

Short Communication



CrossMark

Open Access

토양에 매몰 방제된 화상병 감염 사과와 배 나무로부터 화상병균 생존 조사

김예은, 김준영, 노형진, 이동형, 김수산, 김성환*

단국대학교 자연과학대학 미생물학과 및 생물다양성연구소

Investigating Survival of *Erwinia amylovora* from Fire Blight–Diseased Apple and Pear Trees Buried in Soil as Control Measure

Ye Eun Kim, Jun Young Kim, Hyeong Jin Noh, Dong Hyeung Lee, Su San Kim and Seong Hwan Kim*
(Department of Microbiology and Institute of Biodiversity, College of Natural Science, Dankook University, Cheonan 31116, Korea)

Received: 9 September 2019/ Revised: 15 October 2019/ Accepted: 8 November 2019

Copyright © 2019 The Korean Society of Environmental Agriculture

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ORCID

Seong Hwan Kim
<https://orcid.org/0000-0002-6830-3943>

Jun Young Kim
<https://orcid.org/0000-0002-5264-1649>

Dong Hyeung Lee
<https://orcid.org/0000-0001-6448-7303>

Ye Eun Kim
<https://orcid.org/0000-0002-8487-2003>

Hyeong Jin Noh
<https://orcid.org/0000-0002-9786-3990>

Susan Kim
<https://orcid.org/0000-0001-9713-4360>

Abstract

BACKGROUND: Since 2015, fire blight disease caused by *Erwinia amylovora* has been devastating apple and pear orchards every year. To quickly block the disease spreading, infected apple and pear trees have been buried in soil. However, concern on the possibility of the pathogen survival urgently requires informative data on the buried host plants. Therefore, this study was conducted to investigate the survival of the pathogen from the buried host plants.

METHODS AND RESULTS: Apple trees buried in 42 months ago in a Jecheon site and pear trees buried in 30 months ago in an Anseong site were excavated using an excavator. Plant samples were taken from stems and twigs of the excavated trees. The collected 120 samples were checked for rotting and used for bacterial isolation, using TSA, R2A,

and *E. amylovora* selection media. The purely isolated bacteria were identified based on colony morphology and 16S rDNA sequences. Wood rotting and decay with off smells and discoloring were observed from the samples. A total of 17 genera and 48 species of bacteria were identified but *E. amylovora* was not detected.

CONCLUSION: Our investigation suggests that the survival of *E. amylovora* doesn't seem possible in the infected hosts which have been buried in soil for at least 30 months. Therefore, the burial control can be considered as a safe method for fire blight disease.

Key words: Burial site, *Erwinia amylovora*, Fire blight

서론

고위험 식물병해인 사과·배 화상병(Fire blight disease)은 세균 *Erwinia amylovora*에 의해 발생하는 병해로, 사과, 배를 비롯하여 장미과에 속하는 180여 기주에 피해를 주는 병해이다(Zwet and Keil, 1979). 1780년 미국 동부지역에서

*Corresponding author: Seong Hwan Kim
Phone: +82-41-550-3454; Fax: +82-41-523-3454;
E-mail: piceae@dankook.ac.kr

최초로 발생 보고된 후 북미, 유럽국가, 아프리카 그리고 오세아니아 지역에서 발생하여 큰 피해를 입히고 있다 (Drenova et al., 2012). 국내에서는 2015년 경기도 안성, 천안, 제천시에서 배와 사과에서 최초 발생하였고 (Myung et al., 2016; Park et al., 2016), 이후 매년 지속적으로 발병하여 2019년 현재까지 원주, 충주, 음성, 이천, 파주, 용인, 연천까지 빠르게 확산하여 발병되고 있다.

