한국식물병리학회지 12(3) : 363-367(1996)
Korean J. Plant Pathol. 12(3) : 363-367(1996)

배나무잎 이상반점증상에 관한 연구
6. 간이 검정방법 개발

남기웅* · 김충회 · 水谷房雄[1]
농업과학기술원 작물보호부 병리과, [1]愛媛大學 農學部 附屬農場

Studies on the Pear Abnormal Leaf Spot Disease
6. Development of a Simple Detection Method

Ki Woong Nam*, Choong Hoe Kim and Fusao Mizutani[1]
Plant Pathology Division, Department of Crop Protection, National Agricultural Science & Technology Institute, Suwon 441-707, Korea
[1]University Farm, College of Agriculture, Ehime University, Ehime 799-24, Japan

ABSTRACT : A simple grafting method was developed for the early detection of latent infections with the pear abnormal leaf spot disease which is presumed to be caused by a virus. The best grafting time for inoculation was late March, and the later the grafting time, the less the symptom development. The double grafting method induced the severest symptoms, and the double chip grafting method induced the less severe symptoms. However, the latter was more appropriate for the mass screening of the disease since it is simple and easy to perform, while the former needs some degree of skills for grafting. Successful transmissions of the causal agent by the grafting required at least 1-day contact period, and the highest level of the symptom development was achieved at more than 21-day contact period until the grafted tissues were fully united each other to form a callus.

***Key words* : pear, abnormal leaf spot, virus, graft transmission, early detection.**

배나무잎 이상반점증상은 접목에 의하여 전염되며 병원은 바이러스로 추정되고 있는데(11), 본 병의 발생이 심한 나무는 수량이 약 50% 정도 감소하고 품질이 저하된다(10).

본 병의 가장 효과적인 방제방법은 일반 과수바이러스병의 경우와 같이 무독묘목을 생산 보급하는 것으로 생각할 수 있다. 그러나 바이러스 무독묘목을 얻기 위해서는 대상 바이러스의 보독유무를 검정할 수 있는 적절한 진단방법이 개발되어야 한다. 일반적으로 초본류 식물바이러스병 진단에는 전자현미경이나 항혈청 이용, 지표식물 검정 등 여러 방법이 이용되고 있으나(3, 4, 13, 14, 19) 이러한 방법들은 즙액접종이 용이하고 순화가 가능한 바이러스병에 한정된다. 과수 바이러스병 중에도 prunus necrotic ringspot virus, prune dwarf virus, apple mosaic virus, citrus tristeza virus 등은 위와 같은 방법으로 검정이 가능하다(3, 13, 14, 18). 그러나 낙엽 과수의 바이러스는 대부분 초본 지표식물에서 증식이 어렵고 항체 생산이 곤란하기 때문에 목본 지표식물에 의한 접목검정방법으로 진단하는 경우가 많다(8, 17).

저자들은 본 연구의 수행중 이미 이상반점증상의 병징이 조기에 발현하는 지표식물 PS-95를 배 교배실생 중에서 선발한 바 있다(12). 본 연구는 선발된 지표식물을 공시하여 간편하게 보독유무를 조기에 판별할 수 있는 검정방법을 개발하고자 수행하였다.

재료 및 방법

시험재료 및 포장관리. 경기도 수원시 서둔동 소재 농업과학기술원 시험연구포장에 북지콩배 실생대목 1년생을 열간 1 m 주간 30 cm 간격으로 320주를 옮겨 심고 공시 시험수로 이용하였다. 접종원 준비는 매년 이상반점증상이 발병하는 신고 15년생에서 휴면기인 12월에 도장지를 채취하여 8±2°C의 저온실에

*Corresponding author.

