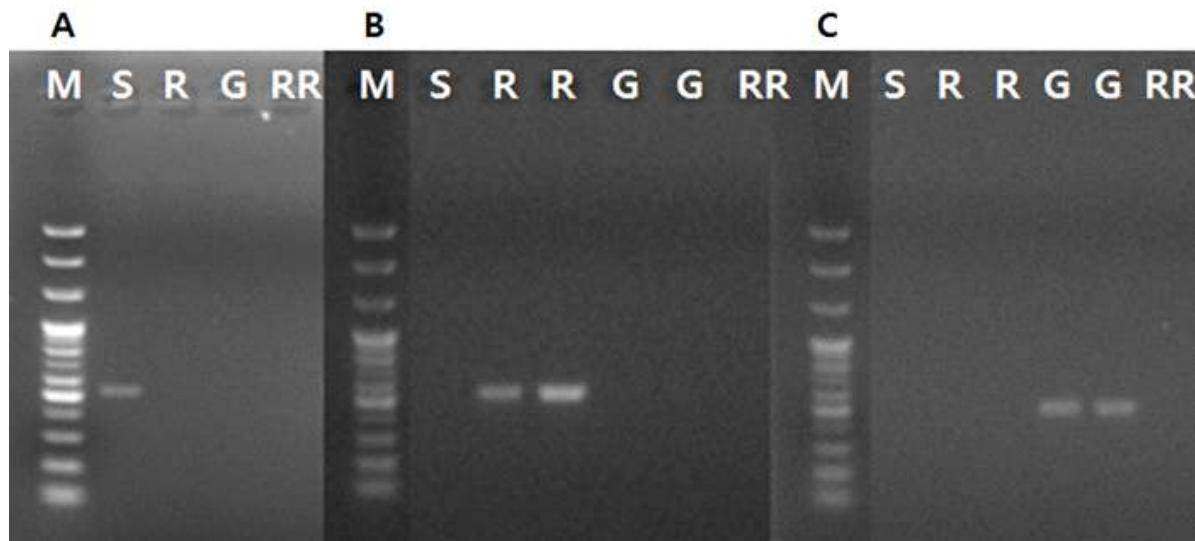


Fig. 7. Allele-specific PCR detection of carbendazim resistant isolates harboring a point mutation E198A or E198G in the β -tubulin gene. (A) Vnbt516/CSR, (B) Vnbt516/CRRA, (C) Vnbt516/CRRG

⑤ β -tubulin 유전자의 E198A 돌연변이를 이용한 QS

V. nashicola 균주 중 β -tubulin의 198번째 codon이 GAG인 DNA와 GCG인 DNA를 비율별로 섞어 PCR 하였고, 이를 sequencing하여 해당 codon에서 나타나는 염기서열 peak의 양상을 분석하였다. 서로 다른 allele이 섞여있는 병원균의 β -tubulin 198번째 codon의 가운데 염기가 1개의 peak가 아닌 2개의 peak가 나타나는 것을 확인하였다. 3:0, 2:1, 1:2, 0:3 의 비율로 섞어 얻어진 각 표현형별 높이를 분석하여 아래의 식을 활용하여 회귀직선을 그었고, 그 직선의 r^2 값이 0.9743인 것을 확인하였다(Fig. 8). QS 수행시 검출 가능한 최소 한계를 확인하기 위해 benzimidazole 살균제에 감수성인 균의 DNA와 저항성인 균의 DNA를 각각에 대한 검출한계를 확인하였다. 살균제에 감수성인 균의 DNA와 저항성인 균의 DNA를 같은 농도로 정량하여 실험에 사용하였다. 살균제에 감수성인 균의 DNA의 농도를 1이라고 하였을 때, 살균제에 저항성인 균의 DNA를 10-1과 10-2으로 희석하여 혼합한 후 QS를 실시하였다. 살균제에 저항성인 균 또한 동일한 방법으로 QS를 실시하였다. 그 결과 비율이 10% 미만인 경우 QS를 통해 검출이 불가능한 것을 확인하였다(Fig. 9).

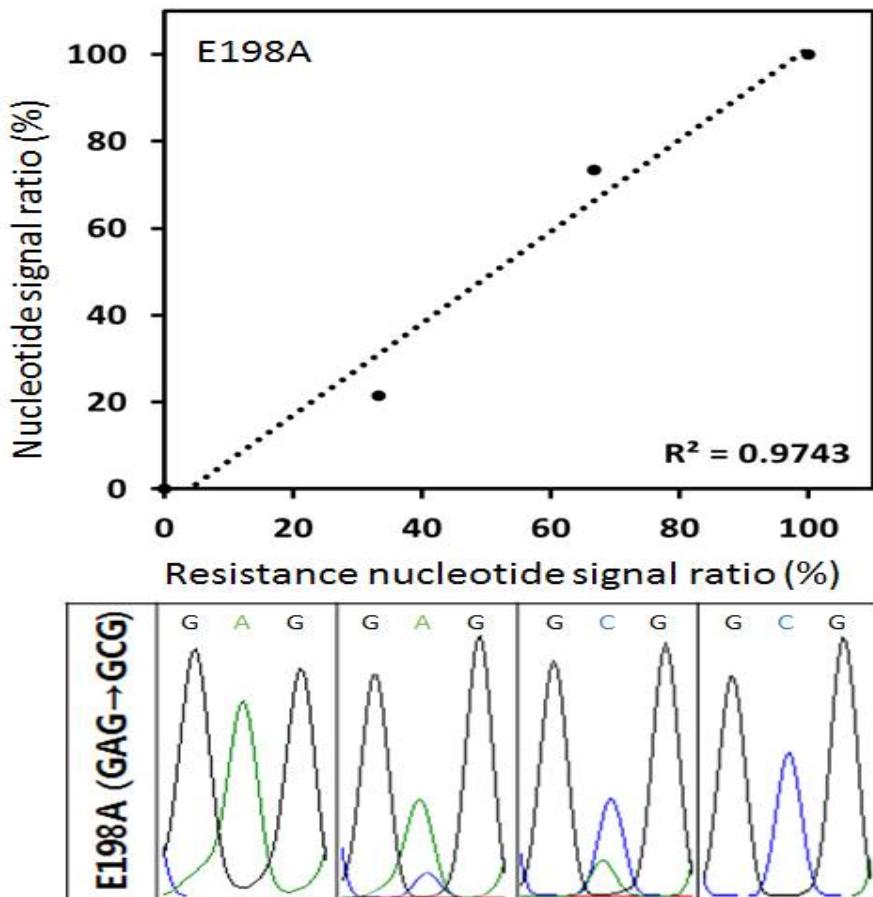


Fig. 8. Identification of detection sensitivity for the substituted DNA base used for quantitative sequencing(QS). Two kinds of DNA base phenotype(GAG : GCG) were mixed in each ratio as 3:0, 2:1, 1:2, 0:3.

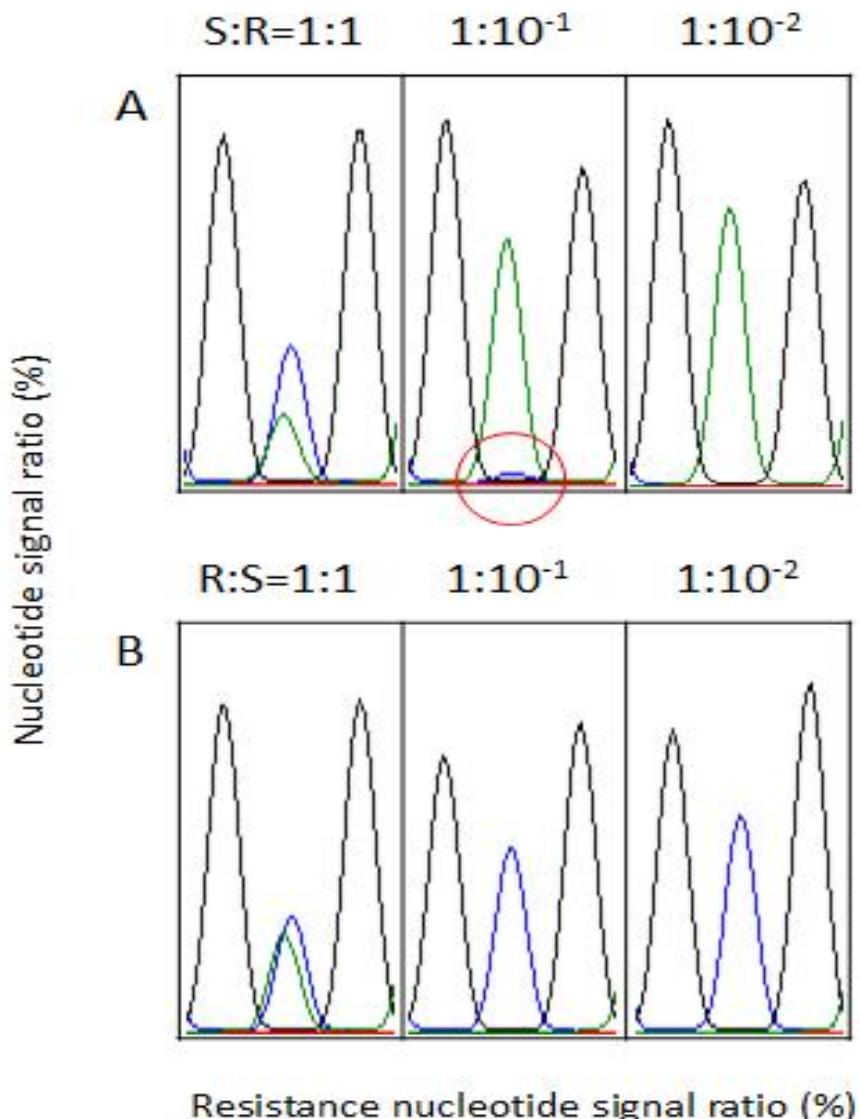


Fig. 9. Detection limit of nucleotide signal of benzimidazole-sensitive isolate(S) to resistant isolate(R) in QS.

(2) 병원균 포장 집단에 대한 대량 모니터링

① *V. nashicola* 분생포자의 포자 발아 조사

포장에서 채집해온 병반 위에 형성된 분생포자를 수확하고 멸균증류수를 이용하여 포자현탁액을 준비하였다. 이 포자현탁액을 살균제를 첨가한 물한천배지에 고루게 접종하고 포자 발아율을 조사하였다. 포자의 발아 여부는 포자 발아관의 길이가 포자의 장경보다 길게 신장할 경우를 발아한 것으로 정하였다. 각 포장 단위로 carbendazim과 합제의 포자발아 억제율을 확인하였을 때, 0.4 µg/mL의 합제를 첨가한 배지 상에서 포장에 따라 100% 포자발아가 억제되기도 하지만, 대부분 70% 이상의 억제율을 보였다. 합제를 0.4 µg/mL의 농도로 배지에 첨가하였을 때에는 각 포장의 병원균 집단의 포자발아는 72 - 100% 억제되었다. 하지만 10 µg/mL 처리구에서는 HD3 포장을 제외한 모든 포장의 분생포자가 전혀 발아하지 못하였다. Carbendazim의 경우 carbendazim과 diethofencarb 합제에 대한 반응과는 다르게 포자발아억

제율의 양상이 서로 다른 3개의 집단으로 나뉘어졌다. 첫 번째 집단(HD1, HD2, HD3, NJ, YJ, US, CJ, ES, SAJ2)은 가장 높은 농도인 50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 포자발아가 억제되지 않았으며, 두 번째 집단(WJ)은 가장 낮은 농도인 0.016 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 포자가 대부분 발아하지 않았고, 세 번째 집단(MU, OC, SAJ1)은 첫 번째 집단과 두 번째 집단의 중간에 위치의 모든 농도에서 40 - 80% 정도의 포자발아 억제율을 보여주었다.

포장에서 채집한 병든 식물의 병반 상에 형성된 포자를 단포자 분리하여 순수배양체를 확보한 후 한천희석법으로 살균제의 균사생장 억제율을 조사하였다. 옥천(OC), 원주(WJ), 나주(NJ) 포장에서 각각 58군주, 36군주, 20군주를 선발하여 한천희석법으로 살균제 저항성을 검정한 결과, 실험에 사용된 모든 포장군주들은 carbendazim에 대하여 저항성반응을 나타내었지만, carbendazim과 diethofencarb합제에 대해서는 분리한 포장군주들이 모두 감수성반응을 나타내었다(Fig. 10). 옥천 포장에서 분리한 군주들의 합제에 대한 EC₅₀ 값의 범위는 최소 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 최대 0.39 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었으며, 평균 EC₅₀ 값은 0.16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었다(Table 3, Fig. 12). 원주와 나주 포장에서 분리한 군주들의 합제에 대한 평균 EC₅₀ 값은 각각 0.21 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (0.09 ~ 0.43 $\mu\text{g}/\text{mL}$)와 0.26 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (0.06 ~ 0.52 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로, 대부분의 군주의 균사생장이 억제되었다(Table 3, Fig. 12). 세 곳 포장의 병원균 집단의 저항성 요인(resistance factor, Rf) 값은 옥천 포장이 39.97로 4.99의 원주와 8.28의 원주에 비하여 높게 나와 포장 집단 내에서 살균제에 대한 병원균의 다양성 정도가 높음을 알 수 있었다(Fig. 11).

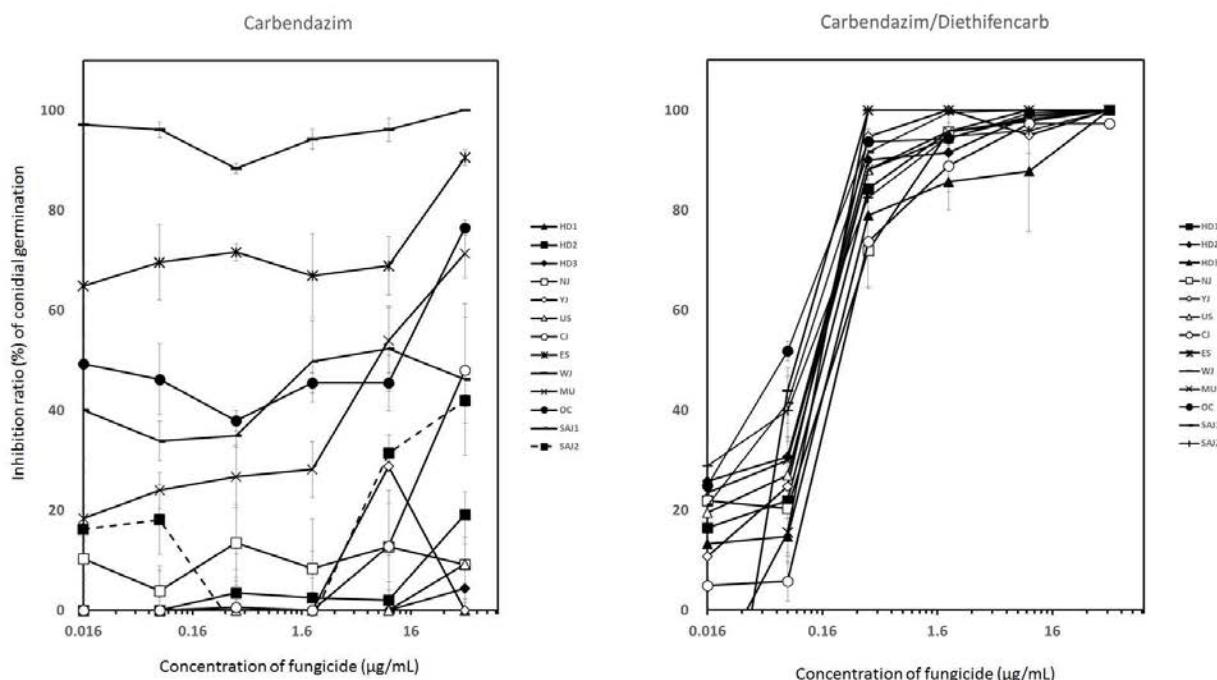


Fig. 10. Inhibition of conidial germination of *Venturia nashicola* on water agar amended with carbendazim (Left) and the mixture of carbendazim and diethofencarb (Right) by the indicated concentration. A conidial suspension was prepared by harvesting conidia from pear scab lesions, which were developed on each leaf or young fruit directly collected from orchards.

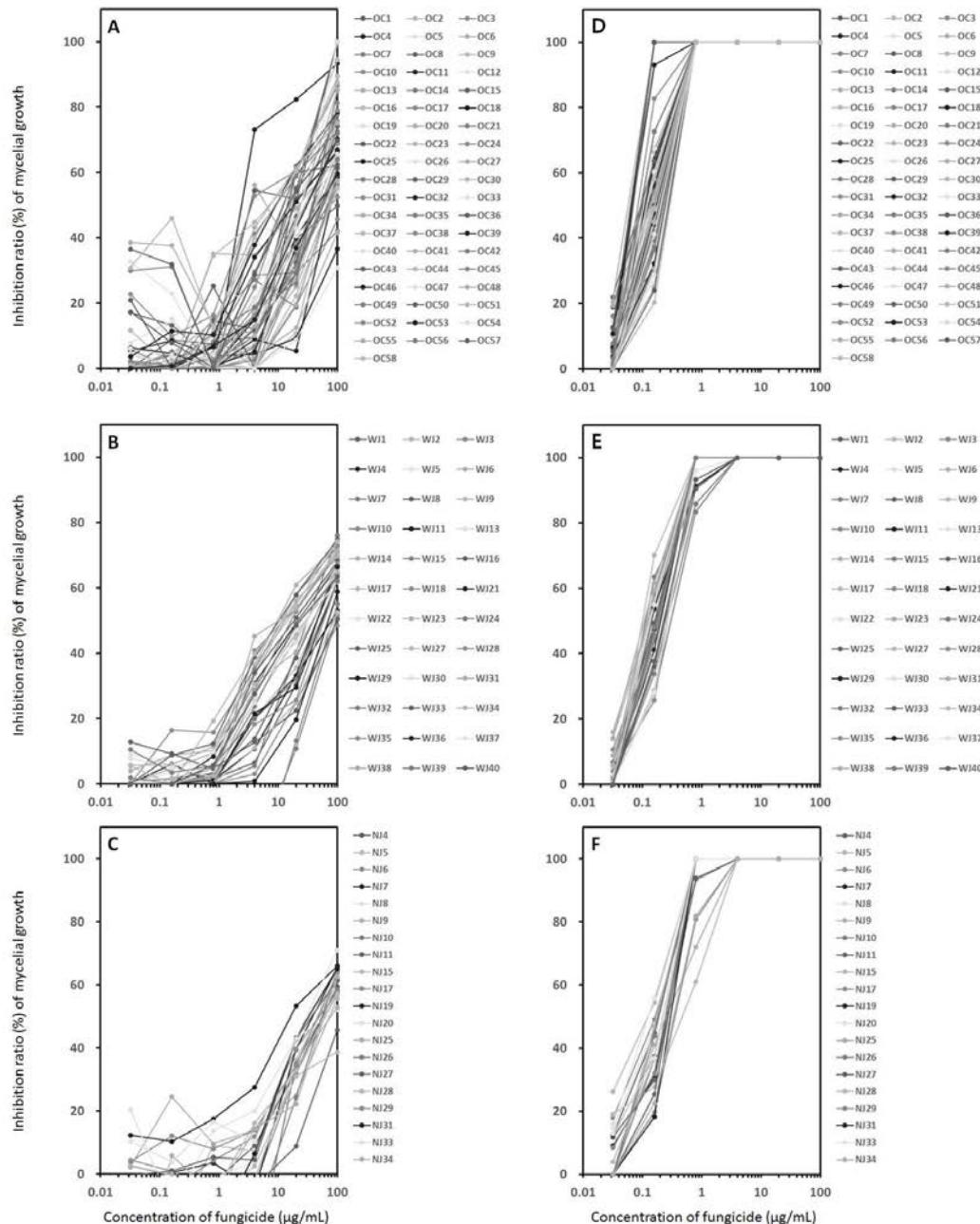


Fig. 11. The response of field isolates from three different pear orchards to carbendazim and carbendazim/ diethofencarb. (A, D: Okcheon; A, E: Wonju; C, F: Naju)

Table 3. EC₅₀ value of each orchards for mixture of carbendazim and diethofencarb

Orchard ^a	EC ₅₀ value ($\mu\text{g/mL}$)		
	minimum	average	maximum
OC	0.01	0.16	0.39
WJ	0.09	0.21	0.43
NJ	0.06	0.26	0.52

a; OC is Okcheon, WJ; Wonju and NJ; Naju.

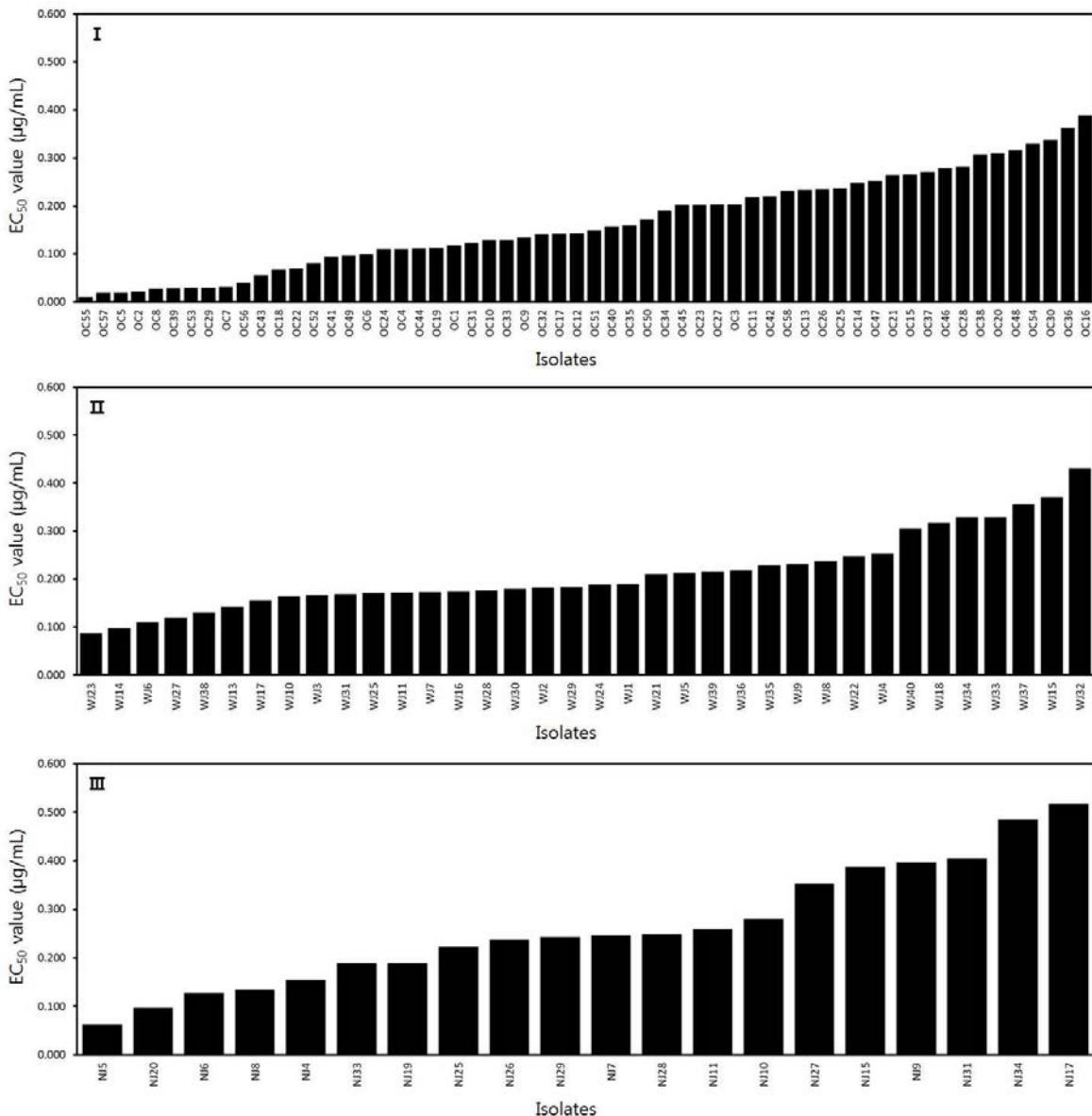


Fig. 12. Distribution of EC₅₀ value of *Venturia nashicola* isolated from pear orchards in Okcheon (I), Wonju (II) and Naju (III) against the mixture of carbendazim and diethofencarb.

② 분자마커를 이용한 대량 모니터링

가. 병든 조직에서 β -tubulin 유전자 증폭

배의 줄기와 유과의 병든 부분에서 추출한 gDNA를 이용하여 ITS 영역과 병원균의 β -tubulin 유전자를 증폭하였다. 줄기에서 추출한 DNA와 유과에서 추출한 DNA 모두 PCR을 통해 증폭이 된 것을 확인할 수 있었는데, 균체에서 추출한 DNA에서 증폭할 때와 마찬가지로 ITS 영역의 경우 약 550 bp의 PCR 산물이 증폭되었으며, β -tubulin의 경우 1263 bp의 산물이 증폭되었다. 그러나 배의 병든 조직에서 추출한 DNA원액에서는 증폭산물의 확인이 불가능하였으며, ITS 영역의 경우 10-1(유과)와 10-2(줄기)로 희석된 DNA에서 산물이 확인되기 시작하였으며 10-3(유과)까지 산물이 확인되었다. β -tubulin 유전자의 경우도 ITS영역과 마찬가지로

병든 식물체에서 추출한 DNA 원액에서는 PCR 산물의 확인이 불가능하였으며, 10-2, 10-3(유과)와 10-3(줄기)로 희석된 DNA에서 산물이 확인되었다(Fig. 13, Fig. 14).

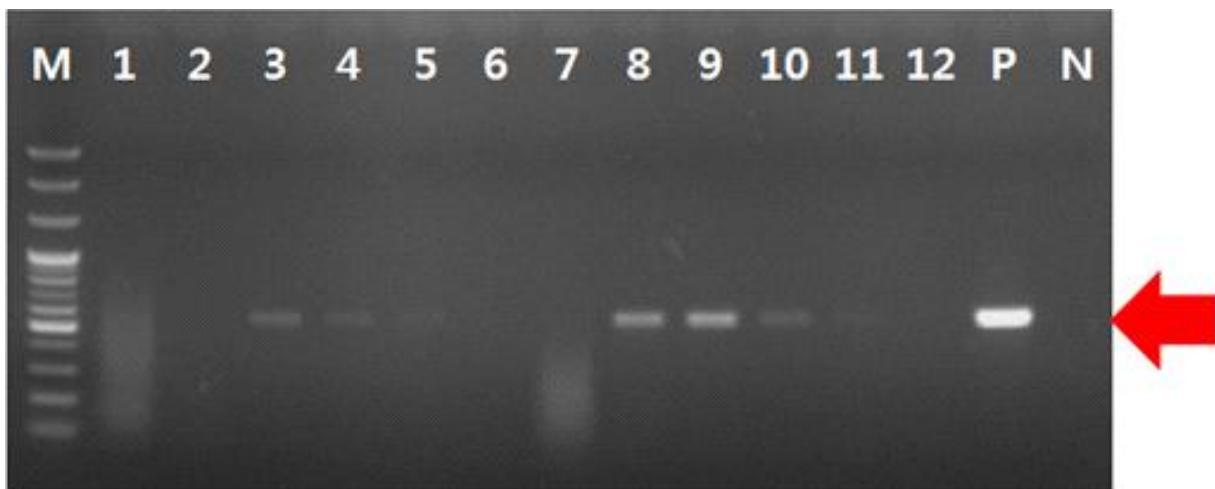


Fig. 13. Amplification of ITS1, 2 - 5.8S region (550 bp) of *Venturia nashicola* with crude DNA extracted from diseased tissues of pear. Amplification was conducted with sequentially diluted crude DNA. M, 100 bp ladder; 1~6, DNA of extracted from peduncle diluted from 100 to 10-5; 7~12, DNA of extracted from young fruits from 100 to 10-5; P, positive control (KCTC 6484); N, negative control.

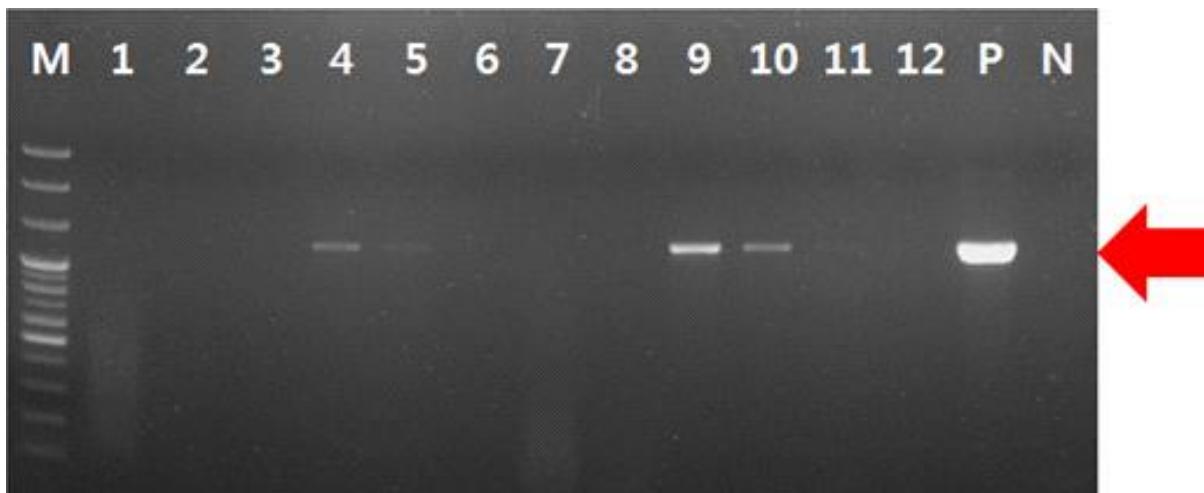


Fig. 14. Amplification of β -tubulin gene (1263 bp) of *Venturia nashicola* with crude DNA extracted from diseased tissues of pear. Amplification was conducted with sequentially diluted crude DNA. M, 100 bp ladder; 1~6, DNA of extracted from peduncle diluted from 100 to 10-5; 7~12, DNA of extracted from young fruits from 100 to 10-5; P, positive control (KCTC 6484); N, negative control.

나. 발병 조직으로부터 추출한 DNA를 이용한 Quantitative Sequencing(QS)과 AS-PCR
2015년 배 포장에서 채집한 병든 배의 조직에서 병반 부위만 잘라내어 gDNA를 추출한 다

음, 추출한 DNA를 100에서 10-5까지 10-1씩 희석하여 PCR을 수행한 결과, DNA를 10-4로 희석하였을 때 PCR 증폭효율이 가장 좋은 것으로 나타났다(Fig. 14). 포장 집단의 DNA를 이용하여 QS를 하였을 때 β -tubulin 유전자의 198번째 codon이 GCG로 바뀌어 있는 E198A의 돌연변이를 확인할 수 있었는데, 이 유전자형은 benzimidazole계 살균제에 대해서 저항성을 보이는 균주에서 확인한 유전자형과 동일하였다. 실제로 포장에서 GCG 표현형만 있는지 다른 표현형이 존재하지만 검출되지 않는 것인지 확인하기 위해 병든 조직에서 추출한 DNA에 carbendazim 감수성 균주인 KCTC6484에서 추출한 DNA를 100에서 10-4까지 10-1씩 희석해서 첨가한 후 QS를 수행하였다(Fig. 15). 그 결과 감수성 균주의 DNA 양이 많을 경우 198번째 아미노산의 codon에서 GAG의 아데닌의 피크가 높게 나타나지만, 감수성 균주 DNA양을 희석하여 첨가할수록 아데닌의 피크는 낮아지면서 저항성 균에서 볼 수 있는 GCG codon의 시토신의 피크가 상승하였다(Table 4).

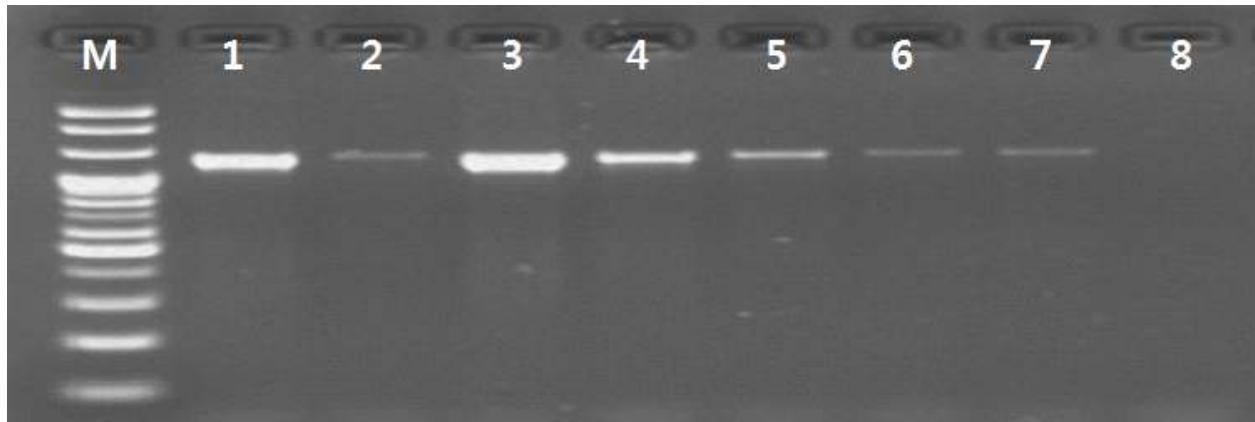
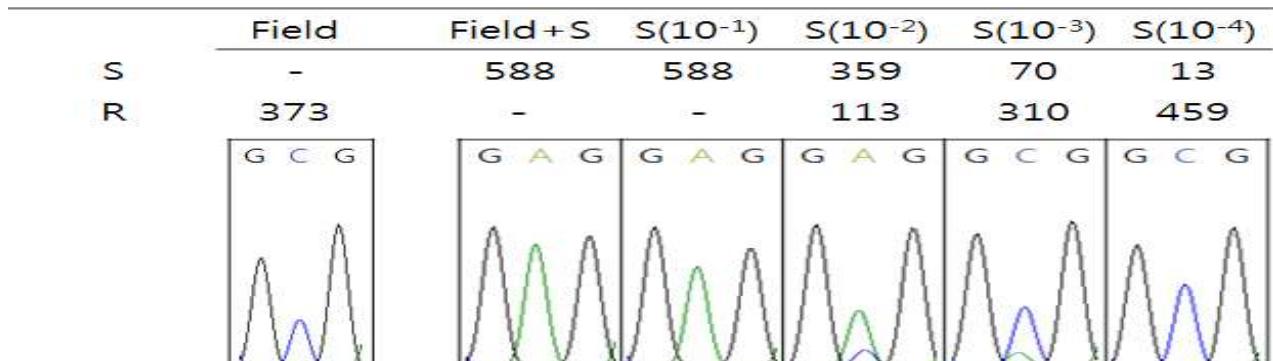


Fig. 15. Amplification of β -tubulin gene with gDNA mixture of carbendazim sensitive isolate KCTC6484 and a crude DNA from a wild lesions from pear orchard. M; 100 bp ladder, 1; KCTC6484 (S), 2; Orchard DNA (O), 3; O+S0, 4; O+S1, 5; O+S2, 6; O+S3, 7; O+S4, 8; negative control.

Table 4. Verification of sensitive nucleotide signal (A, adenine) in the DNA mixturea through quantitative sequencing method



a; The DNA mixture was prepared with gDNA of carbendazim-sensitive isolate KCTC6484 and a crude DNA from pear orchard.

다. 포장 집단에 대한 모니터링

2015년 35개 배 과원에서 채집한 병든 배 조직에서 gDNA를 추출하였다. 추출한 각각의 포장 집단의 DNA를 이용하여 QS를 실시한 결과, 실험에 사용된 모든 포장 집단의 β -tubulin 유전자의 198번째 codon이 carbendazim에는 저항성이고 carbendazim+diethofencarb 합제에 감수성인 GCG로 나타났다. AS-PCR을 통해 포장 집단의 유전자형을 확인한 결과 모든 포장에서 benzimidazole 감수성 codon인 GAG는 검출되지 않았으며 benzimidazole 저항성 codon인 GCG가 모든 포장에서 검출되었다. 2014년 포장 균주들을 대상으로 한 β -tubulin 유전자 분석에 의해 발견된 GGG codon은 전체 35개 포장 중에서 19개 포장에서 검출되었다(Table 5).

Table 5. Benzimidazole-resistance detection using fungicide target-specific markers with a crude DNA from pear orchard.

Fields	QS	Allele-specific PCR ^a			Fields	QS	Allele-specific PCR		
		GAG	GCG	GGG			GAG	GCG	GGG
ASGD	GCG	-	+	+	JNSC1	GCG	-	+	+
ASGG	GCG	-	+	+	JNSC2	GCG	-	+	-
ASMY	GCG	-	+	+	JNSC3	GCG	-	+	-
CASG	GCG	-	+	+	OCAN	GCG	-	+	+
CASH	GCG	-	+	+	OCGB	GCG	-	+	-
CHJNS	GCG	-	+	-	OCOC	GCG	-	+	+
CJNE	GCG	-	+	-	PTAJ	GCG	-	+	+
CNYS	GCG	-	+	+	PTGD	GCG	-	+	+
ESSS	GCG	-	+	-	PTHDS	GCG	-	+	-
HS1	GCG	-	+	-	SAJ-A	GCG	-	+	-
HS2	GCG	-	+	-	SAJ-P	GCG	-	+	-
HS3	GCG	-	+	-	SAJCEN	GCG	-	+	-
HS4	GCG	-	+	-	US1	GCG	-	+	+
HS5	GCG	-	+	-	US2	GCG	-	+	+
HS6	GCG	-	+	-	US3	GCG	-	+	+
HCN	GCG	-	+	+	YDYG	GCG	-	+	+
ICDW	GCG	-	+	+	YDYS	GCG	-	+	+
JCBG	GCG	-	+	+					

^a; AS-PCR product. +; band positive, -; band negative.

