

박사 학위 논문

대미 감귤 수출단지에서 감귤궤양병 연구



제주대학교 대학원

농 학 과

강 익 범

2002年 12月

대미 감귤 수출단지에서 감귤궤양병 연구

指導教授 姜 榮 吉

康 益 範

위 論文을 農學 博士學位 論文으로 提出함

2002年 12月

 제주대학교 중앙도서관
康益範의 農學 博士學位 論文을 認准함

審査委員長

조 남 기

委 員

진 경 석

委 員

송 창 길

委 員

전 용 철

委 員

강 영 길

濟州大學校 大學院

2002年 12月

Studies of Citrus Canker caused by
Xanthomonas axonopodis pv. *citri*
in the Citrus Cultivating Areas
for Export to USA

Ik-Beom Kang

(Supervised by professor Young-Kil Kang)



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF AGRICULTURE

DEPARTMENT OF AGRICULTURE
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

2002. 12.

목 차

Summary -----	3
I. 서 언 -----	6
II. 연구사 -----	8
1. 감귤궤양병의 분류 및 동정 -----	8
2. 감귤궤양병 생리생태 및 검출방법 -----	9
3. 감귤궤양병의 예찰 -----	11
가. Bacteriophage를 이용한 세균병 예찰 -----	11
나. ELISA를 이용한 세균병 예찰 -----	12
4. 감귤궤양병의 경제적 중요성 -----	13
5. 우리나라에서의 감귤궤양병 연구 -----	14
III. 재료 및 방법 -----	16
1. 공시배지 -----	16
2. 공시 Bacteriophage -----	16
3. 시험에 이용한 감귤궤양병균 및 분리방법 -----	16
4. 수출단지 감귤궤양병 발생조사 -----	18
5. 감귤궤양병균 동정 -----	20
가. 병원균의 속동정 -----	20
나. 병원균의 종동정 -----	22
6. 감귤궤양병 발생 예찰을 위한 병원균 검출방법 개발 -----	23
가. 감귤궤양병균에 대한 ELISA 역가검정 -----	23
나. PSB에서의 감귤궤양병균 배양효과 검정 -----	23
다. 감귤궤양병균 신속검출을 위한 배지 연구 -----	23
라. ELISA법에 의한 검증시험 -----	23
마. ELISA법과 Bacteriophage법 비교 실증실험 -----	24
7. ELISA법과 Bacteriophage법을 이용한 감귤궤양병 발생 예찰 -----	26
가. 예찰포장 선정 및 조사 -----	26
나. 시료조제방법 -----	26

다. Enzyme-linked immunosorbent assay -----	26
라. Bacteriophage test -----	27
8. 감귤궤양병 방제방법 연구 -----	27
가. 감귤궤양병에 대한 약제방제 효과 구명 -----	27
 IV. 결 과 -----	 29
1. 수출단지 감귤궤양병 발생조사 -----	29
2. 감귤궤양병균 동정 -----	31
가. 병원균의 속동정 -----	31
나. 병원균의 종동정 -----	33
3. 감귤궤양병 예찰을 위한 병원균 검출방법 개발 -----	35
가. ELISA 역가검정 -----	35
나. 병원균배양이 ELISA반응에 미치는 효과 -----	36
다. 감귤궤양병균 검출을 위한 배양 배지연구 및 ELISA 검증시험 -----	36
라. ELISA법과 Bacteriophage법 비교 실증실험 -----	38
4. ELISA법과 Bacteriophage법을 이용한 감귤궤양병 예찰 -----	41
가. 온주밀감 생육단계별 감귤궤양병 예찰 -----	41
나. 감귤궤양병균 검출과 병발생 관계 -----	45
5. 감귤궤양병 방제방법 연구 -----	47
가. 감귤궤양병에 대한 약제방제 효과 구명 -----	47
 V. 고 찰 -----	 49
 VI. 적 요 -----	 54
 인용문헌 -----	 57
 Appendix(1-17)-----	 70

Summary

Citrus canker caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Hasse) (Abb. Xac) is one of the most important diseases of citrus in the world due to severe destruction by the disease. In these studies the citrus canker the pathogen was isolated and identified from the infected leaves and fruits in the citrus (Satsuma mandarin, *Citrus unshiu* Marc.) cultivating areas for export to USA. Moreover, method of pathogen detection and the disease forecasting were compared between enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and bacteriophage test (BPT). On the other hand, the efficacies of application with copper and/or antibiotic were also studied in the field in 2001 and 2002.

Citrus canker on spring leaves occurred in 196 fields in the six fruit exporting areas in July in 2001. The disease severities of the leaves at Haean, Sangyae, Chongsu, Sangga, Ansung and Eugui were 0.7, 2.6, 5.6, 1.2, 5.4 and 0.2%, respectively. The disease severities of citrus canker were determined in the late July on spring leaves, in early September on summer leaves, and in the late October on autumn leaves in the six areas in 2001. The percentage of diseased plants ranged from 1.3 to 35.3% and that of diseased leaves <0.1 to 15.6% in the late July, 8.7 to 39.3% and 0.6 to 23.1%, respectively, in early September, and 3.4 to 36.3% and <0.1 to 11.5%, respectively, in late October.

Six bacterial isolates from the six areas were isolated, and identified genus as *Xanthomonas* which were characterized gram negative, produced yellow pigment on nutrient-broth yeast extract agar (NBY), no fluorescent pigment on King's B medium (KB) produced, no growth anaerobically, single polar flagellated, rod shaped, and not formed endospore. The isolates were also identified species as *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, which were characterized mucoid growth on yeast extract-dextrose-CaCO₃ (YDC), growth at 35°C, hydrolyzed asculin, gelatin liquefaction negative, and produced acid from glucose, but not arabinose and mannose. Isolates also caused the similar symptom with those naturally formed

citrus canker when inoculated on citrus leaves by pin prick method.

Efficiencies in detecting Xac on fruits were compared between using ELISA and BPT with infected fruits from the fields. ELISA detected Xac by 100%, while BPT by about 44%, indicating that the detection efficiency was improved by 23.5% by ELISA, compared to that of BPT. In addition, ELISA has simpler procedure for testing and is less time-consuming than BPT, suggesting that ELISA may be accurate and simple method to detect Xac on citrus fruits.

For the disease forecasting, the four kinds of leaves at four developmental stages were tested by using ELISA and BPT. On overwintered leaves, Xac was detected on 17 May and 30 May by ELISA in the untreated and chemical-treated fields, respectively. However, Xac was not detected by BPT. On spring leaves, Xac was detected in the untreated and chemical-treated fields by ELISA on 30 May and on 7 June, respectively. ELISA detected Xac one week earlier on spring leaves than BPT did. On summer leaves, both ELISA and BPT detected Xac on 27 July in the untreated field and on 3 August in the chemical-treated field. On autumn leaves, Xac detections in the untreated and chemical-treated fields by using ELISA and BPT were on 12 September. The detections of Xac on overwintered leaves were 15 and 20 days faster than the first dates of disease occurrence in the chemical treated and untreated fields, respectively. But the detection of Xac on spring leaves was 7 days earlier than disease appearance in both the treatments.

The disease control by chemicals was tested in 2001. Percentages of diseased leaves of the plants treated with chemicals traditionally were 3.1% on spring leaves, 17.3% on summer leaves and 2.5% on autumn leaves, but 8.8% on spring leaves, 78.7% on autumn leaves and 18.0% on autumn leaves for the untreated plants. The efficiencies of disease control on 16 July, 3 September and 24 October were 64.7, 78.5 and 86.1%, respectively. Experiments with different chemicals and times of spraying were carried out in 2002. Percentages of diseased spring leaves on the plants treated with chemicals traditionally, antibiotic, and antibiotic + copper, and untreated plants on 16 July were 0.29, 0.38, 0.04, 0.25 and 1.25%, respectively.

Those of diseased summer leaves on plants treated with chemicals traditionally, antibiotic, and antibiotic + copper, and untreated plants on 6 September were 0.67, 0.46, 0.00, 0.41 and 3.13%, respectively. The efficiencies of chemical treatment were 69.6 to 96.8% on 16 July and 78.6 to 100% on 6 September. Especially efficiencies of antibiotic treatment on 16 July and 6 September were highest with 96.8 and 100%, respectively.



I. 서 언

감귤은 운향과(*Rutaceae*)에 속하는 식물로서 학자에 따라 다소 다르게 분류되고 있지만 Tanaka는 6속으로 분류하였는데(한과 권, 1974), 이 중에 원예학상의 감귤류에는 탕자속(*Poncirus*), 감귤속(*Citrus*), 금감속(*Fortunella*), 크리메니아속(*Clymenia*)이 있다. 현재 제주도에서 재배되고 있는 감귤은 주로 온주밀감(*Citrus unshiu* Marc.)으로서 감귤생산의 98.1%을 차지하고 있으며(제주도, 2001), 1980년에 감귤재배면적은 14,094ha이고 생산량이 187,470M/T, 조수익은 54,500백만원 이었으나, 2000년에는 25,796ha에서 563,341M/T이 생산되고 조수익이 370,811백만원이다(농림부, 2001; 제주도, 2001). 이처럼 급속한 감귤 재배면적이 증가하는 과잉생산으로 인한 가격의 폭락으로 연결되어 소비시장을 외국으로 확대하고 또한 감귤의 수출을 증가시키기 위해서는 수출상대국의 우려하는 병해충방제를 통하여 수출경쟁력을 제고시킬 수 있는 생산체제로의 전환이 불가피하게 되었다.