화상병은 이처럼 단시간에 멀리 퍼질 수 있고 상당한 피해를 주는 매우 위험한 병해이기 때문에 우리나라를 비롯하여 많은 나라들이 식물검역에 있어서 급속히 병해로서 관리하고 있다. 이에 따라 국내에서는 병 발생 시점 초기에 즉시 발생과원을 비롯하여 주변 반경 100 m 이내의 모든 기주식물을 제거한 뒤 2 m 정도의 깊이로 구덩이를 파고 식물을 매몰하는 공적 방제를 하여 왔다(농촌진흥청, 농작물 병해충 예방 방제에 관한 규정 전문 제2017-36호, 2017). 2015년 당시에는 매몰 후 매몰지에서 5년간 기주식물을 식재하지 못하도록 규정하다가 3년으로 그 기한을 줄여 매몰지를 관리하고 있다. 그러나 매몰된 감염기주로부터 병원균이 생존해 있어서 토양 곤충이나 서식 생물에 의해 매몰지 주변 과원에 병이 재발 또는 확산될 우려가 있다고 농민들이 우려하고 있다. 그 결과 매몰지에 기주 아닌 다른 작물을 재배하는 것조차 안전한지의 구심을 가지고 있는 실정이다. 매몰 처리된 감염기주에 대한 국내의 연구자료가 부족한 바, 발병지의 병 방제에 대한 신뢰성을 얻기 위해 매몰 방제의 안전성에 대한 연구자료의 확보가 매우 시급한 실정이다. 이에 따라, 본 연구는 화상병 감염으로 토양에 매몰된 사과와 배 나무를 다시 발굴하여 식물체의 상태와 화상병균의 생존을 조사하였다.

재료 및 방법

화상병 감염 식물 매몰지에서의 시료 채취

농가 섭외를 통하여 2015년 최초 발생하여 사과나무를 매몰한 충청북도 제천 소재 농지(매몰한지 약 42개월 지난 토양)와 2017년 발생한 배나무를 매몰한 경기도 안성 소재 농지(매몰한지 약 30개월 지난 토양)를 선정하였다. 제천 농지는 쿡이 재배되고 있었고 안성 농지는 감자를 재배하고 수확을 마친 직후였다. 매몰 후 3년 이하는 기주식물 식재가 금지되기 때문에 안성 농지는 농촌진흥청의 허가를 받아 발굴을 수행하였다. 발굴 수행전 안전 발굴 지침을 마련하여 지침 교육 후 수행하였다. 감염 기주 발굴은 포크레인을 이용하여 각 농지 마다 토양 3군데를 약 2-4 m 깊이 지점까지 판 후 구덩이 마다 20개의 기주 식물 줄기와 가지 일부분을 각각 채집하여 총 120개의 시료를 확보하여 분석하였다.

매몰지 발굴 배화상병 감염 식물시료로 부터 세균 분리, 동정, 화상병균 존재여부 검증

확보된 발굴 식물 시료는 지퍼백에 담은 후 밀폐용기에 넣어 실험실로 운송 후 분석하였다. 붓으로 토양을 제거 후 식물체를 쪼개어서 표면과 내부를 육안과 해부현미경으로 부속

상태와 변색을 관찰하고, 코로 냄새를 맡았다. 미생물 분석을 위해서는 나무를 작은 조각으로 잘라 50 mL conical tube에 들어 있는 20 mL의 멸균 증류수에 잠시 침지 하였다가 3분간 vortexing 하였다. 침지수는 10^{-5} 까지 serial dilution을 진행한 후 TSA (Tryptone Soya Agar, OXOID, Waltham, Massachusetts, USA), R2A Agar (Reasoner's 2A agar, BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA), *Erwinia amylovora* selection 배지(Crosse and Goodman, 1973)에 도말 하여 25°C 배양기에서 2일 간 배양하였다. 배양된 배지에 자란 세균 군집의 형태학적 특징인 크기, 모양, 색 등을 관찰하고 서로 다르게 보이는 세균 군집들을 취하여 TSA 배지에 순수 분리를 진행하였다. 순수 분리가 완료된 세균은 16S rDNA region에 특이적인 universal primer (27F 5'-AGAGTTGATCCCTGGCTCAG-3'; 1492R 5'-GGTACCTTGTACGACTT-3') (Cohen et al., 1972)를 사용하여 PCR(polymerase chain reaction)을 하였다. 증폭된 PCR products는 MACROGEN사에 염기서열분석을 의뢰하여 nucleotide sequence 정보를 확보 하였다. 세균의 종 동정은 결정된 nucleotide sequence를 미국 국립생물공학정보센터(NCBI)의 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 및 한국 천랩의 EzBioCloud (Yoon et al., 2017) 프로그램을 이용하여 수행 하였다.