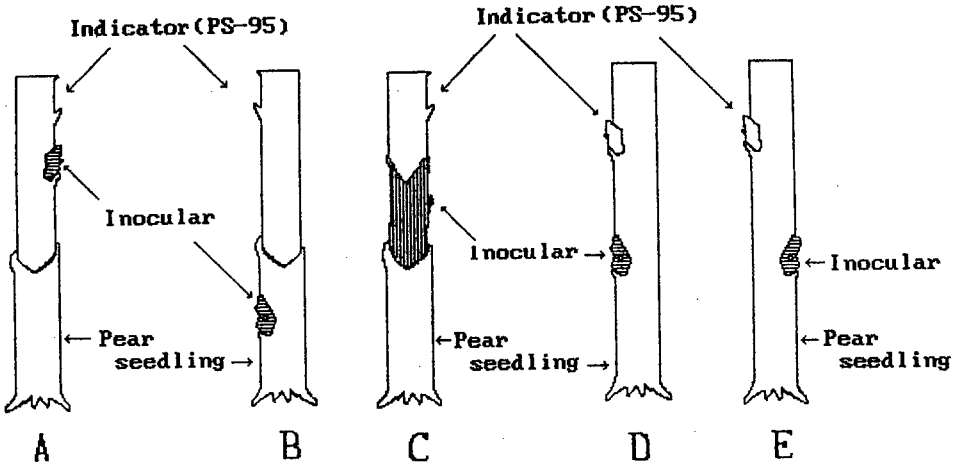

Fig. 1. Inoculation methods used in this study. A: Double chip grafting in which an indicator PS-95 was grafted to as seed-originated virus-free root stock, and then an infected bud was chip-grafted to the indicator plant; B: Double chip grafting method, the same as A except an infected bud being grafted to the rootstock; C: Double grafting in which an infected pear tree was grafted to the seed-originated virus-free root stock and then the indicator PS-95 was grafted to the scion; D: Double chip budding method in which an infected bud was firstly chip-grafted, and then a bud of the indicator PS-95 was secondly chip-grafted to the seed-originated virus-free root stock; E: Alternate double chip budding method, in which the method D was alternated.

보관하고 시험에 이용하였다. 지표식물은 남 등(12)이 선발한 PS-95를 공시하고 병해충 방제 및 일반관리는 관행에 준했다(6).

접목 검정시기. 조기검정에 가장 적합한 접목시기를 구명하고자 접목시기를 3월 29일, 4월 10일, 4월 22일, 5월 4일의 4시기에 걸쳐 지표면으로부터 5 cm 위의 대목부위에 신고 이병지 눈을 삭아접목접종하고 그 위에 지표식물 PS-95를 절접하는 이중삭아절접을 하였다. 접목한 후 접목부위가 완전히 활착한 후에 접목테이프를 풀어주었다. 시험구는 처리당 10주씩 단구제로 하였으며 발병조사는 2회에 걸쳐 발병주수 및 발병엽율을 조사하였다.

접목접종방법. 접목방법은 Fig. 1과 같이 5가지 방법으로 하였다. A는 대목 위에 지표식물 PS-95를 절접하고 지표식물에 신고 이병지 접종원을 삭아접목접종하는 방법, B는 대목에 접종원을 삭아접목접종하고 그 위에 지표식물을 절접하는 방법, C는 대목 위에 접종원을 절접하고 그 위에 지표식물을 절접하는 방법, D는 대목에 접종원을 삭아접목접종하고 바로 위에 지표식물을 삭아 접목접종하는 방법, E는 D방법을 교호로 접목접종하는 방법으로 하였다. 접목시기는 1995년 4월 10일에 접목방법별 10주씩 단구제로 하였다. 발병조사는 6월 20일과 7월 19일에 전 시험주를 대상으로 발병주수 및 발병엽율을 조사하였다.

접촉시간시험. 실생대목에 신고 이병지눈을 1995년 4월 10일 삭아접목접종하고 그 위에 지표식물 PS-95를 절접하였다. 처리는 삭아접목접종한 신고 이병지눈을 접목, 5시간, 1일, 5일, 14일, 21일, 28일이 경과한 후에 접종한 신고 이병지 눈을 제거하고(Fig. 2) 제거한 상처부위는 수분증발을 막기 위해 비닐테이프로 감아 주었다. 대조구로 이병지를 제거하지 않은 처리를 두되 처리당 10주씩 단구제로 하였고 발병조사는 6월 20일, 7월 19일 2회에 걸쳐서 발병주수 및 발병엽율을 조사하였다.

결 과

접목시기. 이상반점증상을 검정하기 위한 방법으로 어느 시기에 접목을 해야 병징이 가장 빨리 발현하는가의 여부를 조사하기 위해 4시기에 걸쳐 시험한 결과 3월 29일에 접목한 처리에서 10주중 9주가 발병하였고, 발병엽율도 92%로 가장 높았다(Table 1). 4월 10일 접목처리에서는 9주가 발병하였고 78%의 발병엽율을 보였으나 시기가 늦은 5월 4일 처리에서는 10주중 6주가 발병, 34%의 발병엽율을 나타내어 접목시기가 빠를수록 발병율이 높았다.