3) 고찰

순천대학교에서 분양받은 *V. nashicola* 5균주의 한천희석법에 의한 benzimidazole계 살균제 저항성 모니터링 결과 carbendazim과 carbendazim+diethofencarb 합제에 대한 반응이 세 가지로 나뉘어졌다. 이들 5균주는 KCTC6484, MAFF615002 균주와 MAFF615003, MAFF615029 균주, MAFF615023 균주로 살균제에 대한 저항성 반응이 나뉘었다. 이들 균주 그룹은 β -tubulin의 198번째 codon이 각각 benzimidazole계 살균제에 감수성을 가지는 GAG, carbendazim에는 저항성을 나타내었지만 합제에 대하여 감수성을 가지는 GCG, benzimidazole계 살균제와 carbendazim+diethofencarb 합제에도 저항성을 나타내는 AAG로 확인되었다. GAG codon은

아미노산으로 glutamic acid를 지정하는데, glutamic acid는 음전하를 띠기 때문에 benzimidazole계 살균제가 결합하여 정상적인 β -tubulin형성을 억제함으로써 살균효과를 나타내게 된다. 그러나 β -tubulin의 198번째 codon이 변이되어 GAG가 아닌 GCG 또는 AAG 등 다른 아미노산을 지정하는 codon이 되면 아미노산이 alanine과 lysine으로 바뀌게 되어 해당 아미노산 부위의 전자가 달라지게되고 benzimidazole계 살균제가 해당부위에 결합하지 못함으로써 병원균이 살균제에 대한 저항성을 가지게 된다.

Carbendazim과 diethofencarb는 역상관 교차저항성을 가지는 살균제로 알려져 있으며(Elad 등, 1988; Fujimura 등, 1992; Isii 등, 1992, 1995; Kato 등, 1984), carbendazim에 대해 저항성 반응을 보이는 균들의 방제를 위해 diethofencarb와 carbendazim을 혼합하여 사용하고 있다. Ishii 등(1992)이 보고한 바에 따르면 *V. nashicola*의 방제를 위해 N-phenylformamidoxime계와 N-phenylcarbamate계 화합물을 사용하였을 경우, benzimidazole계 살균제에 대해 높은 저항성 반응을 보이는 *V. nashicola*에는 높은 방제 효과를 보이는 반면, 중도 저항성을 보이는 *V. nashicola*의 분포 비율이 높은 배 과원에선 N-phenylformamidoxime계와 N-phenylcarbamate 계 화합물의 방제효과가 상대적으로 낮은 것으로 나타났다.

분양받은 *V. nashicola* 5개 균주 중 3개의 균주는 β -tubulin 유전자의 198번째 codon이 GCG 와 AAG로 변이되어 benomyl과 carbendazim에 대해 살균제 저항성 반응을 나타내었다. 이 3 개 균주들 중 benzimidazole계 살균제와 역상관 교차저항성을 가지는 N-phenylcarbamate계 살균제인 diethofencarb에 대해서는 AAG로 변이된 1개의 균주만 다른 2개 균주들과는 다르게 저항성을 나타내었다.

*V. nashicola*의 β -tubulin 유전자를 증폭하기 위해 사용한 primer는 *V. inaequalis*의 β -tubulin 유전자를 증폭하는 primer를 사용하였다. 현재 미국 국립생물정보센터(NCBI)에 등록되어 있는 *V. nashicola*의 β -tubulin 유전자는 약 350 bp 내외의 단편만 등록이 되어있다. 등록된 β -tubulin 유전자를 통해 benzimidazole계 살균제에 저항성을 가지게 되는 198번째 codon의 변이를 확인 가능한 primer를 제작할 수 있지만, 살균제 저항성을 가지도록 변이되는 다른 부분이 있는지 확인하기 위해 *V. inaequalis*의 β -tubulin 유전자를 대상으로 하는 primer를 사용하였다. 해당 primer를 사용하여 순천대학교에서 분양받은 5개의 표준균주의 β -tubulin 유전자를 PCR을 통해 증폭하였고 1264 bp 의 산물을 얻을 수 있었다. 얻어진 산물을 sequencing 하여 각 균주의 염기서열을 align 하여 5균주들의 β -tubulin 유전자 중 변이가 일어난 부분을 탐색하였다. 그 결과 52번째, 80번째, 169번째, 198번째 codon에서 변이가 일어난 것을 확인할 수 있었다. 해당 codon을 아미노산으로 변환하여 아미노산서열에도 변이가 일어났는지를 확인하였다. 그 결과, 52번째 codon은 KCTC6484 균주만 asparagine을 지정하였고, 나머지 MAFF615002, MAFF615003, MAFF615029, MAFF615023 균주는 lysine을 지정하였다. 80번째와 169번째 codon은 codon에서는 변이가 확인되었지만 해당 부분의 아미노산은 각각 proline과 valine으로 지정되어 아미노산서열에서는 변이가 나타나지 않았음을 확인하였다. 198번째 codon은 KCTC6484와 MAFF615002 균주가 glutamic acid로, MAFF615003과 MAFF615029 균주가 alanine으로, MAFF615023 균주가 lysine으로 지정되어 있었다. 이를 토대로 *V. nashicola*의 benzimidazole계 살균제에 대하여 저항성을 가지도록 하는 β -tubulin 유전자 내의 유효한 변이는 198번째 codon인 것으로 결론내릴 수 있었다.

병원균의 살균제 저항성 모니터링기법으로 많이 사용되는 한천희석법의 경우 *V. nashicola*와 같이 인공배지에서 균사의 생장이 매우 더딘 균을 대상으로 하기에 긴 기간이 소모되므로 신

속한 모니터링에 어려움이 있다. 배 검은별무늬병균은 포장에서 채집된 병든 식물체로부터 병원균을 순수 분리한 후 한천희석법을 사용하여 저항성 여부를 판단할 수는 있지만, 저항성 획득 여부를 신속하게 확인이 불가능하다. 실제로 포장에서의 배 검은별무늬병균의 방제는 개화기에서 유과에 봉투를 씌우기 전까지에 집중되어있는데, 작기 초에 나타나는 병원균의 저항성 획득여부를 신속히 판단할 수 없다면 효과적인 병 방제에 어려움이 발생한다. 따라서 포장에 존재하는 병원균 집단의 살균제 저항성 획득여부를 신속히 진단하는 것이 중요하다. 포장 균주 집단의 저항성 획득여부를 신속히 판단하기 위해서 병든 식물체에서 포자를 수확하여 포자 발아 억제율을 조사하였다. 실험에 사용된 포장 균주집단들의 포자발아 억제율은 carbendazim에 대하여 크게 세 집단의 반응이 나타났고 carbendazim+diethofencarb 합제에 대하여 한 집단의 반응이 나타났다. Carbendazim에서의 균주집단들의 반응은 실험에 사용한 살균제의 농도 중 높은 농도에서 포자 발아가 억제되지 않는 집단, 아주 낮은 농도에서 포자 발아가 억제되는 집단, 그리고 앞의 두 종류의 중간에 걸치는 집단으로 나뉘어졌다. Carbendazim과 diethofencarb 합제에서의 균주집단들의 반응은 모두 일반적인 한천희석법에서의 감수성 반응과 비슷하게 나타났다. Carbendazim에서의 포자 발아 억제율 결과를 보았을 때 benzimidazole 살균제를 사용한지 상당한 시간이 흘렀음에도 불구하고 감수성균의 분포도가 높은 포장이 존재하는 것으로 나타났다. 이 결과를 바탕으로 실제 포장에서 단포자 분리한 균주들의 감수성균의 비율과 포자 대량모니터링의 결과가 일치하는지 확인하기 위해 각각의 서로 다른 살균제 저항성 반응을 보인 세 집단의 포장들 중 각 집단을 대표할 수 있는 포장을 하나씩 선발하여 한천희석법으로 살균제 저항성 획득 여부를 확인하였다. 각 반응별 대표 포장은 OC(옥천), WJ(원주), NJ(나주)를 선정하였다. 각 포장별로 분리된 균주를 한천희석법을 통해 carbendazim과 carbendazim+diethofencarb의 합제에 대한 저항성을 검정한 결과 합제에 대한 균사 생장 억제율과 포자 발아 억제율은 비슷한 경향치를 나타내었으나 carbendazim에 대해서는 균사 생장 억제율 결과와 포자 발아 억제율 결과의 경향치가 다르게 나타났다. 특히 WJ 포장의 경우는 대량모니터링을 이용한 포자발아 억제율이 매우 감수성인 경향치를 나타내었으나, 분리한 균주들을 한천희석법으로 검정한 결과는 모두 저항성인 균인 것으로 나타났다. 병원균의 포자를 이용한 실험을 할 때는 순수분리한 배양체로부터 포자를 형성시켜 이를 이용하여 실험에 사용한다. 그러나 V. nashicola의 경우 순수분리한 후 인공배지에서 생장시켜 포자를 형성시키기 매우 힘들뿐만 아니라 형성된 포자의 수도 적기 때문에 포자실험을 진행하기에 어려움이 많다. 따라서 병징에서 형성된 수많은 포자를 활용하여 실험에 바로 사용하였다. 이 포장 대량 모니터링과 일반적인 포자실험과 차이점은 병원균의 포자를 균주별로 사용한 것이 아니라 다양한 병징에서 채취한 포자들을 한군데 섞어서 사용한 점이라는 것이다. 이는 포장 전체의 병징에서 채집한 포자들 각각 하나의 개체라는 점이다. 즉, 한 균주로부터 형성된 동일한 유전형을 가진 포자가 아닌, 하나의 포자가 하나의 균주가 되는 것이다. 따라서 실제로 포자실험을 할 때 조사한 포자들은 한 포장 전체를 대표할 수 있는 포장집단이 될 순 있지만, 이로부터 분리된 각각의 단포자들과 완벽히 일치하는 결과를 나타낼 수 없는 것이다. 즉, 병원균의 포장집단에 대한 benzimidazole 계 살균제에 대한 저항성 여부를 판단하기 위해 포장전체에서 발병한 병원균의 포자를 이용하여 수행한 실험은 실제로 병원균 각각의 개체를 모니터링한 결과와 맞지 않는다는 결론을 내릴 수 있다. 그러나 단포자 분리한 병원균들의 carbendazim에 대한 EC50 값의 분포도를 그려보았을 때, 저항성으로 나타난 OC과 NJ 집단과는 다르게 WJ 집단은 EC50 값의 분포가 좀 더 낮은 경향을 보였다. 따라서 포장 집단에 대한 포자 발아를 이용한 살균제 저항성 대량모니터

링이 정확도가 높지 않아 포장 집단의 저항성 정도를 판단하기에 사용 가능하지만, 포장 집단의 정확한 저항성 대량모니터링기법으로는 적합하지 않은 것으로 생각된다.

포장 집단의 포자 발아를 이용한 살균제 저항성 대량모니터링은 모니터링에 소요되는 기간이 짧지만 정확도가 개체모니터링에 비해 낮기 때문에 문자마커를 활용한 포장 집단의 저항성 모니터링을 확립하였다. Benzimidazole계 살균제에 저항성을 가지는 균들은 β -tubulin 유전자의 198번쨰 codon이 변이되어 있으므로 이 변이 부위를 대상으로 한 분자생물학적 살균제 모니터링을 실시하였다. 포장 당 균일한 간격을 두고 채집한 10개 이상의 병든 식물체에서 병징만을 도려내어 DNA를 추출하였다. 식물체에서 바로 추출한 DNA를 사용하여 *V. nashicola*의 β -tubulin 유전자를 증폭하였을 때 증폭이 되지 않았다. PCR 반응이 일어나지 않는 조건이 여러 가지가 있는데 PCR mixture를 만들 때 조성이 잘못되는 경우, PCR 수행시 primer가 template에 결합하는 annealing 온도의 오류, template로 사용하는 DNA의 문제 등이 있다. PCR mixture의 조성이 잘못되는 경우 실험의 반복을 통해 숙달되는 것이 중요하고, primer의 annealing 온도 오류의 경우 gradiant PCR을 통해 수정할 수 있다. 마지막으로 template로 사용하는 DNA의 문제의 경우 DNA의 순도가 낮아 primer가 활성화하기에 부적합한 불순물이 많거나 DNA의 농도가 너무 높아 primer가 특이적으로 반응이 일어나지 않아 PCR 산물이 생성되지 않을 수 있다. 이 경우는 template DNA를 희석하여 불순물과 DNA의 농도를 낮추어 PCR을 수행하여 조건을 찾아야 한다. 포장 집단의 병징들로부터 추출한 DNA는 배의 표면에 형성된 병징을 도려내어 DNA를 추출하기 때문에 병원균의 DNA 뿐만 아니라 기주식물인 배의 DNA도 혼재되어 있을 것으로 생각되었다. 따라서 포장 집단에서 분리한 DNA를 순차적으로 희석하여 β -tubulin 유전자를 증폭하였고 DNA의 농도가 원액의 10-4배로 희석되었을 때 안정적으로 증폭되는 것을 확인할 수 있었다. 균의 DNA만 순수하게 분리되지 않더라도 병징으로부터 직접 추출한 DNA로 PCR이 가능하였으므로 이를 활용하여 문자마커를 활용한 살균제 저항성 모니터링이 가능하다고 판단하였다. 2015년 경기, 충북, 충남, 전남, 강원 등지의 총 35개 포장에서 병든 배 조직을 채집하였다. 이로부터 분리한 병원균 포장 집단의 total DNA를 활용하여 QS를 수행한 결과, QS를 통해 포장 집단 내 저항성균의 비율이 100%로 확인되었다. Lee 등(2009)은 permethrin 살충제에 대한 머리 이의 저항성 모니터링을 위해 QS를 사용하여 집단의 유전자형을 검정하였다. QS는 집단의 검정에는 유용하지만 더 정확한 집단 내의 대립유전자의 빈도를 알기 위해선 검출한계를 뒷받침할 추가적인 방법이 필요하여 rtPASA와 SISAR를 활용하였다(Lee 등, 2009). 배 포장 집단에 대한 QS를 수행하였을 때 모든 집단의 β -tubulin 유전자의 해당 염기서열에 변이되는 부분에서 GCG codon만 나타나고 GAG codon은 나타나지 않아 benzimidazole계 살균제에 저항성인 것으로 나타났으나 포장집단내의 대립유전자가 정말 한가지 유형만 존재하는지 확인하기 위해 포장 집단의 DNA를 대상으로 AS-PCR을 수행하였다. AS-PCR을 통해서 포장 집단내의 대립유전자의 유무를 확인한 결과 benzimidazole계 살균제에 감수성인 대립유전자는 발견되지 않았다. 앞서 연구한 QS의 최저 검출 한계실험 결과와 포장 집단을 대상으로 한 AS-PCR결과를 종합해 보았을 때 대립유전자가 존재하더라도 10% 이하로 존재할 경우 QS를 통해서는 검출이 불가능한 것을 알 수 있었다. 이는 Kwon 등(2008)이 머리 이의 permethrin 저항성 검정을 위한 QS모니터링에서 검출 가능한 대립유전자의 최저 비율이 7.4%로 보고한 결과와 유사하므로 본 연구의 결과가 실제로 포장 집단 모니터링에 활용 가능한 것으로 생각할 수 있다.

제2절. *Venturia nashicola*의 에르고스테롤을 저해하는 DMI 살균제 저항성

1. 연구방법

(1) 실험에 사용된 병원균

① 병반 채집과 병원균의 단포자 분리 및 보관

2014년 5월에 7개 지역의 8곳의 배 과원에서, 2015년 5월에는 18개 지역의 43곳의 배 과원에서 배 검은별무늬병의 뚜렷한 병반이 형성된 유과와 잎, 줄기 등을 채집하였다(Fig. 1). 채집한 병반 위에 형성된 분생포자를 화염멸균한 메스로 긁어서 $300 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 streptomycine을 첨가한 살균증류수에 혼탁하고 $1,500 \text{ rpm}$ 으로 3분간 2회 원심분리하여 세척하였다. 다시 $300 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 streptomycine을 함유한 살균증류수 첨가하여 $1 \times 104 \sim 1 \times 105 \text{ spores/mL}$ 으로 밀도를 조절한 후, 물 한천배지에 $100 \mu\text{L}$ 씩 도말하고 20°C 배양기에 2일간 배양 후, 현미경으로 포자 빌아 여부를 확인하였다. 순수배양체 확보를 위하여 현미경으로 확인한 빌아한 포자 하나를 PDA(potato dextrose agar; Becton, Dickinson and Company, DifcoTM) 배지에 옮겨 접종하고, 20°C 에서 배양하였다. 단포자 분리한 병원균을 20°C PDA배지에서 30일간 배양한 후, 다시 PDA 사면배지에 접종하여 배양하고, 4°C 에서 보관하며 실험에 사용하였다.



Fig. 1. Lesion of pear scab by *V. nashicola* in young fruit, leaf, petiole.

② 실험에 사용된 병원균

실험에 사용된 병원균은 2014년도 하동에서 53균주, 세종 23균주, 원주 57균주, 울산 17균주, 나주 30균주, 옥천 50균주, 문의 30균주, 총 260균주를 단포자 분리하였고, 2015년도 화성 32균주, 상주 5균주 등 총 37균주를 단포자 분리하여 본 실험에 사용하였다.

③ 염기서열 분석을 통한 병원균의 동정

병원균의 gDNA를 추출하여 ITS영역 유전자를 증폭하고 염기서열을 분석하여 병원균을 동정을 하였다. ITS영역을 증폭하기 위한 primer는 ITS5(5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAC G-3')와 ITS4(5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')를 사용하였으며, PCR 반응조건은 $95^\circ\text{C} 4 \text{ min}, (94^\circ\text{C} 30 \text{ sec}, 62^\circ\text{C} 1 \text{ min}, 72^\circ\text{C} 90 \text{ sec}) \times 30 \text{ cycle}, 72^\circ\text{C} 7 \text{ min}, 4^\circ\text{C} \infty$ 으로 진행하였다. PCR 증폭산물은 (전기영동 조건)에서 전기영동하여 PCR 산물의 크기를 확인하였다. 증폭 산물은 PCR SV Kit (Geneall, Seoul, Korea)를 사용하여 정제한 후 마크로젠(주)에 의뢰하여 염기서열을 받아서 분석하였다.

(2) 살균제 반응 조사

① 배지 선발

실험에 사용할 배지를 선발하기 위해서 병원균을 각각 PDA, oatmeal, MEA, 20% V8, cornmeal agar(CMA), czapek-dox agar(CDA) 배지에 접종하여 20℃에서 배양하며 균총의 직경을 측정하여 균사생장 정도를 조사하였다. 이 때 각각의 배지에 3 mM의 Ca(NO₃)₂를 첨가하여 병원균의 균사생장에 영향을 미치는지를 조사하였다. 병원균의 균총의 직경은 20℃에서 30일간 배양한 후 측정하였다.

② 약제 모니터링

각 지역에서 채집한 병반에서 단포자 분리한 균주를 실험에 사용하였다. 2014년도에는 충청북도에서 72균주, 충청남도에서 24균주, 경상남도에서 44균주, 전라남도에서 26균주, 세종특별자치시에서 22균주, 강원도에서 39균주, 울산광역시에서 15균주 등 총 242균주를 사용하였고, 2015년도에는 경기도와 경상북도에서 분리한 5균주와 32균주를 포함하여 총 279균주를 실험에 사용하였다. 사용한 약제는 DMI계 살균제인 tebuconazole (a.i. 20%, SC)과 difenoconazole (a.i. 10%, SC)이며, 배지에 처리 농도는 0, 0.032, 0.16, 0.8, 4, 20, 100 µg/mL로 결정하였다. 각 살균제는 살균증류수에 정해진 농도가 되도록 준비한 후, Ca(NO₃)₂를 3 mM 첨가한 PDA배지에 최종농도가 정해진 농도가 되도록 첨가하였다. 병원균은 20℃에서 30일간 배양하여 접종원으로 사용하였다. 병원균은 멀균한 메스를 이용하여 작은 균사조각(가로 x 세로; 1 mm x 1 mm)으로 자른 후, 살균제를 첨가한 배지에 균사면이 배지바닥쪽을 향하도록 올려 접종하였다. 접종한 배지는 20℃ 배양기에서 다시 30일간 배양한 후 자란 균총의 직경을 조사하였다. 살균제의 효과는 살균제 무처리 배지에서 직경에 대한 살균제 처리 배지에서 직경을 비교하여 아래식으로 구하였다.

$$\text{균사생장 억제효과(%)} = \left(1 - \frac{\text{살균제 첨가 배지의 균총의 직경}}{\text{살균제 무첨가 배지의 균총의 직경}} \right) \times 100$$

③ 포장집단 대량모니터링

배 검은별무늬병균은 분리하여 배지에서 생장 속도가 매우 늦어 실험에 사용하기 위해서는 30일 이상을 배양하여야 하며, 배양한다고 하더라도 병원균의 분생포자가 인공배지 상에서는 전혀 형성되지 않기 때문에 인공배지에서 일반적인 방법으로 살균제 저항성을 모니터링하기에는 장시간이 소요될 뿐만 아니라, 여러 가지의 어려움이 있다. 따라서 본 실험에서는 포장에서 형성된 분생포자를 이용하여 포장집단의 약제 반응을 신속하게 조사할 수 있는 대량모니터링 방법을 확립하고, 각 포장의 병원균 집단의 반응을 조사하였다. 포장집단은 2014년도에 전국의 8포장에서 병반을 채집하여 실험에 사용하였고, 2015년도에는 43개의 포장에서 병반을 채집하여 실험에 사용하였다(Table 1). 각 포장에서는 10곳 이상에서 병든 식물을 채집하였으며, 병든 식물을 채집한 장소는 각 포장에서 균일하게 분포하도록 배치하였다. 실험에는 DMI(demethylase inhibitor)계인 tebuconazole(a.i. 20%, SC)을 사용하였다. 병든 식물을 채집한 포장의 병원균 포자 집단을 준비하기 위해서 채집한 병반 위에 형성된 분생포자를 화염멸균한 메스로 긁어서 300 µg/mL의 streptomycineⁱ 첨가된 살균증류수에 혼탁하여 포자 밀도가 1 x 104~1 x 105 spores/mLⁱ 되도록 조절하였다. 이 포자 혼탁액은 살균제의 농도가 0, 0.016, 0.08, 0.4, 2, 10, 50 µg/mLⁱ 되도록 첨가한 물 한천배지에 100 µL씩 도말하고 20℃에서 2일간

배양한 후, 현미경으로 발아 여부와 발아관의 길이를 조사하였다. 각 처리구는 3반복으로 실험하였으며, 각 반복당 100개의 포자를 조사하였다.

Table 1. The number of orchards on which mass-monitoring was conducted for the fungicide resistance monitoring

year	region	the number of orchards
2014	Chungcheongbuk-do	Cheongju-si Okcheon-gun
	Gyeonggi-do	Yeoju-si
	Jeollanam-do	Naju-si
	Ulsam	
	Gangwon-do	Wonju-si
	Sejong	
2015	Chungcheongbuk-do	Cheongju-si Cheongju-si Eumseong-gun Jincheon-gun Okcheon-gun
	Chungcheongnam-do	Yesan-gun Cheonan-si
	Gyeonggi-do	Anseong-si Hwaseong-si Yeoju-si Pyeongtaek-si
	Incheon	
	Gyeongsangbuk-do	Sangju-si
	Ulsam	
	Gangwon-do	Hongcheon-gun
	Jeollanam-do	Suncheon-si
	Sejong	

(3) gDNA의 추출

① gDNA의 추출

Ca(NO₃)₂를 첨가한 PDA배지에 접종하여 20℃에서 30일간 배양한 병원균의 균체를 수확한 후, -70℃에서 12시간 동안 동결건조 하였다. 동결건조한 균체는 소독한 유리막대로 마쇄한 후 DNA 추출 buffer를 1 mL씩 넣고 65℃ water bath에서 1시간동안 반응시켰다. 반응 후 4℃에서 13,000 rpm으로 15분간 원심분리하고, 상정액을 650 μL만큼 새로운 tube에 옮긴 후 동량의 phenol을 넣고 교반하여 고르게 혼합한 후 15분간 반응시켰다. 반응 후 동일한 조건에서 원심분리하여 얻은 상정액에 동량의 phenol을 처리하고 15분간 반응시킨 후 동일한 조건에서 원심분리하여 얻은 상정액에 동량의 chloroform을 처리한 후 50회 이상 잘 흔들어 준 후 15분간

반응시켰다. 반응액을 동일한 조건으로 원심분리하여 얻은 상정액에 동량의 isopropyl alcohol을 처리하고 4°C에서 13,000 rpm으로 원심분리하였다. 상정액을 버리고, 침점물을 200 μL의 70% 에탄올에 용해시킨 후, 4°C에서 13,000 rpm으로 원심분리 하여 상정액은 버리고 침전물은 12시간 이상 건조시켰다. 건조시킨 침전물에 TE buffer 70 μL와 RNase 5 μL를 넣고 37°C에서 30분간 처리하고, 계속해서 65°C에서 1시간 처리하여 gDNA를 추출하였다.

② gDNA의 정량 및 희석

gDNA의 정량은 nano drop(Micro-p, M600)을 이용하여 순도와 gDNA의 양을 측정하였고, 25 ng/mL로 희석하여 실험에 사용하였다.

(4) CYP51 유전자 증폭

CYP51 유전자의 증폭은 Cools(2002)의 방법을 사용하여 실시하였다. Primer는 VN14DM1(5'-GGC CAC CAC CTC ACC ACC AAC-3')와 VN14DM2(5'-CTT TCA CTC TAT CGC ACT TCC-3')를 사용하였다. 그리고 PCR의 효율을 높이기 위해서 새로운 primer인 VN14DMF(5'-GGC CAC CAC CTC ACC ACC AAC AA-3')와 VN14DMR(5'-CTT TCA CTC TAT CGC ACT TCC CG-3')를 제작하여 CYP51 유전자의 증폭 여부를 Cools 등이 사용하였던 primer와 비교하였다.

CYP51유전자를 증폭하기 위한 반응조건은 94°C 4min, (94°C 30 sec, 62°C 1 min, 72°C 90 sec) × 35 cycle, 72°C 7 min, 4°C에 보관으로 진행하였으며, 전기영동을 이용하여 랜드 위치를 확인하여 증폭여부를 확인하였다. 증폭된 산물은 PCR SV Kit (GeneAll, Seoul, Korea)를 이용하여 정제한 후 마크로젠(주)에 염기서열 분석을 의뢰하였으며, phydit 프로그램과 MEGA5.2 프로그램을 이용하여 염기서열을 비교, 분석하였다.

2. 연구결과

(1) 병원균의 동정

① 형태적 동정

채집한 유과와 잎에서 병징을 관찰하고 포자를 관찰한 결과 유과에서는 검은색으로 유과가 뒤덮이는 것을 확인하였고, 잎에서는 잎맥을 따라 검은색 포자가 잎의 뒷면을 둘러싸는 것을 관찰할 수 있었다. 포자를 관찰한 결과 작은 타원형이고 한쪽이 뾰족한 모양을 하고 있었으며, 크기는 장경이 15~20 mm이며 단경이 10~12 mm이었다. PDA배지 상에서의 균총은 밝은 갈색에서 어두운 갈색까지 관찰되었으며, 자라면서 배지의 안쪽으로 균사가 파고 들어가는 것이 관찰되었다(Fig. 2).

② 마커 유전자를 이용한 동정

분리된 병원균의 gDNA를 추출하고 ITS영역을 증폭하여 전기영동으로 랜드를 확인 후(Fig. 3) 염기서열을 BLAST 해본 결과 모두 *V. nashicola*로 동정되었다(Fig. 4).



Fig. 2. Colony of *V. nashicola* cultivated on PDA at 20°C for 30 days (left) and conidial spores collected from naturally occurred lesions under microscope (right).

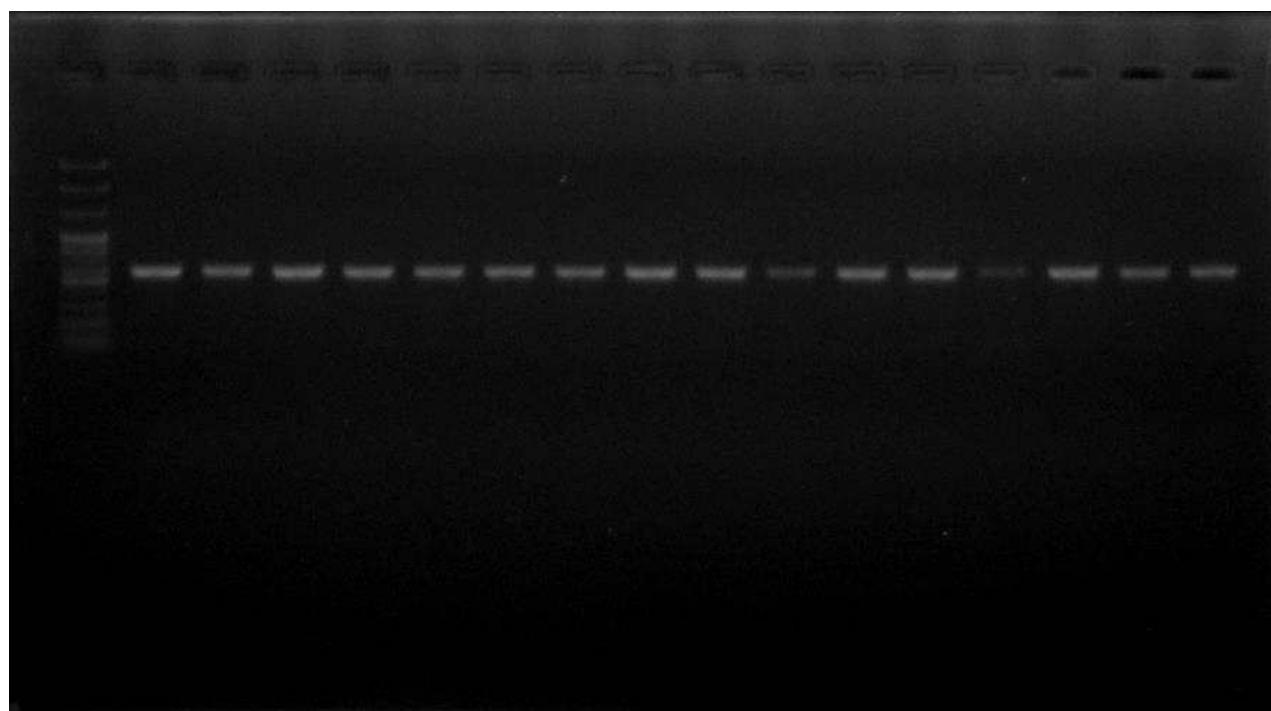


Fig. 3. ITS region amplification of *V. nashicola* isolates collected from pear orchard.

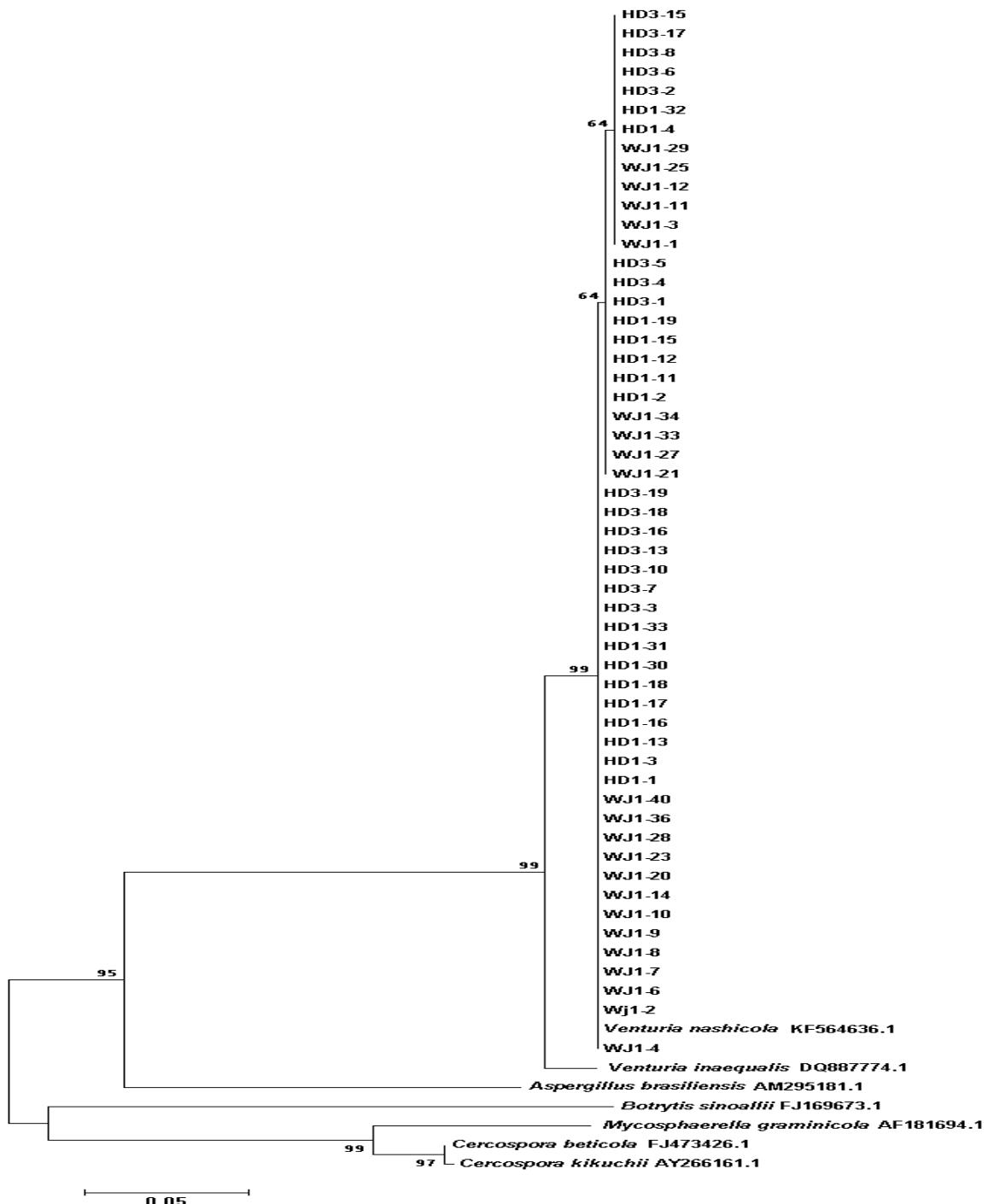


Fig. 4. Phylogenetic tree from ITS sequence: the tree was constructed using the neighbour-joining method. Branch lengths are proportional to the genetic distance between the taxon. DNA sequence listing of another pathogenic fungi bring to NCBI.

(2) 배지 선발

PDA배지, Oatmeal배지, MEA배지, V8배지, CMA배지, Czapek배지에 각각 Ca(NO₃)₂를 3 mM씩 첨가한 배지와 첨가하지 않은 배지에서 병원균을 한 달 동안 배양한 결과, PDA배지를 비롯한 3종류의 배지에서는 Ca(NO₃)₂를 첨가한 배지에서 첨가하지 않았을 때보다 *V. nashicola*의 생장이 빨랐으나, Oatmeal 배지와 Czapek 배지에서는 Ca(NO₃)₂첨가에 따른 차이

가 없었다(Table 2). 병원균의 균사생장이 상승한 4종의 배지 중에서는 PDA에서 가장 빠른 생장속도를 보였다(Table 2와 Fig. 5).

Table 2. Mycelial growth of *V. nashicola* on different type of medium amended with $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	length of colony (mm)					
	PDA	Oatmeal	MEA	20% V8	CMA	CDA
+	22.5±0.5	21.7±2.4	22.1±0.2	21.3±0.3	19.0±0.3	9.7±0.3
-	14.7±0.1	21.7±2.4	17.7±0.4	19.5±0.5	9.8±0.6	9.6±1.0

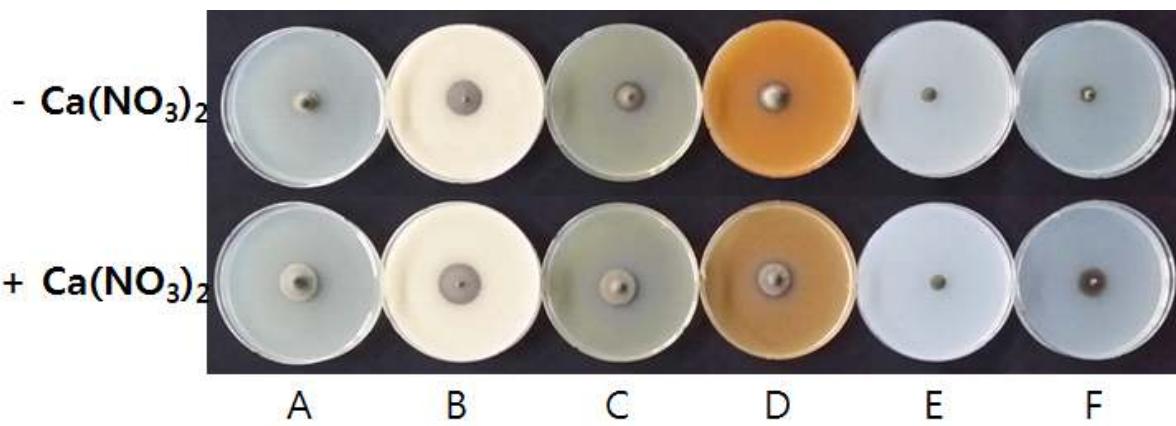


Fig. 5. Effect of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ on the mycelial growth of *V. nashicola* on different type of medium. A; PDA, B; Oatmeal, C; MEA, D; 20% V8, E; CMA, and F; CDA.

(3) 살균제 반응

① Tebuconazole에 대한 모니터링

우리나라 주요 배 과원에서 채집한 병원균의 tebuconazole에 대한 반응을 조사한 결과 울산광역시에서 채집한 병원균의 EC50값 평균이 $3.170 \mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 가장 높았고, 전라남도와 충청북도, 세종특별시가 각각 $2.697 \mu\text{g}/\text{mL}$ 과 $2.560 \mu\text{g}/\text{mL}$, $2.169 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 평균 EC50값을 보였는데, 이들은 전국 평균 EC50값인 $2.107 \mu\text{g}/\text{mL}$ 보다 높은 값을 보였다. 하지만 충청남도는 평균 EC50값이 $1.207 \mu\text{g}/\text{mL}$ 로 가장 낮은 값을 보였으며, 강원도, 경상북도, 경상남도도 $1.509 \mu\text{g}/\text{mL}$, $1.667 \mu\text{g}/\text{mL}$, $1.659 \mu\text{g}/\text{mL}$ 로 평균에 비해 낮은 값을 보였다(Fig. 6). EC50값의 최소값과 최대값을 보았을 때, EC50값의 평균이 가장 높았던 울산광역시에서 채집한 포장의 경우 15.2배의 차이가 나는 것을 볼 수 있었으며, EC50값 평균이 가장 낮은 충청남도 포장의 경우 8.8배의 차이를 보였다. 경상남도의 경우에는 40.2배의 차이를 보였으며, 충청북도의 경우 25배의 차이를 보였다(Table 3).