한편 배화상병균이 식물 조직세포 내에 깊이 분포하여 감염식물 조각 분리 작업에서 빠졌을 가능성을 고려하여 시료를 더 작은 가루로 만들어 검출을 시도하였다. 이를 위해 발굴식물 시료 가지나 줄기의 표면을 2% 락스로 2분간 표면 살균 후 5분 동안 표면물기가 사라지도록 건조 하였다가 알코올로 표면 살균한 싹으로 물관부와 사관부 근처부위를 돌아가며 톱질하여 톱밥(0.3g)을 얻은 후 30 ml potato broth 배지를 담은 50 ml Falcone plastic tube에 넣고 30°C에서 회전 배양기에서 200 rpm 속도로 3일간 배양 하였다. 그 후 template 로서 세균 배양액 50μl를 취하여 배화상균 특이 검출 primer로 PCR을 수행하였다(Kim et al., 2001). PCR 결과물은 1% agarose gel에 전기영동하여 1000bp 크기의 band 증폭여부를 확인함으로써 배화상균의 존재 유무를 판단하였다.

결과 및 고찰

매몰지에서 채취한 감염 식물의 부속 상태 확인

제천에서 채취한 사과나무 시료는 채취할 당시 악취가 많이 나지 않았으나 시료의 겉 표면이 검은색이었으며 만져 보았을 때 무르고 껍질이 쉽게 벗겨졌다. 단면으로 자른 것과 쪼갠 때 내부에 변색과 부후가 존재하였고 현미경으로 관찰 결과 나무 결 사이에 틈이 생긴 것을 관찰하였다(Fig. 1). 안성에서 채취한 배나무 시료는 채취할 당시 혐기적 발효로 인하여 발생하는 악취가 많이 났으며 표면에 검은색 변색이 존재하였고 겉은 단단하였다. 단면을 관찰했을 때 나무의 결이 일정하게 관찰되었다. 현미경 관찰 결과 나무 결 사이에 틈이 보이지 않지만 검게 변한 부분으로 보아 부속이 진행되고 있는

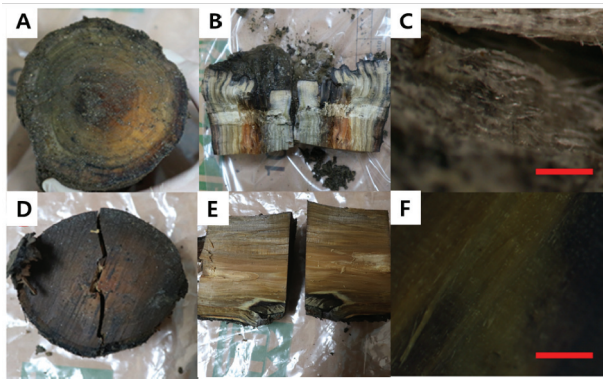


Fig. 1. Photos of examples of discolored and decayed wood pieces sampled in the fire blight-diseased apple trees buried in soil 42 months ago at a Jecheon site (A, B, C) and pear trees buried in soil 30 months ago at an Anseong site (D, E, F). (C) and (F): Stereoscopic microscopic images of the surface of wood pieces in photo B and E, respectively. Bar = 1 mm.