최근 우리나라 감귤 재배지에 발생하는 병해로는 바이러스병 3종, 곰팡이병 14종, 세균병 1종인 궤양병이 보고되었는데(한국식물병리학회, 1998), 미국 등에서 수입규제 검역병으로 지정되어 있는 감귤궤양병은 제주도에서 가장 중요한 온주밀감은 중도저항성(Stall, 1989)으로서 다른 병에 비하여 피해는 적지만 원활한 수출을 위해서는 적절한 관리대책을 마련하는 것이 필요한 실정이다. 감귤궤양병은 잎, 가지, 과실에 발생을 하고 재배포장에서의 피해는 낙엽이나 낙과도 되지만 이병과는 수확기까지 남아 있어 상품 가치를 떨어뜨리고 또한 다른 지역으로 병원균을 전파시킬 수 있다(Stall, 1989). 궤양병원균은 Hasse(1915)가 *Pseudomonas citri* Hasse로 최초 명명하였고, 그 기원은 동남 아시아지역으로 추정하고 있다(Fawcett, 1936). 그 후 많은 학자들에 의하여 학명이 다르게 명명되어 왔으며 최근에 Vauterin 등(1995)은 DNA-DNA 상동성 등을 근거로 *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, *X. axonopodis* pv. *aurantifolii*, *X. axonopodis* pv. *citrumelo*로 분류되어 현재까지 사용되고 있으며, 우리나라에 분포하고 있는 감귤궤양병원균은 bacteriophage에 대한 실험과 RAPD-PCR 결과 *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*(Abb. Xac)에 속하는 strain일 것으로 추정하고 있다(Myung, 1997).

Xac는 병원성이 강하여 미국 등 서구 지역에서는 궤양병에 의한 피해가 보고되었는데,

미국에서는 1912년에 처음으로 일본에서 유입되어 플로리다에서 발생되었으며(Berger 등, 1914), 그 후 1984, 1992년과 1995년에도 다시 유입·발생되어 현재까지 막대한 비용을 들여 박멸활동 중이다(APHIS, 2001). 그 이외의 호주, 뉴질랜드, 남아공, 모잠비크, 우르과이에서도 궤양병이 발생되어 많은 비용과 시간을 소비하여 박멸한 바 있다(Stall과 Civerolo, 1991; CABI와 EPPO, 1992; Commonwealth of Australia, 1984). 이와 같이 감귤궤양병이 온주말감에서는 다른 병에 비해 피해가 적지만 많은 국가에서 자국의 감귤 산업 보호를 위하여 검역병해충(quarantine pest)으로 지정되어(CABI와 EPPO, 1992; Hopper, 1995) 기주식물 수입을 금지하고 유입을 경계하고 있으며, 우리나라 감귤재배 농가는 대미수출 감귤재배에서 궤양병방제로 많은 어려움을 겪고 있는 실정이다.

따라서 본 연구는 대미수출 감귤재배지역에서 감귤궤양병의 발생정도와 그 지역의 병원균을 분리하여 특성을 조사하고, 효과적인 병발생 예찰 및 약제 방제체계를 구명하여, 수출용 감귤재배지역에서 궤양병 무발생 유지를 위한 기초자료로 활용하고자 수행하였다.



II. 연구사

1. 감귤케양병의 분류 및 동정

감귤케양병은 Hasse(1915)에 의해서 최초로 오렌지류에 발생한 세균병을 citrus canker로 명명하였으며, 병원세균이 분리 동정되어 *Pseudomonas citri* Hasse로 보고되었다. 미국에서는 1911년경부터 플로리다, 텍사스, 미시시피, 알바마 등에서 발견되어, 처음은 이 병징과 비슷한 더덩이병과 혼동되었지만, 감귤품종에 따라 발병상황이 다르다는 것과, 전염력이 매우 강한 것에 의해 새로운 병으로 인정되었고, Stevens(1914a, 1914b, 1915)에 의해 발생상황, 분포 등이 조사되었다. 또한 Berger 등(1914)은 플로리다에 발생한 감귤케양병은 대목으로 사용하기 위하여 수입된 탕자나무(*Poncirus trifoliata*)의 묘목을 일본으로부터 수입함으로써 전파되었다고 하였으며, 1915년 이후 감귤묘목 수입을, 1917년 이후 일본 및 서남아시아, 아프리카 등으로부터 과일 수입을 금지하였다. 川上(1921a)은 일본에서 이 병을 처음으로 더덩이병과 구별한 것이 1906년에 福岡縣의 安部態之輔라고 하였으며, Fawcett와 Jenkins(1933)가 1823년에 인도에서 수집한 감귤류 식물표본에서 감귤케양병을 확인하였다. Fawcett(1936)는 30여 개국에서 케양병이 발생되고 있음을 보고 하였으며, 그 기원을 동남아시아 지역으로 추정하였다. 그 후 많은 학자들에 의하여 학명이 바뀌어 불려지고 있는데 Doidge(1916)는 *Bacterium citri*, Holland(1920)는 *Bacillus citri*, Bergey 등(1923)은 *Phytomonas citri*로 명명한 바 있다. Dowson(1939)은 기주-병원균 반응의 개념을 근거로 *Xanthomonas citri*(Hasse) Dowson으로 재명명하여 1970년대까지 사용되어왔다. Dye 등(1978)은 병원균의 기본 생리적 특성에 의하여 재분류하고 병원성의 차이는 병원형(pathovar)의 개념을 도입하여 *Xanthomonas* 속의 병원균을 재분류하였는데 감귤케양병균은 *X. campestris*(Pammel) Dowson pv. *citri* (Hasse) Dye로 명명하였다.

그 후 감귤케양병균은 기주범위, 발생지역, 혈청반응, phage type 등을 근거로 이 병원을 pathotype A(asiatic citrus canker or canker A), pathotype B(cancrosis B or canker B), pathotype C(mexican lime cancrrosis or canker C)와 pathotype D(bacteriosis or canker

D)의 4가지의 pathotype(Carrera, 1933; Civerolo, 1984; Civerolo와 Fan, 1982; Namekata와 Oliveira, 1972; Rodriguez 등, 1985; Stall과 Seymour, 1983)과 미국 플로리다 지역의 오렌지 유묘에 세균성 반점병을 일으키는 병원균을 pathotype E(canker E) 또는 *X. campestris* pv. *citrumelo*로 불려져왔다(Permer와 Gottwald, 1989). Carrera(1933)는 아르헨티나에서 pathotype A와 비슷한 병징을 보고하였다. 그러나 Fawcett(1936)는 포장에서 레몬은 이병성을 보였으나 그레이프후르트와 스위트오렌지는 병 발생이 적게 나타난 것으로 보아 canker A와는 다르다고 하였고 후에 Bittancourt(1957)는 이 병원균을 cancrrosis B라고 하였다. 또한 Namekata와 Oliveira(1972)는 브라질에서 Mexican lime에만 궤양병이 발생하는 것을 보고하였고, 이 병원균은 형태적 생리적으로는 canker A와 같으나 병원성에 있어서 다르고 bacteriophage에 대한 반응도 canker A와 달라서 canker C라고 하였다. 그리고 1981년 멕시코에서도 Mexican lime에 canker A와 비슷한 병징이 발견되었는데, 이 균은 잎에만 병징이 발생하고 과실에는 병발생이 안되었으며 인근 다른 품종에는 병발생이 아주 적어 이 병원균은 canker D라 명명되었다(Rodriquez 등, 1985; Schoulties 등, 1987). Vauterin 등(1995)은 기본적인 생리적 반응만으로서 많은 *X. campestris* pv. 종 세균들을 1개의 종으로 분류되는 불합리성을 DNA-DNA 상동성과 biolog automated system 내의 영양원 이용양상 등을 근거로 *X. campestris* pv. 종의 세균을 20개의 종으로 재분류하였는데 그 중 *X. campestris* pv. *citri*의 pathotype A는 *X. axonopodis* pv. *citri*로 pathotype B, C, D는 *X. axonopodis* pv. *aurantifolii*로 pathotype E는 *X. axonopodis* pv. *citrumelo*로 분류되어 현재까지 사용되고 있다.

2. 감귤궤양병 생리생태 및 검출방법

동남아시아 지역의 원산지로 추정되는 pathotype A에 의한 감귤궤양병은 주로 잎에 발생하나 심할 적에는 과실이나 어린 가지에도 발생을 하고 감염은 잎과 줄기가 자라기 시작한 6주 이내에 이루어지며, 그 후에는 병원균에 감염이 되어도 병발생이 안되거나 아주 작은 돌기(inconspicuous pustule)만이 형성된다. 병징은 작은 반점(pinpoint spot)으로 시작되어 2~10mm의 원형반점이 되며 병징이 융합에 의해 불규칙하게 되기도 한다.