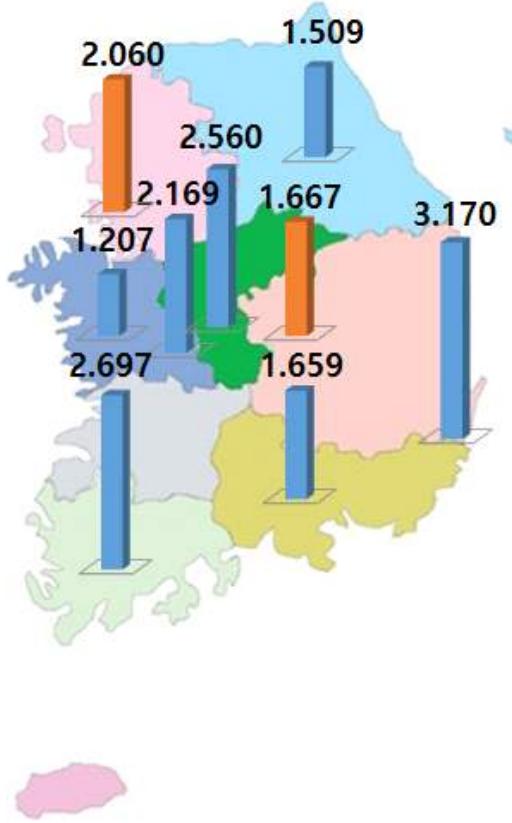


Fig. 6. The regional average of EC_{50} value to tebuconazole.

Table 3. The EC_{50} value and resistant factor to tebuconazole

Regions	No. of isolates	EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)			Resistant factor (b/a)
		minimum(a)	maximum(b)	average	
Gyeongsangnam-do	44	0.126	5.062	1.659	40.2
Chungcheongbuk-do	72	0.341	8.540	2.560	25.0
Jeollanam-do	26	0.591	4.991	2.697	8.4
Chungcheongnam-do	24	0.316	2.791	1.207	8.8
Sejong	22	0.783	6.741	2.169	8.6
Gangwon-do	39	0.430	4.105	1.509	9.5
Ulsan	15	0.642	9.735	3.170	15.2
*Gyeonggi-do	32	0.124	6.145	2.060	49.6
*Gyeongsangbuk-do	5	0.946	3.074	1.667	3.2
total (avr.)	279	0.124	9.735	(2.107)	78.5

* Collected from 2015 year

② Difenoconazole에 대한 모니터링

DMI계 살균제로 많이 사용하고 있는 difenoconazole에 대한 각지에서 단포자 분리한 *V. nashicola*의 반응을 조사한 결과, 울산광역시, 경기도, 충청북도에서 채집한 균주의 평균 EC_{50}

값은 각각 $2.133 \mu\text{g/mL}$, $1.519 \mu\text{g/mL}$, $1.401 \mu\text{g/mL}$ 로 전국 평균값인 $0.898 \mu\text{g/mL}$ 보다 높은 값을 보였으며, 충청남도, 강원도, 전라남도에서 분리한 균주들은 $0.278 \mu\text{g/mL}$, $0.290 \mu\text{g/mL}$, $0.365 \mu\text{g/mL}$ 로 평균에 비해 매우 낮은 평균 EC50값을 보였다(Fig. 7). Difenoconazole의 경우 EC50값이 최대값과 최소값이 가장 차이가 적게 나는 포장이 충청남도에서 49.1배였고, 경기도에서는 1000배 이상의 EC50값 차이를 보였다. 포장 내에서의 차이가 아닌 포장간의 차이를 보면 평균 EC50값이 가장 높은 울산광역시 채집포장은 $2.133 \mu\text{g/mL}$ 이며, 가장 낮은 충청남도 포장은 $0.278 \mu\text{g/mL}$ 로 약 8배 가량의 차이를 보였다(Table 4). 포장에서 분리한 병원균 균주 집단을 비교해 보면 tebuconazole보다 difenoconazole의 경우가 살균제에 대해서 반응이 매우 다양한 균주들로 포장 집단을 이루고 있는 것을 알 수 있었다.

엄 등(2010)이 보고한 나주 지역에서 분리한 병원균의 difenoconazole에 대한 반응을 분리한 균주의 평균 EC50값을 가지고 비교해 보면, 2006년에 분리한 균주의 평균 EC50값보다 2014년에 분리한 균주의 평균 EC50값이 14배, 2007년 균주의 평균 EC50값보다는 6.8배가 더 증가한 것으로 나타났다(Fig. 8). 2007년 결과에서 나주 지역보다 더 저항성화된 지역으로 판명되었던 울산에서 분리한 균주들은 2006년 평균 EC50값보다 711.0배, 2007년 평균 EC50값보다는 54.7배 증가하였다(Table 5). 두 지역 모두 DMI계 살균제에 대해서 병원균의 살균제 저항성은 계속적으로 증가하고 있는 상태로 나타났으며, 저항성이 심한 지역에서 더 급속하게 증가하고 있었다.

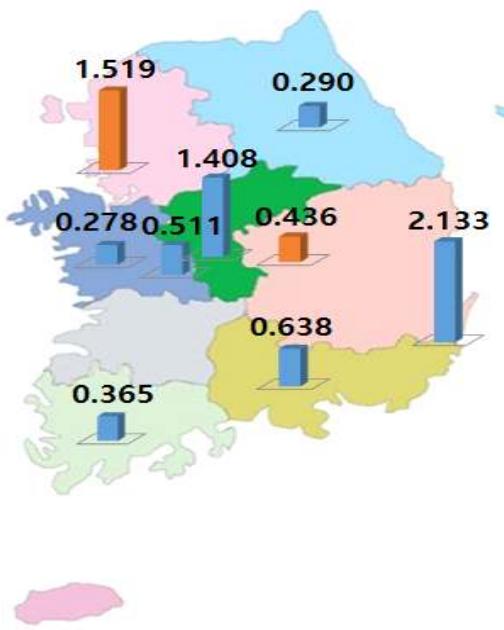


Fig. 7. The regional average of EC₅₀ value to defenoconazole.

Table 4. The EC₅₀ value and resistant factor to defenoconazole

Regions	No. of isolates	EC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)			Resistant factor (b/a)
		minimum(a)	maximum(b)	average	
Gyeongsangnam-do	44	0.024	7.469	0.638	311.2
Chungcheongbuk-do	72	0.017	15.294	1.401	899.6
Jeollanam-do	26	0.003	1.566	0.365	522.0
Chungcheongnam-do	24	0.034	1.671	0.278	49.1
Sejong	22	0.026	2.291	0.511	88.1
Gangwon-do	39	0.021	2.234	0.290	106.4
Ulsan	15	0.003	10.116	2.133	>1,000.0
*Gyeonggi-do	32	<0.001	23.974	1.519	>1,000.0
*Gyeongsangbuk-do	5	0.005	1.002	0.436	200.4
total (avr.)	279	<0.001	23.974	(0.898)	>1,000.0

* Collected from 2015 year

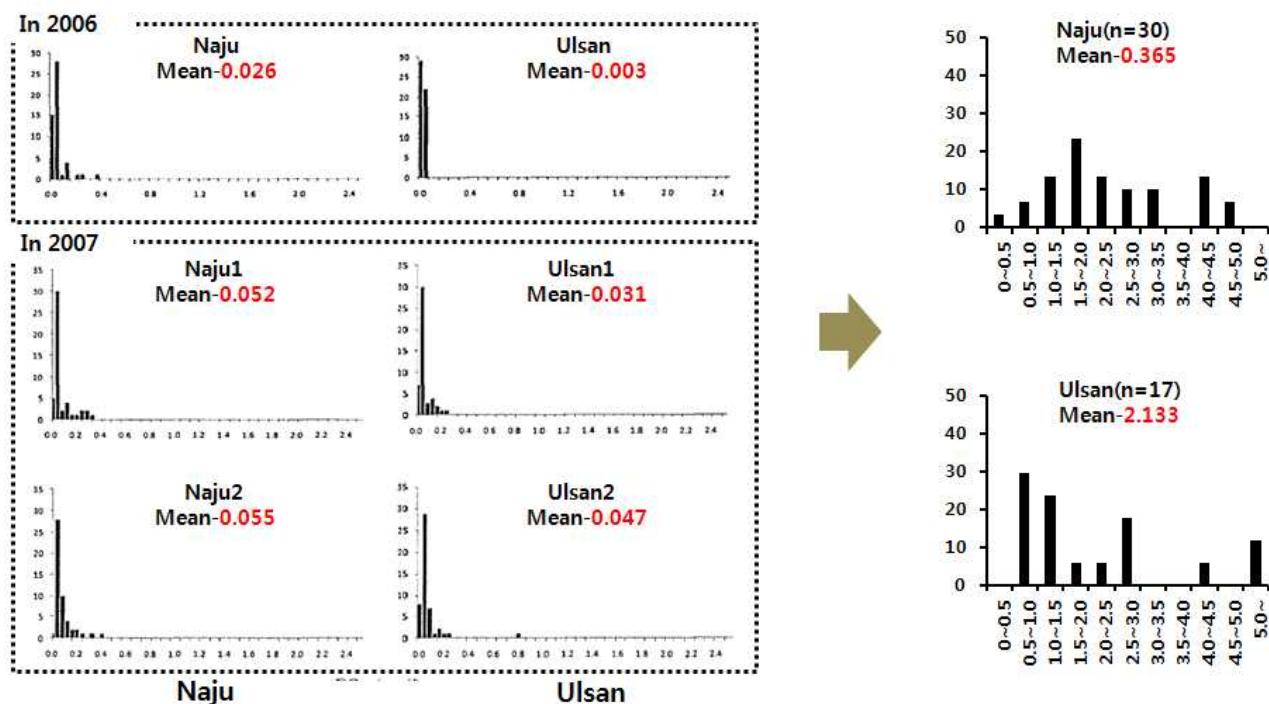


Fig. 8. The distribution of EC₅₀ to defenoconazole of *V. nashicola* collected from Naju and Ulsan region in 2006, 2007 and 2014. Left; in 2006 and 2007 at Naju and Ulsan (Um et al., 2010), right; in 2014.

Table 5. The shift of EC50 of *Venturia nashicola* to difenoconazole in Naju and Ulsan

Regions	Year	EC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	Speed of fungicide resistance occurrence ^a
Naju	2006	0.026	-
	2007	0.054	2.1
	2014	0.365	14.0
Ulsan	2006	0.003	-
	2007	0.039	13.0
	2014	2.133	711.0

a; Speed of fungicide resistance occurrence = EC₅₀ in the that year/EC₅₀ in 2006.

(4) 살균제 저항성과 CYP51 유전자의 아미노산 치환과의 관계

DMI계 살균제의 저항성 기작으로는 살균제의 작용점이 되는 CYP51 유전자의 아미노산 치환과, 타켓 유전자의 과발현, ABC-transporter에 의한 세포질 외부로 배출 등의 기작이 알려져 있다. 본 실험에서는 전국적으로 단포자 분리하여 얻은 순수배양체의 살균제 반응을 한천희석법으로 조사한 다음, 각 균주의 CYP51 유전자의 아미노산 서열과 비교하여 아미노산의 치환이 병원균의 저항성 정도에 영향을 주는지를 조사하고자 하였다.

① CYP51 유전자의 Sequencing 분석

Fig. 9에서 보는 것과 같이 CYP51 유전자를 증폭하여 염기서열을 분석한 결과 140번째, 141 번째, 304번째, 446번째 아미노산의 치환이 확인되었다. 140번째 아미노산 치환은 leucine(L)에서 phenylalanine(F)으로(L140F), 141번째 아미노산은 446번째 아미노산과 동시에 치환이 일어났는데, 각각 methionine(M)에서 valine(V)으로, histidine(H)에서 tyrosine(Y)으로 치환되었다 (M141V/H446Y). 마지막으로 304번째 아미노산은 alanine(A)에서 glycine(G)으로 치환되었다 (A304G). 총 74균주의 염기서열을 분석한 결과 3가지의 유전자형으로 구분할 수 있었고, 아미노산 치환이 일어난 위치로 구분하여 L140F는 8균주, M141V/H446Y는 7균주, A304G는 14균주로 확인되었으며, 치환이 확인되지 않은 wild type(WT)균주가 45균주였다.

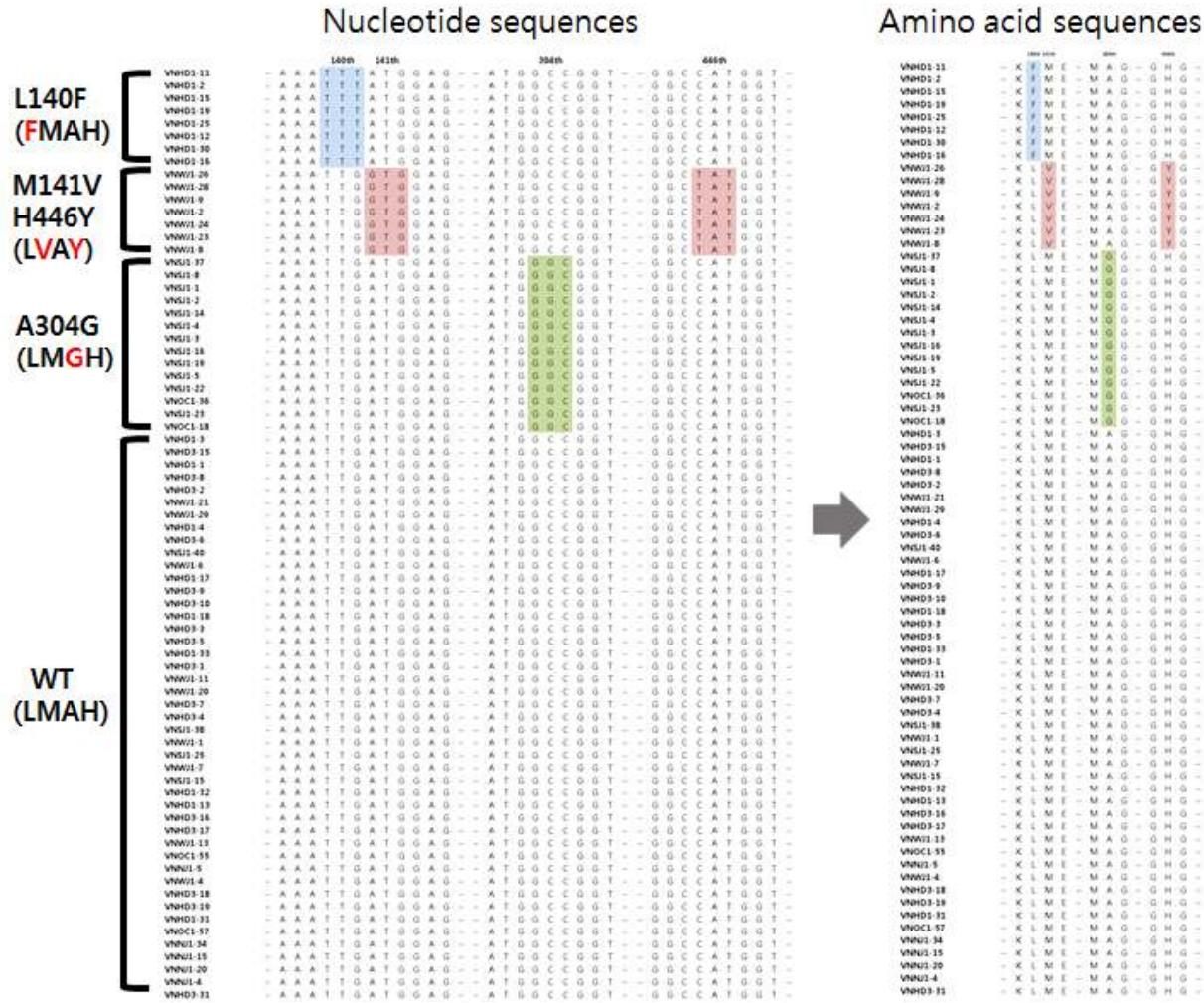


Fig. 9. The sequence variation of *cyp51*, the target site of DMI, on codon 140th, 141st/446th, and 304th.

② 유전자형에 따른 tebuconazole에 대한 반응

아미노산의 치환 위치가 다른 각각의 유전자형에 속하는 균주들의 EC50값을 구하여 서로 비교하였다. Fig. 10에서 보는 것과 같이 M141V/H446Y형처럼 141번과 446번의 아미노산이 치환된 7균주의 tebuconazole에 대한 EC50값은 모두 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 보다 낮았으며, L140F형에 속하는 8균주는 1.757 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 보다 낮았다. 하지만 CYP51 유전자상에서 아미노산의 치환이 발견되지 않은 wild type 균주들의 EC50값은 0.001~5.061 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 사이에서 다양하게 나타났으며, 평균 EC50값은 2.014 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로, 감수성 균주와 저항성 균주가 모두 존재하였다. A304G형 그룹에 속하는 14균주는 모두 1.179 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 보다 높은 EC50값을 보였다(Fig. 11). A304G형과 같이 304번 째의 아미노산이 alanine에서 glycine으로 치환된 균주의 EC50값이 다른 유전자형에 속하는 균주보다 높게 나타났지만, 치환이 일어나지 않은 집단에서도 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 보다 높은 EC50값을 가지는 균주의 수가 32균주로 71.1%에 해당하는 것을 보면, 살균제 저항성 기작이 CYP51 유전자에서 아미노산 치환만은 아닌 것이라고 생각된다. 또한 Table 5에서 보는 것과 같이 울산에서 분리한 병원균의 EC50값을 2006년과 2007년의 값과 2014년의 값을 가지고 비교하면 711.0과 45.4배가 증가한 것으로 나타나고 있다. 그 만큼 현재 과원에서 분리하는 검은별무늬병균의 저

항성 정도가 높아져 있어서, 현재 감수성과 저항성을 결정하는 기준을 잡는다는 것도 어려운 일일 수 있다. 하지만 Fig. 11에서 보는 것과 같이 유전자형과 비교하여 EC50값을 기준으로 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하를 감수성, 이상을 저항성으로 분류하고자 한다.

CYP51 유전자의 염기서열 분석에 사용한 74개 균주들을 분리한 지역으로 나누어 유전자형을 비교하여 보면, Table 6에서 보는 것처럼 A304G형의 304번째 아미노산이 치환된 균주들은 충북의 옥천과 세종에서만 분리되었으며, 가장 감수성으로 나타난 M141V/H446Y형은 원주 지역에서만 분리되었다. 하지만 모든 포장에서 아미노산의 치환이 발견되지 않는 균주들이 분리되었고, 그 중에서 EC50값이 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상인 균주는 하동1과 하동3 포장에서는 각각 55.6%와 57.9%를 차지하였으며, 나주와 옥천 포장은 100%, 세종과 원주는 75.0%와 66.7%를 차지하였다. 이처럼 아미노산의 치환이 없는데도 불구하고 높은 EC50값을 보이는 균주들의 저항성 기작에 대해서는 계속적인 연구가 더 필요할 실정이다.

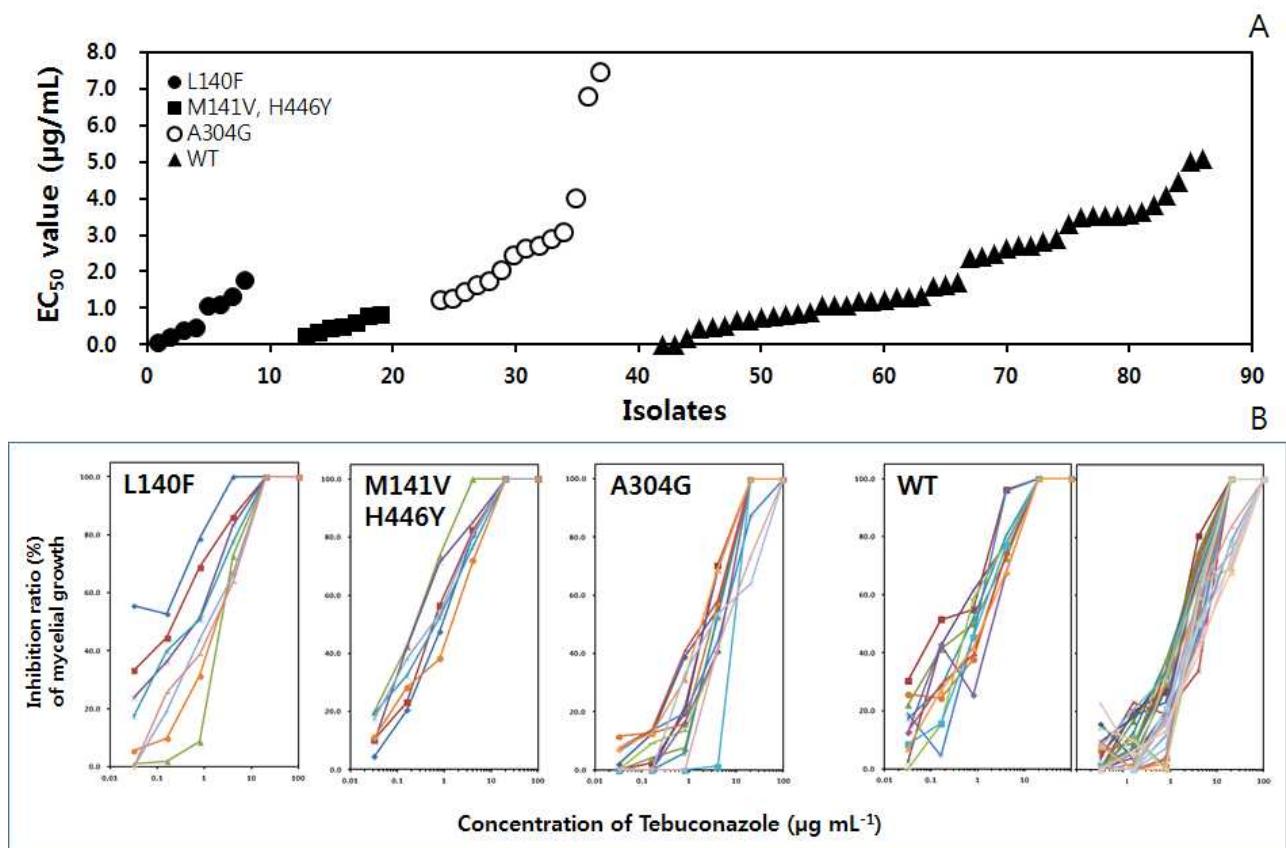


Fig. 10. The EC_{50} distribution and sensitivity to tebuconazole by each *cyp51* codon type.

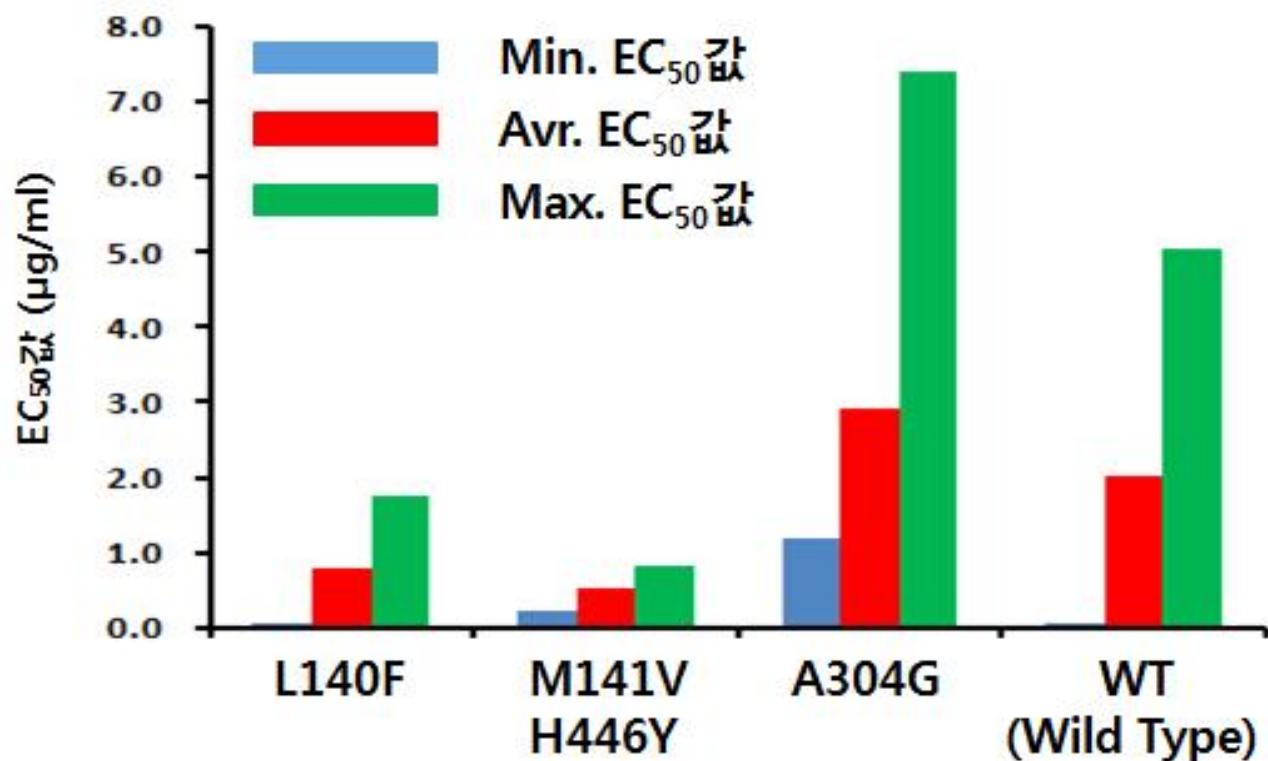


Fig. 11. The comparison of EC50 to tebuconazole by each cyp51 codon type.

Table 6. The EC50 of each cyp51 codon type collected from each pear orchard to tebuconazole

Pear orchard	Codon type	No. of isolates	EC ₅₀ (μg/mL)			
			min.	max.	aver.	>1.0 μg/mL
HD1 ^a	WT	9	0.001	3.558	1.430	55.6%
	L140F	8	0.052	1.757	0.779	
HD3	WT	19	0.001	5.061	1.730	57.9%
NJ	WT	5	3.469	4.991	4.160	100%
OC	WT	2	3.302	3.637	3.470	100%
	A304G	2	3.952	7.405	5.679	
SJ	WT	4	0.783	2.478	1.808	75.0%
	A304G	12	1.179	6.741	2.450	
WJ	WT	9	0.531	3.504	1.680	66.7%
	M141V/H446Y	7	0.211	0.807	0.522	

a; HD; Hadong, NJ; Naju, OC; Okcheon, SJ; Sejong, WJ; Wonju.

(5) 포장집단 대량모니터링

배 검은별무늬병의 병반으로부터 병원균을 분리하여 순수배양체를 얻기까지는 최소한 한 달 이상의 시간이 걸린다. 또한 분리한 순수배양체는 인공배지 상에서 군사 생육이 매우 느릴 뿐만 아니라 분생포자가 전혀 형성되지 않기 때문에 모니터링을 실시하는데 어려움이 많다. 또한 분자마커를 이용하여 모니터링을 하기 위해서는 단일한 저항성 기작을 가지고 있어야 하는데, DMI계 살균제의 작용점으로 알려진 CYP51 유전자의 아미노산 치환 이외에도 다른 기작이 있는 것으로 보고되었고, *V. nashicola*를 가지고 실시한 본 연구 결과에서도 작용점 유전자의 아미노산 치환 이외의 기작이 존재할 수 있는 결과를 얻었기 때문에 분자마커를 이용한 모니터링도 용이하지는 않다고 생각한다(Fig. 12).

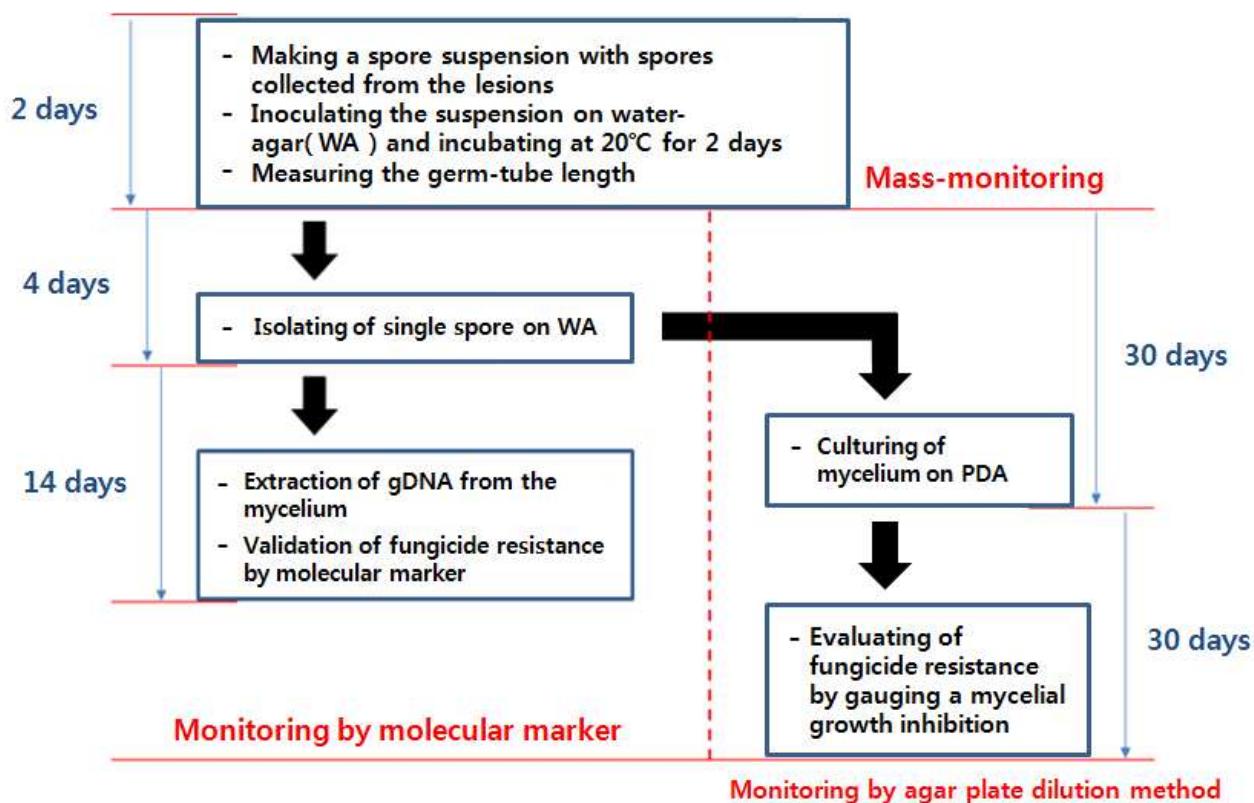


Fig. 12. The scheme of three different methods for fungicide resistance monitoring in *V. nashicola*.

Fig. 12에서 보는 것과 같이 일반적으로 사용하는 한천희석법을 사용하여 배 검은별무늬병균의 살균제 저항성을 모니터링 한다면 병원균을 단포자 분리하고 결과를 얻기까지 최소한 2달의 시간이 소요된다. 분자마커를 이용한 모니터링이 가능하다고 해도 약 2주간의 시간이 소요되는 것은 말할 것도 없고, DMI계 살균제에 대한 저항성 분자마커를 찾는 것 자체가 어려움이 있다. 따라서 본 실험에서는 포장의 병든 조직 위에 형성된 분생포자를 수확하여 모두 합친 분생포자 혼탁액을 만들어 살균제를 첨가한 배지에서 분생포자 발아실험을 실시하였다. DMI계 살균제는 식물병원균의 분생포자 발아를 억제하지 못하고, 발아한 발아관의 신장을 억제하기 때문에 발아한 분생포자의 발아관 길이를 측정하여 살균제의 효과를 조사하는 방법을 사용하였다. 이 방법은 순수분리한 균주를 사용하는 것이 아니라, 포장의 모든 병원균 포자 집단을

사용하기 때문에 균주의 살균제에 대한 반응을 조사하는 것이 아니라 포장 집단이 살균제에 대해서 어떤 반응을 보이고 있는지를 알 수 있는 방법으로 병원균 포장 집단의 살균제 반응에 대한 경향을 알 수 있는 방법이라고 할 수 있다.

① 살균제의 분생포자 발아관 신장 억제 효과

병든 식물체를 채집한 8개 포장에서 획득한 분생포자를 가지고 실험한 결과는 Table 7과 같았다. 하동1과 나주1포장을 제외한 나머지 포장에서 획득한 분생포자를 모두 모아 혼탁액을 만들어 실험한 결과, 0.08 µg/mL의 tebuconazole을 함유한 물한천배지에서 발아한 포자의 발아관 신장을 전혀 억제하지 못하였다. 다만 세종 포장에서 획득한 포자의 경우 17.1%의 억제효과를 보였을 뿐이었다. 하지만 하동1과 나주1포장에서 획득한 포자에 대한 발아관 신장 억제율은 동일한 농도에서 29.3과 34.6%이었으며, 이들 포장에서 획득한 분생포자는 다른 지역의 분생포자 집단과는 다르게 2.0 µg/mL부터 0.016 µg/mL까지 tebuconazole을 첨가한 모든 배지에서 발아관 신장을 약 28%에서 30% 사이를 유사하게 억제하고 있었다. 발아관 신장 억제 양상은 하동1과 울산 포장의 결과를 보여주는 Fig. 13에서 더 뚜렷하게 구별할 수 있었다.

Table 7. The inhibition ratio of the germ-tube length of each spore

Field ^c	Concentration of tebuconazole (µg/mL)					
	0.016	0.08	0.4	2	10	50
HD1	30.99 ^a	29.33	28.32	28.09	38.52	74.44
NJ1	29.92	34.66	28.88	30.90	53.78	75.83
SJ	12.82	17.13	18.87	22.19	38.24	68.98
ULS	3.78	0.00	0.00	11.52	23.92	70.47
HD3	2.77	5.14	0.76	16.95	37.86	68.20
WJ1	0.00	6.00	19.08	10.75	45.01	59.22
MU	1.36	0.00	2.75	12.29	26.46	70.43
OC	0.00	0.00	0.00	2.57	17.72	55.45

a; The spore suspension was prepared with the field spore population harvested from lesions on diseased leaves and young fruits directly collected from pear orchard in 2014 for mass-monitoring against tebuconazole.

b; Germ tube growth was measured on each water agar medium amended with each indicated concentration of tebuconazole under a light microscope. It was observed germ tube length of one hundred conidium per a replicate.

c; HD1 and HD3 was Hadong, NJ1 was Naju, SJ was Sejong, ULS was Ulsan, WJ1 was Wonju, MU was Munui, and OC was Okcheon.

Fig. 14에서 보는 하동1 포장과 울산 포장에서 *V. nashicola*를 각각 34균주와 17균주를 단포자 분리하여 한천희석법으로 tebuconazole에 대한 반응을 조사하였다. 두 포장에서 분리한 각

균주의 tebuconazole에 대한 EC50값을 구하여 분포도를 비교하여 보면 하동1 포장에서는 4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 EC50값을 갖는 균주가 전혀 발견되지 않았던 반면에, 울산 포장에서는 17.6%의 포자가 4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 EC50값을 갖는 균주로 나타났다. 두 포장에서 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하의 EC50값을 균주의 비율도 하동1 포장의 경우가 64.7%, 52.9%의 분포를 보인 울산 포장보다 높았다. 결국 균주 집단의 tebuconazole에 대한 반응에서 감수성 경향을 보이는 지역의 균주 집단의 경우, 포장에서 형성된 분생포자를 획득하여 포자발아 실험을 할 경우 Fig. 13에서 보는 것과 같이 하동1과 같은 발아관 신장 억제율의 곡선을 나타내었다. 본 실험의 결과, 포장에서 직접 획득한 병원균의 포자 집단을 이용하여 발아관 시장 억제를 조사할 경우 포장 집단을 구성하는 병원균 중에서 tebuconazole에 대한 감수성 경향을 보이는 균주의 비율이 높을 경우 하동1과 같은 억제 양상을 보였다. 이와 같은 실험은 포장에서 획득한 포자를 모두 혼탁하여 만든 집단을 살균제를 첨가한 물한천배지에 접종하고 2일 후에 결과를 조사하기 때문에 매우 신속하게 포장의 병원균 집단의 살균제에 대한 저항성 경향을 알 수 있으나, 어느 정도의 균주가 저항성인지의 여부를 알 수 있는 정확도는 떨어지는 것으로 나타났다.

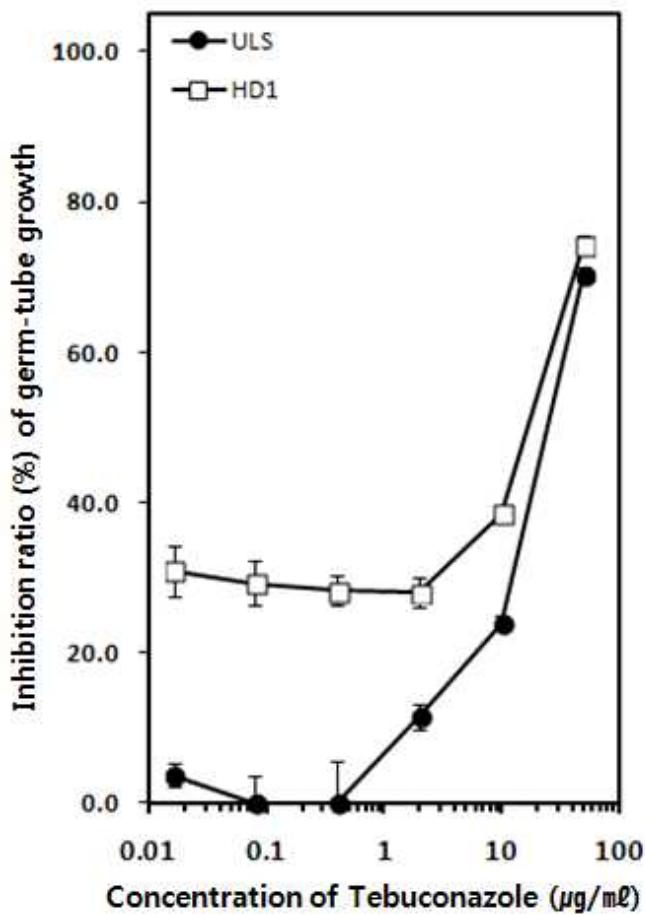


Fig. 13. Inhibition of germ-tube growth by variable concentrations of tebuconazole by mass monitoring in HD1 and ULS field population.