것으로 사료되었다. 안성시료와 제천시료의 조직 관찰 결과의 차이는 배나무와 사과나무의 조직적 특성이 다른 점과 더불어 매몰된 기간이 42개월과 30개월로 서로 다르기 때문에 나타난 결과로 볼 수 있다. 매몰기간이 길수록 부숙 정도가 클 수 있을 것이다.

매몰지 발굴 배화상병 감염 식물시료로부터 세균 분리 및 동정 및 화상병균 존재여부 검정

제천과 안성 매몰지에서 채집한 120개 시료 중 배지에 자란 나온 콜로니 형태를 기반으로 서로 달라 보이는 콜로니를 선별하여 총 92개 순수분리 균주를 선별하였다. 16S rDNA 분석 결과

에 따라 17속 48종이 동정되었다. 제천에서 발굴한 사과 나무 시료에서는 3개 지점 모두 *Bacillus* 균이 우점을 차지하였고 *Pseudomonas* 균이 공통으로 존재하였다(Fig. 2. A-1, A-2, A-3). 세균 종류는 3에서 4 속에 국한하였다. 안성에서 발굴한 사과 나무 시료에서도 2개 지점 시료에서 *Bacillus* 균이 우점을 차지하였고 그 다음으로 *Psychrobacillus* 균이 빈도 높게 검출되었다(Fig. 2. B-2, B-3). 1개 지점에서는 *Psychrobacillus*가 우점을 차지 하였고, 그 다음으로 *Bacillus* 균이 높게 검출되었다. 세균의 종류는 7속에서 12속까지 존재하였다. *Bacillus*은 토양에서 널리 퍼져 있는 세균으로 제천과 안성 시료 모두에서 우점하였다(Gagelidze et al., 2018). 그러나 화상병균인 *Erwinia amylovora*는 제천과 안성 시료 모두에서 하나도 검출되지 않았다. 별도로 진행한 120개 발굴식물의 줄기와 가지를 미세하게 싹뚱으로 갈아 만든 분말 시료로부터 자라난 세균을 대상으로 PCR을 이용하여 *E. amylovora* 특이 마커로 배화상병균의 존재를 조사한 실험에서도 대상균 밴드가 증폭되지 않았다(data not shown). 검출된 종 들은 대부분 토양에 서식하는 종으로 보고된 것이고 부숙이 진행된 나무의 상태로 보아 매몰한 화상병 감염 식물에는 화상병균이 존재하지 않는 것으로 사료된다. 따라서 약 2 m 깊이에 매몰된 화상병 감염 사과와 배나무는 혐기적 조건에서 약 3년 정도이면 병원세균에 의해 병이 재발하거나 확산될 우려는 없을 것으로 보여진다. 특히 화상병의 화학적 방제(Gusberti et al., 2015)보다 친환경적인 매몰 방제는 초기 전염원을 줄이는데 매우 효과적인 방법이다. 따라서 본 연구 결과를 바탕으로 향후 좀 더 확대된 조사를 수행함과 동시에 매몰 된지 1년 또는 2년 된 감염 기주식물에 대해서도 발굴조사를 수행한다면 매몰지의 안전 관리에 필요한 정보가 얻어질 것으로 전망된다.