병이 심하게 발생한 포장에서는 낙엽이나 낙과도 되지만, 주로 이병과는 수확기까지 남아 있어 상품가치를 떨어뜨리고 또한 다른 지역으로 병원균을 전파시킬 수 있다고 하였다 (Stall, 1989). 後藤(1962)은 병원균의 계통, 월동, 전염 등에 대해 새로운 견해를 발표하였는데, 감귤에서 감염을 반복하는 생태형과 잡초에서 부생생활을 하는 생태형으로 구별해 생각할 필요가 있다고 보고했다. 또한 이병성인 하귤과 저항성인 온주밀감의 성숙 잎과 어린 잎의 기공의 형태를 관찰하여 저항성인 온주밀감의 성숙 잎에서는 기공이 공변세포의 상층 큐티쿨라층이 발달해서 기공 개구부가 덮혀져 있는 것 같이 되어 병원균이 기공침입을 어렵게 하고 외관상으로는 건전한 감귤나무의 조직 내에도 균이 생존하는 것을 확인하였다(後藤, 1972). 後藤(1978)은 감귤원의 토양, 질 등에 부생적으로 생존하는 병원세균이 전염원으로서 중요성에 대해 검사하여 이것은 매우 장기간에 걸쳐 안정적인 전염원으로 되는 것을 보고하였으며, 太田(1980)은 감귤잎에 대한 접종 2시간 후 조직내의 세균수는 접종시의 1/2로 감소했고, 그 회복에서는 12시간 이상을 요한다고 보고하였다. 궤양병이 감염, 발병에 대하여 芹澤과 井上(1974)은 5m/s 바람에서 발병은 조장되지 않지만 6.5m/s를 넘으면 발병은 급격하게 많아진다고 하였으며, 이것은 기공에서 세균을 함유한 물이 침입하기 쉽게되기 때문이며, 또 바람에 의해 잎, 과실이 상처가 많게되기 때문이라고 하였다.

감귤궤양병 발생을 예측하는 방법으로는 직접 검출하는 방법, 간접적으로 병원균의 활동을 파악하는 방법이 있다. 식물 병원세균을 직접 검출하는 방법으로는 일반적으로 사용하는 선택배지를 이용하여 병원균을 분리하는 방법이 과거에 많이 사용되었는데, 이는 많은 시간과 노력이 필요하고 사용범위에도 제한되어 특히 병징이 없이 존재하는 병원균들(epiphytics)에는 어려움이 있다(Schaad와 Forster, 1985). 간접적으로 병원세균을 검출하는 방법으로서 여러 가지 방법이 있는데, 혈청학적인 방법에는 콩불마름병균인 *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 검출에 많이 이용하는 agglutination tests (Guthrie 등, 1965), *X. campestris* pv. *phaseoli*에 많이 이용하는 agar diffusion 방법, 십자화과 작물에 흑부병균인 *X. campestris* pv. *campestris*에 많이 이용하는 immunofluorescence(IF) 방법(Schaad와 Donaldson, 1980)과 많은 병원세균에 이용되는 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) 방법(van Vuurde 등, 1983)등이 있다. 또한 여러 가지 세균들에 대한 DNA probe를 이용하여 간접 검출방법(Schaad 등, 1986)이 주로 이용되고 있으며, 특히 병원체 검출에 제한되고 있는 세균의 정체를 추적하는 방법도

새롭게 개발되고 있다(Gitaitis 등, 1989). Bacteriophage도 여러 가지 병원세균 검출에 이용되고 있는데 여기에는 고추 궤양병균, 더텡이병균(Ercolani, 1968), 콩불마름병균(Sutton과 Katznelson, 1953)과 벼 흰잎마름병균(Webster 등, 1983) 등의 검출에 이용한 보고가 있다. 그러나 bacteriophage를 이용하여 병원균 검출에는 같은 병원균이라 할지라도 균주에 따라서 그 반응(sensitivity)이 다른 경우가 있어 잘못 검출할 수가 있다. 이런 방법들은 실질적인 증명과 결과 해석의 어려움에도 불구하고 빠르고 비용이 적게 들며 대량검출이 가능하기 때문에 많이 사용되고 있다(Saettler 등, 1989). 또한 Hartung(1992)과 Alvarez 등(1991)과 Civerolo(1984)는 다른 병원세균에 사용하는 방법들을 이용하여 Xac균을 검출하거나 진단하는 방법을 개발하여 왔다.

3. 감글궤양병의 예찰

가. Bacteriophage를 이용한 세균병 예찰

Bacteriophage를 이용하여 세균 연구를 시작한 것은 1918년 D'Herelle 이었으며 그는 또한 bacteriophage의 역할까지 구명하였는데, bacteriophage는 세균에 기생하는 바이러스로서 독성파지(virulent phage)는 감염된 세균의 균체 안에서 증식되고 성숙하면 균체를 용해시키고 파지가 주변으로 흩어져서 용균된 용균반(clean zone)을 형성하게 되는데, bacteriophage는 특이성이 강하여 특정 기주 세균에만 기생하기 때문에 이것을 이용하여 병원세균이 존재 또는 밀도변화를 추정할 수 있다. 그 당시 연구는 주로 동물병원세균을 대상으로 연구되었고 식물병원세균은 사과·배 화상병균(*Erwinia amylovora*)과 각종 채소류에 연부병을 일으키는 *E. carotovora* subsp. *carotovora*와 *E. carotovora* subsp. *atroseptica*을 대상으로 연구되었다(Coons와 Cotila, 1925). 또한 bacteriophage는 특이성이 높은 활물기생체로서 기주세균의 상태, 활력이나 성장기에 따라 다르게 반응한다고 하였다(Gotto와 Starr, 1972b). 일본에서는 1950년대 초에 벼흰잎마름병균(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)에 bacteriophage를 이용하여 병발생 예찰, 병원균 월동 및 phage의 group을 분류하고 병방제에 이용하려는 연구가 주로 이루어 졌고(Goto, 1965), Tagami(1959)는 벼 재배 논에서 bacteriophage 검출량과 병원세균량 및 병발생과는 높은 정의상관이 있다고 하였다. 감글궤양병균에 대한 bacteriophage 연구는 1933년 인도에서 Uppal에 의하여 처음 분리 보고하였으며, 일본에서는 Matsumoto와 Okabe

(1937)에 의하여 이병된 감귤잎과 토양에서 처음 분리한 바 있고, Wakimoto(1960)에 의해 구주지방에서 분리하여 CP₁ phage라 명명하였다. 벼흰잎마름병균에 대한 bacteriophage 연구기술이 감귤쾌양병균에 적용되면서 1960년대에 감귤쾌양병균 bacteriophage 연구가 다양하게 이루어 졌는데, Wakimoto(1967)는 41군주의 감귤쾌양병균과 분리지역이 다른 42개의 phage에 대한 특성구명을 하여 phage는 2개(CP₁, CP₂)의 group으로 나누고 쾌양병균은 3개의 lysotype으로 구별하였다. 또한 bacteriophage에 의해서 쾌양병균의 colony 형태변화, 병원성 차이, 세포기질의 변화 등 병원균 유전자를 전위시키는 vector로서 역할까지 하고 있음을 보고하였다(Wu, 1972a, 1972b; Goto와 Starr, 1972b).

Bacteriophage를 이용하여 일본의 감귤 수출지역에 대한 병원균 strain의 분포 (Obata, 1974), 병원균이 잡초, 토양 및 감귤뿌리의 표면에서 부생적 생존여부(Goto 등, 1975), *Xanthomonas*속 균에서 다른 병원균들과의 기주관계 등의 연구가 이루어졌다 (Goto와 Starr, 1972a). 우리나라에서도 Kang(1999)은 온주밀감과 하귤잎에서의 bacteriophage검출은 6월초부터 검출되어 이는 쾌양병 발병 시기보다 약 1개월 전에 이미 쾌양병균이 감귤잎에서 활동이 시작되었고, 9월 중순까지 급격히 증가되었다고 하였으며, 여름순잎에서 bacteriophage 검출량이 월동잎이나 봄순잎에 비하여 월등히 많았으며, 또한 건전포장보다 병발생 포장에서 많은 양이 검출되어 감귤쾌양병 발생과 bacteriophage 검출량과는 높은 정의 상관관계가 있음을 보고하였다.

Bacteriophage를 이용하여 감귤잎에서 처음으로 감귤쾌양병균검사는 Obata(1974)에 의해 보고되었으며, 한국에서는 명 등(1995a)에 의해 일본과 비슷한 방법으로 개발되어 대미 감귤수출 검사에 사용되고 있다.