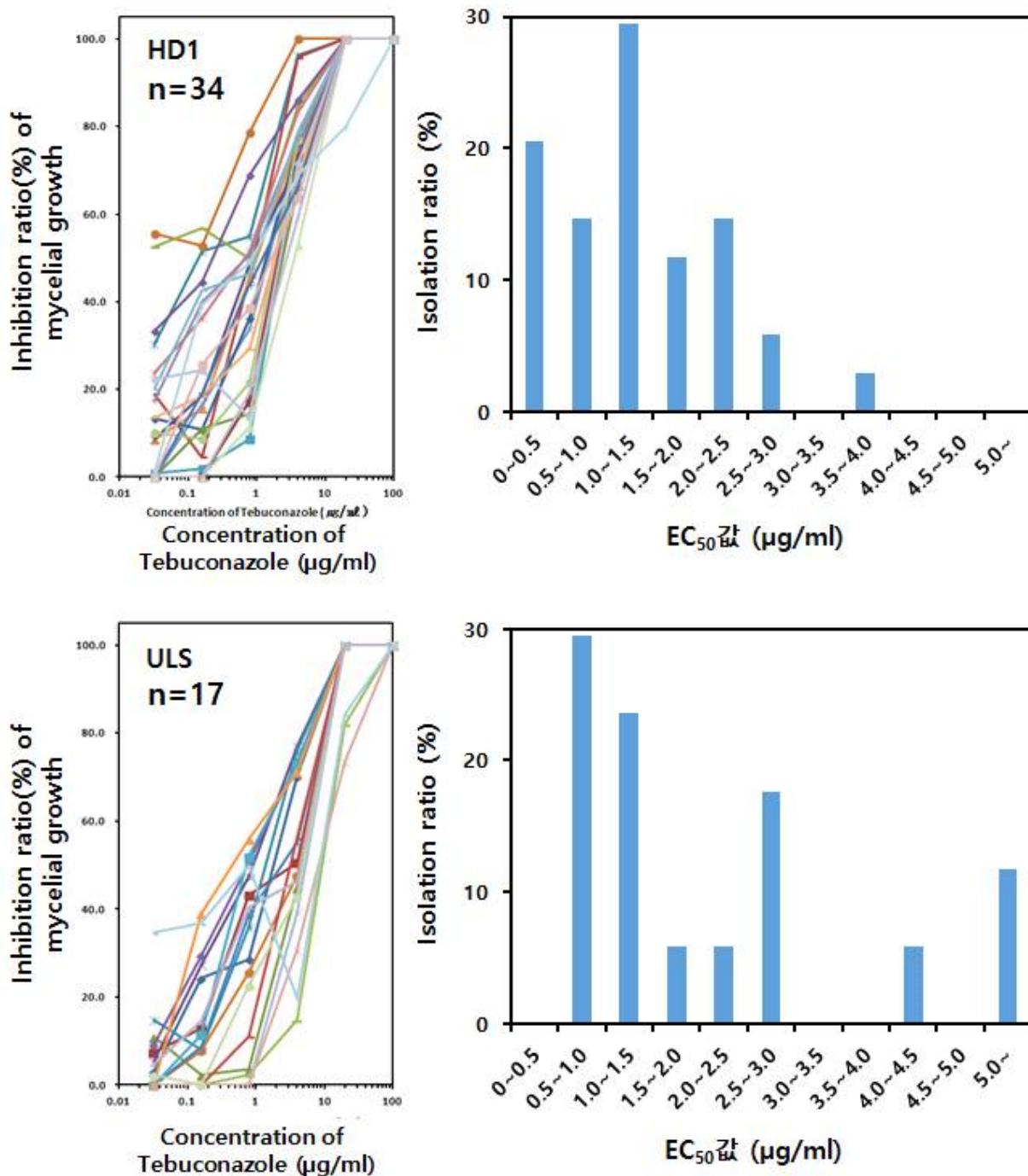


Fig. 14. Inhibition of mycelial growth and the EC_{50} distribution to tebuconazole of individual isolates from HD1 and ULS field.

② 병원균 포장 집단의 발아관 신장

DMI계 살균제는 포자의 발아를 억제하는 살균제가 아니기 때문에 살균제를 처리하여도 대부분의 포자가 발아한다. 하지만 발아 후 발아관의 신장은 억제하기 때문에, tebuconazole의 처리구마다 조사한 100개의 포자에서 발아관 길이의 분포를 비교하였다. Fig. 15에서 보는 것과 같이 각 처리구의 포자 발아관의 길이 분포를 조사해 보면, tebuconazole에 대한 포장 집단의 반응이 감수성 경향을 보이는 집단으로 나타난 하동(HD1) 포장의 경우 무처리구의 최빈값

의 구간은 60~80 μm 이었다. 가장 긴 발아관을 갖는 포자들도 140~160 μm 의 구간에 분포하였다. 하지만 모든 tebuconazole 처리구에서 포자 발아관의 분포를 보면 최빈값의 구간은 40~60 μm 이었으며, 0.016, 0.08, 0.4, 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 tebuconazole 처리구에서는 100~120 μm 구간에서 각각 1.2, 3.0, 3.1, 2.8%의 균주가 분포하였으며, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리구에서는 80~100 μm 구간에서 4.0%의 포자가 분포하였다. 하지만 저항성 경향을 보인 울산(ULS) 포장에서는 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리구를 제외한 모든 처리구에서 무처리구와 동일하게 최빈값의 구간이 60~80 μm 구간이었다. 또한 120~140 μm 구간에는 조사한 포자의 8.7, 13.6, 12.2, 9.3%가 각각 분포하였다. 하지만 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리구의 분포 형태는 감수성 경향을 보이는 포장과 동일하였다.

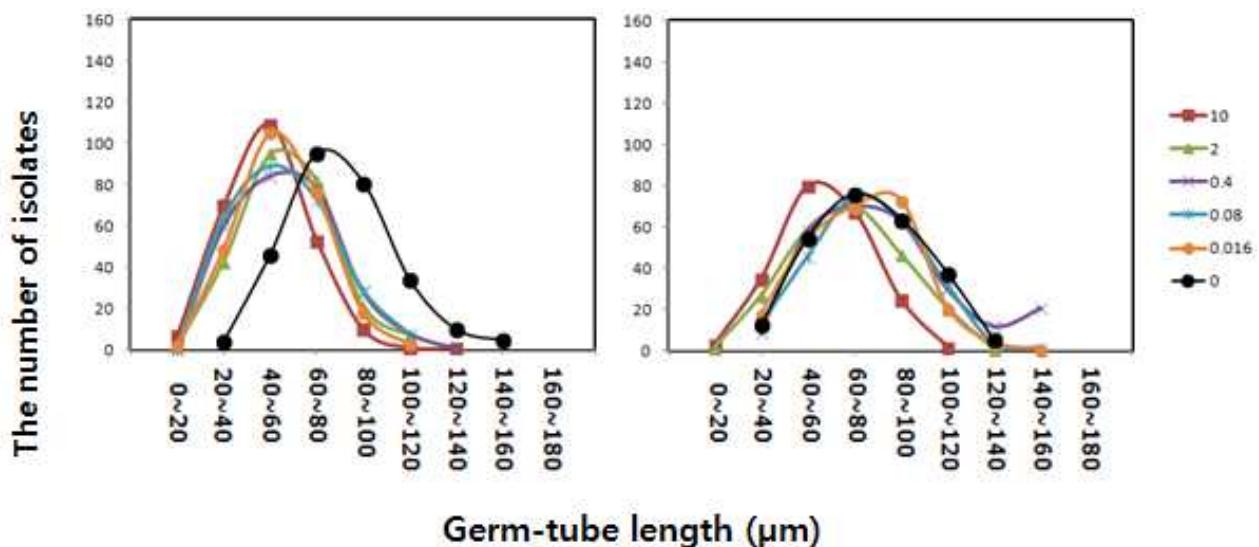


Fig. 15. Distribution curve of a germ-tube length of the field population by each concentration of tebuconazole at length intervals of 20 μm . Left; HD1, Sensitive-tendency field population, Right; ULS, Resistant-tendency field population.

③ 발아관 억제율 분포 분석

Tebuconazole을 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리하였을 때 감수성 경향을 보이는 HD1포장과 저항성 경향을 보이는 ULS포장 집단에서 각 포자에 대한 억제율의 분포를 보면 60~80%를 억제하는 구간에 68.7~72.4%의 포자가 분포하였다. 하지만 감수성 경향을 보이는 포장 집단에서는 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하의 농도로 tebuconazole을 처리하였을 경우 각 농도의 처리구에서 모든 포자의 억제율 분포를 보면, 가장 낮은 구간인 0~20% 구간에 분포하는 포자의 비율이 다음 구간에서는 높아지거나 비슷하게 유지되다가 감소하는 양상을 보이고 있는데 비해서, 저항성 경향을 보이는 포장 집단에서는 모든 처리구에서 0~20%의 구간에 가장 많은 포자가 분포하고 억제율이 높아지는 구간에 분포하는 포자의 비율은 급속하게 감소하였다. 결국 저항성 경향을 보이는 포장 집단의 포자들은 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 tebuconazole 처리를 제외한 나머지의 모든 처리구에서 가장 낮은 억제효과의 구간인 0~20%의 구간에 제일 많은 포자가 있는 것을 알 수 있었다. 하지만 감수성 경향을 보이는 포장 집단의 경우에는 0~20%의 구간 부터 40~60%의 구간까지 80% 이상의 포자들이 분포하고 더 높은 억제율의 구간에서는 포자의 비율이 낮아지고 있었다(Fig. 16).

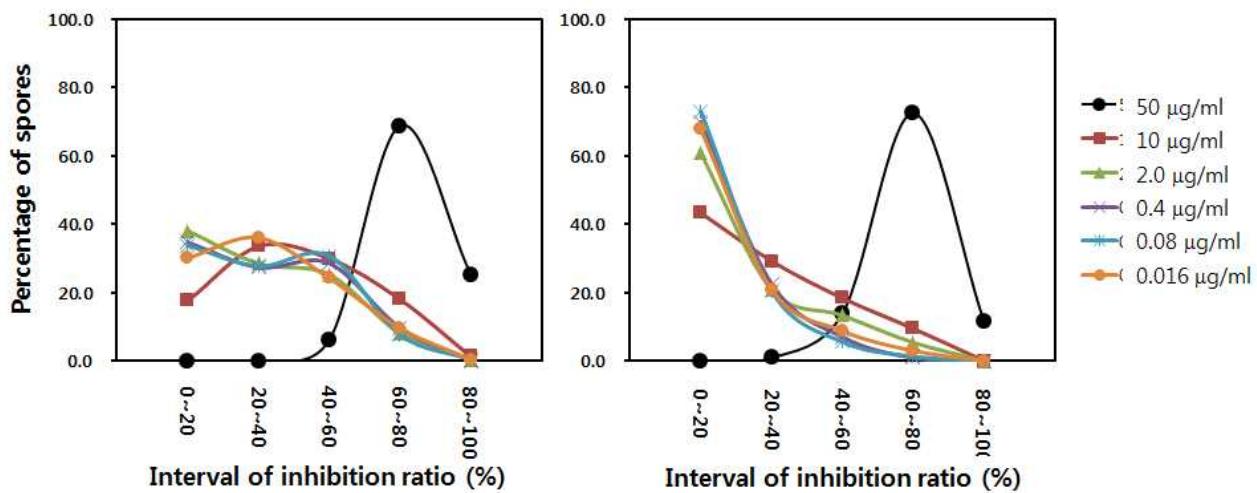


Fig. 16. Distribution curve of a germ-tube growth inhibition of the field population by each concentration of tebuconazole at ratio intervals of 20%. Left; HD1, Sensitive-tendency field population, Right; ULS, Resistant-tendency field population.

④ 개체모니터링과의 비교 분석

대량모니터링의 신뢰성을 확보하기 위해 각 포장집단에서 단포자를 분리하여 얻은 균주를 사용하여 살균제에 대한 저항성을 개체 모니터링으로 실시한 결과, 감수성 경향이 보였던 포장집단인 HD1(하동군)포장은 EC50값의 평균이 가장 낮은 $1.394 \mu\text{g}/\text{mL}$ 로 나왔으며, 저항성 경향을 보이던 6개 포장의 병원균 포장집단의 경우에는 WJ1(원주시)포장, HD3(하동군)포장, SJ(세종특별자치시)포장, OC(옥천시)포장, MU(문의면)포장, ULS(울산광역시)포장에서 각각 $1.426 \mu\text{g}/\text{mL}$, $1.948 \mu\text{g}/\text{mL}$, $2.163 \mu\text{g}/\text{mL}$, $2.338 \mu\text{g}/\text{mL}$, $2.599 \mu\text{g}/\text{mL}$, $2.966 \mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 모두 HD1 포장보다 높은 EC50값 평균을 보였다. 반면 감수성 경향을 보였던 나주포장(NJ1)은 저항성 경향을 보이는 포장집단보다 높은 EC50값 평균인 $2.638 \mu\text{g}/\text{mL}$ 를 보여주었다(Table 8). 각 균주의 EC50값의 분포도를 살펴본 결과 HD1포장에서는 $0\sim0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 약 20% 가량의 균주가 분포하였으며, $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 이상에서는 균주가 존재하지 않았다. 하지만 NJ1포장의 경우에는 $0\sim0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 균주가 거의 존재하지 않으며, $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 이상에서도 많은 균주가 발견되었다. 이는 나머지 저항성 경향을 보이는 포장집단인 6개의 포장과 비슷한 경향을 나타낸 것이다 (Fig. 17).

Table 8. The EC50 of individual isolates collected from the pear orchard monitored tebuconazole sensitivity with the field population

Sensitivity trend in mass-monitoring	Field ^a	Number of isolates	EC ₅₀ value ($\mu\text{g/mL}$)
Sensitive-tendency	HD1	34	1.394 (± 0.833)
	NJ1	30	2.638 (± 1.285)
Resistant-tendency	WJ1	57	1.426 (± 1.060)
	HD3	19	1.948 (± 1.180)
Resistant-tendency	SJ	23	2.163 (± 1.263)
	OC	50	2.338 (± 1.953)
	MU	30	2.599 (± 1.135)
	ULS	17	2.966 (± 2.859)

a; HD; Hadong, NJ; Naju, WJ; Wonju, SJ; Sejong, OC; Okcheon, MU; Munui, ULS; Ulsan.

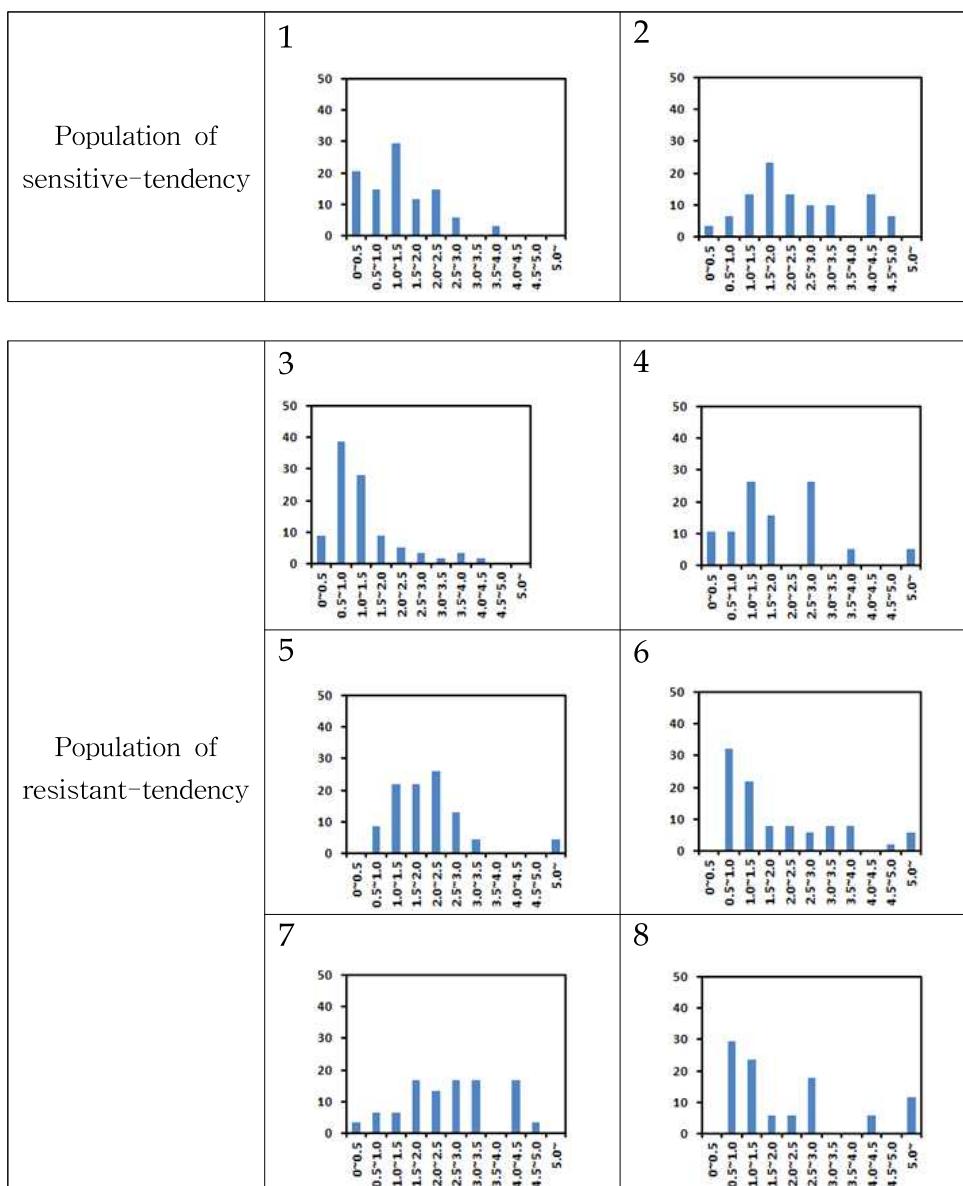


Fig. 17. The EC₅₀ distribution of individual isolates collected from the pear orchard to be mass-monitored to tebuconazole. 1; HD1, 2; NJ1, 3; WJ1, 4; HD3, 5; SJ, 6; OC, 7; MU, 8; ULS.

⑤ 2015년도 채집한 포장집단의 대량모니터링

2015년도 43개의 포장에서 병반을 채집하여 대량모니터링을 진행한 결과 43개의 포장 모두 0.016 µg/mL과 0.08 µg/mL농도에서 0~20%의 억제율을 보였다. 이는 2014년도에 resistance-tendency로 생각한 포장과 비슷한 값으로 2015년도에는 2014년도에 비해 *V. nashicola*의 tebuconazole에 대한 저항성 정도가 증가한 것을 간접적으로 알 수 있었다(Table 9). 억제율 그래프를 확인해 보았을 때 43개의 포장 모두 저항성 경향을 보이는 집단에 몰려있었으며, 감수성 경향을 보이는 집단과 비슷한 경향을 보이는 포장집단은 한 포장도 존재하지 않았다(Fig. 18).

Table 9. The sensitivity trend to tebuconazole at the specific concentration of the field populations collected in 2015

Sensitivity trend	Field population	Inhibition ratio(%)		Sensitivity trend	Field population	Inhibition ratio(%)	
		0.016a	0.08			0.016	0.08
R	15VNASGD	5.96	8.92	R	15VNOCGB	5.30	12.99
R	15VNCASG	8.39	6.13	R	15VNOCOC	4.76	6.94
R	15VNCASH	0.00	0.00	R	15VNPTAJ	0.00	1.31
R	15VNCHJNS	11.73	8.18	R	15VNPTAJGG	3.03	11.95
R	15VNCJNE	1.63	6.76	R	15VNPTAJH	0.00	10.59
R	15VNCNYS	6.02	8.42	R	15VNPTGD	6.19	8.58
R	15VNESSS	5.90	9.73	R	15VNPTHDS	4.01	5.66
R	15VNGNHD1	0.00	0.00	R	15VNSAGG	2.92	12.89
R	15VNGNHD2	8.99	9.48	R	15VNSAJ1	17.35	14.12
R	15VNGNHD3	8.32	1.26	R	15VNSAJ2	5.57	8.67
R	15VNHCN	2.41	5.45	R	15VNSAMY	15.28	19.12
R	15VNHS1	7.12	2.46	R	15VNSJ1	1.11	1.32
R	15VNHS2	0.00	0.00	R	15VNSJ2	0.00	2.92
R	15VNHS3	6.29	11.30	R	15VNSJ3	0.00	8.17
R	15VNHS4	0.01	5.78	R	15VNSJ4	0.00	0.00
R	15VNHS5	0.00	0.00	R	15VNYDYG	0.00	4.29
R	15VNHS6	0.96	1.30	R	15VNYDYS	0.00	0.96
R	15VNICDW	5.12	3.98	R	15VNUJUB	6.42	6.88
R	15VNJCGB	3.42	4.93	R	15VNINC	2.74	7.21
R	15VNJNSC1	9.48	16.17	R	15VNPTDY	0.56	2.09
R	15VNJNSC2	0.00	0.00	S	14VNHD1	30.99	29.33
R	15VNJNSC3	7.51	1.83	R	14VNULS	3.78	0.00
R	15VNOCAN	8.95	20.78				

a; Concentration (µg/mL) of tebuconazole.

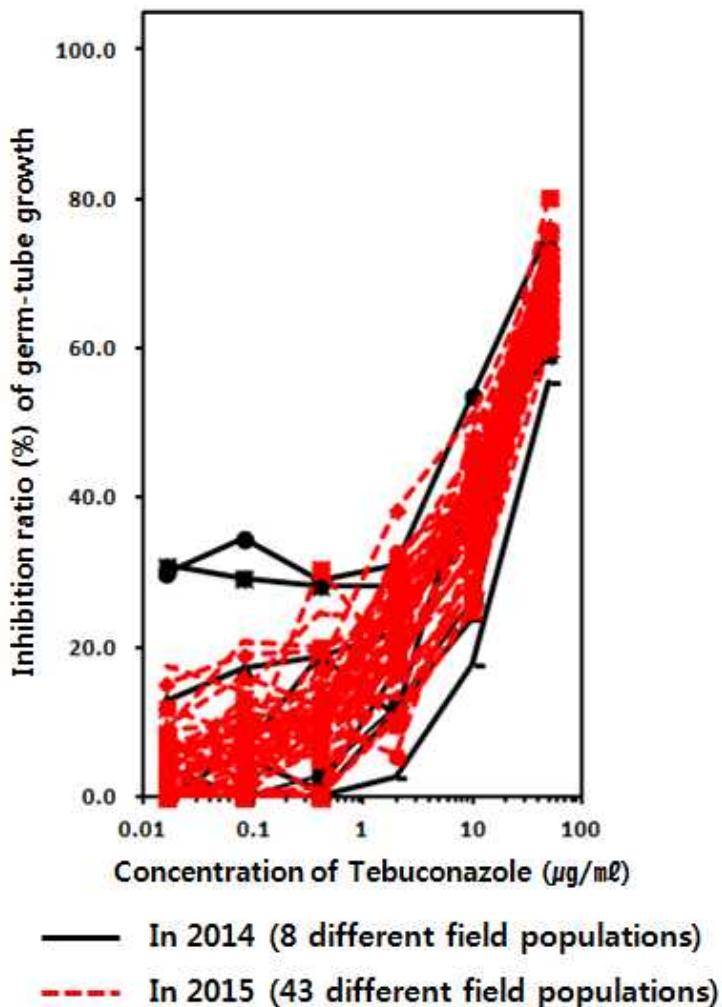


Fig. 18. Inhibition patterns of the germ-tube growth on tebuconazole by mass-monitoring with the field populations collected in 2014 and 2015.

3) 고찰

배 검은별무늬병균(*Venturia nashicola*)은 오래전부터 배 과원에 피해를 주는 주요 병원균 중 하나로 이 병을 관리하기 위하여 1980년도 중반부터 EBI 살균제를 사용하였다. EBI 살균제를 사용하기 직후에도 살균제에 대한 병원균의 저항성 발현에 대해서 관리가 중요하게 생각되었고, 실제로 2006년도 EBI에 속하는 DMI계 살균제에 대해 감수성 정도가 떨어지는 균주들이 출현하였다고 보고되었다(엄, 2010). 따라서 2014년도와 2015년도 현재 국내 주요 배 과원에서 *V. nashicola*를 채집하여 DMI계 살균제인 tebuconazole과 difenoconazole에 대한 감수성 수준을 알아보고자 본 실험을 진행하였다. 실험에 사용한 배지는 생육속도가 가장 빠른 Ca(NO₃)₂를 첨가한 PDA배지로 하였고, 유(2014)에 의하면 Ca(NO₃)₂를 첨가한 PDA배지는 배의 과육, 성엽, 과피, 과즙, 유엽을 갈아 만든 배지에서 보다도 생육속도가 가장 빠르다고 알려져 있다. 병원균 채집은 2014년도에 충청북도, 충청남도, 경상남도, 전라남도, 세종특별자치시, 강원도, 울산광역시에서 이루어졌으며, 2015년도에는 경기도와 경상북도에서 이루어졌다. 각 채집한 병원균을 단포자 분리하여 isolates를 얻은 후 한천희석법을 이용하여 실험을 진행한 결과 tebuconazole에 대한 반응에서는 울산광역시에서 EC₅₀값의 평균이 3.170 µg/mL으로 가장 높게 나왔으며, 충청북도, 전라남도, 세종특별자치시에서도 각각 2.560 µg/mL, 2.697 µg/mL,

2.169 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 전체의 평균 EC50값인 2.107 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 보다 높게 나왔다. 반면 충청남도에서는 가장 낮은 값인 1.207 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 나왔다. 하지만 충청남도에서 채집한 병원균의 EC50값의 최대값과 최소값을 살펴보면 최대값이 최소값의 약 9배정도 높은 것을 볼 수 있었다. 울산광역시에서 채집한 병원균은 EC50값의 최대값과 최소값이 각각 9.735 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 0.642 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 약 15배정도 차이나는 것을 볼 수 있으며, 전체 병원균의 EC50값의 최대값과 최소값은 약 80배정도 차이 나는 것을 알 수 있었다. 이전에 tebuconazole에 대한 반응을 조사한 결과가 없어서 비교를 할 수는 없지만, 현재 병원균의 약제 반응을 보았을 때, 저항성이 많이 발현된 균주가 있을 것이라 라고 추측할 수 있었다. Difenoconazole에 대한 반응으로는 울산광역시, 충청북도, 경기도에서 각각 EC50값 평균이 2.133 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1.401 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1.519 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 높은 값을 보였으며, 충청남도에서 0.278 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 가장 낮은 값을 보였다. 엄(2010)의 논문에 따르면 2007년도에 전라남도 나주시에서 채집한 *V. nashicola*의 두 포장에 대한 EC50값 평균은 각각 0.052 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.055 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 였으며, 울산광역시에서 채집한 병원균 두 포장에 대한 EC50값 평균은 각각 0.031 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.047 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었다. 2014년도 전라남도 나주시에서 채집한 병원균의 EC50값 평균은 0.365 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 였으며, 울산광역시에서 채집한 병원균의 EC50값 평균은 2.133 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었다. 이는 2006년도에 비해 2014년도에 나주시에서 약 7배 정도의 EC50값 증가가 있었고, 울산광역시에서 약 50배 이상의 EC50값 증가가 있었다는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과로 보아 현재 difenoconazole에 대한 *V. nashicola*의 저항성 정도가 매우 증가하였다는 것을 알 수 있었다. 그리고 배 검은별무늬병을 방제하기 위해서 등록된 살균제 수는 2015년도에 단제가 48종, 혼합제가 38종인데, 이중 difenoconazole과 같은 DMI계 살균제가 유효성분으로 들어가 있는 살균제 수는 단제에서 27종, 혼합제에서는 26종인 것으로 되어 있다. 이처럼 동일한 작용 기작을 갖는 살균제가 한 가지 식물병 방제에 집중적으로 사용되고 있는 현실은, 이 살균제와 동일한 기작을 갖는 살균제 모두에 대한 병원균의 저항성 정도가 계속적으로 증가하게 되는 원인을 제공하고 있으며, 포장에서의 사용량이 계속 증가될 수 있다는 가능성을 보여주고 있다.

다음 실험은 DMI계 살균제의 저항성 기작을 알아보기 위한 실험으로 현재 DMI계 살균제에 대한 저항성 기작은 타겟 유전자(CYP51)의 아미노산 치환, CYP51 유전자의 과발현(overexpression), ABC-transporter에 의한 살균제 펌핑이 있다. 이 중에 CYP51유전자의 아미노산 치환과 EC50값을 서로 비교하기 위해 실험을 진행하였다. CYP51 유전자를 증폭한 결과 140번째, 141번째, 304번째, 446번째의 아미노산에서 치환이 있었으며, 각 유전자형을 가진 병원균의 EC50값을 구해본 결과 140번째 leucine에서 phenylalanine으로의 치환을 가진 균주는 EC50값이 1.757 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 넘지 않는 균주만 존재하였고, 141번째 아미노산의 치환과 446번째 아미노산의 치환은 동시에 일어났으며 각각 methionine에서 valine으로, histidine에서 tyrosine으로 치환이 일어났었다. 141번째와 446번째 아미노산의 치환을 가진 균주는 EC50값이 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 넘어가는 균주가 존재하지 않았으며 304번째 아미노산의 치환은 alanine에서 glycine으로의 치환으로 EC50값이 1.179 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 넘는 균주만 존재하였다. 또한 치환이 일어나지 않은 wild type(WT)은 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 5.061 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 병원균이 다양하게 분포하고 있었다. 아미노산 치환에 의해 저항성이 발현되는 경우는 *M. graminicola*의 CYP51 유전자 중 I381V의 변이가 저항성 발현에 가장 많은 영향을 준다고 보고되었고, Délye 등(1997)도 *Uncinula necator*에서 triadimenol에 대한 저항성이 아미노산의 mutation에 의해 충분히 저항성 수준이 올라갈 수 있다고 보고하였다. 따라서 *V. nashicola*에서도 EC50값이 1.179 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상에서만

나타나는 304번째 아미노산의 치환도 저항성 기작일 것으로 생각된다. 하지만 WT의 경우에도 높은 EC50값을 가지는 병원균이 다수 존재하므로 다른 저항성 기작인 과발현 또는 ABC-transporter가 발현되었을 가능성도 배제할 수는 없다.

현재 *V. nashicola*에 대해 DMI계 살균제의 저항성 반응을 알기 위해서는 저항성 마커를 통한 검출과 한천희석법을 이용한 검출방법이 널리 알려져 있다. 하지만, 앞의 실험에서 알 수 있듯이 저항성 기작이 한 가지가 아닌 여러 가지 기작에 의해 발생하므로 모든 저항성 균주를 검출해 낼 수 없다는 단점이 존재하였고, 한천희석법은 *V. nashicola*의 특성상 인공배지에서 생장이 매우 느리기 때문에, 결과를 얻기까지 약 60일 이상의 시간이 소요된다. 따라서 두 가지 방법의 단점을 보완하기 위하여 tebuconazole에 대한 포장집단 대량모니터링을 실시하였고, 그 결과 2014년도에 채집한 포장집단에서 2가지 양상을 보이는 포장집단을 발견하였는데, 하나는 감수성 경향을 보이는 포장집단이었고, 다른 하나는 저항성 경향을 보이는 포장집단이었다. 감수성 경향의 집단에는 하동(HD1)포장과 나주(NJ1)포장이, 저항성 경향의 집단에는 하동(HD3)포장, 울산(ULS)포장, 세종(SJ)포장, 문의(MU)포장, 옥천(OC)포장, 원주(WJ1)포장이 포함되었다. 두 가지 경향을 띠는 집단들을 비교하기 위하여 각 농도의 살균제를 처리한 곳에서의 포자 발아관 길이의 분포와 포자 발아관 억제율 분포를 비교해 보았다. 그 결과 포자 발아관 길이의 분포에서는 살균제를 처리한 곳에서는 모든 포장에서 서로 차이가 거의 없었으나, 살균제를 처리하지 않은 무처리구에서의 발아관 길이 분포 곡선은 감수성 경향의 포장 집단에서 살균제를 처리한 곳에서의 발아관 길이 분포 곡선에 비해 발아관 길이가 더 긴 포자가 많이 존재하여 발아관 길이가 긴 쪽으로 이동한 것처럼 보였으며, 저항성 경향의 포장 집단에서는 살균제를 처리한 곳에서의 발아관 길이나 무처리구에서의 발아관 길이가 크게 차이나지 않아 분포 곡선에서 큰 차이가 나지 않아 겹쳐 보이는 양상을 띠어 양 집단의 차이를 보여주었다. 발아관 억제율 분포에서는 저항성 경향의 포장 집단의 경우 억제율이 낮은 곳으로 갈수록 균주가 많이 분포하는 양상을 보였지만, 감수성 경향의 포장 집단의 경우 억제율이 낮은 곳으로 갈수록 균주가 많이 분포하는 것이 아니라 살균제 처리 농도에 따라 균주 분포가 증가하다가 감소하는 농도도 존재하며 증가하다가 다시 감소하고 다시 소량 증가하는 경향을 보였다. 이로써 2014년도에 채집한 포장 집단은 두 가지 경향을 보이는 집단으로 나눌 수 있었으며, 이를 기반으로 2015년도 채집한 43개의 포장 집단을 대량모니터링한 결과 모두 저항성 경향을 보이는 포장과 비슷한 양상을 띠는 것을 알 수 있었다. 따라서 대량모니터링을 이용하여 저항성 수준을 비교한 결과 2014년도에 비해 2015년도에는 tebuconazole에 대한 저항성 정도가 증가한 것을 알 수 있었다. 간편하고 빠른 포장집단 대량모니터링의 정확성을 알아보기 위해 포장집단 대량모니터링에 사용한 포장에서 단포자 분리하여 각각의 개체 균주를 얻어 개체 모니터링을 한 결과 감수성 경향 포장에 속하는 HD1포장에서는 가장 낮은 EC50값 평균을 가졌으며, 저항성 경향 포장에 속하는 6포장은 모두 HD1포장보다 높은 EC50값 평균을 나타냈다. 하지만 NJ1 포장의 경우에는 저항성 경향 포장에 속하는 포장보다 높은 EC50값을 보여주었으며, EC50값 분포도를 살펴본 결과 저항성 경향을 보이는 집단과 비슷한 경향을 보이는 것을 알 수 있었다. 이는 포장집단 대량모니터링에서는 각 농도별 살균제를 처리한 배지에 서로 다른 포자를 접종하여 조사 결과에도 오차가 생길수 있으며, 개체 모니터링에 비해 정확도는 조금 떨어진다고 볼 수 있다. 하지만 Stevenson 등(2010)에 의하면 *Fusicladium effusum*에 대해 포장집단에서 병원균을 채집하여 포자를 수확하여 살균제를 첨가한 배지에 포자를 도말한 후 자란 균총의 길이를 현미경으로 측정하여 저항성 정도를 측정하는 실험에서는 대량모니터링의 정확도가 매

우 높다고 알려져 있고, *V. nashicola*의 특성을 고려하면 빠른 시간 안에 포장집단의 경향치를 볼 수 있다는 큰 장점을 가지고 있으므로 간이법으로는 충분히 가치 있는 방법이라 생각한다.

제3절. strobilurin계 살균제에 대한 배 검은별무늬병균의 저항성

1. 연구방법

(1) 실험에 사용한 병원균

① 병반 채집과 병원균의 분리

*V. nashicola*는 화염 멸균한 메스를 이용하여 잎자루, 엽병, 유과 등의 병반에 형성된 포자를 긁어 포자 혼탁액을 만들었다. 이 때 혼탁액에는 세균의 오염을 방지하기 위해서 streptomycin 을 300 µg/mL가 되도록 첨가하였으며, 포자의 밀도는 1~4 × 10⁴ spores/mL로 조절한 후, 물 한천 배지(한천 농도; 1.5%)에 100 µL씩 접종하고 20°C 배양기에서 48시간 배양하였다. 병원균의 단포자 분리를 위하여 현미경에서 발아한 포자를 확인한 후 떼어내어 PDA배지에서 배양하였다. 또한 strobilurin에 대해서 저항성 수준이 높은 균주를 선발하기 위해서 포장 포자 집단을 최종 농도가 50 µg/mL가 되도록 azoxystrobin(a.i. 98%, Tech.)을 첨가한 물한천 배지에 접종하였다. 이 때 azoxystrobin은 DMSO에 용해시킨 후 배지에 적정농도가 되도록 첨가하였는데, DMSO의 최종 농도는 1%가 넘지 않도록 조절하였다. Azoxystrobin이 첨가된 물한천 배지에도 포자 혼탁액을 100 µL 도말하고, 20°C에서 48시간 배양하여 단포자를 분리하였다.

② 보관 균주

분리한 *V. nashicola*는 병원균의 균사생장을 촉진하기 위하여 유(2014)가 사용한 Ca(NO₃)₂ (0.5 g/L)를 첨가한 PDA배지에서 20°C 암조건의 배양기에서 배양하였다. 보관은 PDA로 만든 사면배지에 치상하여 4°C에서 보관하며 실험에 사용하였다.

③ 실험에 사용한 병원균

*V. nashicola*는 2015년 6개 배 과원에서 분리한 59균주와 azoxystrobin 50 µg/mL^o 처리된 WA배지에서 분리한 균주는 24균주를 실험에 사용하였다.

(2) Strobilurin계 살균제에 대한 병원균의 균사생장조사

① 실험에 사용한 살균제

실험에는 strobilurin계이며, quinone outside inhibitor(QoI fungicides) 살균제로 알려진 azoxystrobin과 pyraclostrobin을 사용하여 *V. nashicola*의 살균제에 대한 반응을 조사하였다. 인공배지 상에서 병원균의 대체호흡경로를 억제하기 위하여 salicylhydroxamic acid(SHAM; SIGMA-ALDRICH, Lot # STBD3487V, 99%, MW; 153.14)를 살균제 배지에 같이 첨가하여 병원균에 대한 살균제 효과를 조사하였다.