접목방법. 보독유무를 검정하기 위한 접목방법은 누구나 쉬운 방법으로 간편하게 할 수 있어야 하고 병

Fig. 2. The photograph showing a method to determine the length of time required for the graft-transmission by a double chip grafting method.

징이 신속하게 발현해야 한다. 본 시험에 공시한 5가지 접목방법중 실생위에 신고 이병지를 접목하고 그 위에 지표식물을 접목하는 2중 절접방법(Fig. 1-C, Fig. 3-②)이 100%의 발병주율에 51%의 발병엽율로 가장 좋았다(Table 2). 실생에 신고 이병지를 삭아접목접종하고 그 위에 지표식물을 절접하는 2중삭아절접방법(Fig. 1-B, Fig. 3-①)은 10주중 8주에서 발병하

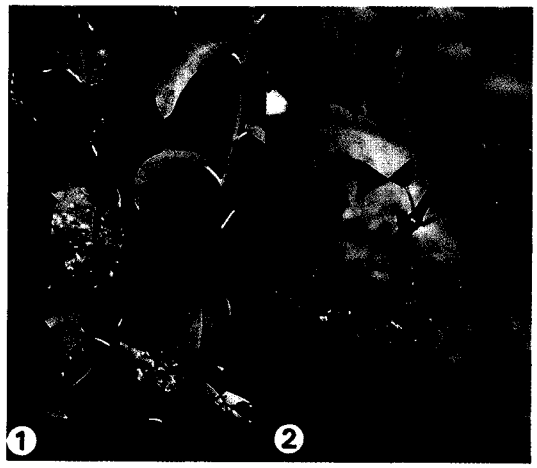

Fig. 3. Abnormal leaf spot symptoms developed on the indicator plant PS-95 when inoculated with an infected bud (1) or tree (2) by a double chip grafting (1) and by a double grafting method (2).

Table 1. Symptom severity appearing on the indicator pear line PS-95 when inoculated with infected buds at different times by a double chip grafting method

Time of grafting	No. trees inoculated	No. trees with symptoms		% leaves diseased
		June 20	July 19	July 19
Mar. 29	10	9	9	92
Apr. 10	10	8	9	78
Apr. 22	10	7	7	34
May 4	10	4	6	34

Table 2. Symptom severity developed on the indicator pear line PS-95 when inoculated with infected buds or seedlings by five different grafting methods

Inoculation method[a]	No. trees inoculated[b]	No. trees with symptom		% leaves diseased
		June 20	July 19	July 19
A	10	4	8	34
B	10	5	8	42
C	10	6	10	51
D	10	2	5	39
E	10	1	3	31

[a] See the legend in Fig. 1. [b] Inoculated on April 10, 1995.

Table 3. Time required for graft-transmission of the causal agents as expressed by infections of the indicator pear line PS-95 when inoculated with infected buds by a double chip grafting method

Contact period[a]	No. trees inoculated	No. trees with symptom		% leaves diseased
		June 20	July 19	July 19
5 hours	10	0	0	0
1 day	10	0	1	10
5 day	10	0	2	8
14 day	10	2	4	39
21 day	10	3	7	55
28 day	10	4	8	62
Control[b]	10	5	10	85

[a] A period from the time of grafting to the time of detaching the scion.
[b] Grafted scion was not removed from the stock.

여 42%의 발병엽율을 나타내었다. 배실생에 지표식물을 절접하고 지표식물에 신고이병지를 삭아접목접종하는 방법(Fig. 1-A)과 2중삭아접방법(Fig. 1-D), 교호 2중삭아접방법(Fig. 1-E)은 각각 34%, 39%, 31%의 발병엽율을 나타내었다.

접촉시간. 접목접종시 전염이 성립하는 최소 접촉시간을 밝히는 시험을 실시한 결과 5시간후 접종원을 제거한 처리에서는 병징이 전혀 발생하지 않았다. 1일간, 5일간 접촉시킨 후 제거한 처리에서는 10주중 1주, 2주가 각각 발병하였다. 접목부위 캘루스 형성이 육안으로 관찰되는 14일간 처리에서는 10주중 4주가 발병하였고, 21일, 28일후에 제거한 처리에서는 10주중 7주, 8주가 각각 발병하였다. 접종원을 제거하지 않은 처리에서는 10주 모두 발병하였다(Table 3).