나. ELISA를 이용한 세균병 예찰

ELISA는 세균밀도 또는 단백질량에 동일하게 반응하는 것으로써 세균의 상태에 따라 변하지 않고(Seattler 등, 1989; Simbert와 Krieg, 1981) 반응이 효소에 의해 육안관찰이 가능하게끔 제작된 것(De Boer 등, 1989)으로서 그 과정은 대상 병원체와 혈청(antibody) 등 연구자에 따라 여러 가지 방법을 사용하고 있다. ELISA법은 효소를 결합시킨 항체와 항원을 반응시킨 후 기질(substrate)을 첨가하면 기질 중의 화합물이 항체와 결합된 효소에 작용하여 발색하게 되는데, 이 발색정도를 측정하여 반응의 정도를 알 수 있는

방법이다. 기술적으로 ELISA법은 다른 방법에 비하여 그 과정이 단순하고, 비록 초보자라 하더라도 쉽게 접근할 수 있으며, 적용하는 방법에 있어서는 이중결합항체법(double antibody sandwich method : DAS), 간접검사법(indirect sandwich method) 등 다양하지만 많은 시료를 검사하는데 적당한 것으로 인식되어 왔고, 사용하는데 비교적 간편하기 때문에 병징이 없이 병원균에 오염되었거나 병발생 예찰에 많이 사용되어 왔다. ELISA법은 콩종자에 감염된 콩불마름병균인 *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*(Guthrie 등, 1965), 토마토종자에 감염된 궤양병균인 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*(진 등, 1998)와 감자윤부병균인 *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*(De Boer 등, 1960) 검사 등에 이용되어 왔다.

ELISA법에 의한 감귤궤양병균 검출은 Civerolo와 Fan(1984)에 의해 보고되었고 검출 한계는 $10^5 \sim 10^6$ cfu/ml이하라고 하였으며, Stall 등(1980)은 이병잎 세척액에서 감귤 궤양병균 농도가 $10^4 \sim 10^6$ cfu/ml로 다양하다고 보고하였으며, 또한 Timmer 등(1991)은 병징의 코르크화(suberization) 때문에 오래된 병징에서는 세균이 분출되지 않는다고 하였다. 또한 진 등(2001)은 대미수출단지 감귤궤양병검사에 현행 사용중인 복잡하고 인력이 많이 소요되는 bacteriophage법(명 등, 1995b) 대신 간편한 방법인 ELISA법을 이용하여 검사하는 방법을 개발한 바 있다.

4. 감귤궤양병의 경제적 중요성

이병성 품종인 오렌지류, 레몬, 그레이프후르트 등을 재배하고 있는 미국 등 서구 지역에서는 궤양병에 의한 피해가 보고되었다. 미국에서는 1912년에 일본으로부터 대목용 탱자나무 묘목에 의해 옮겨져 플로리다에서 발생되었으며(Berger 등, 1914), 주변 5개 주로 전파되었는데 1933년까지 플로리다에서는 6백만불의 비용을 들여 27만 그루의 성목과 3백만 그루의 묘목을 소각함으로써 이 병이 방제된 바 있으며, 1947년에 박멸 선언을 하였다(Loucks, 1934; Schoulties 등, 1987). 또한 1984년에 플로리다 지역에 다시 유입·발생되어 박멸하는 데에 1986년까지 25백만불이 소요되었다는 보고가 있다(Stall과 Civerolo, 1991; CABI와 EPPO, 1992). 그 후 1992년과 1995년에도 유입·발생되어 플로리다 여러 지역으로 확산되어 막대한 비용을 들여 공식적으로 박멸활동 중이며 (APHIS, 2001), 미국 감귤궤양병 박멸규정(citrus canker eradication regulations)은 감귤

퀘양병에 감염된 나무의 125피트(38.1m)이내에 있는 감귤나무는 이병에 노출되었기 때문에 모두 폐기하도록 규정하고 있으며, 또한 192만주를 제거하였고 2001년 9월까지 박멸하는데 보험을 제외한 연방 및 지방정부가 사용한 비용이 1억 6,000만불에 이르고 있다. 그 이외의 지역인 호주, 뉴질랜드, 남아공, 모잠비크, 우루과이에서도 퀘양병이 발생되어 많은 비용과 시간을 소비하여 박멸한 바 있다(Curry, 1989; Dye, 1969; Stall과 Civerolo, 1991; CABI와 EPPO, 1992; Commonwealth of Australia, 1984). Xac균이 분포하고 있는 아시아지역의 감귤류 재배지역에서는 퀘양병에 약한 오렌지, 레몬, 그레이프푸르트 등 경제적 가치를 갖는 감귤류 뿐 만 아니라 퀘양병균의 기주인 여러 가지 감귤류들이 자생되고 있어 상업적으로 재배되는 감귤류에 심각한 경제적 손실을 일으키기 때문에(Civerolo, 1984; Stall과 Seymour, 1983) Xac는 국제적 검역병해충(quarantine pest)으로 지정되어 있다(CABI와 EPPO, 1992).

식물병의 방제는 사용되는 방법에 따라 경종적, 물리적, 생물학적, 화학적 방제 등으로 구분되며, 그 중에 경제적으로 가장 쉽게 접근할 수 있는 것이 화학적 방제인데 감귤퀘양병 등 세균병은 병발생을 효과적으로 예찰하는 것이 병방제의 지름길이라 하였다(조 등, 1999). 그리고 Lee(1920, 1921)는 감귤퀘양병에 대한 품종저항성 및 약제 방제를 병행하는 연구를 행하였으며, Lee(1920)와 川上(1921b)은 보르도액이 퀘양병 방제에 유효하다는 것을 보고하였고, 卜藏과 金野(1938)는 3~4회 약제살포로 퀘양병 방제가 가능하다고 하였다. 山本(1959)은 스트렙토마이신을 사용할 경우 퀘양병을 효과적으로 방제할 수 있었으며, 田中(1962)과 北島(1965)는 보르도액, 스트렙토마이신, 클로로마이세틴 등을 교차 살포시 방제효과가 증진되었다고 보고하였으며, 行方과 小泉(1966), 小泉과 山田(1972), 松本(1976) 등은 감귤퀘양병균이 항생물질 및 thiaziazole계 살균제에 대한 내성에 대해서 보고하였다.

5. 우리나라에서의 감귤퀘양병 연구

박 등(1976)에 의하면 우리나라에 발생하는 감귤퀘양병은 1935년에 일본으로부터 유입되어 국내 정착된 것으로 추정하고 있으며, 또한 문헌기록은 한국작물보호학회(1963)에 있으나 실질적인 조사 보고나 연구는 1960년대 후반부터 이루어졌으며, 퀘양병의 발생시기 등에 대한 보고가 대부분이었는데, 퀘양병은 6월부터 발생하여 10월까지

발생하고 발병최성기는 8월 하순이라고 보고되었다(김과 문, 1967; 김, 1978; 김, 1979). 궤양병은 태풍에 의하여 잎에 상처가 생겼을 때 피해가 증가하고(김, 1979) 온주밀감에서 보다 잡감류에서 병발생도 많고 최초 발병시기도 40일 정도 빠르며(김 등, 1996), 병발생도 이병엽율이 1.0~20.0%이었고, 이병과율도 0.2~12.2%로 품종에 따라 발병정도가 차이가 있다고 하였다(문 등, 1994, 문 등; 1996).

감귤궤양병균의 동정 및 분류에 대한 연구는 최근에야 이루어졌는데, Myung(1997)은 한국에서 분리한 병원균들에 대한 RAPD-PCR 결과, 다른 지역의 궤양병균들과 비교하여 동남아 및 일본에 분포하는 병원균의 병원형을 Xac와 동일하다고 하였고, 제주도에 분포하는 대부분의 감귤궤양병균에 용균반응을 일으키는 bacteriophage(CPK-5)를 선발, 보고하여(명 등, 1995a) 대미 수출 과실검사용으로 1995년부터 현재까지 사용되고 있다. Kang(1999)은 bacteriophage법을 이용한 궤양병균 검사방법을 궤양병 발생예찰에 이용하여 병발생 이전에 병원균이 검출되어 병방제에 도움이 되었고, 또한 병발생과 bacteriophage검출량과 높은 상관성이 있음을 보고하였다.

온주밀감은 궤양병에 중도저항성(Civerolo, 1984)으로 궤양병에 의한 감귤의 수량이나 품질에 영향이 적기 때문에 궤양병 방제에 대한 연구가 많지 않다. 김 등(1967)은 약제 방제시험에서 vitigran blue가 다른 약제보다 방제효과가 좋다고 보고하였고, Kang(1999)은 copper제와 streptomycin제를 병용 사용하였을 경우 봄순잎과 여름순잎 모두에서 효과가 있었다고 하였다. 또한 현재 사용하고 있는 streptomycin제에 대한 내성균에 대한 보고도 있다(이 등, 1997).

III. 재료 및 방법

1. 공시배지

본 실험을 수행하는데 사용한 배지는 부표 4~13과 같다.

2. 공시 bacteriophage

본 시험에 사용한 bacteriophage는 제주도 감귤재배지 대부분의 궤양병균에 용균반을 일으키는 CPK-P5를 농촌진흥청 농업과학기술원에서 1994년도에 분양 받아 사용하였다 (명 등, 1995a).