② 한천희석법을 이용한 strobilurin계 살균제의 효과 검정

각각의 살균제를 DMSO에 용해하여, 배지에 정해진 농도로 첨가하였는데, 배지에서 DMSO

의 최종 농도는 1%가 되도록 조절하였다. 또한 배지에서의 세균 오염을 방지하기 위해 300 μ g/mL의 streptomycin을 첨가하였다. 배지에서 살균제의 최종 농도는 10, 2, 0.4, 0.08, 0.016, 0.0032, 0 μ g/mL가 되도록 조정하였고, 대체 호흡을 억제하기 위해서 10 μ g/mL의 SHAM을 첨가하였다. 사용한 배지인 PDA배지에는 병원균의 균사 생장 속도를 높이기 위해 Ca(NO₃)₂를 0.5 g/ℓ의 농도로 첨가하였다. 20°C의 PDA배지에서 한 달간 배양한 병원균의 균사 선단에서 1 × 1 mm의 조각을 떼어내어 약제가 첨가된 PDA배지에 접종하고, 동일한 조건에서 다시 한 달간 배양하였다. 살균제의 효과를 검정하기 위하여 살균제를 첨가한 배지에서 자란 균총의 직경을 측정하였으며, 약제가 첨가되지 않은 무처리구 PDA배지에서 균총의 직경과 비교하여 살균제의 균사 생장 억제율(%)을 아래식으로 계산하였다.

$$\text{균사생장억제율(%)} = \frac{\text{살균제 첨가 PDA배지의 균총의 직경}}{\text{살균제가 첨가되지 않은 PDA배지의 균총의 직경}} \times 100$$

③ 대체호흡저해제가 *V. nashicola*에 대한 strobilurin계 살균제 효과에 미치는 영향

*V. nashicola*에 대한 배지에서의 대체호흡억제제인 SHAM의 농도에 따른 살균제 반응을 조사하기 위해 SHAM의 최종 농도가 100, 20, 5, 2.5, 1.25, 0 μ g/mL가 되도록 배지에 첨가하였다. 이 때 사용한 살균제로는 azoxystrobin을 선발하였으며, 배지의 농도는 10, 2, 0.4, 0.08, 0.016, 0 μ g/mL가 되도록 Ca(NO₃)₂가 추가된 PDA에 첨가하여 약제배지를 준비하였다. 접종 원으로는 20°C의 PDA배지에서 한 달간 배양한 병원균의 균사 선단부에서 1 × 1 mm의 균사 조각을 떼어내어 사용하였다. PDA 배지에는 SHAM을 각각의 농도로 처리하고 각 농도에는 결정한 azoxystrobin의 농도를 각각 처리하여 살균제와 대체호흡 억제제인 SHAM이 공동으로 첨가된 배지를 준비하였다. 각 배지에 병원균의 접종원을 접종하여 20°C에서 30일간 배양한 후 병원균의 직경을 측정하여 대체호흡억제제와 살균제간의 상호작용을 알아보았다.

(3) *V. nashicola*의 포장 접단을 이용한 살균제 저항성 대량검정법 확립

천안시 성거읍, 평택시 고덕면과 안중읍, 순천시 낙안면, 하동군 하동읍의 총 6개 배 과원에서 채집한 검은별무늬병의 병징을 보이는 유과, 엽병, 잎맥 등의 표면에 형성된 분생포자를 멸균된 메스로 긁어내어 300 μ g/mL의 streptomycin 용액에 혼탁하였다. 포자는 동일한 300 μ g/mL streptomycin 용액을 사용하여 3000 rpm에서 10분간 2회 원심분리하여 세척하였다. 포자 혼탁액은 1 × 10⁴ ~ 10⁵ spores/mL 사이로 밀도를 조절하여 실험에 사용하기 위해 준비하였다. 병원균을 분리하기 위하여 azoxystrobin이 각각 50, 10, 2, 0.4, 0.08, 0.016 μ g/mL씩 들어간 물한천 배지를 준비하였으며, 모든 물한천 배지에는 세균의 오염을 방지하기 위해서 streptomycin을 300 μ g/mL씩 넣어주었다. 준비된 각각의 물한천 배지(한천 농도: 1.5%)에 100 μ L의 포자 혼탁액을 떨어뜨려 고루게 접종한 후, 20°C의 암조건 배양기에서 48시간 동안 배양하고 포자 발아율을 현미경으로 관찰하며 조사하였다.

(4) 분자생물학적 기법을 통한 살균제 저항성 검정: 병원균의 cytochrome b 유전자 증폭 및 염기서열 분석

*V. nashicola*는 Ca(NO₃)₂가 추가된 PDA배지에서 3주 배양한 후 round tube(용량: 2 mL)에 담아 -70°C에서 12시간 이상 동결건조 하였다. 동결 건조한 균사체를 beads-beater를 이용하여

마쇄한 후 Hybrid-RTM의 protocol에 따라 병원균의 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 -20°C 보관하며 실험에 사용하였다.

*V. nashicola*의 cytochrome b 유전자 증폭을 위해 Avila-Adame 등(2003)이 사용한 프라이머를 변형하여 *V. inaequalis*의 염기서열과 대조해 Vncytb F5(5'-ACT GCC TCG GCT TTC TTC TT-3'), Vncytb R8(5'-TTA CCC GAC CCA CTA ACG TC-3')를 제작하여 사용하였다. RT-PCR을 진행하기 위해 10 pmole의 각각의 프라이머 1 μL, total RNA(25 ng/ul) 2 μL, 2x HyperscriptTM One-step RT-PCR master mix 8 μL에 멸균 증류수를 첨가하여 최종 20 μL의 PCR mixture를 만들었다. RT-PCR의 반응은 55°C에서 30분간 cDNA를 합성, 94°C에서 5분간 pre-denaturation한 후 94°C에서 40초 동안 denaturation, 54.5°C에서 40초 동안 annealing하고, 72°C에서 50초 동안 extension하는 과정을 35회 반복하였고 마지막으로 72°C에서 5분간 반응시킨 후 종료하였다. PCR 산물을 확인하기 위하여 1X TAE buffer로 1% agarose gel을 만들고 safe viewTM classic을 권장 사용량에 준하여 첨가하여 주었다. 100 V에서 45분간 전기영동을 수행하여 UV-transilluminator를 사용하여 증폭여부를 확인하였다. 증폭이 확인된 시료들에 대해서 PCR SV의 protocol에 따라 정제한 후 macrogen에 증폭된 산물의 염기서열 분석을 의뢰하였다. 분석된 cytochrome b 유전자의 염기서열은 BioEdit ver. 7.0.9.0의 clustal X를 이용하여 정리하였고, MEGA ver. 5.2.1에서 정렬한 후 NCBI GenBank의 염기서열을 획득하여 유연관계를 확인하였다.

2. 연구결과

(1) 국내 주요 병원균의 분리 및 동정

2015년 5개 지역의 배과원에서 분리한 균주 중 천안시 성거읍 11균주, 평택시 고덕읍 14균주, 평택시 안중읍 14균주, 순천시 낙안면2 18균주, 순천시 낙안면3 17균주, 하동군 하동읍 12균주를 실험에 사용하였다(Fig. 1, Table 1). ITS영역을 증폭한 결과 모두 *V. nashicola*로 동정되었다.



Fig. 1. Symptom and colony morphology of *Venturia nashicola* causing pear scab.

Table 1. Isolates of *Venturia nashicola* causing pear scab used in this study

No.	Isolate	Geographical origin	Identification	Host
1	15VNCASG-1	Seonggeo-eup, Cheonan-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
2	15VNCASG-2	Seonggeo-eup, Cheonan-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
3	15VNCASG-3	Seonggeo-eup, Cheonan-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
4	15VNCASG-4	Seonggeo-eup, Cheonan-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
5	15VNCASG-5	Seonggeo-eup, Cheonan-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
6	15VNCASG-6	Seonggeo-eup, Cheonan-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
7	15VNCASG-7	Seonggeo-eup, Cheonan-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
8	15VNPTGD-1	Godeok-myeon, Pyeongtaek-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
9	15VNPTGD-2	Godeok-myeon, Pyeongtaek-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
10	15VNPTGD-3	Godeok-myeon, Pyeongtaek-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
11	15VNPTGD-4	Godeok-myeon, Pyeongtaek-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
12	15VNPTGD-5	Godeok-myeon, Pyeongtaek-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
13	15VNPTGD-6	Godeok-myeon, Pyeongtaek-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
14	15VNPTGD-7	Godeok-myeon, Pyeongtaek-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
15	15VNPTGD-8	Godeok-myeon, Pyeongtaek-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
16	15VNPTGD-9	Godeok-myeon, Pyeongtaek-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
17	15VNPTGD-10	Godeok-myeon, Pyeongtaek-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
18	15VNJNSC2-1	Nakan-myeon, Suncheon-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
19	15VNJNSC2-2	Nakan-myeon, Suncheon-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
20	15VNJNSC2-3	Nakan-myeon, Suncheon-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
21	15VNJNSC2-4	Nakan-myeon, Suncheon-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
22	15VNJNSC2-5	Nakan-myeon, Suncheon-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
23	15VNJNSC2-6	Nakan-myeon, Suncheon-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
24	15VNJNSC2-7	Nakan-myeon, Suncheon-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
25	15VNJNSC2-8	Nakan-myeon, Suncheon-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
26	15VNJNSC2-9	Nakan-myeon, Suncheon-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
27	15VNJNSC2-10	Nakan-myeon, Suncheon-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
28	15VNJNSC2-11	Nakan-myeon, Suncheon-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
29	15VNJNSC2-12	Nakan-myeon, Suncheon-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
30	15VNJNSC2-13	Nakan-myeon, Suncheon-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
31	15VNJNSC2-14	Nakan-myeon, Suncheon-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
32	15VNJNSC3-1	Nakan-myeon, Suncheon-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
33	15VNJNSC3-2	Nakan-myeon, Suncheon-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
34	15VNJNSC3-3	Nakan-myeon, Suncheon-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
35	15VNJNSC3-4	Nakan-myeon, Suncheon-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
36	15VNJNSC3-5	Nakan-myeon, Suncheon-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
37	15VNJNSC3-6	Nakan-myeon, Suncheon-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
38	15VNJNSC3-7	Nakan-myeon, Suncheon-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
39	15VNJNSC3-8	Nakan-myeon, Suncheon-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
40	15VNJNSC3-9	Nakan-myeon, Suncheon-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
41	15VNJNSC3-10	Nakan-myeon, Suncheon-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
42	15VNJNSC3-11	Nakan-myeon, Suncheon-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
43	15VNJNSC3-12	Nakan-myeon, Suncheon-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
44	15VNGNHD2-1	Hadong-eup, Hadong-gun	<i>V. nashicola</i>	Pear
45	15VNGNHD2-2	Hadong-eup, Hadong-gun	<i>V. nashicola</i>	Pear
46	15VNGNHD2-3	Hadong-eup, Hadong-gun	<i>V. nashicola</i>	Pear

47	15VNGNHD2-4	Hadong-eup, Hadong-gun	<i>V. nashicola</i>	Pear
48	15VNGNHD2-5	Hadong-eup, Hadong-gun	<i>V. nashicola</i>	Pear
49	15VNGNHD2-6	Hadong-eup, Hadong-gun	<i>V. nashicola</i>	Pear
50	15VNGNHD2-7	Hadong-eup, Hadong-gun	<i>V. nashicola</i>	Pear
51	15VNGNHD2-8	Hadong-eup, Hadong-gun	<i>V. nashicola</i>	Pear
52	15VNPTAJH-1	Anjung-eup, Pyeongtaek-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
53	15VNPTAJH-2	Anjung-eup, Pyeongtaek-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
54	15VNPTAJH-3	Anjung-eup, Pyeongtaek-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
55	15VNPTAJH-4	Anjung-eup, Pyeongtaek-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
56	15VNPTAJH-5	Anjung-eup, Pyeongtaek-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
57	15VNPTAJH-6	Anjung-eup, Pyeongtaek-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
58	15VNPTAJH-7	Anjung-eup, Pyeongtaek-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
59	15VNPTAJH-8	Anjung-eup, Pyeongtaek-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
60	15VNCASG-A50①	Seonggeo-eup, Cheonan-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
61	15VNCASG-A50②	Seonggeo-eup, Cheonan-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
62	15VNCASG-A50③	Seonggeo-eup, Cheonan-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
63	15VNCASG-A50④	Seonggeo-eup, Cheonan-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
64	15VNPTGD-A50①	Godeok-myeon, Pyeongtaek-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
65	15VNPTGD-A50②	Godeok-myeon, Pyeongtaek-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
66	15VNPTGD-A50③	Godeok-myeon, Pyeongtaek-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
67	15VNPTGD-A50④	Godeok-myeon, Pyeongtaek-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
68	15VNJNSC2-A50①	Nakan-myeon, Suncheon-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
69	15VNJNSC2-A50②	Nakan-myeon, Suncheon-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
70	15VNJNSC2-A50③	Nakan-myeon, Suncheon-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
71	15VNJNSC2-A50④	Nakan-myeon, Suncheon-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
72	15VNJNSC2-A50①	Nakan-myeon, Suncheon-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
73	15VNJNSC3-A50②	Nakan-myeon, Suncheon-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
74	15VNJNSC3-A50③	Nakan-myeon, Suncheon-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
75	15VNJNSC3-A50④	Nakan-myeon, Suncheon-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
76	15VNJNSC3-A50⑤	Nakan-myeon, Suncheon-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
77	15VNGNHD2-A50①	Hadong-eup, Hadong-gun	<i>V. nashicola</i>	Pear
78	15VNGNHD2-A50②	Hadong-eup, Hadong-gun	<i>V. nashicola</i>	Pear
79	15VNGNHD2-A50③	Hadong-eup, Hadong-gun	<i>V. nashicola</i>	Pear
80	15VNGNHD2-A50④	Hadong-eup, Hadong-gun	<i>V. nashicola</i>	Pear
81	15VNPTAJH-A50①	Anjung-eup, Pyeongtaek-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
82	15VNPTAJH-A50②	Anjung-eup, Pyeongtaek-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
83	15VNPTAJH-A50③	Anjung-eup, Pyeongtaek-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
84	15VNPTAJH-A50④	Anjung-eup, Pyeongtaek-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
85	15VNPTAJH-A50⑤	Anjung-eup, Pyeongtaek-si	<i>V. nashicola</i>	Pear
86	15VNPTAJH-A50⑥	Anjung-eup, Pyeongtaek-si	<i>V. nashicola</i>	Pear

(2) 한천희석법을 이용한 strobilurin계 살균제의 저항성 기준 결정

① 대체호흡억제제 SHAM이 strobilurin계 살균제 효과에 미치는 영향

*V. nashicola*의 모니터링을 위하여 대체호흡억제제로서 배지에 첨가한 SHAM이 농도에 따라서 모니터링하고자 하는 살균제의 균사생장 억제효과에 영향을 미치는지를 조사하였다. Azoxystrobin을 정해진 각각의 농도가 되도록 첨가한 PDA배지에 SHAM을 각각 20 µg/mL와 10 µg/mL를 첨가한 후, 첨가하지 않은 배지에서의 azoxystrobin의 효과와 SHAM을 첨가한 배지에서의 효과를 비교하였다. VNWJ1-2의 경우 SHAM의 농도에 상관없이 azoxystrobin 10~

0.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도까지 100% 억제되었으나, 나머지 3균주는 azoxystrobin 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서만 100% 억제되었다. Azoxystrobin 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에 SHAM의 무처리와 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리하였을 때 4 균 모두 억제율에 큰 차이를 보이지 않았으나(Fig. 2A, B) SHAM 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 처리하였을 때 VNNJ27^o VNWJ1-2와 함께 100% 억제되었다(Fig. 2C).

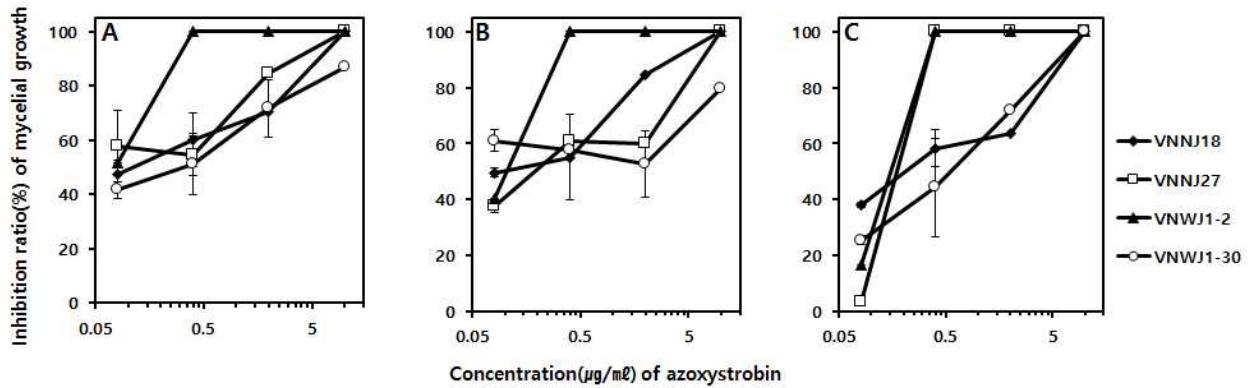


Fig. 2. Effects of SHAM on the inhibitory activity of azoxystrobin against mycelial growth of *Venturia nashicola* causing pear scab. SHAM was poured into potato dextrose agar medium by the each indicated concentration. A; PDA medium without SHAM as a untreated control, B; PDA amended with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of SHAM, and C; PDA with 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of SHAM.

하지만 PDA 배지에 첨가하는 SHAM의 농도가 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상이 되면 azoxystrobin을 첨가하지 않은 PDA 배지에서 조차 병원균의 균사 생장이 크게 억제되었기 때문에 균사 생장을 크게 억제하지 않는 농도인 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 첨가하여 살균제 저항성 모니터링을 실시하기로 하였다.

② 한천희석법을 통한 주요 병원균의 균사생장억제율: *V. nashicola*에 대한 azoxystrobin과 pyraclostrobin의 균사생장억제

PDA배지(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 SHAM과 Ca(NO₃)₂ 첨가)에서 azoxystrobin과 pyraclostrobin에 대한 *V. nashicola*의 균사생장억제율을 구하였다(Fig. 7). Azoxystrobin에 대한 EC₅₀값의 평균은 6.83, 최소값은 0.01, 최대값은 96.17이었고, pyraclostrobin에 대한 EC₅₀값의 평균은 1.52, 최소값은 0.01, 최대값은 10.83이었다(Table 6). 두 약제간의 균사생장억제의 경향은 비슷하게 나타났으나 pyraclostrobin에 비하여 azoxystrobin의 EC₅₀값의 평균값과 최대값이 더 높게 나타났다. 균주들에 대한 각각의 EC₅₀값을 정렬하고 최소억제농도(MIC) 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 기준으로 이보다 작은 경우를 감수성, 10보다 큰 경우 저감수성으로 분류하였다(Figure. 7. B., D.). Azoxystrobin과 pyraclostrobin에 대한 EC₅₀값을 MIC 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 기준으로 분류하였을 때 각각 35균주, 20 균주가 저감수성으로 나타났다.

6개 배 과원에서 채집한 배 검은별무늬병 병징에서 얻은 분생포자 중 azoxystrobin 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 발아한 균주들과 무처리구에서 단포자 분리한 균주들 간의 균사생장 억제율을 비교하였다(Figure. 8.). 천안시 성거읍, 평택시 고덕읍, 평택시 안중읍의 3개 과원에서 포자발아억제

율과 균사생장억제율의 경향이 비슷하게 나타났으나 순천시 낙안면2, 3 과원에서는 포자발아억제율에 비해 균사생장억제율의 경향이 더 높게 나타났고, 하동군 하동읍에서는 균사생장억제율보다 포자발아억제율의 경향이 더 높게 나타났다.

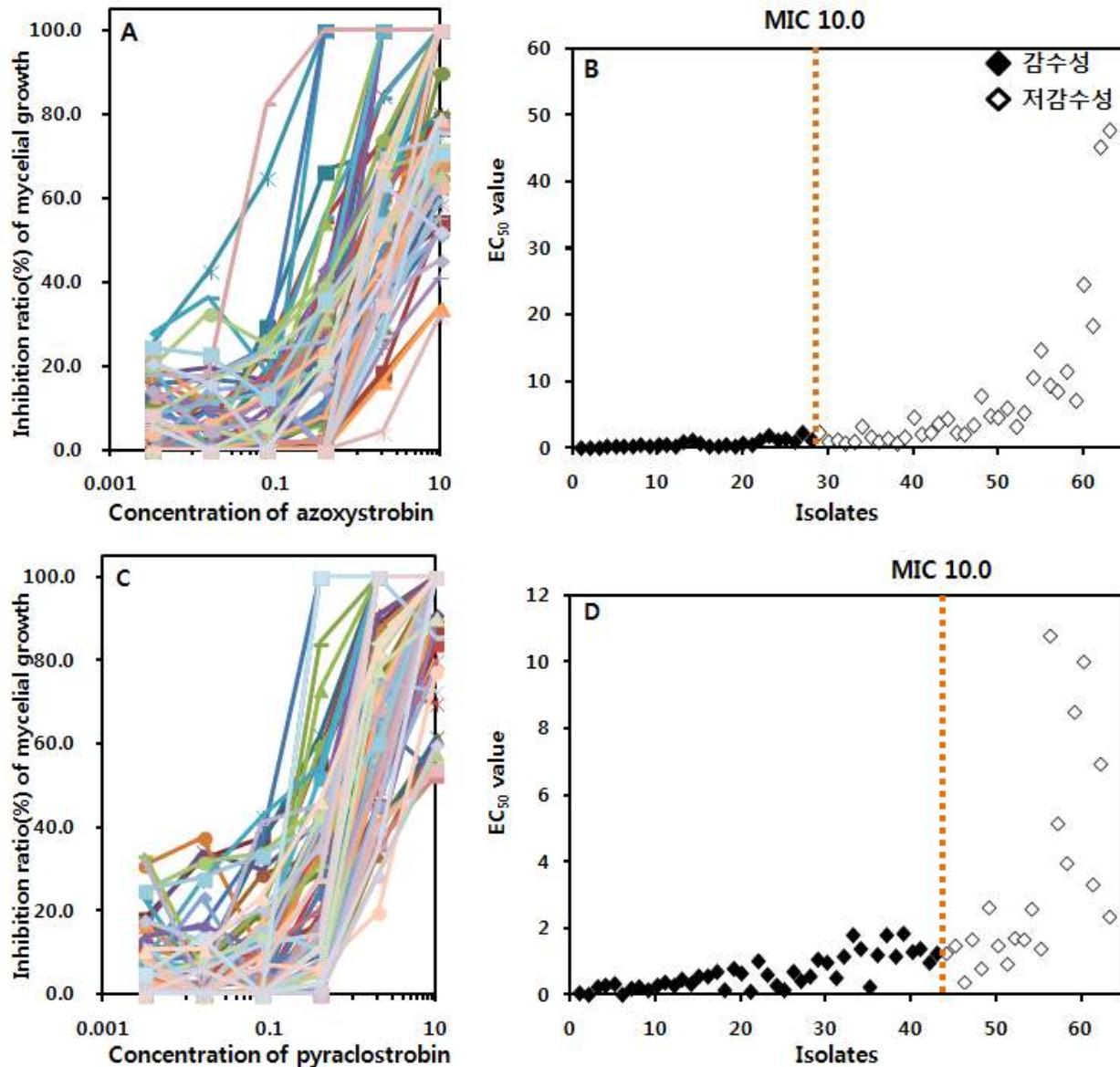


Fig. 7. Effects of azoxystrobin (A) and pyraclostrobin (C) on the mycelial growth of *Venturia nashicola* at 20°C, and the distribution of EC₅₀ value of the pear scab pathogen against each strobilurin fungicide as azoxystrobin (B) and pyraclostrobin (D). Baseline sensitivity was determined as 10.0 µg/mL of minimum inhibitory concentration (MIC).

Table 6. EC₅₀ value (µg/mL) of *Venturia nashicola* to strobilurin fungicides and resistant factor

Fungicides ^a	SHAM ^b	EC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) value ^c			Rf value ^d
		Average	Minimum	Maximum	
Azoxystrobin	-	3.33	0.01	47.76	4776
	+	4.55	0.20	[REDACTED]	[REDACTED]
Pyraclostrobin	-	0.64	0.02	1.73	[REDACTED]
	+	1.65	0.11	[REDACTED]	[REDACTED]

a; Each fungicide was poured into potato dextrose agar medium by indicated concentrations.

b; Applied concentration of SHAM was 50 µg/mL.

c; EC₅₀ value means the concentration inhibiting mycelial growth on PDA by 50%.

d; Rf value means resistance factor value, calculating as follows; $RF = \frac{\text{maximum EC50 value}}{\text{minimum EC50 value}}$.

Table 7. EC₅₀ value of *Venturia nashicola* on potato dextrose medium with 10 µg/mL of salicylhydroxamic acid against azoxystrobin and pyraclostrobin and according to regions

Regions	Azoxystrobin				Pyraclostrobin			
	Minimum	Maximum	RF value ^b		Minimum	Maximum	RF value	
Cheonan	0.39 ^a	0.01	1.02	102	0.70	0.02	4.02	201
Pyeongtaek 1	1.13	0.28	4.34	15.5	0.51	0.12	1.27	10.58
Pyeongtaek 2	4.08	0.03	11.46	382	2.49	0.01	10.05	1005
Suncheon 2	10.35	0.43	96.17	223.65	1.10	0.23	6.07	26.39
Suncheon 3	10.75	0.05	54.73	1094.6	2.05	0.15	10.83	72.2
Hadong	10.66	1.04	47.76	45.92	2.09	0.41	7.05	17.20

a; Figures indicated as EC50($\mu\text{g}/\text{mL}$) value, which means inhibitory concentration of mycelial growth by 50%.

b; RF value means resistance factor value, calculating as follows; $RF = \frac{\text{maximum EC50 value}}{\text{minimum EC50 value}}$.

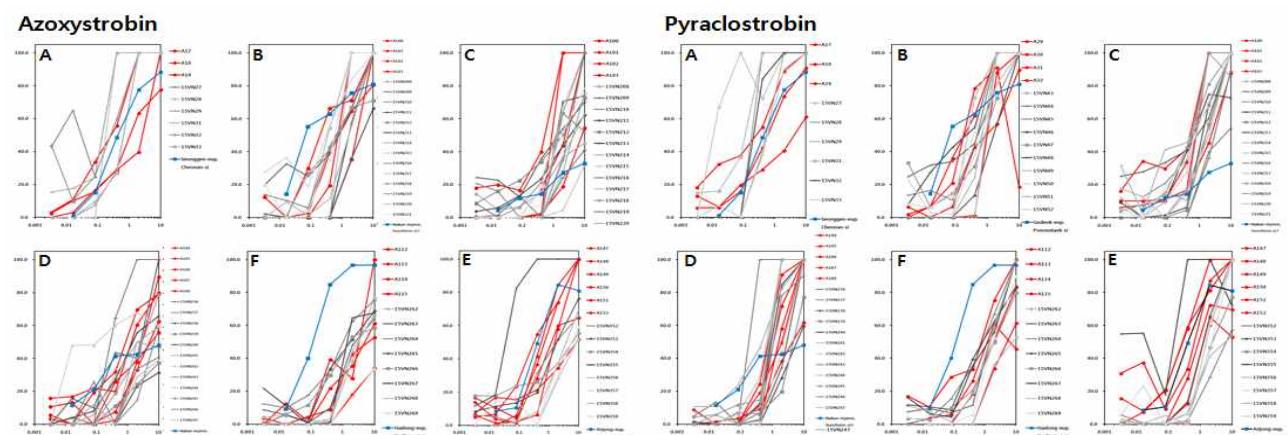


Fig. 8 Inhibition ratio of *Venturia nashicola* isolated from each orchard located in each

region to azoxystrobin and pyraclostrobin. Red lines indicated as the response to each fungicide of *V. nashicola* isolate obtained from PDA amended with 50 µg/mL of azoxystrobin through a single spore isolation, whilst gray lines indicated as the response to each fungicide of *V. nashicola* isolate obtained from PDA without azoxystrobin. Blue line indicated inhibition ratio of spore germination. A; Seonggeo of Cheonan-si, B; Godeok of Pyeongtaek-si, C; Nakan of Suncheon-si, D; Nakan of Suncheon-si, F; Hadong of Hadong-gun, E; Anjung of Pyeongtaek-si.

③ Strobilurin계 살균제 효과 검정을 위한 다양한 검정법 개발: *V. nashicola*에 대한 strobilurin계 살균제 저항성 대량 모니터링

Azoxystrobin의 농도에 따른 *V. nashicola*의 포자발아억제율을 확인하기 위하여 약제가 섞인 물한천배지(WA)에서 실험을 수행하였다. 배 과원에서 채집한 배 검은별무늬병 병징으로부터 수확한 포자들을 약제 배지에 도말하여 포자발아억제율을 구하였고(Fig. 14.), 이를 바탕으로 살균제에 대한 과원의 대표 EC50값을 구하였다. 천안시 성거읍의 EC50값은 0.617, 평택시 안중읍의 EC50값은 0.605, 평택시 고덕읍의 EC50값은 0.178, 하동군 하동읍의 EC50값은 0.136, 순천시 낙안면 2의 EC50값은 47.118, 순천시 낙안면 3의 EC50값은 5.377이었다. Azoxystrobin 2 µg/mL를 기준으로 천안시 성거읍, 평택시 안중읍, 평택시 고덕읍, 하동군 하동읍과 순천시 낙안면 2, 3의 2가지로 그룹지을 수 있었다. 이 두 그룹은 azoxystrobin이 가장 높게 처리되는 농도인 50 µg/mL에서 90%이상 억제되거나 70%이하로 억제되는 2가지 그룹과 동일하게 나타났다.

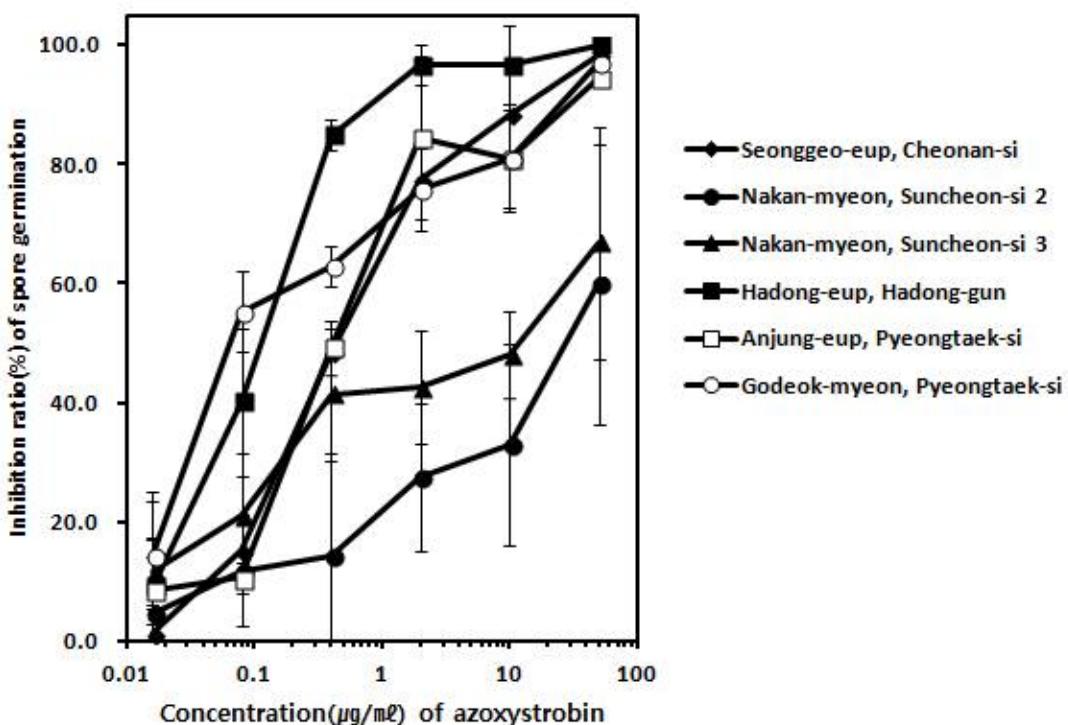


Fig. 14. Mass monitoring of conidia of *Venturia nashicola* obtained from diseased young fruits and leaves of pear. It was conducted sampling the diseased pear in 6 orchard, which

were located to 4 regions as Cheonan, Suncheon, Hadong, and Pyeongtaek. In one orchard, 9 disease samples were obtained at least 5 position of the orchard. After harvesting all the conidia of *V. nashicola* obtained at a orchard, conidial suspension adjusted to 1×10^3 conidia/mL was flooded onto PDA with or without azoxystrobin by ??? μL . After incubating conidia at 20°C for 2 days, conidial germination ratio was investigated by observing 100 conidia per a replicate under a light microscope.

④ *V. nashicola*의 cytochrome b 유전자 분석

*V. nashicola*의 total RNA로부터 cDNA를 합성하여 PCR을 수행하여 병원균의 미토콘드리아 내 cytochrome b 유전자를 증폭하였다. RT-PCR을 수행한 결과 86균주 모두 374 bp 크기의 증폭 산물이 확인되었다(Fig. 20.B). *V. nashicola*의 cytochrome b 유전자내 60번째 아미노산부터 184번째 아미노산까지 증폭된 산물에 대하여 염기서열과 아미노산 서열을 분석한 결과 증폭된 범위 안에서의 아미노산 치환이 확인되지 않았다(Fig. 22.).

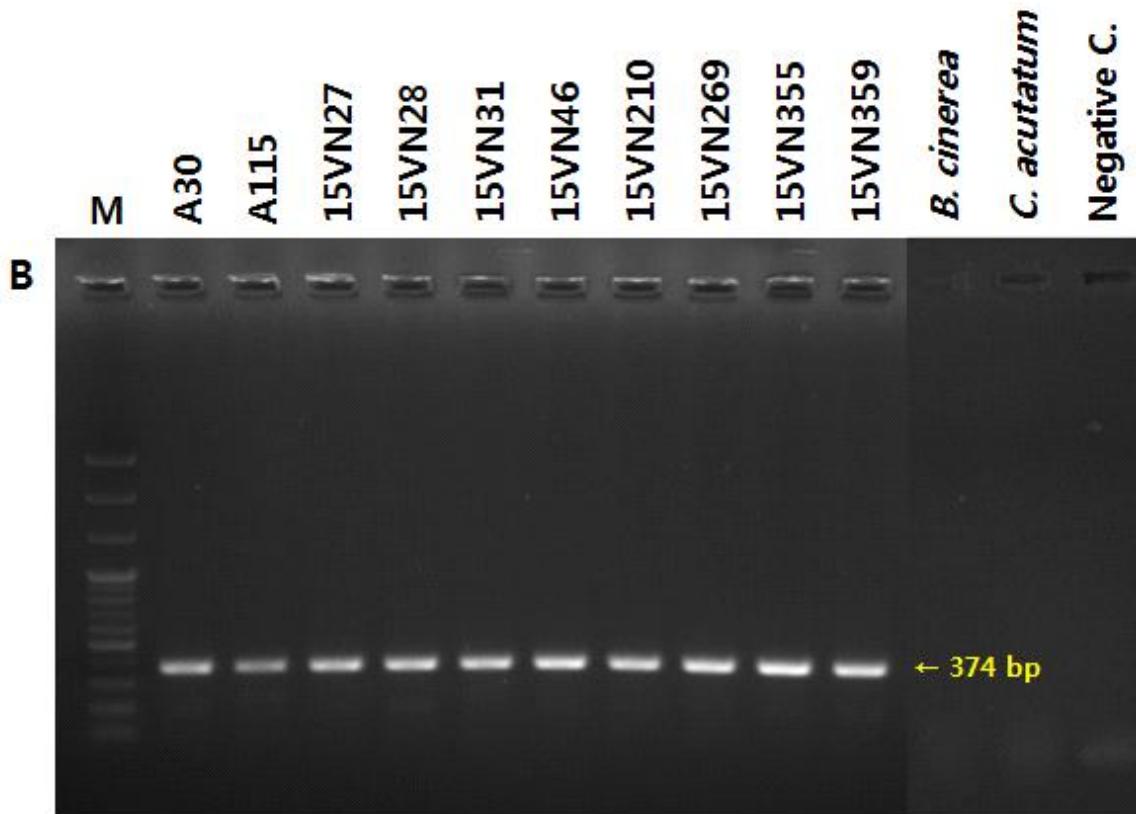


Fig. 20. Agarose gel electrophoresis of amplified cytochrome b gene, obtained with RNA of *Venturia nashicola* isolated from each pepper, pear and using Cacytb-P2, Cacytb-R primers and Vncytb F5, Vncytb R8 primers. M; 100 bp marker.

	129th	143rd
A30	... T T C C C T G G G G T T A T G T T T T A C C T T A T G G T C A A A T G T C G C T A T G G G G T G C A . . .	
A115	... T T C C C T G G G G T T A T G T T T T A C C T T A T G G T C A A A T G T C G C T A T G G G G T G C A . . .	
15VN46	... T T C C C T G G G G T T A T G T T T T A C C T T A T G G T C A A A T G T C G C T A T G G G G T G C A . . .	
15VN210	... T T C C C T G G G G T T A T G T T T T A C C T T A T G G T C A A A T G T C G C T A T G G G G T G C A . . .	
15VN269	... T T C C C T G G G G T T A T G T T T T A C C T T A T G G T C A A A T G T C G C T A T G G G G T G C A . . .	
15VN359	... T T C C C T G G G G T T A T G T T T T A C C T T A T G G T C A A A T G T C G C T A T G G G G T G C A . . .	
15VN27	... T T C C C T G G G G T T A T G T T T T A C C T T A T G G T C A A A T G T C G C T A T G G G G T G C A . . .	
15VN28	... T T C C C T G G G G T T A T G T T T T A C C T T A T G G T C A A A T G T C G C T A T G G G G T G C A . . .	
15VN31	... T T C C C T G G G G T T A T G T T T T A C C T T A T G G T C A A A T G T C G C T A T G G G G T G C A . . .	
15VN355	... T T C C C T G G G G T T A T G T T T T A C C T T A T G G T C A A A T G T C G C T A T G G G G T G C A . . .	
	129th	143rd
A30	... F L G Y V L P Y G Q M S L W G A . . .	
A115	... F L G Y V L P Y G Q M S L W G A . . .	
15VN46	... F L G Y V L P Y G Q M S L W G A . . .	
15VN210	... F L G Y V L P Y G Q M S L W G A . . .	
15VN269	... F L G Y V L P Y G Q M S L W G A . . .	
15VN359	... F L G Y V L P Y G Q M S L W G A . . .	
15VN27	... F L G Y V L P Y G Q M S L W G A . . .	
15VN28	... F L G Y V L P Y G Q M S L W G A . . .	
15VN31	... F L G Y V L P Y G Q M S L W G A . . .	
15VN355	... F L G Y V L P Y G Q M S L W G A . . .	