고 찰

과수바이러스병 진단을 위한 검정방법은 연중 언제든지 단기간에 수행할 수 있어야 가장 좋은 방법이다. 식물바이러스의 검정방법에는 지표식물을 이용한 생물검정법, 혈청학적 수법, 전자현미경에 의한 검정법 등이 알려지고 있다. 그러나 대부분의 과수바이러스병은 목본 지표식물을 이용한 검정에 의존하고 있기 때문에 그 시기가 제한되어 있다. 지표식물에 의한 검정방법에는 여러 가지가 있겠으나 사과의 경우 이중절접 방법과 2중삭아접목 방법이 이용되고 있다(15). 핵과류 바이러스는 삭아접목접종 방법으로 4월부터 10월까지 검정이 가능하며 한여름에 할 경우에는 검정기간이 단축되기도 한다(16, 17, 19). 또한 감귤바이러스의 검정에는 실생에 직접 접목접종하는 경우와 피검수의 조직을 접목접종하는 경우가 있으나 주로 1아복접을 이용하고 있다(5). 배나무잎 이상반점증상은 현재까지 보독유무 검정을 위한 적당한 방법이 없기 때문에 방제에 많은 어려움이 있다. 때문에 지표식물의 이용이 실용상 강하게 요망되고 있었다. 본 연구의 수행중 이상반점증상에 감수성이 높은 지표식물 PS-95를 선발하였다(12). 이를 이용하여 접목시기별로 시험한 결과 접목시기가 빠를 수록 병징이 뚜렷하게 많이 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 일반적으로 노지에서의 접목시기는 4월초로 생각할 수 있으나 검정을 하기 위해서는 이보다 좀 더 이른 시기에 접목검정하는 것이 적합한 것으로 생각된다.

접목검정시 접목방법은 가능한 한 간단하고 누구나 쉽게 작업할 수 있어야 하는데 그 동안 주로 2중삭아접목 방법이 이용되어 왔다(15, 17). 그러나 본 연구결과는 2중삭아접목보다는 2중절접방법이 병징발현에 가장 좋았고 다음으로 2중삭아절접 방법이었다(Table 1). 이중절접 방법은 숙련된 기술이 필요하고 시간이 많이 소요된다는 단점이 있으므로 작업이 간단하고 대량검정이 가능한 이중삭아절접 방법이 보다 실용적인 방법이라고 사료된다. 이 방법은 배 대목에 접종원을 삭아접목 접종하고 대목 위에 지표식물을 절접하는 방법인데, 이와 비슷한 검정법으로 사과고접병 검정의 가장 좋은 방법으로 실생에 지표식물을 절접하고 그 지표식물에 접종원을 삭아접목접종하는 방법이 알려져 있다(17).

접목접종한 후 활착 및 캘루스형성 전에 바이러스가 전염되어 발병하는 경우가 있는데 복숭아의 경우 mosaic, yellow, rosette 바이러스의 전염이 성립하려면 mosaic 증상은 2~3일 이상 접촉, yellow와 rosette 증상은 8일 이상 접촉하고 있어야 증상이 발현하였다(7). 그러나 사과고접병의 경우는 최소한 2일간은 접촉하고 있어야 전염이 성립하였다(9). 복숭아의 prunus necrotic ringspot virus와 prune dwarf virus는 3일 이상

접촉하고 있어야 바이러스가 이행한다(19). 또한 12종의 핵과류 바이러스에 대하여 접촉에 의한 바이러스 전염의 속도에 의한 3개의 그룹으로 분류하였다. 제1그룹은 접촉에 의한 감염은 48시간에 0%, 74시간에 100%, 제2그룹은 66시간에 0%, 106시간에 100%, 제3그룹은 98시간에 0%, 152시간에 100% 전염한다. 이와 같이 바이러스의 종류에 따라 전염하기 위한 접촉시간은 다르다. 이러한 원인은 바이러스의 세포내 국재성에 의해 설명할 수 있다(2). 사부조직에 있는 바이러스는 접목부위의 사부융합에 시간이 필요하기 대문에 바이러스의 감염이 즉각적으로 이루어지지 않는 것으로 생각된다(1).