3. 시험에 이용한 감귤궤양병균 및 분리방법

ELISA 역가검정에 사용된 궤양병원균 pathotype A, B, C와 bacteriophage검사에 이용한 궤양병균(그림 1)은 농촌진흥청 농업과학기술원 병리과에서 분양 받아 사용하였다 (명 등, 1995b; Myung, 1997).



Fig. 1. Colony of *X. axonopodis* pv. *citri* on WPSA medium (appendix 10).

또한 6개 대미 감귤수출단지에서 분포하는 궤양병균을 분리하고 동정하기 위하여 궤양병에 이병된 잎(그림 2)을 수집하였으며, 수집된 이병잎은 병징을 중심으로 5mm×5mm크기의 정방형으로 자르고 0.5% 차아염소산나트륨(NaClO)에서 1분간 살균한 후 흡습지에서 물기를 제거한 다음 4등분하여 5% peptone액 5ml에서 1시간동안 조직 속의 병원균을 누출(oozing)시킨 후 그 액을 영양배지에 도말하여 28±1℃의 항온기에서 colony를 형성시킨 후 궤양병균으로 추정되는 노란 colony를 분리배양 하였다. 각 수출단지별 1개씩 6개 균주를 분리하였으며, 분리된 병원균은 stock solution(NA broth 70ml + Glycerol 30ml)에 저장하여 1.5ml의 cap tube에 1ml씩 넣고 그 액을 -20℃에 보관한 후 다음 실험에 사용하였다.

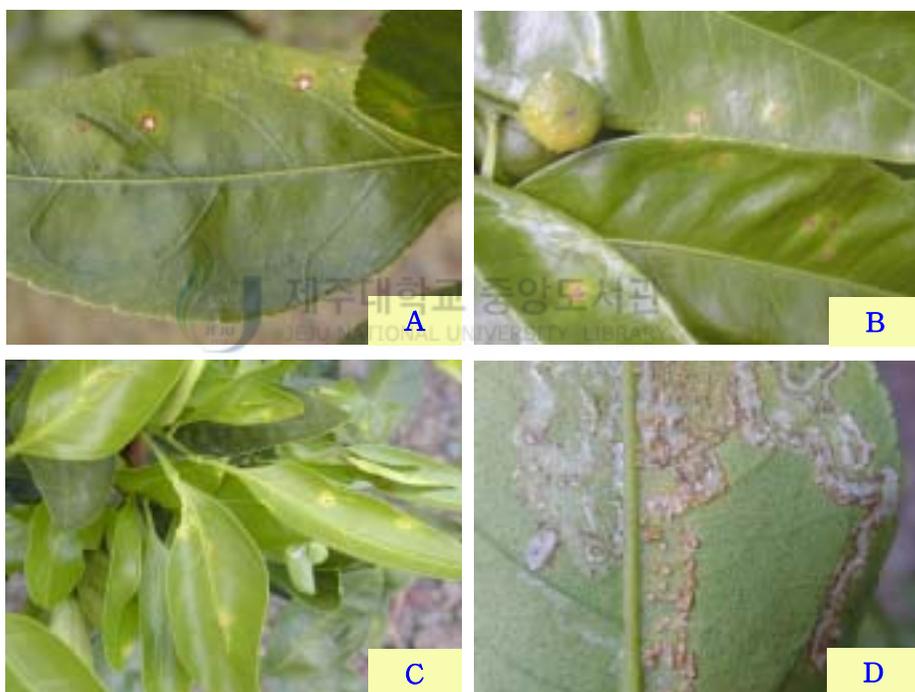


Fig. 2. Disease symptoms by citrus canker at different developmental stages on the leaves of citrus (satsuma mandarin); The overwintered leaf (A), the spring leaf (B), the summer leaf (C), the autumn leaf with damage by miner (D).

4. 수출단지 감귤궤양병 발생조사

제주도내 대미감귤수출단지(이하 수출단지 : 부표 1)로 지정된 해안단지, 상예단지, 상가단지, 청수단지, 안성단지, 의귀단지(그림 3)의 279농가 704포장에서 모든 온주밀감에 대해 2001년 7월에 감귤궤양병 발생율을 조사하였으며, 이병주율(%)은 (이병주수/조사주수)×100, 이병포장율(%)은 (이병포장수/조사포장수)×100, 이병농가율(%)은 (이병농가수/조사농가수)×100으로 하여 산출하였다.



Fig. 3. Citrus cultivating areas for export to USA in Jeju.

궤양병 발생조사는 월동잎과 새로 발생한 봄순잎, 여름순잎, 가을순잎에 대하여 발병 최성기에 조사하였는데, 6개 수출단지에서 각각 3개 포장을 선정하여, 50주에 대해 월동잎은 4월 23일부터 4월 25일, 봄순잎은 7월 21일부터 7월 25일, 여름순잎은 9월 1일부터 9월 4일, 가을순잎은 10월 20일부터 10월 24일에 궤양병 이병주율을 조사하였고, 궤양병 이병엽율(%)[(이병엽수/조사엽수)×100]은 포장당 3주를 선정하여 주당 200엽씩 4방향으로 조사하였으며, 조사기간에 각 단지별 궤양병 방제상황은 표 1과 같다.

Table 1. Sorts and frequencies of chemicals treated at the citrus cultivating areas for export to USA in 2001

Area	Location	Frequency of treatment	Chemical ^a
Haean	Jeju-shi	5	Bordeaux mixture, Tribasic copper sulfate 15%, Copper hydroxide 77%
Sangyae	Sogwipo-shi	2	Bordeaux mixture, Streptomycin 20%
Chongsu	Bukjeju-gun	10	Bordeaux mixture, Copper hydroxide 77%,
	Hankyong-myon		Streptomycin 20%
Sangga	Bukjeju-gun	3	Bordeaux mixture, Tribasic copper sulfate
	Aewol-up		15%, Streptomycin 20%
Ansung	Namjeju-gun	9	Bordeaux mixture, Tribasic copper sulfate
	Taejong-up		15%, Streptomycin 20%
Uigwi	Namjeju-gun	6	Bordeaux mixture, Tribasic copper sulfate
	Namwon-up		15%, Streptomycin 20%

^a Bordeaux mixture (5-5); 1,000X for tribasic copper sulfate, copper hydroxide and streptomycin.

5. 감글괘양병균 동정

가. 병원균의 속동정

각 수출단지에서 1개 포장에서 분리한 6개 균주에 대해 병원균을 동정하였는데, Schaad 등(1980), Krieg와 Holt(1984) 및 Meynell 등(1970)의 방법에 의해서 다음의 특성들을 조사하여 병원균의 속동정을 하였다.

1) 그람반응(Annete 등, 1985) : 그람염색은 부표 14~17과 같이 시약을 조제하여 다음의 순서에 의해서 수행하였다.

가) 사용된 시약은 1년 이내에 구입된 시약을 사용하였으며, 특히 iodine 용액은 빛에 의한 변색을 방지하기 위하여 갈색병에 넣고 냉암소에 보관하였다.

나) 병원균은 NA배지(부표 7)에서 배양하였으며, 정확한 반응을 보기 위하여 24~36시간 배양된 균을 사용하였다.

다) 염색 후에 혼동을 방지하기 위하여 세균을 슬라이드 글라스에 골고루 분포시켰다.

라) 슬라이드 글라스에 분포시킨 세균은 공기로 말렸으며, 말린 후에 슬라이드 글라스에 고정시키기 위하여 슬라이드 밑을 알콜램프로 열을 가하였다.

마) Crystal violet 용액으로 1분 동안 염색하였다.

바) 몇 초 동안 수돗물을 흘려서 씻고 흡습지로 말렸다.

사) 탈색제 ethyl alcohol로 약 30초 동안 슬라이드가 색이 없을 때까지 흘려서 탈색시키고 흡습지로 말렸다.

아) 수돗물로 2초 동안 씻고 counter stain 용액으로 10초동안 재염색을 하였다.

자) 수돗물로 씻고, 흡습지로 말린 후 광학현미경 1,000배의 oil immersion하에서 그람음성과 그람양성을 판정하였다.

차) 세균의 색깔이 붉은 색이면 음성으로 하였고 흑청색이면 양성으로 하였다.

2) 황색색소 검정

분리된 병원균을 NBY배지(부표 8)에 병원균을 희석 배양하고 28±1℃의 항온기에서 배양 3일, 5일에 노란색의 colony가 형성되면 양성 다른 색의 colony가 형성되면 음성으로 판정하였다.

3) King's B 배지에서 형광색소 형성 검정

형광색소 형성 유·무를 판정하기 위하여 King's B 배지(부표 5)에 병원균을 28±1℃의 항온기에서 3일간 배양한 후 365nm 자외선등을 쬐여서 형광색소 형성 유무를 판정하였다.