Fig. 22. Nucleotides and amino acids sequence of amplified cytochrome b gene, obtained with RNA of *Venturia nashicola*. Checking the gray box that single amino acid mutations are frequently occurring region.

<제3협동과제: 배 검은별무늬병을 위한 약제 저항성 예측 및 방제 프로그램 개발>

본 연구에서 수행할 내용은 배 검은별무늬병 방제 설명서 및 약제 혼용 정보에 대한 전자책 개발, 방제 이력 및 혼용 프로그램, 그리고 약제 저항성 알림을 위한 프로그램 등 3 가지로 구성되어 있다. 방제 이력 및 혼용 프로그램은 약제 저항성 프로그램으로 최종적으로 통합되었다(그림1).

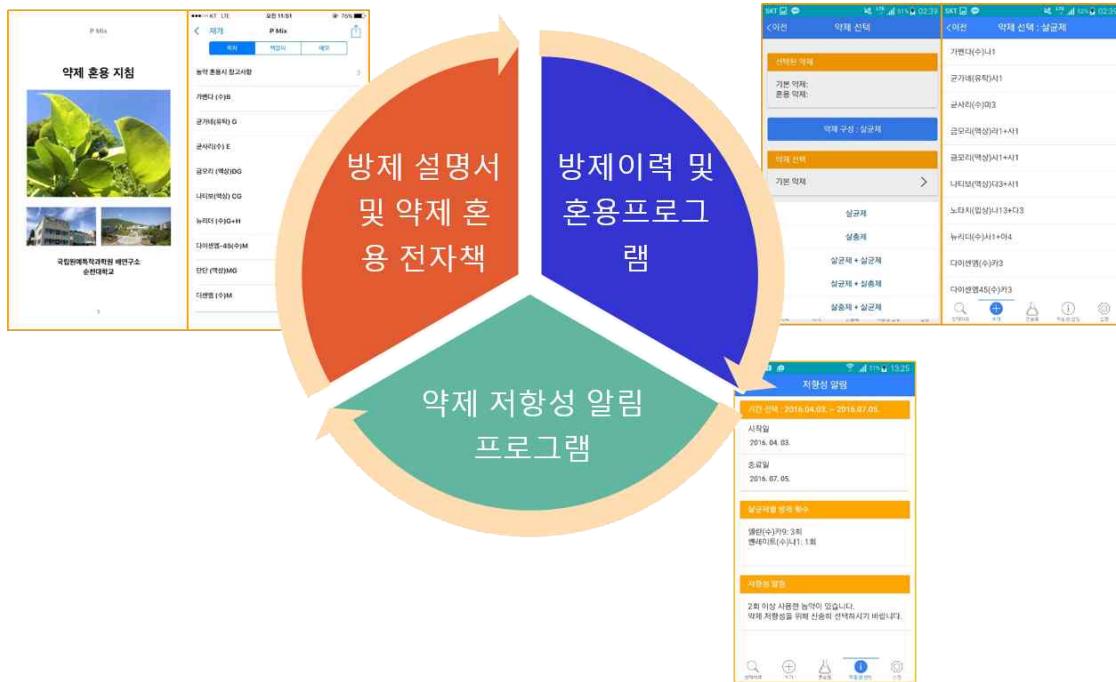


그림 1. 연구 수행 내용 및 결과

제1절 방제 이력

1. 농가 방제 이력 모듈 개발

국내외의 관련 프로그램을 조사, 분석한 결과를 분석한 결과를 토대로 국내 여건에 맞도록 설계하고 개발하였다. 프로그램 사용자가 중장년층이 포함될 것을 고려하여 사용자 편이성, 시인성, 가독성을 최대한 높일 수 있도록 했으며 가능한 단순한 사용자 인터페이스를 적용하여 설계하였다.

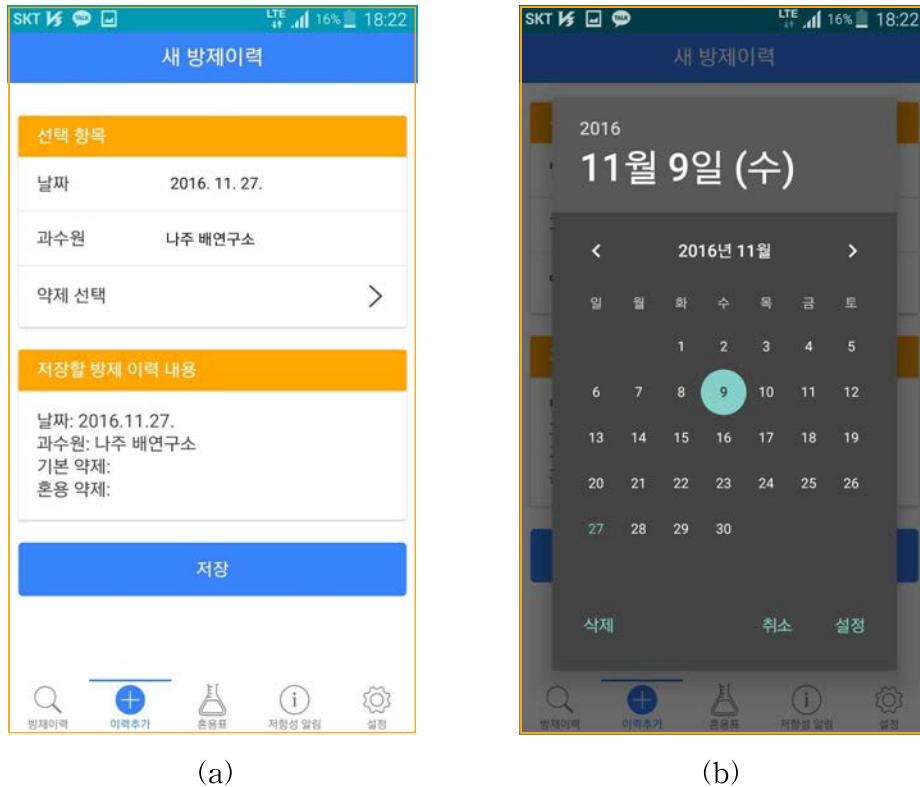
방제 이력 모듈은 다음과 같은 사항을 고려하여 설계하였다.

- 간편한 약제 선택 방법을 고려한 설계
- 약제 혼용을 고려한 방제 이력 모듈 설계
- 약제 살포 이력을 쉽게 볼 수 있도록 설계
- 화면 가독성과 시인성 향상을 위한 디자인

방제 이력을 구성하는 정보는 입력이 간편하도록 단순화하였다.

- 방제 일자
- 방제 장소(과수원)
- 약제 종류
- 약제명
- 저장할 방제 이력 내용

<그림 2>(a)는 최종적으로 통합된 약제 저항성 프로그램에서 새로운 방제 이력을 추가하는 화면을 보여 주고 있다. 화면의 하단에 보면 ‘방제이력’, ‘이력추가’, ‘흔용표’, ‘저항성 알림’, ‘설정’ 등 5 개의 탭이 있다. 이 중 어떤 탭이 선택되면 탭의 색깔이 회색에서 파란색으로 변하게 된다. 아래 그림에서 ‘이력추가’ 탭이 파랗게 나타난 것을 볼 수 있다. <그림 2>(b)는 약제를 살포한 날짜를 입력하는 화면이다. 달력 화면에서 입력하고자 하는 날짜를 손가락으로 탭을 함으로써 손쉽게 입력할 수 있도록 하였다.



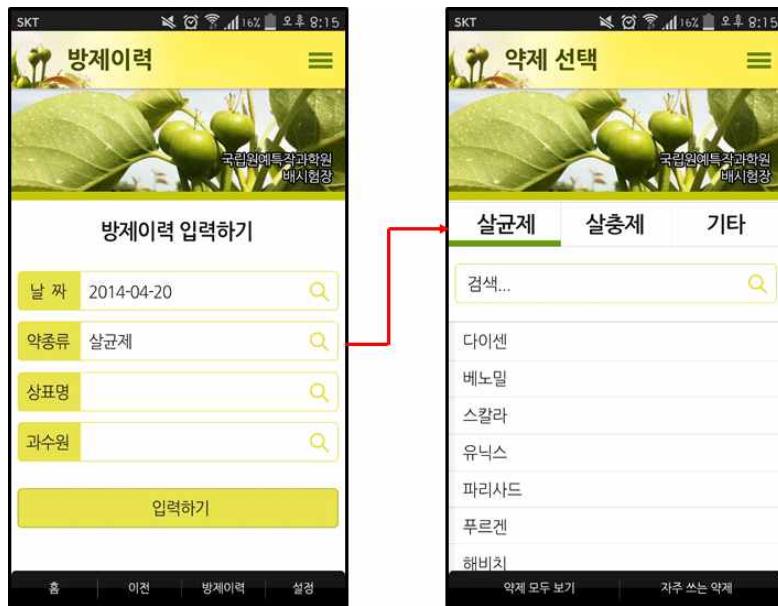
<그림 2> 방제 이력 실행 화면

제2절 약제 선택 및 약제 흔용

1. 약제 코드 세분화로 인한 재설계 및 재구현

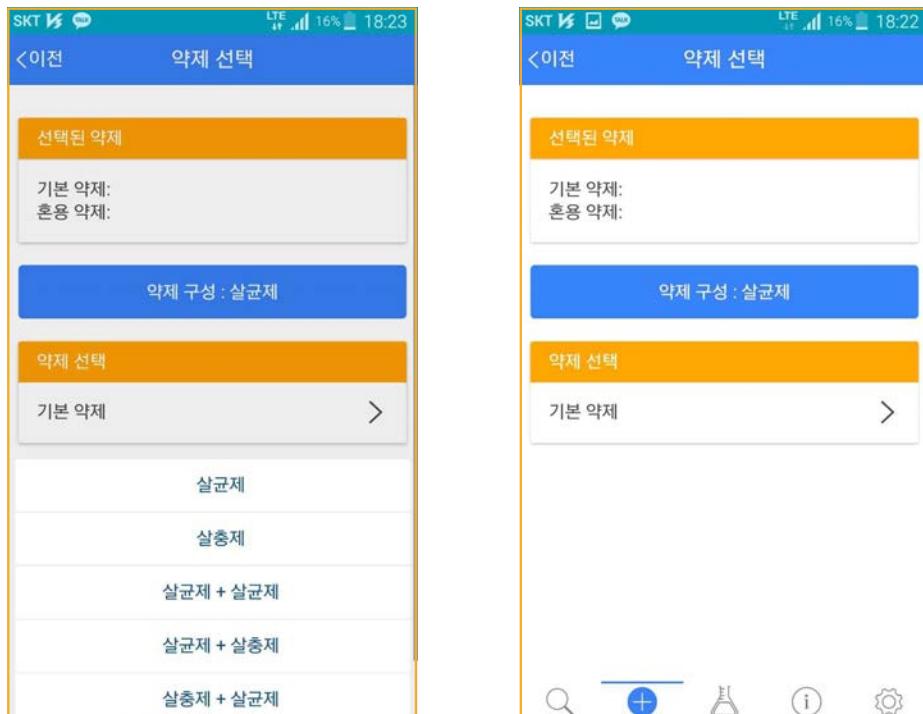
<그림 3>는 본 연구가 시작될 때 설계된 방제 이력이다. 스마트폰에 장착되는 안드로이드 운영체제에 많은 변화가 생겼을 뿐만 아니라, 또한, 약제 코드의 세분화가 필요하여 전체적으

로 프로그램을 <그림 4>와 같이 새롭게 디자인하고 구현하였다.



<그림 3> 방제 이력 및 약제 선택 실행 화면

<그림 2>(a), (b)와 같이 날짜와 약제를 살포할 과수원을 입력한 후에는 약제를 선택하게 된다. 약제 선택 메뉴를 누르면 <그림 4>(a)와 같은 약제 선택 화면이 나타난다. 기본적으로 약제 선택은 살균제가 선택되어 있다.



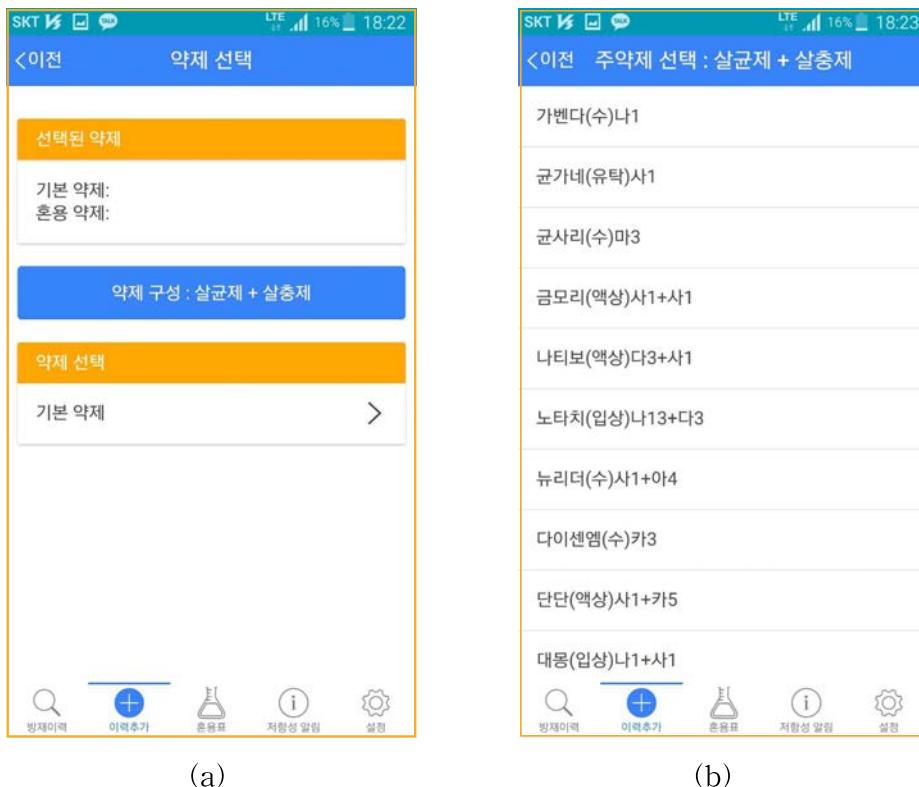
(a)

(b)

<그림 4> 방제 이력 실행 화면

살충제를 선택하거나 약제를 혼용하고자 하는 경우는 하단의 메뉴에서 ‘살충제’, ‘살균제 + 살충제’, ‘살균제 + 살균제’, ‘살충제 + 살균제’ 등의 메뉴를 누른 후 약제를 선택할 수 있다. 이와 같이 메뉴를 선택하고 나면 <그림 4>(b)와 같은 화면으로 전환이 되는데, 이는 ‘살균제’가 선택된 결과이다. 그리고 나서, ‘기본 약제’를 누르면 약제 목록이 나타나는데, 이전 과정에서 살균제를 선택했기 때문에 살균제 목록만 나타나도록 되어 있다.

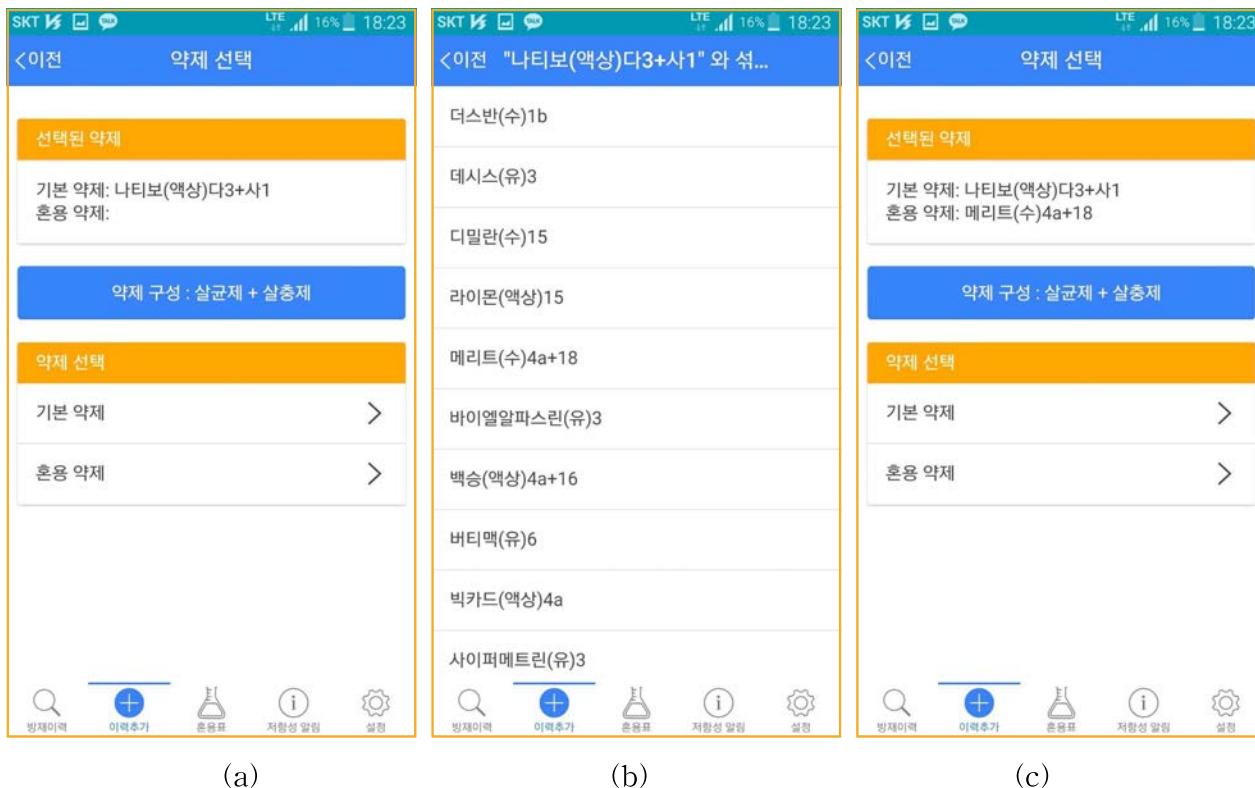
<그림 4>(a)에서 ‘살균제 + 살충제’를 선택하면 아래와 같은 그림이 나타난다. 그리고 나서 기본 약제를 누르면 오른쪽 화면과 같이 살균제 목록이 나타나고 약제 이름을 눌러서 살포하고자 하는 약제를 선택할 수 있다.



<그림 5> 새롭게 구현된 방제 이력 및 약제 선택 실행 화면

위의 그림에서 특정 약제(예, 나티보(액상)다3+사1))가 선택이 되면 다음 두 번째 그림처럼 그 약제와 혼용 가능한 약제 목록들만 제시가 된다. 이와 같이 두 가지 약제를 혼용하는 경우 약제가 선택되었을 때, 혼용 가능한 약제들만 제시되도록 함으로써 농민들이 혼용해서는 안 되는 약제를 실수로 선택하여 약해를 입는 일을 막을 수 있도록 하였다.

<그림 6>(a)는 첫 번째 약제가 선택된 결과를 나타낸다. 하단에 나타난 ‘혼용 약제’ 메뉴를 클릭하면 <그림 6>(b)와 같이 현재 선택된 약제와 혼용할 수 있는 약제 목록이 나타난다. 원하는 약제를 눌러서 약제를 선택하면 <그림 6>(c)의 상단에서 선택된 두 가지 약제를 확인할 수 있다. ‘이력추가’를 누르면 <그림 7>과 입력한 방제 이력 내용이 나오고 ‘저장’ 버튼을 누르면 최종적으로 방제 이력이 추가된다.

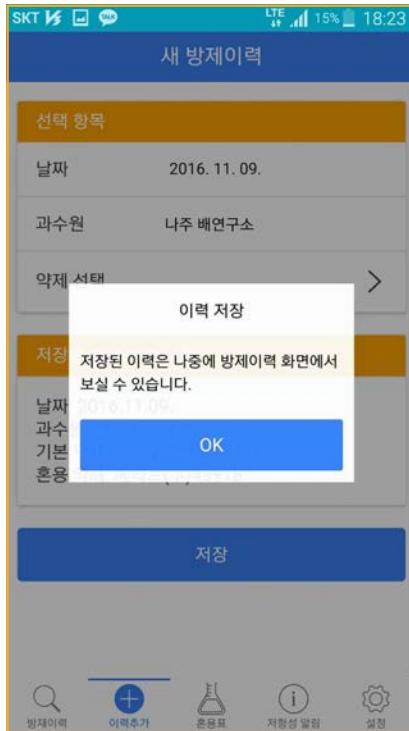


<그림 6> 약제 혼용 실행 화면



<그림 7> 방제 이력이 입력된 화면

저장된 방제이력은 ‘방제이력’ 화면에서 확인할 수 있으며 잘못 입력했을 경우에 삭제를 한 후 다시 입력할 수 있도록 하였다.



<그림 8> 방제 이력의 저장

제3절 배 검은별무늬병 방제 설명서 전자책

1. 본 연구에서 개발한 전자책의 특징

PDF나 한글과 같은 문서를 이용하여 전자책을 만들 수 있다. 하지만, 스마트폰 화면이 작기 때문에 화면을 확대할 경우, PDF나 한글과 같은 파일 포맷들은 페이지가 화면 밖으로 벗어나기 때문에 한 페이지를 읽기 위해서 빈번하게 화면을 좌우로 스크롤 하게 되어 매우 불편하다.

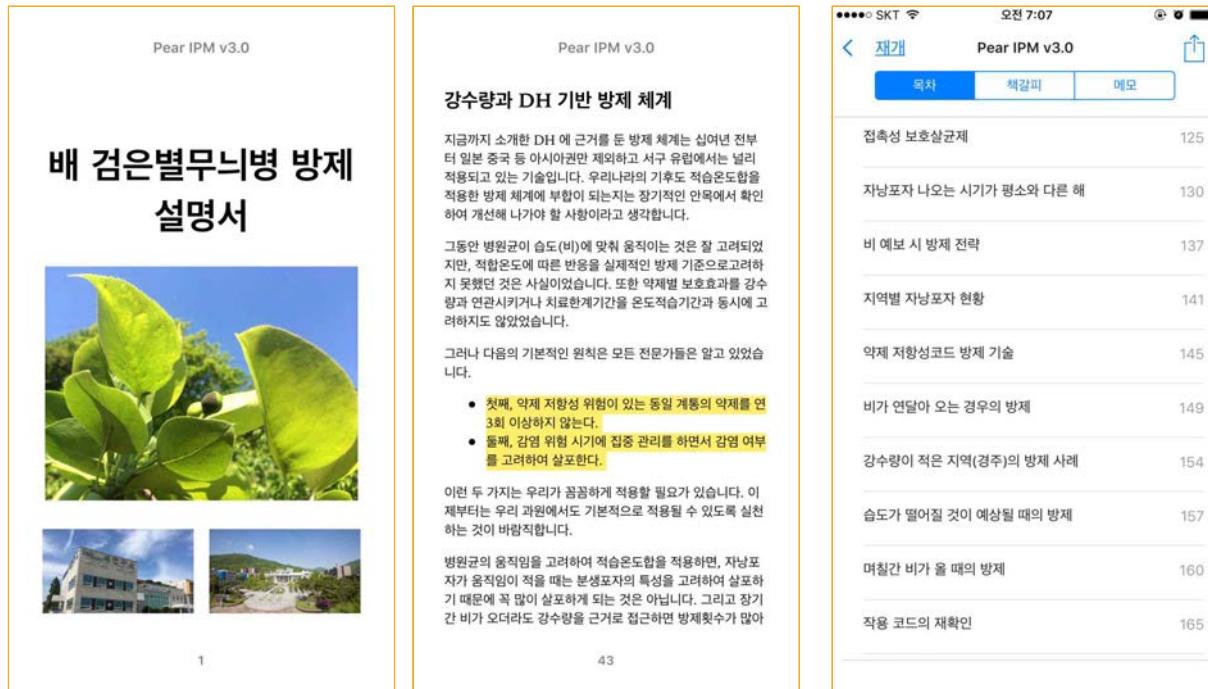
본 연구에서는 자동공간 및 페이지 조절 기능(reflowable)이 가능한 전자책을 제작하여 확대를 할 때 자동으로 디스플레이 화면에 내용이 맞춰지면서 페이지가 자동으로 조절되기 때문에 화면을 벗어난 내용을 보기 위해 스크롤이 필요하지 않아서 편리하다. 즉, 화면을 확대하면 글씨가 커지면서 문서가 화면 크기에 맞춰지기 때문에 스크롤을 전혀 하지 않고 편리하게 읽을 수 있다. 화면이 커지면 쪽수가 자동적으로 증가하게 되는데 이에 따라 목차 페이지도 모두 자동으로 조절된다.

방제 설명서 전자책은 이와 같은 기능을 구현할 수 있는 EPUB 포맷으로 제작하였다. 또한,

EPUB 전자책 포맷으로 개발된 전자책은 스마트폰, 스마트 패드 뿐만 아니라 데스크탑 컴퓨터에서 ebook 리더기를 설치하면 대부분의 기기에서 전자책을 읽을 수 있어 유용하다.

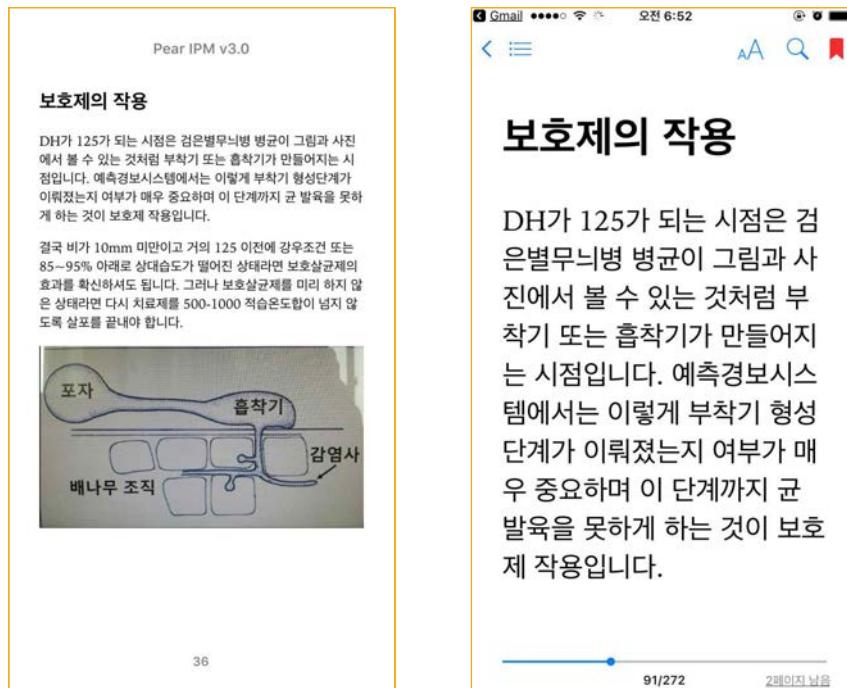
2. 배 검은별무늬병 방제 설명서 전자책 개발

다음 그림은 개발한 방제 설명서 전자책을 스마트폰에서 iBooks 앱을 이용하여 읽은 것을 보여주고 있다. 첫 번째 그림은 표지를 보여주고 있다. 두 번째 그림은 본문 중의 한 페이지로서 손가락으로 탭한 후 드래그하면 그림과 같이 강조 표시를 할 수 있다.



<그림 9> 배 검은별무늬병 방제 설명서

전자책 화면을 탭하면 화면 모서리에 목차를 비롯한 간단한 메뉴가 나타난다. 위의 그림에서 맨 오른쪽 그림은 전자책의 목차 메뉴를 선택한 결과를 보여주고 있다. 위의 메뉴는 방제 시기별 순서대로 정렬되어 있으며 각 시기마다 관심을 기울여야 할 주제들로 목차를 구성하였다. 다음 두 화면은 전자책 내의 동일한 내용을 보여주고 있다. 화면을 탭하면 상단 좌우측, 그리고 하단에 간단한 메뉴 또는 도구가 나온다. 그림에서 A자 아이콘을 탭하여 손쉽게 글자를 확대하거나 축소할 수 있다. 중요한 사실은 오른쪽 그림을 보면 페이지가 확대되었지만 화면 밖으로 페이지가 나가지 않고 글자가 화면에 맞춰짐을 볼 수 있다. 그리고, 화면 하단에 나타난 페이지를 비교해 보면 페이지가 36 페이지에서 91페이지로 늘어난 것을 볼 수 있다. 이러한 EPUB 포맷의 자동공간 및 페이지 조절 기능으로 인해서 PDF나 워드 문서와 달리 전자책을 매우 편리하게 사용할 수 있다.



<그림 10> 전자책의 확대와 자동공간 및 페이지 조절 기능

3. 방제 설명서를 위한 전자책 개발의 주안점

중장년층을 대상으로 간단한 설문을 조사한 결과, 전자책의 편의성은 또렷하고 큰 글씨에 있다는 답변을 얻었다. 전자책 사용자가 중장년층 이상이 주를 이를 것을 고려하여 사용자 편의성, 시인성, 가독성을 최대한 높일 수 있도록 했으며 가능한 단순한 사용자 인터페이스를 적용하여 설계하였다.

제4절 약제 혼용 지침 전자책

1. 약제 혼용 지침 전자책의 필요성

약제 정보가 담겨 있는 한국작물보호협회의 작물보호제 지침서는 무려 1,000 페이지를 넘는다. 약제의 종류가 방대하기 때문에 배 농가에서 체계적이고 일목요연한 약제 정보를 관리하는 것은 매우 어려운 일이다.

특히, 약제 혼용은 때에 따라서 잘못된 혼용으로 인한 약해는 큰 피해를 유발할 수 있으므로 매우 신중히 다루어야 한다. 약제의 적절한 사용은 경제적으로나 환경적으로 매우 중요한 사안이다.

2. 인터넷 커뮤니티와 SNS를 통한 정보 획득의 어려움

네이버 밴드와 같은 SNS가 활성화되어 있어서 배 농가들이 과거에 비해서 쉽게 영농 정보를 얻을 수 있으나, 정보의 생산자와 사용자의 경계가 없는 정보사회에서는 많은 정보가 중요

한 방제 정보를 묻어버리는 경향이 빈번하다.

SNS 상의 정보들은 시간과 함께 흐르기 때문에 정기적으로 꾸준히 구독해야 한다. 중장년 층의 농민들이 복잡한 IT 생태계에서 시의적절하게 필요한 정보를 취하는 것은 높은 집중력을 요하는 일로서 피로감을 느끼게 한다. 이로 인해 SNS로부터의 정보 외에 손쉽게 언제 어디서든 접근할 수 있고 체계적으로 정리되어 정적인 정보가 필요하다.

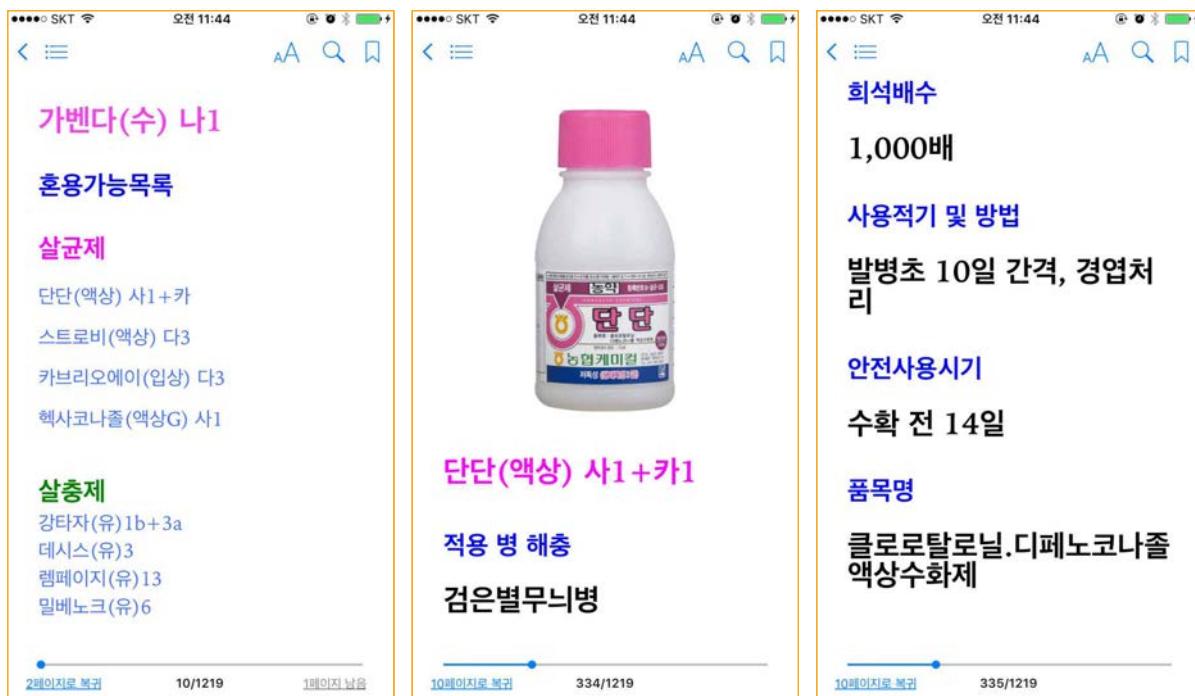
3. 약제 혼용 지침 전자책 개발

다음 그림은 약제 혼용 지침 전자책의 일부를 보여주고 있다. 본 연구에서 구축한 약제 정보는 아래와 같은 화면으로 1,200여 페이지에 달한다. 방대한 약제 중에서 쉽게 원하는 약제를 찾을 수 있도록 약제명을 가다나순으로 배열한 후 목차로 구성하였다.

제목	페이지
농약 혼용 방법	4
농약 혼용 시 주의 사항	4
농약 혼용시 참고사항	6
기벤다(수) 나1	10
실균제	10
균가네(유탁) 사1	12
살균제	12
균사리(수) 마3	15
살균제	15
금모리(액상) 라1+사1	18

<그림 11> 약제 혼용 지침 전자책

다음 그림은 목차에서 특정 약제를 선택한 후의 화면이다. 그림은 가벤다 약제와 혼용할 수 있는 살균제 목록과 살충제 목록을 각각 볼 수 있다. 약제를 쉽게 구분할 수 있도록 약제 색상을 사용하여 살균제는 분홍색, 살충제는 녹색으로 표기하였다. 혼용 가능 목록에서 혼용하고 싶은 약제, 예를 들어 단단 약제를 선택하면 해당 약제에 대한 자세한 약제 정보를 편리하게 확인할 수 있다.



<그림 12> 약제 혼용 목록과 약제 정보

제5절 약제 저항성 알림 프로그램

1. 약제 저항성 예측

다양한 약제 조합에 따른 저항성을 실험적으로 예측하기는 현실적으로 무척 어렵다. 따라서, 저항성을 예측하는 대신 저항성 증가를 불러일으킬 수 있는 치료제를 최소한으로 살포하는 조건을 마련하여 꼭 필요한 경우에만 치료제를 살포하도록 한다.

- 카균 이외의 치료제를 연속으로 살포하려는 경우 알림을 준다.
- 연 3회 이상의 치료제를 살포하려는 경우 알림을 준다.
- 보호 살균제의 살포 여부, 강우량, 적습온도합을 토대로 방제 적기가 아닌 경우에 카균 이외의 살균제를 살포하려는 경우 알림을 준다.
- 이를 위해서 살균제 살포시 나, 다, 라, ... 군별로 방제 이력을 기록한다.

약제 코드의 표기법 변화로 인해서 살균제의 경우 알파벳에서 가나다 표기로 일관 변경하였으며, 살충제를 위한 코드는 숫자를 부여하였다.

- 살균제: B, C, … M ↔ 나, 다, … 카
- 살충제: 1, 2, …, 20, …

입력된 방제 이력을 바탕으로 약제 살포 조합, 약제 종류에 따라 저항성 예측치를 산정하였다.

2. 약제 누적 저항성

치료 목적의 살균제를 살포함에 따라서 약제의 저항성은 누적된다. 균이 자라는 환경이 다양하고 약제의 종류가 많기 때문에 실험적으로 약제의 저항성을 구하기는 어렵다. 이로 인해서 극히 적은 수의 약제에 대해서 극히 적은 실험에 대한 저항성 값만이 보고되어 있다[8], [9].

알려져 있는 데이터와 데이터 사이에 값을 추정하여 끼워 넣는 방법을 내삽(interpolation)법이라고 한다. 본 연구에서는 매우 적은 데이터이지만 기존에 알려져 있는 실험치와 내삽법을 이용하여 약제를 살포함에 따라서 들어나는 저항성 증가치를 추정하였다. 내삽 방법으로는 두 데이터 사이의 값을 선형적으로 증가시키는 선형 내삽법을 이용하였다.

누적된 저항성의 크기를 cfr(cumulative fungicide resistance)이라 나타내자. 약제 코드가 ‘나1’군인 경우의 누적 저항성은 nal_cfr로 나타낸다. 그리고, $\text{delta}(i, j)$ 를 약제를 살포할 때의 저항성 크기 증가분이라고 하자. 약제의 저항성은 약제를 살포하는 순서(조합)에 따라서 달라질 수 있는데, i 는 약제를 살포하는 조합에 따른 유형을 나타낸다. 예를 들어서 치료제를 살포한 후 다음 약제 살포시 치료제를 살포하는 경우가 유형 0이며, 치료제를 살포한 후, 그 다음 약제 살포시 혼합제를 살포하는 경우가 유형 1로 구분하였다.

이와 같은 약제 살포 순서에 따른 유형을 6가지로 구분하였으며, 모든 유형은 다음의 의사 코드 (pseudo code)에 유형 0 ~ 유형 5까지 제시하였다.