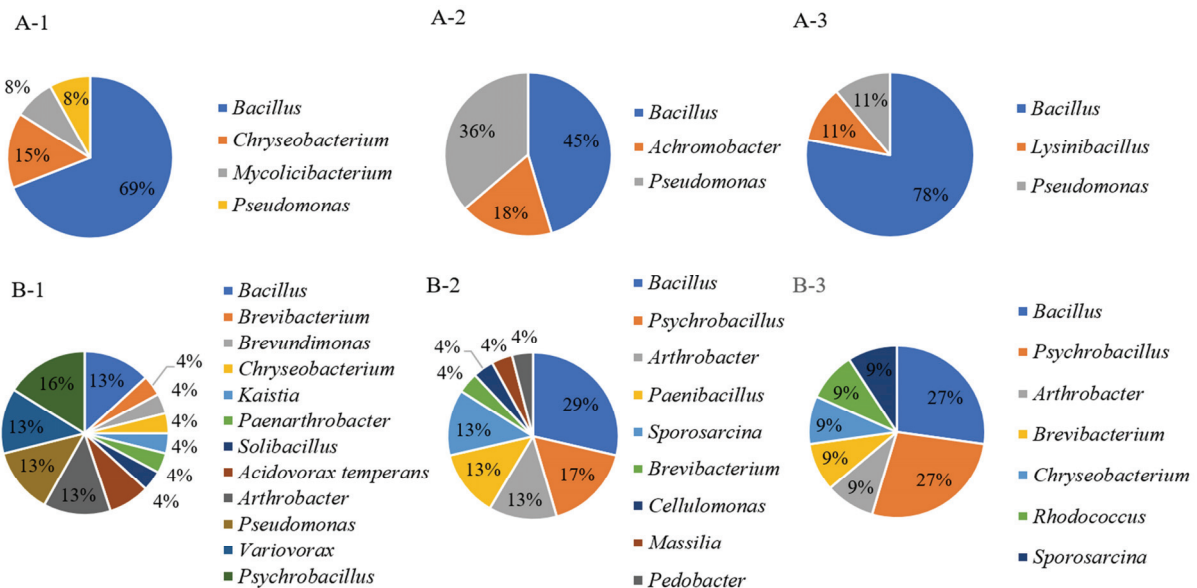


Fig. 2. Bacteria identified in the fire blight-diseased apple trees buried in soil 42 months ago at a Jecheon site (A) and pear trees buried in soil 30 months ago at an Anseong site (B). Numbers in A and B are three replicates of excavation at each site.

Note

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgement

This work was carried out with the support of "Cooperative Research Program for Agriculture Science & Technology Development (Project No. PJ0142192019)", RDA, Republic of Korea.

References

- Cohen, S. N., Chang, A. C., & Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 69(8), 2110-2114.
- Crosse, J. E., & Goodman, R. N. (1973). A selective medium for and a definitive colony characteristic of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*, 63(11), 1425-1426.
- Drenova, N. V., Isin, M. M., Dzhamurzina, A. A., Zharmukhamedova, G. A., & Aitkulov, A. K. (2012). Bacterial fire blight in the Republic of Kazakhstan. *Plant Health Research and Practice*, 1, 44-48.
- Kim, W. S., Hildebrand, M., Jock, S., & Geider, K. (2001a). Molecular comparison of pathogenic bacteria from pear trees in Japan and the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Microbiology*, 147(Pt 11), 2951-2959.
- Myung, I. S., Yun, M. J., Lee, Y. H., Kim, G. D., & Lee, Y. K. (2016). First report of fire blight caused by *Erwinia amylovora* on Chinese quince in South Korea. *Plant Disease*, 100(12), 2521.
- Park, D. H., Yu, J. G., Oh, E. J., Han, K. S., Yea, M. C., Lee, S. J., Myung, I. S., Shim, H. S., & Oh, C. S. (2016). First report of fire blight disease on Asian pear caused by *Erwinia amylovora* in Korea. *Plant Disease*, 100(9), p. 1946.
- Gagelidze, N. L., Amiranashvilia, L. L., Sadunishvilia, T. A., Kvesitadze, G. I., Urushadze, T. F., & Tamar O. K. (2018). Bacterial composition of different types of soils of Georgia. *Annals of Agrarian Science*, 16, 17-21.
- Gusberti, M., Klemm, U., Meier, M., Maurhofer, M., & Hunger-Glaser, I. (2015). Fire blight control: the struggle goes on. A comparison of different fire blight control methods in Switzerland with respect to biosafety, efficacy and durability. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(9), 11422-11447.
- Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., & Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(5), 1613-1617.
- Zwet, T., & Keil, H. L. (1979). Fire blight, a bacterial disease of Rosaceous plants. *Agriculture Handbook No. 510*. (pp. 2-18), USDA, Washington, USA.