4) 혐기적 성장 여부 검정

혐기적 성장여부 시험용 배지(부표 13) 시약을 희석시킨 후 pH 7.1로 조절하고, 시험관에 5ml의 배지를 넣고 121℃에서 15분간 고압살균 하였다. 10%의 glucose 용액을 filter sterilization 한 후 , 각 시험관에 0.5ml씩 더하고 2개의 시험관에 병원 세균을 접종한 후 1개의 시험관에는 살균된 액체 paraffin을 5mm 두께로 부은 후 28±1℃ 항온기에서 3, 5, 7, 9일간 배양한 후 양쪽 tube가 모두 푸른색에서 노란색으로 변하면 혐기적 성장을 하는 것으로 판정하였다.

5) 내생 포자 형성 여부 검정(Gerhardt 등, 1981)

영양배지(NA : 부표 7)에 자라고 있는 병원균을 희석하여 slide glass에 떨어뜨리고 자연상태에서 말렸다. 5% malachite green 용액으로 slide glass에 10분 동안 흘려 염색하였다. 흐르는 물로 서서히 씻고 조심스럽게 말린 후 15초 동안 0.5% safranin 용액으로 slide glass에 흘려서 counter 염색을 한 다음 물로 서서히 씻고 흡습지로 건조시켰다. 400배의 현미경하에서 세균의 cell은 빨강계 염색되고 내생포자의 색은 푸르게 염색되었을 때 내생포자가 형성되는 것으로 판정하였다.

6) 형태 및 편모조사

병원균의 관찰은 slide glass에 증류수를 한 방울 떨어뜨리고 세균 균주를 loope로 채취하여 혼탁액을 만들었다. carbon을 가볍게 증착(두께 10nm 정도)하여 보강한 formvar가 입혀진 grid(200mesh)의 막을 밑으로 하여 병원균 혼탁액에 묻힌 후 흡습지로 빨아낸 다음 1~2% uranyl acetate로 염색시켜서 투과전자현미경(Hitachi H-7100)으로 병원세균의 형태, 편모의 수 및 착생부위를 조사하였다.

나. 병원균의 종동정

분리된 *Xanthomonas*속 병원균에 대한 종동정은 Schaad(1988) 및 Krieg 등(1984)의 다음 방법에 의한 생리 화학적 특성과 병원성 검정을 하여 종을 동정하였다.

1) YDC 배지에서의 mucoid 성장 검정

병원균을 YDC배지(부표 11)에 접종한 후 28±1℃ 항온기에서 5일간 배양한 후에 colony의 가운데가 볼록하게 자라는지 여부를 검정하였다.

2) 35℃에서의 성장여부 검정

병원균을 yeast salt 액체 배지(부표 12) 10ml를 시험관에 넣고 35℃의 water bath에서 10~12일간 배양한 후 성장여부를 검정하였다.

3) Asculin 액화 검정

병원균을 asculin 액체 배지(YS broth + Ferric amonium citrate 0.05% + Asculin 0.1%)에 접종한 후에 28일간 배양하고 자외선등으로 조사하였을 때 형광색소가 없으면 양성, 형광색소가 있으면 음성으로 판정하였다.

4) Gelatin 액화 검정

병원균을 gelatin 액화 검정용 배지(부표 4) 10ml를 시험관에 넣어 살균한 후에 접종하여 28±1℃의 항온기에 배양하였다. 3, 7, 14, 21일 후에 4℃에 30분간 넣어 두었다가 시험관을 눕혔을때 물이 옆으로 흐르면 gelatin 액화된 것으로 판정하였다.

5) Arabinose, Mannose, Glucose로부터 산생성 검정

Dye medium C 배지(부표 6)를 pH 6.8로 조정하고 살균한 후 filter 살균시킨 arabinose, mannose, glucose를 0.5% 더하였다. 배지에 병원균을 접종하고 2, 4, 6, 12, 24일간 배양하면서 배지의 색깔을 관찰하여 배지가 노란색으로 변하면 양성으로 판정하였다.

6) 병원성 검정

분리된 병원균을 영양배지에 접종하여 28±1℃의 항온기에서 48시간 배양한 후 배양된 병원균을 살균수에 희석하여 그 농도를 biolog turbidity meter에서 optical density 0.250~0.265(3×10^8 cfu/ml)에 조절하고 접종원인 포트재배 2년생 온주밀감 봄순이 발아하여 3주 정도 자란 새잎에 떨어뜨려 침 접종하였으며, 온실에 두고 병반의 진행상황을 30일간 관찰하였다.

6. 감글퀴양병 발생 예찰을 위한 병원균 검출방법 개발

가. 퀘양병균에 대한 ELISA 역가검정

본 실험에 사용한 퀘양병균 혈청(antibody)과 효소(enzyme conjugate)는 미국의 Agdia회사(Elkhart, Indiana, USA)로부터 Indirect ELISA kit(catalog number CAB 92200, ECA 92200)를 구입하여 사용하였다. 사용된 병원균을 PSA 배지(부표 9)에 배양하여 살균수로 병원균을 3×10^8 cells/ml에서 3×10^4 cells/ml까지 희석하였으며, 죽은 균에 대한 반응을 검정하고자 세균 희석액을 2등분하여 받은 100℃의 끓는 물에 10분간 담가 세균을 죽인 후에 살아있는 균과 죽은 균을 동시에 ELISA 역가검정을 하였다.

나. PSB에서의 퀘양병균 배양효과 검정

ELISA에 반응하는 최소농도 이하의 퀘양병균에 대한 액체배지에서 배양효과를 검정하기 위하여 과실을 세척한 물에 병원균을 3×10^5 cells/ml에서 3×10^1 cells/ml까지 희석하였다. 0.1ml의 병원균 희석액을 10ml의 PSB배지에 넣고 24, 48시간/100rpm 진탕 배양한 후 ELISA검정을 하였다.

다. 퀘양병균 신속검출을 위한 배지 연구

기본배지(PSB)에 과실세척액을 배양한 결과 과실에 부생되어 있는 세균들 중 형광성 세균(fluorescent Pseudomonads)들에 의한 병원균 증식 저지를 막기 위하여 PSB에 철분(Fe-EDTA) 0.1, 0.25, 0.5, 1.0g/l 과 감자즙(potato dextrose broth) 2.5%를 첨가하여 modified peptone sucrose broth(MPSB)를 만들고 배지에 24시간/100rpm 진탕 배양한 후 ELISA검정을 하였다.

라. ELISA법에 의한 검증시험

개발된 배지를 이용하여 포장에서 ELISA검정을 실제적으로 검증하기 위하여 수출단지인 상가단지 퀘양병 이병포장에서 병반이 있는 과실과 병반이 없는 과실 그리고 건전포장에서 병반이 없는 과실을 수집하였다. 수집된 과실을 살균수로 세척하고 세척한 물을 10,000rpm에서 15분간 원심분리하여 농축시켰다. 0.1ml의 농축액을 10ml의 PSB 배지에 넣고 24, 48시간/100rpm 진탕 배양한 후 ELISA검정을 하였다.

마. ELISA법과 Bacteriophage법 비교 실증시험

현재 대미수출에 사용되고 있는 bacteriophage법과 새로운 ELISA법 비교실험(그림 4)을 수행하였다. 3개 수출단지 재배포장인 해안단지, 상가단지, 의귀단지의 건전한 3개 포장과 궤양병이 이병된 3개 포장을 선정하여 각 포장으로부터 1kg의 과실을 수집하여 실험에 사용하였다. 수집된 과실은 살균수로 세척하여 10,000rpm에서 15분간 원심분리한 후 20ml의 살균수로 희석하였으며 그 중 1ml를 취하여 ELISA검사를 하였고, 19ml는 bacteriophage검사에 사용하였다. ELISA검사를 위한 1ml 중 0.1ml를 10ml의 MPSB배지에 24시간 진탕 배양한 후 ELISA검사를 하였다.