저항성 누적

- 누적 저항성
 - cfr (cumulative fungicide resistance)
 - 약제별 저항성 표기
 - na1_cfr
 - ra1_cfr 등
 -
 - 약제 살포시마다 군별로 저항성을 누적함.
 - $na1_cfr = na1_cfr + \text{delta}(i, j)$
 - $\text{delta}(i, j)$ 는 저항성 크기 증가분
 -
 - 약제 살포 유형
 - 유형 0
 - 치료제 —> 치료제
 - 유형 1
 - 치료제 —> 혼합제
 - 유형 2

- 혼합제 —> 혼합제
- 유형 3
 - 혼합제 —> 치료제
- 유형 4
 - 보호제 —> 치료제
- 유형 5
 - 보호제 —> 혼합제
-
- 약제 살포 유형 예시
 - 유형 0 ($i=0$)
 - 직전: 치료제, 이번: 치료제
 - 직전: na1, 이번: na1 또는 ra1 또는 sa1
 - 유형 1 ($i=1$)
 - 직전: 치료제, 이번: 혼합제
 - 직전: na1 이번: ra1 + ka
 - 유형 2 ($i=2$)
 - 직전: 혼합제, 이번: 혼합제
 - 직전: na1 + ka 이번: ra1 + ka
 - 유형 3 ($i=3$)
 - 직전: 혼합제, 이번: 치료제
 - 직전: ka 이번: na1
 - 유형 4 ($i=4$)
 - 직전: 보호제, 이번: 치료제
 - 직전: ka 이번: na1
 - 유형 5 ($i=5$)
 - 직전: 보호제, 이번: 혼합제
 - 직전: ka 이번: na1 + ka
 -
- delta(i, j)
 - $i = 0 \sim 5$
 - 유형 번호
 - $j = 0 \sim 49$
 - 약제 살포 유형 i (유형 0~유형5)에 따라 저항성 증가분이 다름. j 는 현재의 저항성을 값을 지정하는 인덱스 정도
 - $\text{delta}(i, j)$ 는 저항성 증가분을 포함하는 표에 해당됨.
- 새해의 시작 누적 저항성 초기값을 이전 해의 마지막 누적 저항성의 0.3을 곱함
 - $\text{na1_cfr} = \text{na1_cfr} * 0.3$

위와 같은 의사 코드에 의한 약제 저항성 값은 해가 갈수록 누적되기 때문에 수 년이 지나면 저항성이 100%에 다다르게 된다. 앞서서 언급한 바와 같이 실제의 정확한 저항성 값을 알아낼 수는 없으며, 위와 같은 저항성 예측치는 선형 내삽법에 의한 추정치이다.

비록 추정치일지라도 특정 약제를 살포하는 약제 살포 경향(trends)를 농민들에게 알려줌으로써 저항성 증가에 대한 경각심을 주고 상대적으로 낮은 누적 저항성을 보이는 약제를 살포하도록 유도하는 효과가 있다.

다음은 선형 내삽법에 의해서 계산된 저항성 살균제 유형별 저항성 증가치 delta와 누적 저항성 resist를 저장하고 있는 자바스크립트 파일이다. 예를 들어서 //delta 0 하단에 나타난 5줄의 숫자는 유형 0, 즉, 이전에 치료제를 살포한 후, 그 다음 살포시 치료제를 살포했을 때 저항성이 9.1111만큼 증가한다는 것을 의미한다. 계속해서 유형 0에 해당하는 약제를 살포하면 계속해서 9.1111씩 증가하다가 1.7, 1.7, …, 1.7, 0, 0, …, 0, 0과 같이 증가하는 것을 의미한다. 약제를 계속해서 살포함에 따라서 저항성 증가분이 감소하는 것은 실제로 저항성 증가분이 감소하는 것이 아니라, 단지, 지속적으로 유형 0의 살균제를 살포할 경우 예측 누적 저항성이 거의 100%에 도달함으로 인하여, 누적 저항성으로 추정한 저항성 증가폭이 작아지기 때문이다. 실제로 //resist 0 하단에 나타난 누적 저항성 값을 보면 지속적으로 유형 0의 약제를 계속 살포하면 누적 저항치가 1, 10.111, 19.222와 같이 급격히 증가하는 것을 볼 수 있다. 앞서서 언급한 바와 같이 delta(i, j)에서 i는 유형 i를 나타내고, 유형 i의 약제를 j 번 살포했음을 나타낸다.

```
var delta = [
  [ // delta 0
    9.1111, 9.1111, 9.1111, 9.1111, 9.1111, 9.1111, 9.1111, 9.1111,
    9.1111, 1.7,
    1.7, 1.7, 1.7, 1.7, 1.7, 1.7, 1.7, 1.7, 1.7, 0,
    0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,
    0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,
    0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,
  ],
  [ // delta 1
    3.0625, 3.0625, 3.0625, 3.0625, 3.0625, 3.0625, 3.0625, 3.0625,
    3.0625, 3.0625,
    3.0625, 3.0625, 3.0625, 3.0625, 3.0625, 3.0625, 6.25, 6.25, 6.25,
    6.25,
    6.25, 6.25, 6.25, 6.25, 0, 0, 0, 0, 0, 0,
    0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,
    0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,
  ],
]
```

```

    ],
    [ // delta 2
        3.0625, 3.0625, 3.0625, 3.0625, 3.0625, 3.0625, 3.0625, 3.0625,
        3.0625, 3.0625,
        3.0625, 3.0625, 3.0625, 3.0625, 3.0625, 3.0625, 6.25, 6.25, 6.25,
        6.25,
        6.25, 6.25, 6.25, 6.25, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,
        0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,
        0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,
    ],
    [ // delta 3
        3.0625, 3.0625, 3.0625, 3.0625, 3.0625, 3.0625, 3.0625, 3.0625,
        3.0625, 3.0625,
        3.0625, 3.0625, 3.0625, 3.0625, 3.0625, 3.0625, 6.25, 6.25, 6.25,
        6.25,
        6.25, 6.25, 6.25, 6.25, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,
        0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,
        0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,
    ],
    [ // delta 4
        4.31, 4.31, 4.31, 4.31, 4.31, 4.31, 4.31, 4.31, 4.31, 4.31, 4.31,
        4.31, 4.31, 4.31, 4.31, 4.31, 4.31, 4.31, 4.31, 4.31, 4.31, 1.70,
        1.70, 1.70, 1.70, 1.70, 1.70, 1.70, 1.70, 1.70, 1.70, 1.70, 0,
        0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,
        0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,
    ],
    [ // delta 5
        0.375, 0.375, 0.375, 0.375, 0.375, 0.375, 0.375, 0.375, 0.375,
        0.375,
        0.375, 0.375, 0.375, 0.375, 0.375, 0.375, 0.375, 0.375, 0.375,
        0.375,
        0.375, 0.375, 0.375, 0.375, 3.6, 3.6, 3.6, 3.6, 3.6, 3.6,
        3.6, 3.6, 3.6, 3.6, 3.6, 3.6, 3.6, 3.6, 3.6, 3.6,
        3.6, 3.6, 3.6, 3.6, 3.6, 3.6, 3.6, 3.6, 3.6, 0,
    ],
];

```

```
var resist = [
  [ // resist 0
    1, 10.111, 19.222, 28.333, 37.444, 46.556, 55.667, 64.778,
    73.889, 83,
    84.7, 86.4, 88.1, 89.8, 91.5, 93.2, 94.9, 96.6, 98.3, 100,
    100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100,
    100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100,
    100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100,
  ],
  [ // resist 1
    1, 4.0625, 7.125, 10.188, 13.25, 16.312, 19.375, 22.438, 25.5,
    28.562,
    31.625, 34.688, 37.75, 40.812, 43.875, 46.938, 50, 56.25, 62.5,
    68.75,
    75, 81.25, 87.5, 93.75, 100, 100, 100, 100, 100, 100,
    100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100,
    100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100,
  ],
  [ // resist 2
    1, 4.0625, 7.125, 10.188, 13.25, 16.312, 19.375, 22.438, 25.5,
    28.562,
    31.625, 34.688, 37.75, 40.812, 43.875, 46.938, 50, 56.25, 62.5,
    68.75,
    75, 81.25, 87.5, 93.75, 100, 100, 100, 100, 100, 100,
    100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100,
    100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100,
  ],
  [ // resist 3
    1, 4.0625, 7.125, 10.188, 13.25, 16.312, 19.375, 22.438, 25.5,
    28.562,
    31.625, 34.688, 37.75, 40.812, 43.875, 46.938, 50, 56.25, 62.5,
    68.75,
    75, 81.25, 87.5, 93.75, 100, 100, 100, 100, 100, 100,
    100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100,
    100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100,
  ],
]
```

```
[ // resist 4
  1, 5.3158, 9.6316, 13.947, 18.263, 22.579, 26.895, 31.211,
  35.526, 39.842,
  44.158, 48.474, 52.789, 57.105, 61.421, 65.737, 70.053, 74.368,
  78.684, 83,
  84.7, 86.4, 88.1, 89.8, 91.5, 93.2, 94.9, 96.6, 98.3, 100,
  100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100,
  100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100, 100,
],
[ // resist 5
  1, 1.375, 1.75, 2.125, 2.5, 2.875, 3.25, 3.625, 4, 4.375,
  4.75, 5.125, 5.5, 5.875, 6.25, 6.625, 7, 7.375, 7.75, 8.125,
  8.5, 8.875, 9.25, 9.625, 10, 13.6, 17.2, 20.8, 24.4, 28,
  31.6, 35.2, 38.8, 42.4, 46, 49.6, 53.2, 56.8, 60.4, 64,
  67.6, 71.2, 74.8, 78.4, 82, 85.6, 89.2, 92.8, 96.4, 100,
]
];
];
```

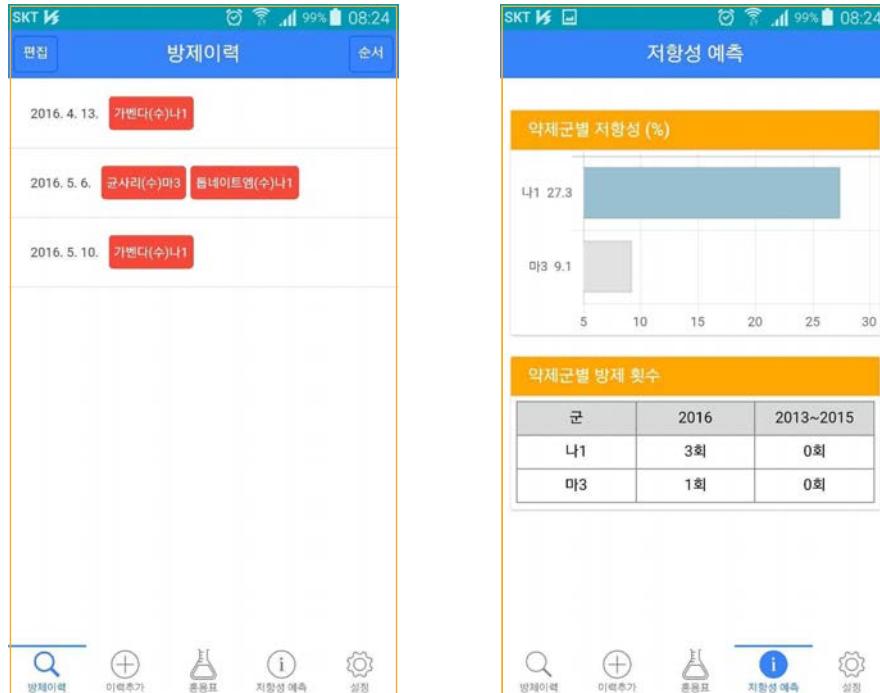
바로 위에 보이는 // restist 5는 유형 5에 대한 누적 저항성으로서 이전에 보호제를 살포한 후, 그 다음에 혼합제를 살포했을 때의 누적 저항성을 나타내는데, 다른 유형에 비해서 서서히 누적되게 예측되고 있는 것을 볼 수 있다. 그런데, 이렇게 누적 저항성이 서서히 증가하더라도 시간이 지나면 100%에 도달하게 된다. 이것은 실제의 저항성이 아니라 저항성을 추정한 데 기인한다. 따라서, 누적 저항성을 보정해 줄 필요가 있으며, 본 프로그램에서 설정한 보정치는 새 해가 될 때 작년의 누적 저항성에 30%를 취하도록 했으며, 앱 프로그램의 설정에서 변경할 수 있도록 하였다.

2. 배 검은별무늬병 방제 프로그램

방제 이력, 약제 혼용, 저항성 알림 기능은 하나의 프로그램에 통합되었다. 그림에서 맨 왼쪽 그림은 방제 이력 예시를 보여 주고 있다. 저항성을 확인하고 싶은 날짜를 선택하면 그날로부터 오늘까지 살포한 약제 목록을 보여준다. 또한, 앞서서 언급한 조건에 부합하는 경우 저항성 알림 메시지가 나타나서 저항성 증가 우려가 있음을 알게 한다. 하단에 있는 그림처럼 알람을 주기 위한 살포 횟수를 정하여 알람 허용치를 조절할 수도 있도록 하였다.

다음 그림은 저항성 예측 프로그램을 테스트하기 위해서 실행 결과를 보여 주고 있다. <그림 13>(a)에 나타난 방제이력에 따르면 2016.4.13.일에 “나1” 살균제, 2016.5.6.일에 “마3”와 “나1”을 혼용한 살균제, 2016.5.10.일에 “나1” 살균제를 살포한 것을 볼 수 있다. 이러한 방제이력을 선택한 후 하단의 “저항성 예측” 메뉴를 누르면 <그림 13>(b)와 같이 저항성 예측 결과를

볼 수 있다. 농부들이 참고를 할 수 있도록 하단에 약제별로 살포 횟수를 제시하였으며, 최근 3년 간의 누적 살포 횟수도 볼 수 있도록 하였다.



<그림 19> 약제 저항성 예측 테스트 화면

실제와 비슷한 방제 이력을 저항성 예측 프로그램을 테스트하기 위해서 수년간에 걸친 테스트 방제력을 작성하였다. 다음은 테스트용 방제 이력에 대한 jason 파일의 일부분을 보여주고 있다. Jason 파일 내용에서 “d”는 날짜, “1”은 약제 혼용시 첫 번째 약제, “2”는 두 번째 약제를 나타낸다. “2”번이 공란으로 되어 있는 것은 살균제 한 가지만을 살포한 것을 의미한다.

누적 저항성은 동일한 약제 작용 코드에 대해서 누적되므로 특정 약제명을 지칭할 필요없이 “약제명()사1”과 같이 약제 작용 코드만을 명시하였다.

```
[  
{  
    "d": "2013. 5. 1.",  
    "1" : "약제명()카",  
    "2" : ""  
},  
{  
    "d": "2013. 5. 5.",  
    "1" : "약제명()다1",  
    "2" : "약제명()카",  
},
```

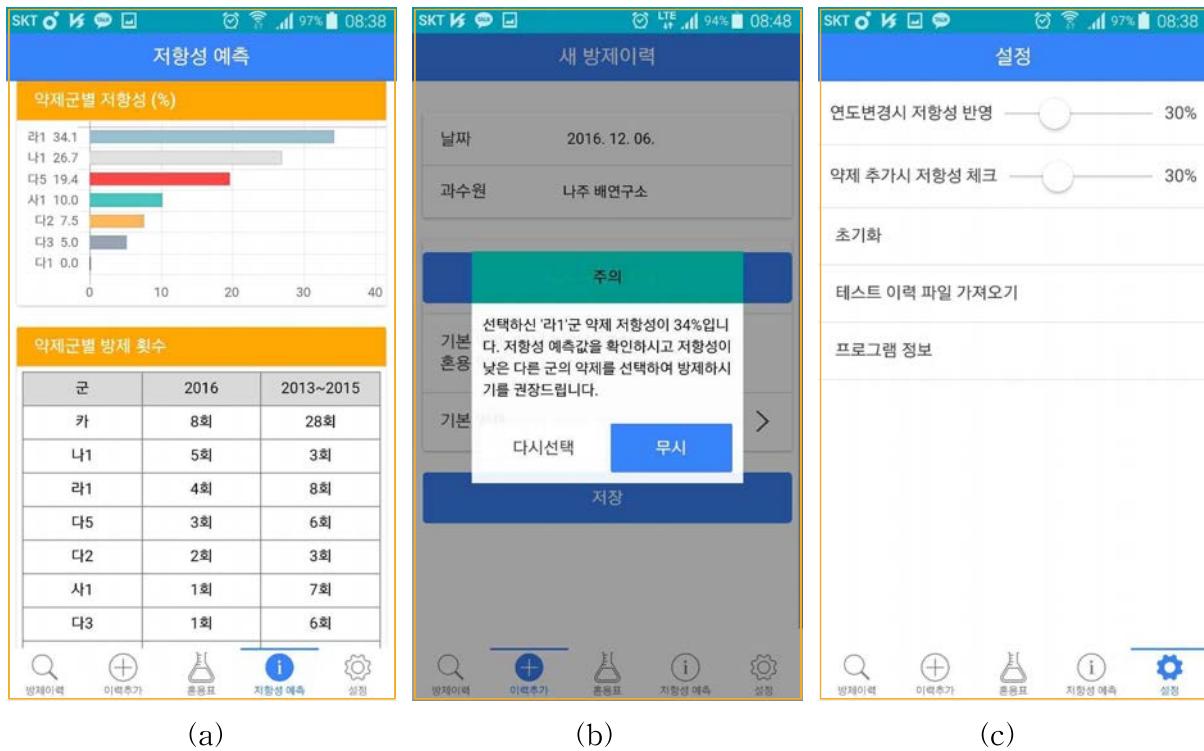
```
{  
    "d": "2013. 5. 10.",  
    "1" : "약제명()사1",  
    "2" : "약제명()카",  
},  
{  
    "d": "2013. 5. 15.",  
    "1" : "약제명()라1",  
    "2" : "약제명()사1+카"  
},  
{  
    "d": "2013. 5. 20.",  
    "1" : "약제명()나1",  
    "2" : "약제명()카"  
},  
{  
    "d": "2013. 5. 25.",  
    "1" : "약제명()다2",  
    "2" : ""  
},  
{  
    "d": "2013. 5. 30.",  
    "1" : "약제명()다3",  
    "2" : "약제명()카"  
},  
{  
    "d": "2013. 6. 5.",  
    "1" : "약제명()다5",  
    "2" : "약제명()카"  
},  
{  
    "d": "2013. 9. 15.",  
    "1" : "약제명()카",  
    "2" : ""  
},  
{  
    "d": "2013. 9. 20.",  
    "1" : "약제명()나1",  
    "2" : "약제명()카"  
},
```

```
{
  "d": "2013. 9. 25.",
  "1" : "약제명()다3",
  "2" : "약제명()카"
},
```

... 후략

]

<그림 14>(a)는 위에 제시된 방제 이력에 대해서 저항성 예측 화면을 보여주고 있다. 저항성 그래프를 통하여 저항성이 높게 예측되는 약제를 쉽게 구분할 수 있다. 또한, <그림 14>(b)와 같이 다른 군의 약제를 선택할 것을 권장하는 메시지를 제공하였다. <그림 14>(c)는 연도가 변경될 때 누적 저항성의 반영 비율을 정하기 위한 설정 화면이다.



<그림 14> 방제 이력과 약제 저항성 알림

<제4협동과제 : 배 검은별무늬병 방제를 위한 전신저항성 활성제 이용연구>

제1절 연구 수행 내용

1. 전신저항성 활성제의 선발 연구방법

전신저항성 활성제는 Acibenzolar-S-Methyl (ASM), Chitosan, Harpin 등과 농약 혼합 처리구, 무처리구 및 대조구로써 농약 처리구와 비교를 하였다. 이병엽률 조사를 위하여 각 처리구에서 주당 20개의 작은 가지를 선정한 후 이병엽이 많은 부위의 10개 잎을 무작위로 조사하여 총 200개의 잎으로부터 이병엽을 조사하여 이병엽률과 방제가를 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{이병엽률}(\%) = (\text{시험구 이병엽수} / \text{시험구 총 조사 엽수}) \times 100$$

$$\text{시험구별 방제가}(\%) = (1 - \text{활성제 처리구 이병엽률} / \text{무처리구 이병엽률}) \times 100$$

이병과율 조사를 위하여 각 처리구에서 주당 20개의 과실을 무작위로 선정하여 조사하여 이병과율과 방제가를 ○위와동일한 방식으로 계산하였다.

2. 선발된 전신저항성 활성제의 기주 방어 기작 규명 연구방법

선발된 전신저항성 활성제 ASM을 처리한 후 jpNPR1, PGIP, PPO, CHI, PAL, PR-1 등과 같은 병저항성 마커 유전자들의 발현 양상을 비교하였다. 또한 RT-PCR 및 real time qPCR 수행은 아래와 같은 병저항성 유전자들의 primer set으로 하였다.

jpNPR1: F: 5'-CAGGTTGGAAGCCCTTATGA-3',

R: 5'-CGCCTCCTCTTACCTTG-3'

PGIP: F: 5'-AAGCTTGACCTCGCTGGATA-3'

R: 5'-TACTCGTCGAAGCTCTGCAA-3'

PPO: F: 5'-GACATTGCTATGCCGTTCT-3'

R: 5'-GTCCTCGGTCCCGTTGTAAT-3'

CHI: F: 5'-CTAGACGGCGCTATCCAAAC-3'

R: 5'-CCGGTAACCCCATGAATACC-3'

PAL: F: 5'-ATGGACAACACTCGCTTGG-3'

R: 5'-GATTCAGCCCCCTTGAAAC-3'

PR-1: F: 5'-GCAAGGCAAGTCTGATGTGA-3'

R: 5'-TCAACGTCAGTTACCGTCCA-3'

EF1- α : F: 5'-CTGCTGCAACAAGATGGATG-3'

R: 5'-CAGTCAAGGTTGGTGGACCT-3'

HPLC를 이용한 병저항성 관련 식물호르몬인 SA(salicylic acid) 함량을 조사하기 위해 물 처리된 배나무 잎과 ASM 처리된 배나무 잎 그리고 각각의 배나무에 검은별무늬병균 분생포자를 접종한 후 시간별로 샘플링하여 SA 함량 조사하였다. SA 함량조사 방법은 각각의 샘플에 90% Methanol을 넣고 vortexing 후 sonification을 진행하였다. 그 후 원심분리를 진행한 후 원심농축을 실시하고 샘플에 100mM sodium acetate buffer 400 μ l를 넣은 후 10% trichloroacetic acid 400 μ l를 넣

고 또 Ethyl acetate:cyclopentane: isopropanol=100:99:1의 비율로 400 μ l씩 분주하였다. 원심분리를 진행 후 상층액을 vaccum drayer로 말려서 HPLC(Shimadzu Prominence LC-20AD) 기계의 안정화를 진행한 후 샘플을 넣어서 SA 함량을 측정하였다.

3. 검은별무늬병 감수성 수준별 전신저항성 활성제의 선발

배 재배농가에서 검은별무늬병을 방제하기 위해 사용 가능한 전신저항성 활성제를 일차적으로 유효성분이 각각 acibenzolar-S-Methyl(ASM)인 비온, chitosan인 키토산, 그리고 harpin 단백질인 메신저 등을 선발하여 시험에 이용하였다(표 1).

표 1. 실험에 사용된 전신저항성 활성제

상표명	유효성분	성분함량
비온	Acibenzolar-S-methyl[ASM]	ASM(5%)
키토산	Chitosan	Chitosan(6%)
메신저	Harpin protein	Harpin protein(3%)

검은별무늬병 저항성(원황) 및 감수성(신고, 황금배) 품종 등에 적용 가능한 전신저항성 활성제를 최종적으로 선발하기 위해 살균제등이 전혀 사용되지 않은 무처리구, 그리고 ASM, Chitosan, Harpin 등의 전신저항성 활성제가 두 차례 살포된 혼합 처리구, 마지막으로 살균제만을 이용한 농약 처리구 등을 만들어 검은별무늬병에 대한 방제가를 비교하였다(표 2). 전신저항성 활성제만을 이용한 방제력으로 검은별무늬병 방제를 시도한 2013년 예비실험에서 전신저항성 활성제만으로는 방제가 어렵다는 결론을 얻었기에 살균제와 혼합한 처리구를 만들었으며 이 혼합된 방제 매뉴얼을 수정 보완해 최종연도에 배 재배농가에 적용하였다.

표 2. 전신저항성 활성제 혼합구 및 농약처리구 처리내용

살포시기	혼합 처리구	농약 처리구
4월 7일	Kresoxim-methyl	Kresoxim-methyl
4월 14일	Cyprodinil	Cyprodinil
4월 23일	ASM/Chitosan/Harpin	Captan, Pyrimethanil
4월 30일	ASM/Chitosan/Harpin	mancozeb, Difenoconazole
5월 5일	Dithianon, Pyraclostrobin	Dithianon, Pyraclostrobin
5월 12일	Triflumizole	Triflumizole
5월 26일	Boscalid, Pyraclostrobin	Boscalid, Pyraclostrobin
6월 5일	Captan, Difenoconazole	Captan, Difenoconazole

무처리구, 그리고 ASM, Chitosan, Harpin 등의 전신저항성 활성제가 두 차례 살포된 혼합 처리구, 마지막으로 살균제만을 이용한 농약 처리구 등의 검은별무늬병에 대한 방제가는 2014년 6월 19일(신고, 황금배, 원황)과 9월 15일(원황, 황금배), 9월 27일(신고)에 각각 이병엽률과 이병과율을 조사하였다(그림 1).



그림 1. 전남 나주지역 봉황농장에서 이병엽률(위)과 이병과율(아래)을 조사하는 모습

5) 검은별무늬병 감수성 품종인 신고를 대상으로 선발하였던 전신저항성 활성제 Acibenzolar-S-Methyl (ASM)의 약효기간 및 최적의 처리 시기 설정 연구방법

○ 병저항성 관련 식물호르몬인 SA (salicylic acid) 함량을 조사하기 위해 ASM이 처리된 배나무 잎으로부터 처리 전, 4일, 14일, 그리고 7일 후에 한차례 더 ASM를 처리한 7일+7일 등 각 샘플에 90% Methanol을 넣고 vortexing 후 sonification 한 다음 원심분리를 진행한 후 농축하였다. 그리고 샘플에 100mM sodium acetate buffer 400 μ l를 넣은 후 10% trichloroacetic acid 400 μ l를 넣은 후 Ethyl acetate:cyclopentane:isopropanol=100:99:1의 비율로 400 μ l씩 분주하여 원심분리를 진행 후 상층액을 vaccum drayer로 건조하여 HPLC (Shimadzu Prominence LC-20AD)를 이용하여 각 샘플의 SA 함량을 측정하였다.

제2절 연구결과

1. 전신저항성 활성제의 선발

무처리구(non-treated), 그리고 살균제와 ASM, Chitosan, Harpin등의 전신저항성 활성제가 두 차례 살포된 혼합 처리구, 마지막으로 살균제만을 이용한 농약 처리구(self-treated) 등의 검은별무늬병에 대한 이병엽률을 2014년 6월 19일에 조사한 결과 검은별무늬병 감수성 품종인 신고와 황금배의 이병엽률이 각각 61.5%와 30.25%의 발병도를 보여 처리구간의 방제가를 평가하기에 충분하였으나 검은별무늬병 중간 저항성 품종인 원황의 경우는 무처리구의 발병도가 5%로 나와 처리구간의 정확한 방제가를 평가하기에는 큰 의미가 없을 것으로 생각되었다. 검은별무늬병 감수성 품종인 신고와 황금배에서 각 처리구간별 방제가를 비교해 보았을 때, 살균제만을 이용한 농약처리구와 ASM이 혼합된 처리구가 비교적 비슷한 방제 효과를 보였다. ASM이 혼합된 처리구가 Chitosan 혹은 Harpin이 혼합된 처리구 보다 두 품종 모두에서 좋은 방제 효과를 보였다(그림 2).

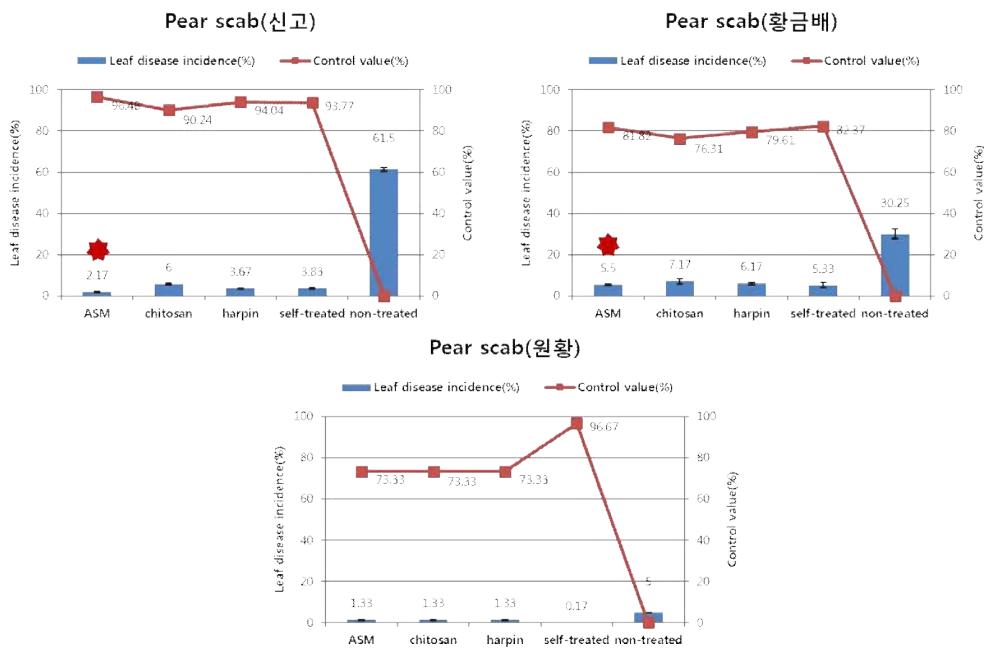


그림 2. 전신저항성 활성제 선발을 위한 각 처리구별 이병엽률과 방제가

무처리구(non-treated), 그리고 살균제와 ASM, Chitosan, Harpin 등의 전신저항성 활성제가 두 차례 살포된 혼합 처리구, 마지막으로 살균제만을 이용한 농약 처리구(self-treated) 등의 검은별무늬병에 대한 이병과율을 조생종인 원황과 황금배는 9월 15일에 만생종인 신고는 9월 27일에 각각 조사한 결과 검은별무늬병 감수성 품종인 신고와 황금배의 이병과율이 각각 81.63%와 87.68%의 발병도를 보여 처리구간의 방제가를 평가하기에 충분하였으며 검은별무늬병 중간 저항성 품종인 원황의 경우는 무처리구의 발병도가 28.33%로 나와 다소 미흡하지만

처리구간의 방제가를 평가할 수는 있을 것으로 생각되었다. 검은별무늬병 감수성 품종인 신고와 황금배에서 각 처리구간별 방제가를 비교해 보았을 때, 이병엽에 대한 방제 효과와는 달리 살균제만을 이용한 농약 처리구가 가장 우수한 방제 효과를 보였다. 그러나 전신저항성 활성제가 혼합된 처리구들만 비교해 보았을 때, 모든 품종에서 ASM이 혼합된 처리구가 다른 처리구에 비해 우수한 방제 효과를 보였다. ASM 혼합 처리구와 비슷하게 Harpin 혼합 처리구도 방제 효과가 나타났지만 이병엽률과 이병과율을 함께 고려해서 여러 전신저항성 활성제 중에서 최종적으로 ASM을 선발하게 되었다(그림 3). 이병엽률과 다르게 이병과율에서 살균제만을 이용한 농약 처리구에 비해 전신저항성 활성제가 혼합된 처리구가 방제 효과가 전체적으로 낮은 결과가 나온 이유를 분석하여 전신저항성 활성제의 사용 횟수와 살포시기를 조정하여 과수원 현장에서 적용 가능한 최적의 방제 매뉴얼을 만드는 기초자료로 이용하였다.

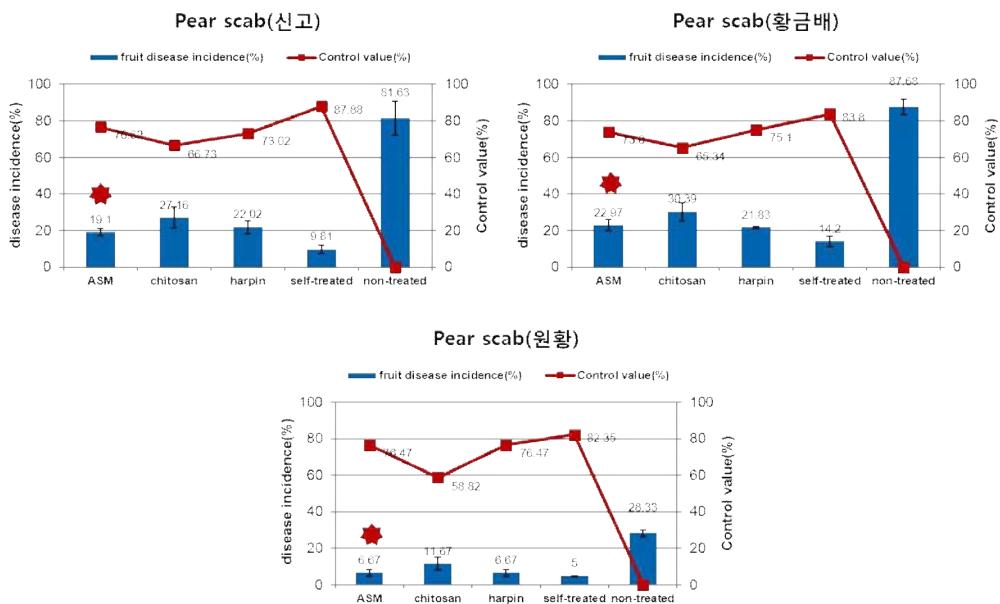


그림 3. 전신저항성 활성제 선발을 위한 각 처리구의 이병과율과 방제가 결과

2. 선발된 전신저항성 활성제 ASM의 기주 방어 기작 규명

검은별무늬병에 대한 방제 효과 검증을 통해 최종적으로 선발된 전신저항성 활성제 ASM의 기주 방어 기작을 규명하기 위해 식물생장상에서 검은별무늬병균 분생포자를 이용한 인공접종 방법을 확립하였다(그림 4). 과수원 수준에서 기주 방어 기작 규명은 비생물학적인 환경 스트레스에 의해 병저항성 관련 유전자들의 발현이 지속적으로 일어나고 있는 관계로 정확한 기작 규명이 어렵기 때문에 검은별무늬병균 분생포자를 실생묘 상태의 배나무에 인공접종한 후 식물생장상에서 온도와 습도를 조절하여 배양하면 아래 그림의 화살표로 나타낸 것처럼 배나무에 병반이 발생되는 조건을 확립하였다.



그림 4. 검은별무늬병균 분생포자를 이용한 실내 인공접종 과정

식물생장상에서 재배하고 있는 실생묘 상태의 배나무에 전신저항성 활성제 ASM을 처리한 후 3일, 7일 후에 *jpNPR1*, *PGIP*, *PPO*, *CHI*, *PAL*, *PR-1* 등과 같은 병저항성 마커 유전자들의 발현 양상을 비교한 결과, 병저항성 신호 전달에 관여된 전사조절인자로 알려진 *jpNPR1* 유전자는 지속적인 발현을 보여 주었으나 *PGIP*과 *CHI* 유전자는 처리 3일 후에 증폭되었다가 다시 처리전으로 되돌아 오는 발현 양상을 확인 할 수 있었다. 그러나 *PPO*와 *PAL*과 같은 병저항성 유전자들의 발현은 확인 할 수 없었다. 여러 병저항성 관련 유전자들 중에서 가장 중요한 마커 유전자로 알려진 *PR-1* 유전자의 발현 양상을 좀 더 정확하게 확인해 보고자 ASM을 한 차례 처리한 후 일주일 뒤에 한 차례 더 처리한 다음 발현 양상을 real-time qPCR로 확인해 보았다. 첫 번째 처리 후 *PR-1* 유전자는 1.5배 정도 증폭되었으나 두 번째 처리 후에는 4배 이상 증폭되는 것을 확인하였다. 따라서 일주일 간격으로 ASM을 더 처리함으로써 병저항성 유전자의 발현을 대폭 상승시킬 수 있음을 확인 할 수 있었다(그림5).

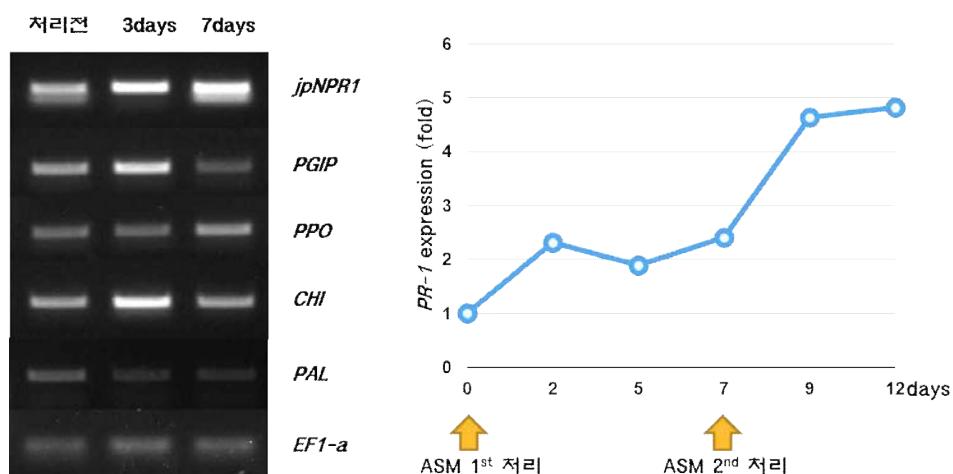


그림 5. ASM을 처리한 후 병저항성 마커 유전자들의 발현 양상을 확인한 결과

병저항성 마커 유전자들의 발현 양상을 확인해 본 결과, PPO와 PAL과 같은 병저항성 유전자들이 발현되지 않는 것으로 확인되어 이 유전자들 관련 효소 활성을 확인하는 것은 의미가 없을 것으로 생각되어 병저항성 관련 식물호르몬인 SA(salicylic acid) 함량을 HPLC로 측정해 보았다. SA standard를 이용하여 HPLC 조건을 확립한 뒤 대조구인 물처리된 배나무와 ASM이 처리된 배나무로부터 SA를 추출한 결과 ASM 처리된 배나무에서 물 처리된 배나무에 비해 평균 2-4배 이상의 SA가 검출되었다(그림 6).