본 시험결과에서 이상반점증상의 경우 전염이 성립하려면 최소한 1일 이상 접촉하고 있어야 하는 것으로 밝혀졌다. 본 병의 병원바이러스는 사부조직 이외의 어느 부위에 존재하는지 확실히 밝혀지지 않았지만 접목후 1일만에 조직이 융합하기는 어렵다. 따라서 접목부위 융합이 일어나지 않아도 병원이 어떻게 이행하는지에 대해서는 앞으로 연구가 필요하다.

이상의 결과에서 배나무 이상반점증상의 보독유무의 검정방법으로는 PS-95 지표식물을 이용해서 3월 하순경에 이중삭아절접 방법이 적당하다고 생각된다.

요 약

배나무잎 이상반점증상의 이병여부를 조기에 판별할 수 있는 가장 간편한 검정방법을 개발코자 시험하였다. 접목시기는 3월 하순이 가장 좋았으며 접목시기가 늦어질수록 병징발현율이 감소하였다. 접목방법은 2중절접, 2중삭아절접 순으로 양호하였으나 숙련된 기술이 필요한 이중절접방법보다 간편한 2중삭아절접 방법이 대량검정에 적합하였다. 이상반점증상의 전염에 필요한 최소 접촉시간은 1일 이상이었고 칼루스가 형성되어 접목부위가 활착된 21일 이후에서 발병이 가장 높았다.

참고문헌

1. 江原淑夫. 1981. 植物ウイルスの感染部位と組織内播. 植物防疫 35 : 17-21.
2. Fridlund, P. R. 1967. The relationship of inoculum-receptor contact period to the rate of graft transmission of twelve prunus viruses. *Phytopathology* 57 : 1296-1299.
3. Fulton, R. W. 1967. Purification and some properties of tobacco streak and tulare apple mosaic virus. *Virology* 32 : 153-162.
4. Gera, A., Loebenstein, G. and Raccah, B. 1978. Detection of cucumber mosaic virus in viruliferous aphids by enzyme-linked immunosorbent assay. *Virology* 86 : 542-545.
5. 加納 健. 1989. かンキツウイルス病の檢定方法. 植物防疫 43(6) : 344-348.
6. 김정호 편저. 1994. 최신 배 재배. 오성출판사. 421pp.
7. Kunkel, L. O. 1938. Contact periods in graft transmission of pear viruses. *Phytopathology* 28 : 491-496.
8. Luckwill, L. C. and Campbell, A. I. 1959. *Mallus platycarpa* as an apple virus indicator. *J. Hort. Sci.* 34(4) : 248-252.
9. 松中謙次郎, 瀨川一衛. 1970. リンゴ高接病に關する研究. 第1報 接木接種による感染成立時間について. 日植病報 36(5) : 349-350.
10. 남기웅, 김충회. 1994. 배나무잎 이상반점증상에 관한 연구. 1. 발생상황과 피해. 한식병지 10(3) : 169-174.
11. 남기웅, 김충회. 1995. 배나무잎 이상반점증상에 관한 연구. 3. 병원의 접목전염. 한식병지 11(3) : 217-223.
12. 남기웅, 김충회, 황해성. 1996. 배나무잎 이상반점증상에 관한 연구. 5. 목본지표식물 선발. 한식병지 12(2) : 214-218.
13. 日本植物病理學會編. 1995. 植物病理學事典. 養賢堂. 210pp.
14. Patrakosol, P. and 柳瀨春夫. 1982. Detection of prunus necrotic ringspot virus and prune dwarf virus in peach by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Bull. Fruit Tree Res. Stn.* A9 : 165-176.
15. Posnette, A. E. 1963. Virus disease of apples and pears. Commonwealth Agricultural Bureaux. 141pp.
16. Refatii, E. and Osler, R. 1975. Possible relationships among pome fruit viruses detected in graft transmission trials. *Acta Horticulturae* 44 : 201-208.
17. 齊藤範彦, 夏井 勉, 大谷朋男. 1988. *Mallus scheideckeri*によるりんご高接ぎ病の早期檢定. 植防研報 24 : 33-37.
18. Waterworth, H. E. and Gilmer, R. M. 1969. Dark green epinasty of *Chenopodium quinoa*, a syndrome induced by a virus latent in apple and pear. *Phytopathology* 59 : 334-338.
19. 山口 昭, Patrakosol, P., 石井英夫. 1980. 核果類ウイルスの白普賢檢定法に關する二三の檢討. 果樹試報 A7 : 63-70.