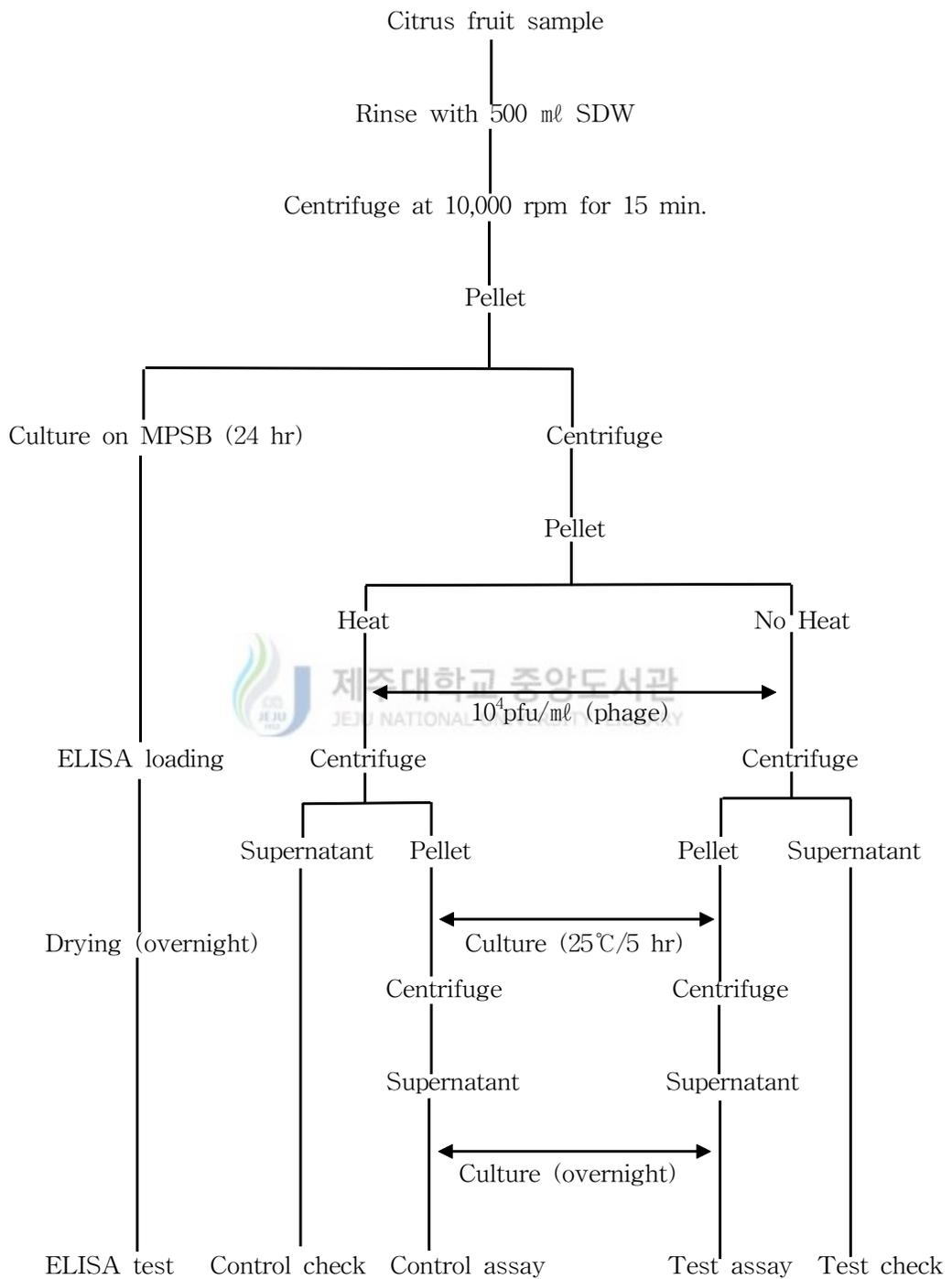


Fig. 4. Detection procedures of ELISA and bacteriophage test

7. ELISA법과 Bacteriophage법을 이용한 감귤궤양병 발생 예찰

가. 예찰포장 선정 및 조사

궤양병 발생예찰은 수출단지에는 궤양병방제를 위한 지속적인 약제살포가 이루어지고 있어서 수출단지가 아닌 제주도 북제주군 조천읍에 위치한 온주밀감원에서 궤양병방제가 잘 이루어지지 않았던 포장에 선정하였으며, 궤양병 약제 방제구와 약제 무방제구로 나누고 다시 궤양병이 발생되고 있지 않는 무발생구를 선정하여 2001년 4월부터 10월까지 월동잎과 새로 발생된 봄순잎, 여름순잎, 가을순잎에 대하여 1주일 간격으로 궤양병균 활동과 병발생을 조사하였다. 궤양병균 활동조사는 각 시험포장별로 각각 10m이상 떨어진 3주를 선정하여 월동잎에 대해서는 4월 19일부터 6월 15일, 봄순잎에 대해서는 5월 11일부터 7월 12일, 여름순잎은 7월 27일부터 8월 30일, 가을순잎은 9월 12일부터 10월 24일까지 ELISA법과 bacteriophage법에 의하여 궤양병균의 검출을 비교 조사하였으며, 잎과 과실에서의 최초 궤양병 발생시기를 관찰하고 조사하였다.

나. 시료조제방법



궤양병균 유·무를 조사하기 위하여 온주밀감의 동서남북 등 5방향에서 각각 잎을 수집하고, 살균한 250ml 삼각플라스크에 증류수 50ml를 넣고, 25±1℃의 항온진탕배양기 120rpm에서 1시간 동안 진탕한 다음 거르로 협잡물을 제거하고 고속원심분리기(한일 SUPRA28K)의 10,000rpm에서 15분간 원심분리한 후 상등액은 버리고 침전물(pellet)을 20ml의 살균수로 희석하여, 그 중 1ml를 취하여 ELISA검사를 하였고 19ml는 bacteriophage검사에 사용하였다. 또한 ELISA검사를 위한 1ml중 0.1ml를 10ml의 MPSB 배지에 배양하여 사용하였다.

다. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ELISA 검정은 준비된 시료(7. 나) 1ml를 MPSB배지에서 24시간 배양한 액을 well당 100 μ l씩 분주하고, 37℃의 항온기에서 overnight하여 well을 고정시킨 후 blocking solution(PBST에 5% skim milk)을 well당 200 μ l 주입하여 1시간 습실상자에서 실온에 배양하여 PBST solution(PBST 50ml + distilled water 950ml)으로 5~8회 세척하였다. 그 후에 antibody(6. 가)를 각 well당 100 μ l 분주하여 습실상자에서 60분간 실온 배양

하여 세척한 후에 다시 enzyme conjugate(6. 가)를 $100\mu\text{l}$ 씩 분주하여 습실상자에 넣고 실온에서 60분 배양하고 세척한 후 PNP solution(PNP tablet $1\text{mg}/\text{ml}$) $100\mu\text{l}$ 씩을 각 well에 분주하고 습실상자에 넣고 실온에서 60분 정도 배양하면서 관찰하고 ELISA reader(DYNATECH MR5000) 405nm 에서 조사하였다. 모든 배양은 광선에 의한 영향을 줄이기 위하여 습실상자를 호일로 피복하였고 배양 시 검은 천으로 덮었다. 또한 반응을 정지시키고자 할 때에는 $50\mu\text{l}$ 의 3M sodium hydroxide를 첨가하여 냉장 보관한 후 필요시 조사하였다.

라. Bacteriophage test (BPT)

준비된 세척액 검정시료(7. 나) 19ml를 농축시키기 위하여 고속원심분리기에서 다시 한 번 원심분리한 후 6ml의 농축액을 만들었으며 이것을 둘로 나누어 3ml는 100°C 에서 10분간 가열하여 control구로 하고 3ml는 가열하지 않은 상태로 하여 test구로 하였다. 각 시험구에 bacteriophage($10^4\text{pfu}/\text{ml}$) 1ml를 넣고 다시 10,000rpm에서 10분간 원심분리한 후 그 상등액 0.1ml와 퀘양병균 희석액($10^8\text{cfu}/\text{ml}$) 0.2ml를 취하여 50°C WPSSA (부표 10) 8ml에 혼합하여 plate에 균힌 후 배양하여 이것을 check구로 하였으며, 0.1ml를 취한 나머지 3.9ml는 다시 항온진탕배양기 25°C 에서 5시간, 150rpm으로 진탕 배양하여 앞의 check와 동일한 방법으로 반복 배양하여 이것을 assay구로 하였다. bacteriophage 검사는 가열구(control)와 가열하지 않은 구(test)를 각각 25°C 항온기에서 overnight 배양하고 용균반(phage plaque)을 센 다음 비교 분석하여 그 차이가 20% 이상이면 양성으로 하였다.

8. 감귤퀘양병 방제방법 연구

가. 감귤퀘양병에 대한 약제방제 효과 구명

퀘양병 방제시험을 위한 포장은 병발생 예찰 시험과 동일한 포장에서 수행하였는데, 2001년(1차년도)에 퀘양병 방제시험에 사용한 약제 및 시기는 봄순발아기인 4월 19일에 bordeaux mixture(5-5), 6월 15일에 tribasic copper sulfate 15%(1,000X), 7월 18

일에 copper hydroxide 77%(1,000X)를 각각 1회씩 살포하고 새순 생육단계별 발병 최성기에 이병엽율을 조사하였으며, 방제가(%)는 [(무처리발병율-처리발병율)/무처리 발병율]×100으로 하여 산출하였다.

2002년(2차년도)에는 관행구(1차년도 시험구)와 병원균 검출 예찰시기에 따라 방제 시험구를 동제, 항생제, 혼합제 처리구를 두었는데, 관행구는 2001년(1차년도) 궤양병 방제 시험에 사용한 동일한 약제 및 시기에 각각 살포하였다. 동제, 항생제, 혼합제구는 봄순 발아기인 4월 11일에 bordeaux mixture(5-5식)를 살포하였고, 5월 20일에 동제구는 tribasic copper sulfate 15%, 항생제구는 streptomycin 20%, 혼합제구는 streptomycin 10% + copper hydroxide 50%를 각각 살포하였다. 7월 30일에 동제구는 copper hydroxide 77%, 항생제구는 streptomycin 20%, 혼합제구는 streptomycin 10% + copper hydroxide 50%를 각각 살포(표 2)하여 각 순잎 발병 최성기에 이병엽율을 조사 하였다. bordeaux mixture(5-5식)를 제외한 시험에 사용한 약제는 모두 1,000배액으로 살포하였으며, 가을순잎은 발생되지 않아서 조사를 하지 않았다.