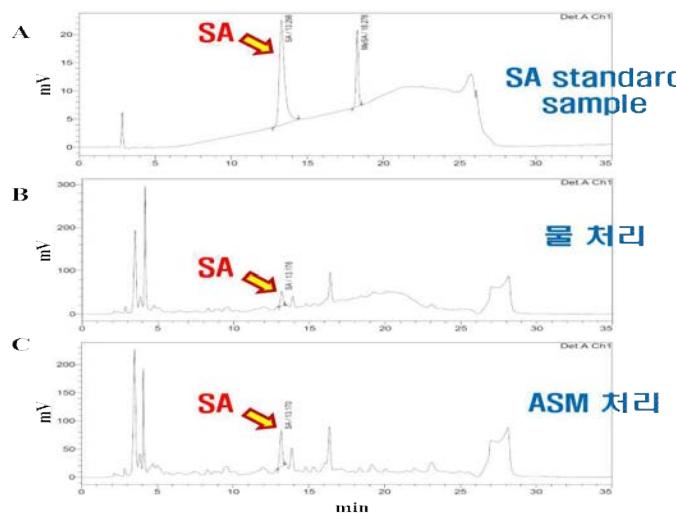


그림 6. ASM 처리된 배 실생묘에서 병저항성 식물호르몬 SA 함량 조사

확립된 실내 인공접종 방법을 이용하여 물처리된 배나무와 ASM이 처리된 배나무에 각각 검은별무늬병균(*Venturia nashicola*) 분생포자를 접종한 다음 시간별로 샘플링 한 다음 각 샘플로부터 SA를 추출한 결과, 병원균이 접종된 4일 후에 ASM 처리된 배나무에서 물처리된 배나무에 비해 SA가 약 11배 더 많이 검출되었다(그림7). 따라서 ASM이 처리된 배나무에서 전신저항성 활성제 ASM에 의해 병저항성 관련 신호전달체계가 활성화 되어 있다가 검은별무늬병균의 침입을 인식한 다음 물처리된 배나무에 비해 빠르게 SA를 합성하고 이러한 결과로 PR-1 등과 같은 병저항성 관련 유전자들이 발현되어 결과적으로 검은별무늬병에 대한 병저항성을 획득하게 됨을 의미한다 하겠다.

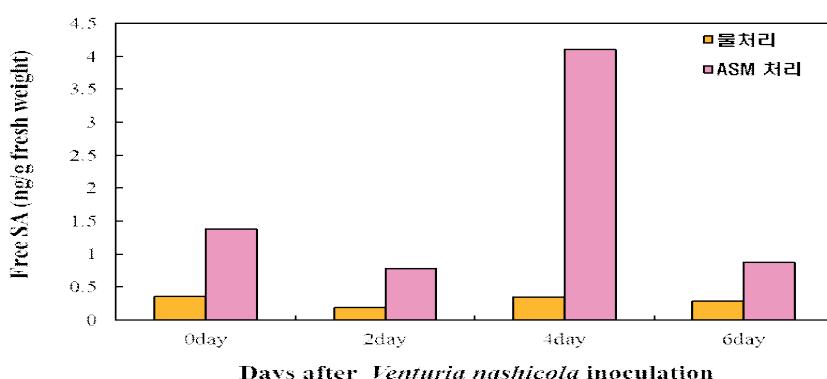


그림 7. ASM 처리된 배 실생묘에 검은별무늬병균 분생포자 접종 후 증폭된 병저항성 식물호르몬 SA 함량

검은별무늬병 방제 효과를 높이기 위해 전신저항성 활성제 ASM을 배재배 과정에서 ASM 약효지속 기간과 최적의 처리 시기를 결정하기 위해 병저항성 호르몬인 SA의 함량 변화를 확인하였다. ASM을 처리 후 그림 8에서 확인할 수 있듯이 SA 함량이 증가됨을 알수 있었으며 증가된 SA 함량은 시간이 지속됨에 따라 약 14일후에는 처리전 단계로 감소되고 있음을 확인 할 수 있었다. 그러나 ASM을 처음에 처리한 뒤 7일 후에 다시 한번 더 처리한 배나무의 경우는 처음 처리 후 14일후에도 처리전에 비해 약 3배정도의 SA 함량이 존재하고 있어 7일 간격으로 두 번 처리에 의한 상승효과를 확인 할 수 있었다. 이러한 결과를 통해 ASM의 약효지속 기간은 배나무의 품종과 환경에 따라 차이는 있을 수 있겠지만 약 7-10일 정도까지 유지되고 있음을 확인하였다. 그리고 ASM의 최적 처리시기는 2015년 경우에도 검은별무늬병에 걸린 이 병엽이 5월 초에 처음 확인이 되었으므로 ASM에 의한 병저항성이 유도되는 시간을 감안해서 4월 중순경에 처음으로 살포하는 것이 좋을 것으로 생각되었다. 따라서 ASM을 포함한 방제력은 4월 중순에 처음 처리하는 것으로 결정하여 사용하였다.

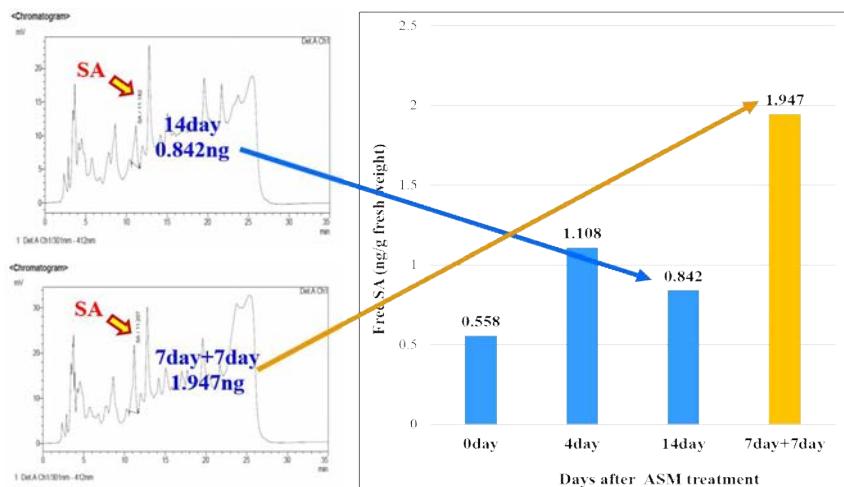


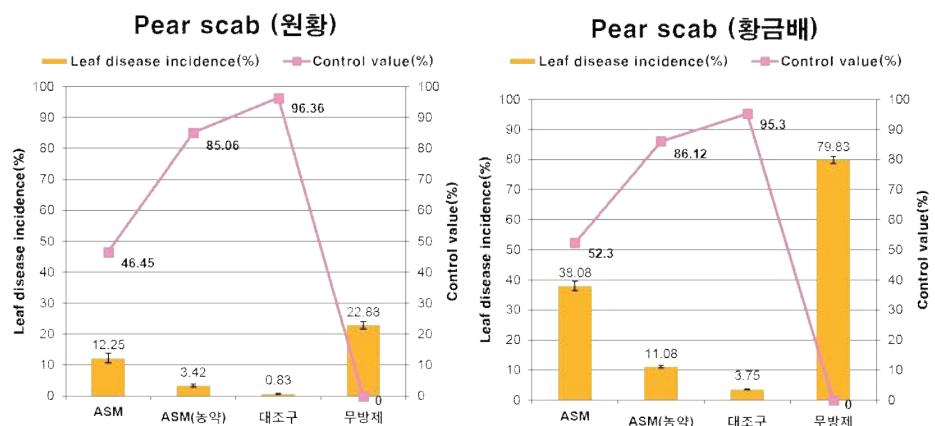
그림 8. ASM 처리 후 SA 함량 변화

ASM 처리시기와 약효지속 기간이 결정됨에 따라 ASM의 검은별무늬병 방제 효과를 검증하기 위해 나주 배연구소의 실험포장과 전남대학교 봉황농장의 배과수원에서 실험에 사용 가능한 품종을 대상으로 4가지 ASM이 포함된 방제력을 만들어 실험을 수행하였다. 먼저 검은별무늬병 저항성 품종인 원황 및 감수성 품종인 황금배를 이용하여 ASM만을 4번 처리한 ASM 처리구와 대조구인 농약 처리구에서 2회를 ASM로 대체 처리한 ASM(농약) 처리구를 설정하여 이병엽률과 이병과율 및 각각의 방제가를 조사해 보았다. 2015년 6월 5일에 이병엽률을 조사 하였으며 2015년 9월 23일에 이병과율을 조사하였다 (그림 9).



그림 9. 나주 배연구소 실험포장 및 전남대학교 봉황농장 배과수원에서 각 처리구에 ASM과 농약을 처리하는 모습과 이병엽률 및 이병과율을 조사하는 모습.

검은별무늬병에 대한 이병엽률을 2015년 6월 5일에 조사한 결과, 무방제구에서 검은별무늬병 감수성 품종인 황금배의 이병엽률은 79.83%, 이병과율은 100%의 발병도를 보였으며, 저항성 품종인 원황의 경우 이병엽률은 22.88%의 낮은 발병도를 보였으나 이병과율은 66.96%의 발병도를 보여 처리구간의 방제가를 평가하기에 충분하였다. 그림 10에서 확인할 수 있듯이 ASM 처리구는 원황과 황금배 두 품종 모두에서 이병과 뿐만아니라 이병엽의 방제가도 상당히 낮게 나타나 ASM만을 처리한 방제력으로는 검은별무늬병을 방제할 수 없음을 확인 할 수 있었다. 그러나 대조구인 농약 처리구에서 2회를 ASM으로 대체한 ASM(농약) 처리구는 대조구인 농약 처리구와 비교해 볼 때, 이병엽에 대한 방제가는 원황과 황금배에서 각각 85.06%와 86.12%를 보여 농약 대조구에 비해 약간 떨어졌지만 일정부분 농약을 대체할 수 있는 가능성을 확인할 수 있었다. 그러나 이병과에 대한 방제가는 각각 68.53%와 52.85%로 농약 대조구에 비해 상당히 낮게 나타났다. 이러한 결과는 ASM을 2회 대체한 방제력이 유과 상태의 검은별무늬병을 제대로 방제하지 못했다는 것을 의미하는 것으로 추후에 ASM을 활용한 방제 매뉴얼 제작시 세심하게 고려해야 할 부분이라 생각되었다.



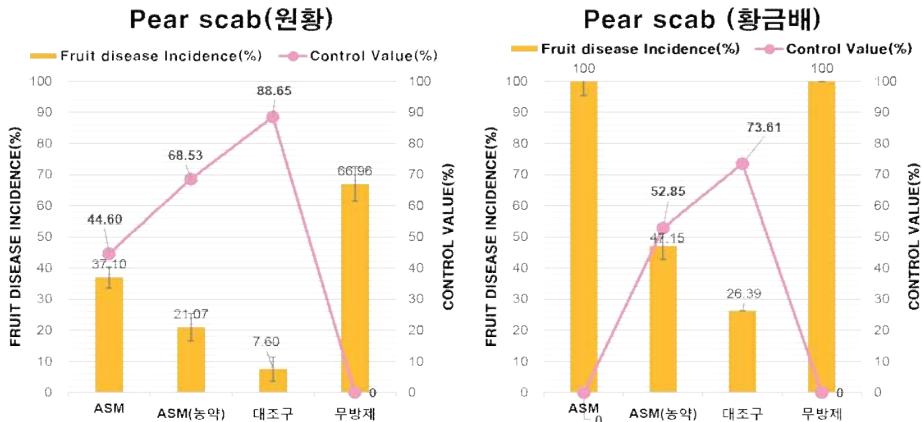


그림 10. 원황과 황금배에서 ASM 처리구와 ASM(농약) 처리구의 이병엽률과 방제가 (위 그림) 및 이병과율과 방제가 (아래 그림)

ASM(농약) 처리구를 보완하여 농약 대체 시기와 처리 횟수를 보완한 ASM이 포함된 새로운 검은별무늬병 방제력을 제작하여 검은별무늬병 감수성 품종인 신고를 대상으로 실험을 수행하였다. ASM이 포함된 새로운 검은별무늬병 방제력은 농약을 대체하는 시기를 일부 조정하여 배가 재배되는 전 생육기간을 모두 포함할 수 있도록 4월 중순부터 5월 하순까지 약 10일 -15일 간격으로 총 4회를 농약 대신 ASM으로 대체하였으며 (B 처리구와 E 처리구), 또 다른 처리구는 ASM을 3회만 대체하였으며 (C 처리구), 그리고 농약 대조구는 각각 보호살균제의 사용 횟수를 다르게 조정한 두 가지 처리구 (A 처리구와 D 처리구)를 통해 ASM을 교호로 처리한 시험구들의 검은별무늬병 방제 검증하였다 (그림 11). 이병엽률은 2016년 6월 23일에 조사한 결과, 무방제구에서 이병엽률은 33.19%의 발병도를 보였으며 2016년 10월 7일에 조사한 이병과율은 83.74%의 발병도를 보여 처리구간의 방제가를 평가하기에 충분하였다. 그림 12에서 확인할 수 있듯이 ASM을 4회 대체한 B 처리구와 E 처리구에서 이병엽에 대한 방제가는 각각 86.17%와 90.96%로 나타났으며, 이병과에 대한 방제가는 각각 86.35%와 90.94%로 나타났다. 이러한 결과는 농약 처리구인 A 처리구와 D 처리구의 방제가와 비교해 보았을 때 통계적으로 같은 수준의 방제가를 보였음을 확인하였다. 따라서 전신저항성 활성제인 농약 대신 ASM을 4회 대체한 ASM과 농약을 교호로 처리한 방제 매뉴얼을 적극적으로 활용한다면 농약을 적게 살포하면서도 검은별무늬병 방제 효율을 증진 시킬 수 있을 것으로 생각한다.

설포시기	A 처리구	B 처리구	C 처리구	D 처리구	E 처리구
3월 24일	Sulfur	Sulfur	Sulfur	Sulfur	Sulfur
4월 01일	Copper	Copper	Copper	Copper	Copper
4월 08일	Dithianon(Multi)	Dithianon(Multi)	Dithianon(Multi)	Dithianon(Multi)	Dithianon(Multi)
4월 15일	Dithianon(Multi)	ASM + Mancozeb (SAR+Multi)	-	Mancozeb(Multi)	ASM + Mancozeb (SAR+Multi)
4월 22일	Mancozeb + Difenoconazole (Multi+DMI)	Mancozeb + Difenoconazole (Multi+DMI)	Mancozeb + Difenoconazole (Multi+DMI)	Mancozeb + Difenoconazole (Multi+DMI)	Mancozeb + Difenoconazole (Multi+DMI)
4월 29일	Dithianon(Multi)	ASM + Mancozeb (SAR+Multi)	ASM + Mancozeb (SAR+Multi)	Dithianon(Multi)	ASM + Mancozeb (SAR+Multi)
5월 05일	Azoxystrobin(QoI)	Azoxystrobin(QoI)	Azoxystrobin(QoI)	Azoxystrobin(QoI)	Azoxystrobin(QoI)
5월 11일	Iminoctadine tris(albesilate)(Guanidine)	ASM + Mancozeb (SAR+Multi)	ASM + Mancozeb (SAR+Multi)	Mancozeb + Cyprodinil (Multi+ AP)	ASM + Mancozeb (SAR+Multi)
5월 20일	Pyrimethanil(AP)	Pyrimethanil(AP)	Pyrimethanil(AP)	Captan + Fluxapyroxad (Multi + SDHI)	Captan + Fluxapyroxad (Multi + SDHI)
5월 27일	Dithianon(Multi)	ASM + Mancozeb (SAR+Multi)	ASM + Mancozeb (SAR+Multi)	Mancozeb + Triflumizole (Multi + DMI)	ASM + Mancozeb (SAR+Multi)
6월 03일	Fluxapyroxad(SDHI)	Fluxapyroxad(SDHI)	Fluxapyroxad(SDHI)	Dithianon + Pyraclostrobin (Multi + QoI)	Dithianon + Pyraclostrobin (Multi + QoI)
6월 23일	Captan + Pyraclostrobin (Multi + QoI)	Captan + Pyraclostrobin (Multi + QoI)			

그림 11. 전신저항성 활성제 ASM을 4회 대체한 처리구와 대조구인 농약 처리구의 방제력

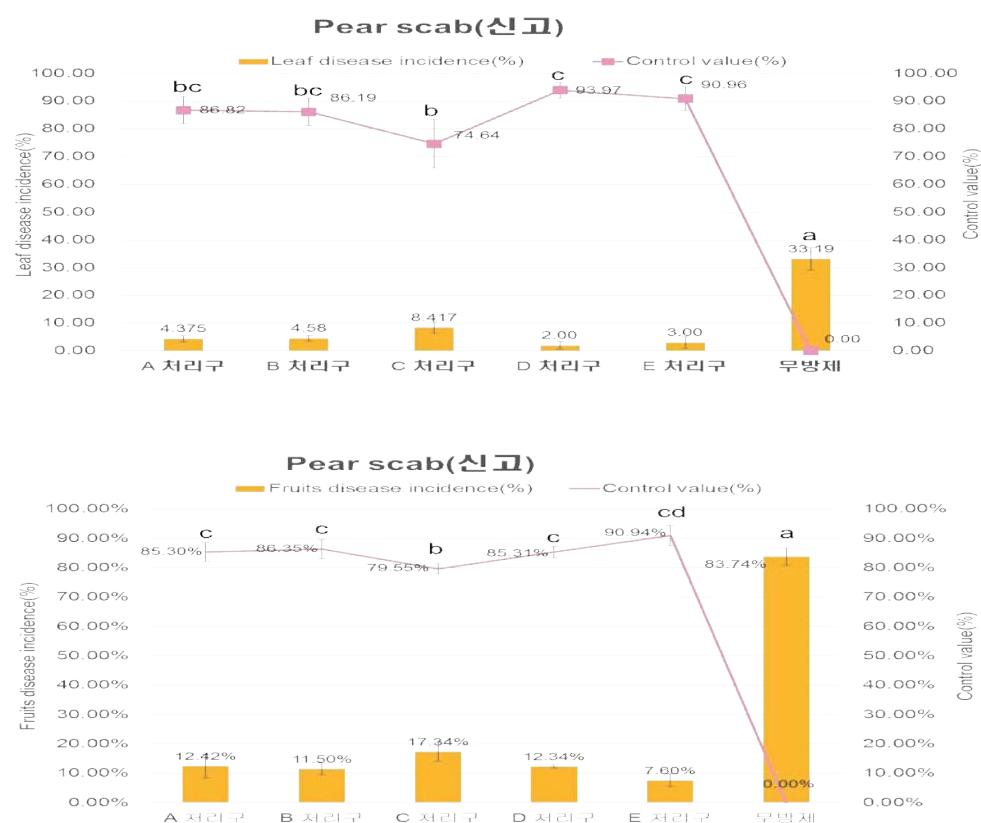


그림 12. 대조구인 농약 처리구와 ASM이 4회 대체된 ASM 처리구의 이병엽률과 방제가 (위 그림) 및 이병과율과 방제가 (아래 그림)

제 4 장 목표달성도 및 관련분야 기여도

제1절 : 목표대비 달성도

당초 목표	가중치(%)	개발 내용	달성도(%)
○ 배 검은별무늬병균 약제저항성 조사 ○ 배 검은별무늬병 방제효율 증진	10 10	○ 배 검은별무늬병균 약제저항성 분석 ○ 강수량 및 적습온도합기준 방제기술개발	100 100
○ 배나무 검은별무늬병균의 균학적 특성 조사 ○ 배나무 검은별무늬병균의 기주별 병원성 및 병원형 분화 조사 ○ 배나무 검은별무늬병균의 계통학적 유연관계 분석	10 5 5	○ 배나무 검은별무늬병균의 균학적 특성 및 분생포자 생성배지 선발 ○ 배나무 검은별무늬병균의 기주별 병원성 및 병원형 분화 조사 ○ 배나무 검은별무늬병균의 계통학적 유연관계 분석	100 100 100
○ 살균제 저항성 모니터링 ○ 저항성 문자마커 개발 ○ 저항성 문자지도 작성	10	○ 벤지미다졸계, DMI계, 스트로빌루린계 살균제 저항성 모니터링 ○ 유전자 염기서열 결정 및 문자마커 개발 ○ 저항성 문자지도 및 발현지역 규명	100 100 100
○ 약제 저항성 예측 알고리즘 개발 ○ 저항성 예측 및 방제프로그램 개발	10 10	○ 방제이력에 따른 약제저항성 알고리즘 개발 ○ 약제저항성 예측 및 방제프로그램 개발	100 100
○ 전신저항성 활성제의 선발 및 방어기작 규명 ○ 선발된 전신저항성 활성제의 약효기간 및 최적의 처리 시기 설정 ○ 전신저항성 활성제와 주요 약제를 교호로 사용하는 검은별무늬병 방제체계 실증	5 5 10	○ 전신저항성 활성제인 ASM를 선발하고 병저 항성 유전자 및 SA를 통해 방어 기작 규명 ○ ASM의 약효가 10일-14일까지 지속되며 처리기간의 조정을 통해 시너지효과를 확인 ○ ASM를 4회 대체한 실증시험으로 관행처리구와 비슷한 방제효과를 확인	100 100 100
검은별무늬병 방제효율 증진	100%	생력적 고효율 방제체계 구성	100

제2절 : 정량적 성과

연도 성과지표명		당초 목표 (전체)	실적	달성도 (%)	가중치 (%)
논문게재	SCI	4	2	50	10
	비SCI	8	3		10
농가기술지도/컨설팅 /현장기술지원		35	49	100	20
영농기술·정보 기관제출		5	5	100	10
전문서 등 저술활동		1	3	100	0
정보 전산 프로그램저작권 개발/등록		1	(1)		10
학술발표	국제	2	3		
	국내	14	20	100	30
홍보성과		9	60.3	100	10
계		-		-	

제 5 장 연구 결과의 활용 계획

<제1세부과제>

- 적습온도합(Degree-hours)에 근거한 방제기술은 향후 감염모형, 치료한계기 설정 등을 정밀 조합하여 방제지원시스템 구성으로 활용 가능하며, 농가별 방제력 구성에 필수적으로 이용될 수 있다.

<제1협동과제>

- 이 연구에서 개발된 2% 당근배지에서 배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola*의 분생포자 생성 방법은 배나무 검은별무늬병균 병원형 조사, 저항성 품종의 육성, 신규 약제 개발, 저항성 균주 탐색 연구 등에 폭넓게 활용할 수 있을 것으로 전망된다.

- 이 연구에서 개발된 2% 당근배지에서 배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola*의 분생포자 생성 방법은 The Plant Pathology Journal에 게재 승인되어 2017년 2월호에 게재됨.

- 우리나라에 분포하는 배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola* 병원형(race)의 지역별, 품종별 분포와 경시적(연차적) 변화를 추가로 연구하고, 현재 재배하고 있는 배나무 품종의 각 병원형(race)에 저항성 정도와 육성 계통의 저항성 정도를 파악함으로써 장기적인 배나무 검은별무늬 병에 저항성 품종을 육성하는 것이 필요하다.

<제2협동과제>

- 배 검은별무늬병균의 분자마커 탐색 기술은 다른 주요 과수에서 중요한 병의 원인이 되는 병원균의 분자마커 탐색에 이용될 수 있다. 특히 과수의 주요 병원균들은 배 검은별무늬병균과 같이 인공배지 상에서 배양기간이 너무 길기 때문에 기존의 방법으로 저항성 모니터링을 실시한다고 할 경우, 결과에 대한 피드백이 현장에 제공되기까지는 장기간의 연구기간을 필요로 한다. 따라서 신속한 결과의 피드백을 필요로 하는 현장에서 한천 희석법과 같은 전통의 살균제 저항성 모니터링 방법은 효율성이 떨어지는 방법이다. 따라서 본 개발기술은 국내 주요 과수 병해의 살균제 모니터링에 사용할 수 있을 것으로 생각한다.

- 우리과수연구회 회원 교육시 활용할 수 있으며, 학술적으로 금년 12월에 4편의 논문을 게재하려고 준비하고 있다. *Venturia nashicola*의 β -tubulin 유전자 변이가 benzimidazole계 살균제에 대한 반응에 미치는 영향, 배 검은별무늬병균의 benzimidazole계와 strobilurin계 살균제, 그리고 DMI 살균제에 대한 저항성 발현, *Venturia nashicola*의 CYP51 유전자에서 아미노산 치환과 DMI 살균제 반응과의 관계, Development of the quantitative sequencing method for the fungicide resistance monitoring of *Venturia nashicola* to benzimidazoles 등의 논문을 게재하려 한다.

<제3협동과제>

- 농가에서 살포하는 약제명, 혼용 약제, 약제 살포 일자, 살포 장소 등의 방제 이력을 기록함으로써 다음 해에 배 검은별무늬병 방제에 유용하게 이용될 수 있다. 또한, 배 검은별무늬병 예측 및 방제 프로그램을 위한 기초 자료가 된다. 반복적으로 사용되는 약제(살균제) 살포 기록은 해당 약제의 저항성 증가 위험을 알리는데 이용된다.
- 약제를 혼용하는 경우 살포하고자 하는 약제를 선택했을 때 그 약제와 혼용할 수 없는 약제를 목록에서 제외하고 혼용 가능한 약제만 제시함으로써 잘못된 약제 혼용으로 인한 약해와 경제적 손실을 줄일 수 있다. 모든 약제를 가나다순으로 정렬하여 살균제나 살충제를 단독으로 살포하거나, 살균제+살충제, 살균제+살균제를 혼용해서 살포하는 경우에도 혼란스럽지 않고 쉽게 약제를 선택할 수 있다.
- 농가 방제 이력을 바탕으로 농가에서 살포한 약제별 저항성 증가 위험을 알리고 저항성 증가 위험이 적은 대체 약제를 사용하도록 유도함으로써 동일 약제의 장기적인 사용으로 인하여 방제 효과가 떨어지는 것을 막는다. 기간을 선택하면 선택된 기간 동안의 계통별 약제 살포 횟수를 보여줌으로써 저항성 증가에 대한 경각심이 생기도록 합니다. 시기별로 필요한 주요 방제 방법을 주제로 일목요연하게 정리되어 있으며, 목차를 이용하여 쉽게 궁금한 점을 찾아 읽어볼 수 있어서 연간 방제 계획을 수립하고, 배 검은별무늬병이 창궐하는 시기에 필요한 방제법을 수시로 찾아보기 위한 참고자료로 유용하다.
- 전자책은 사용이 매우 간편하여 최소한의 조작으로 약제 정보와 혼용 여부를 확인할 수 있으며, 스마트폰과 PC에서 사용 가능하며 기기의 종류, 성능에 크게 구애받지 않고 집이나 과수원 등 언제 어디서나 약제 정보와 혼용 여부를 확인 가능하다. 다른 작물을 위해서도 사용 가능하다.
- 온도적습합(DH)과 기상 정보를 이용한 방제 시기 예찰 프로그램을 국내에서도 시급히 도입하여 방제 효과를 높임으로써 약제 경제성과 배 농가 수익 향상을 높일 수 있을 것으로 기대된다.

<제4협동과제>

- 전신저항성 활성제와 농약을 교호로 혼용한 처리구와 농약만 사용한 처리구의 검은별무늬병 방제 효율을 비교한 결과 검은별무늬병 방제 효율이 비슷하게 입증됨으로써 전신저항성 활성제를 활용한 검은별무늬병 방제 매뉴얼이 확립되었다.
- 전신저항성 활성제와 농약을 혼용해서 사용함으로써 농약을 최소화 할 수 있는 검은별무늬병 방제 기술이 확보되었다.
- 전신획득저항성 활성제를 활용한 검은별무늬병 방제 매뉴얼은 검은별무늬병 뿐만 아니라 스펙트럼이 다양한 병을 방제 할 수 있고 주요 농약이 적게 투여되어 약제저항성의 문제점도 해결할 수 있으며 배 재배농가의 경제적인 이익을 기대할 수 있어 고품질의 안전성이 확보된 배 생산으로 농가 소득에도 기여 할 것임

제 6 장. 연구 과정에서 수집한 해외 과학 기술 정보

- 유럽을 포함한 서구지역에서는 17년 전부터 네델란드 RIMpro시스템 등을 통해 병감염정보 및 방제지원시스템을 이용하고 있으며, 이런 시스템 운영자들은 사과, 포도, 배 등의 과수 병해에 대해 토양수분 및 양분관리 영역에 까지 실시간 기상정보를 연계시켜 운영하고 있다. 주요 선진 연구기관은 이런 방제지원시스템을 매년 개선하는데 참여하고 있으며 향후 상업화를 위한 정밀연구가 계획되고 있다. 또한 방제지원정보체계를 이용하는 사용자가 매년 함께 모여 적용약제에 대한 방제효과를 토론하고, 누적 강우량과 적습온도합을 기준으로 적용사례를 빅데이터화하여 방제지원시스템을 개선하고 있다.
- 일본에는 배나무 검은별무늬병균 *V. nashicola* race 1, race 2와 race 3가 분포하고. 중국에는 race 4, 타이완에는 race 5가 추가로 분포하는 것으로 밝혀짐.
- 해외에서는 Plant Health Technologies사의 Spray Guide 앱 프로그램, IPM (integrated pest management) Toolkit, FMC/Ag PhD의 Field Guide 등의 프로그램을 이용하여 병충해를 미연에 방지하여 경제적 손실이나 환경적인 위험 요소를 줄이도록 하고 있음.
- 일본에서는 배 재배시 전신저항성 활성제의 활용에 대한 연구를 꾸준히 수행하고 있으며 유럽에서는 서양배 생육시기별로 몇 가지 전신저항성 활성제를 처리해 검은별무늬병의 방제에 이용하고 있음
- 최근에는 중국에서도 전신저항성 활성제를 이용한 연구를 수행하고 있음

제 7 장 연구 개발 결과의 보안 등급

연구내용이 보안 등급에 해당되지는 않음

제 8 장 국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비 현황

구입 기관	연구 시설/ 연구 장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입 가격 (천 원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치장소)	NTIS장비 등록 번호

제 9 장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

항 목	적 용 범 위	시행기관	비고
연구실 정기 안전점검 (년 1회 이상)	- 과학기술분야 모든 연구실	대학교, 연구소	
연구실 정밀 안전진단 (2년 1회 이상)	- 유해물질 및 유해인자 취급 연구실 - 정기점검 결과 추가점검이 필요한 연구실	대학교, 연구소	
연구실 실내 공기질 관리 (매년 실시)	- 측정 및 분석 - 유해화학물질 사용, 유해인자 보유, 정밀진단결과 4등급 연구실	대학교, 연구소	
연구실 종사자에 대한 안전교육(매 학기별 6시간이상)	- 과학기술분야 모든 연구활동종사자	대학교, 연구소	
연구종사자 건강점진 (매년 실시)	- 과학기술분야 연구활동종사자	전남대학교	
연구활동종사자 안전공제 (매년 실시)	- 과학기술분야 연구활동종사자	전남대학교	

제 10 장 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문 /특허 /기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/ 인용횟수 등)
1	논문	Development of Carrot Medium Suitable for Conidia Production of <i>Venturia nashicola</i>	순천대 학교	책임 자	The Plant Pathology Journal		2017. 2. 1	단독사사	SCIE
2	논문	Effect of Lime Sulfur on Changes of Fungal Diversity in Pear Fallen Leaves	전남대 학교	교신 저자	The Korean Journal of Mycology	0.6373	2015.12.31	단독사사	
3	논문	배 검은별무늬병균 (<i>Venturia nashicola</i>)의 군사 생장에 대한 배지 조성의 영향	전남대 학교	교신 저자	Agricultural Science & Technology Research	-	2014.06.30	단독사사	

제 11 장 기타사항

- 해당사항 없음

제 12 장 참고문헌

<1세부과제>

- 권수민, 여무일, 최세훈, 김건웅, 전경진, 엄재열. (2010). 울산과 나주에서 채집한 배나무 검은별 무늬병균의 ergosterol 생합성 저해제 5종에 대한 감수성 저하. *식물병연구* 16(1): 48–58.
- Hobbelen, P.H.F., Paveley, N.D., Bosch, F. (2011). Delaying selection for fungicide insensitivity by mixing fungicides at a low and high risk of resistance development: A modeling analysis. *Phytopathology* 101:1224–1233.
- Pfeuffer, E.E., Ngugi, H.K. (2011). Orchard factors associated with resistance and cross resistance to sterol demethylation inhibitor fungicides in populations of *Venturia inaequalis* from Pennsylvania. *Phytopathology* 102:272–282.
- Sanglard, D. (2003). Resistance and tolerance mechanisms to antifungal drugs in fungal pathogens. *Mycologist* 17(2): 74–78.

<1협동과제>

- Bailey, LH (1917). Pyrus. Standard cyclopedia of horticulture, Bailey, LH, ed. New York, NY, USA: Macmillan, pp. 2865–2878
- Bell, RL (1990). Peras (Pyrus). Genetic resources of temperate fruit and nut crops I, Moore, JL, and Ballington, JR, ed. Wageningen, the Netherlands: International Society for Horticultural Sciences, pp. 655–697
- Cho, EK, Cho, WT, and Lee, EJ (1985). The causal organism of pear scab in Korea. *Korean J Mycol.* 13, 263–265.
- Iketani, H, Manabe, T, Matsuta, N, Akihama, T, and Hayashi, T (1998). Incongruence between RFLPs of chloroplast DNA and morphological classification in east Asian pear (*Pyrus* spp.). *Genetic Res Crop Evol.* 45, 533–539.
- Ishii, H, and Yanase, H (2000). *Venturia nashicola*, the scab fungus of Japanese and Chinese pears: a species distinct from *V pirina*. *Mycol Res.* 104, 755–759.
- Koh, HS, Sohn, SH, Lee, YS, Koh, YJ, Song, JH, and Jung, JS (2013). Specific and sensitive detection of *Venturia nashicola*, the scab fungus of Asian pears, by nested PCR. *Plant Pathol J.* 29, 357–363.
- Kwak, YS, Min, JY, and Kim, HT (2015). Field population monitoring of benzimidazole fungicide resistance using quantitative sequencing in pear scab *Venturia nashicola*. *Res Plant Dis.* 21, 371.
- Maruyama, N, Fukue, N, Kim, OK, Shinohara, H, and Negishi, H (2014). Evaluation of

- media containing crop powder(s) for conidia mass production of *Sphaceloma* species. *Res Plant Dis.* 20, 332.
- Ryu, JP, Min, KH, Yim, SH, Song, JH, Choi, JJ, Lee, SH, Kim, WS, Cho, BH, and Yang, KY (2014). Effect of medium compositions on the mycelial growth of *Venturia nashicola* causing pear scab. *Agric Sci Tech Res.* 48, 9–17.
- Sivanesan, A (1977). The taxonomy and pathology of *Venturia* species. J Cramer, Vaduz, Liechtenstein, 94–99.
- Tanaka, S, and Yamamoto, S (1964). Studies on pear scab II. Taxonomy of the causal fungus of Japanese pear scab. *Ann Phytopathol Soc Jpn.* 29, 128–136.
- Won, KH, Kang, SS, Kim, YK, Sherzod, R, Lim, KH, and Lee, HC (2013). Evaluation of scab resistance and effect of photosynthetic rates on fruit characteristics among elite pear seedlings. *Korean J Environ Agric.* 32, 117–122.

<2협동과제>

- 권수민, 여무일, 최세훈, 김건웅, 전경진, 엄재열. (2010). 울산과 나주에서 채집한 배나무 검은별 무늬병균의 ergosterol 생합성 저해제 5종에 대한 감수성 저하. *식물병연구* 16(1): 48–58.
- Hobbelin, P.H.F., Paveley, N.D., Bosch, F. (2011). Delaying selection for fungicide insensitivity by mixing fungicides at a low and high risk of resistance development: A modeling analysis. *Phytopathology* 101:1224–1233.
- Pfeuffer, E.E., Ngugi, H.K. (2011). Orchard factors associated with resistance and cross resistance to sterol demethylation inhibitor fungicides in populations of *Venturia inaequalis* from Pennsylvania. *Phytopathology* 102:272–282.
- Sanglard, D. (2003). Resistance and tolerance mechanisms to antifungal drugs in fungal pathogens. *Mycologist* 17(2): 74–78.

<3협동과제>

- A. Wyenandt, and N. L. Maxwell, “Evaluating fungicide recommendations for vegetable crops in the United States: Should more be done to limit the Risks of fungicide fesistance development?,” *Journal of Extension*, vol. 49, no. 3, June, 2011.
- M. T. McGrath, “Challenge of fungicide resistance and anti-resistance strategies in managing vegetable diseased in the USA. In T. S. Thind, *Fungicide Resistance in Crop Protection: Risk and Management*,” Cambridge, MA: CAB International, pp. 191–207, 2011.
- H. Ishii, “Impact of fungicide resistance in plant pathogens on crop disease control and agricultural environment,” *Japan Agricultural Research Quarterly*, vol. 40, no. 3, p. 205, 2006.

IPM, Integrated Pest and Crop Management: News and Resources for Wisconsin Agriculture from the University for Wisconsin. <http://ipcm.wisc.edu/ipm/>
Spray Quide from Plant Health Technologies, http://www.simplot.com/farmers/products/specialty_products/spray_guide_app.

제주도 농업기술원, <http://e-ati.jeju.go.kr>

경기도 농업기술원, <http://nongup.gg.go.kr/사업소개/농업기술원-앱소개/스마트농업인/소개>

Dekker,J. "Contermeasures for avoiding fungicide resistance. In J. Dekker and S. G. Georgopoulos, Fungicide Resistance in Crop protection, eds," PUDOC, Wageningen, The Netherlands, pp. 149–159, 1982.

Hewitt, H. G. "Fungicides in crop protection," Wallingford, UK: CAB International, p.221, 1998.

<4협동과제>

Percival, GC., Noviss, K., Haynes, I. 2009. Field evaluation of systemic inducing resistance chemicals at different growth stages for the control of apple and pear scab. *Crop Protection* 28:629–633.

Faize, M., Faize, L., Koike, N., Ishizaka, M., and Ishii, H. 2004. Acibenzolar-S-Methyl-induced resistance to Japanese pear scab is associated with potentiation of multiple defense responses. *Phytopathology* 94:604–612.

Ishii, H. and H. Yanase. 2000. *Venturia nashicola*, the scab fungus of Japanese and Chinese pears: a species distinct from *V. pirina*. *Mycological Research* 104:755–759.

주 의

1. 이 보고서는 농촌진흥청에서 시행한 「FTA대응경쟁력향상기술개발」의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농촌진흥청에서 시행한 「FTA대응경쟁력향상기술개발」의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.