Table 2. Chemicals treated with different treatment intervals according to the traditional method in 2002

Treatment	Chemical		
	First (11 April)	Second (20 May)	Third (30 July)
Copper	Bordeaux mixture (5-5)	Tribasic copper sulfate 15%	Copper hydroxide 77%
Antibiotic	Bordeaux mixture (5-5)	Streptomycin 20%	Streptomycin 20%
Copper + antibiotic	Bordeaux mixture (5-5)	Streptomycin 10% + copper hydroxide 50%	Streptomycin 10% + copper hydroxide 50%

IV. 결 과

1. 수출단지 감귤궤양병 발생조사

6개 수출단지, 279농가, 704포장에 대하여 2001년 7월말에 봄순잎을 대상으로 궤양병 발생상황을 조사한 결과 105농가(37.6%), 196포장(27.8%)에서 궤양병이 발생되었다(표 3). 병이 발생한 포장의 평균 이병주율은 수출단지에 따라 병발생이 적은 단지에서는 0.2%(의귀), 많이 발생한 단지에서는 5.6%(청수)로 지역에 따라 다양하였다. 또한 청수 단지, 안성단지, 상예단지에서는 50% 이상의 농가, 40% 이상의 포장, 2.6%이상의 나무에서 궤양병이 발생되고 있었다.

Table 3. Disease survey of citrus canker in the citrus cultivating areas for export to USA in late July of 2001

Area	No. of surveyed farms	No. of surveyed fields	No. of diseased farms (%)	No. of diseased fields (%)	Disease incidence (%)
Haean	38	107	4(10.5)	4 (3.7)	0.7
Sangyae	54	95	32(59.3)	42(44.2)	2.6
Chongsu	22	112	17(77.3)	58(52.0)	5.6
Sangga	63	165	12(19.1)	18(10.9)	1.2
Ansung	49	105	34(69.4)	61(58.1)	5.4
Uigwi	53	120	6(11.3)	13(10.9)	0.2
Total	279	704	105(37.6)	196(27.8)	2.6

각 수출단지별로 월동잎에서 궤양병 이병주율 및 이병엽율이 1.3~24.7%, <0.1~0.5%인 3개 포장을 선정하여 새로 발생한 잎에서 발병율을 조사한 결과, 봄순잎에서는 이병주율이 1.3~35.3%이고, 이병엽율은 <0.1~15.6%이었고, 여름순잎에서는 이병주율이 8.7~39.3%이며, 이병엽율은 0.6~23.1%로 병발생이 증가하였고, 또한 가을순잎은 이병주율이 3.4~36.3%이었고, 이병엽율은 <0.1~11.5%로 감소되었다. 그리고 지역에 따라서는 청수단지가 이병엽율이 봄순잎 <0.1%, 여름순잎 0.6%, 가을순잎 <0.1%로 가장 발생이 적었으나, 상가단지는 봄순잎 15.6%, 여름순잎 23.1%, 가을순잎 11.5%로 병발생이 가장 많았다(표 4).

Table 4. Disease incidence of citrus canker at different developmental stages in the citrus cultivating areas for export to USA in 2001

Area	Disease incidence (%) ^a							
	Overwintered leaf		Spring leaf		Summer leaf		Autumn leaf	
	Tree ^b	Leaf ^c	Tree	Leaf	Tree	Leaf	Tree	Leaf
Haean	21.3	0.3	34.7	1.9	24.0	7.4	13.5	<0.1
Sangyae	1.3	<0.1	24.7	0.2	24.0	12.8	24.4	7.0
Chongsu	10.7	0.2	1.3	<0.1	8.7	0.6	3.4	<0.1
Sangga	14.0	0.3	33.3	15.6	36.7	23.1	36.3	11.5
Ansung	24.7	0.5	35.3	1.0	39.3	2.9	5.0	<0.1
Uigwi	22.0	0.5	19.3	0.4	14.7	3.5	7.3	<0.1
Average	15.7	0.3	24.8	3.2	24.6	8.4	15.0	3.2

^a Surveyed in late April on overwintered leaves, late July on spring leaves, early September on summer leaves, and late October on autumn leaves.

^b % of infected trees.

^c % of infected leaves.

2. 감글괘양병원균 등정

가. 병원균의 속동정

Table 5. Comparison of characteristics for genus identification between the isolates collected from the citrus cultivating areas for export to USA and description of Schaad's

Characteristic	Reaction of isolates						Description of Schaad's
	Haeon	Sangyae	Chongsu	Sangga	Ansung	Uigwi	
	-5 ^a	-28	-3	-37	-33	-35	
Gram stain	- ^b	-	-	-	-	-	-
Yellow pigment on NBY	+	+	+	+	+	+	+
Fluorescent pigment on KB	-	-	-	-	-	-	-
Growth anaerobically	-	-	-	-	-	-	-
Cell shape	R	R	R	R	R	R	R
Flagellar arrangement	M	M	M	M	M	M	M
Endospore formation	-	-	-	-	-	-	-

^a No. of isolates.

^b +; Positive, -; Negative, R; Rod shape, M; Monotrichous.

각 수출단지로부터 분리한 6균주에 대한 속동정 결과, 모든 균주는 그람음성이었고, NBY배지에서 colony 색깔이 황색이었고, King's B 배지에서 형광색소가 형성되지 않았으며, 산소가 없는 상태에서는 생장을 하지 않고, 또한 내생포자도 형성되지 않았으며, 세포형태가 간형으로서 편모가 한쪽 끝에 하나인 세균으로 관찰되었다(표 5, 그림 5).

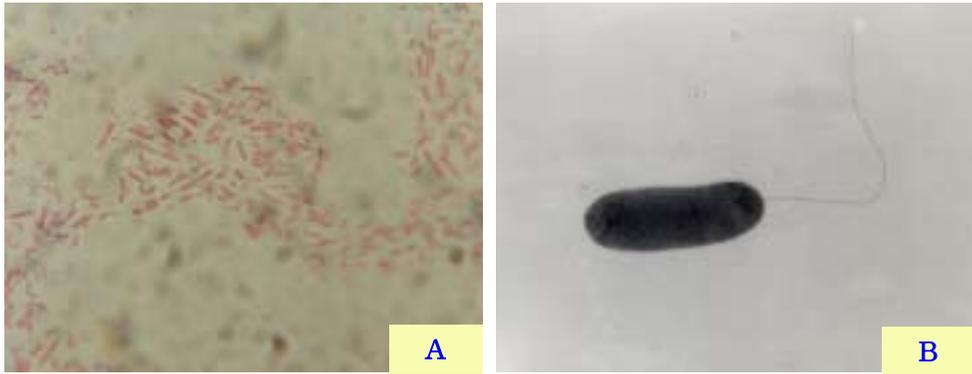


Fig. 5. Reaction of gram stain by microscope (700×; **A**) and cell shape of pathogen causing citrus canker (14,000×; **B**).

나. 병원균의 종동정

분리된 병원균들에 대한 종동정을 실험한 결과, YDC 배지에서는 colony의 가운데가 불투명하게 성장하였으며, 35℃에서 생장이 확인되었고, asculin 액체 배지에 접종한 후에 자외선등으로 조사하였을 때 형광색소가 형성되지 않아 가수분해를 일으키고, gelatin 액화 검정에서도 액화가 되지 않았으며, 또한 arabinose, mannose, glucose로부터 산생 여부 조사에서는 glucose에서만 노란색으로 변화였다(표 6). 그리고 분리한 병원균을 온주 밀감 잎에 접종한 결과, 병원성이 관찰되었다(그림 6).

Table 6. Comparisons of characteristics for species identification between the isolates collected from the citrus cultivating areas for export to USA and description of Schaad's

Characteristic	Reaction of isolates						Description of Schaad's
	Haean	Sangyae	Chongsu	Sangga	Ansung	Uigwi	
	-5 ^a	-28	-3	-37	-33	-35	
Mucoid growth on YDC	+ ^b	+	+	+	+	+	+
Growth at 35℃	+	+	+	+	+	+	+
Asculin hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+
Gelatin liquefaction	-	-	-	-	-	-	-
Acid from Arabinose	-	-	-	-	-	-	-
Glucose	+	+	+	+	+	+	+
Mannose	-	-	-	-	-	-	-
Pathogenicity	+	+	+	+	+	+	+

^a No. of isolates.

^b +; Positive, -; Negative.



Fig. 6. Pathogenicity-test of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* on citrus leaf at 14 (A) and 29 (B) days after inoculation.

3. 감귤궤양병 예찰을 위한 병원균 검출방법 개발

가. ELISA 역가검정

감귤궤양병균 pathotype A, B, C에 대한 ELISA 역가 검정결과, 본 실험에 사용한 혈청은 궤양병균 pathotype A, B, C 모두가 3×10^5 cells/ml에서 양성반응을 보여 모든 궤양병균에 대한 동일한 역가가 인정되었다(표 7). 또한 궤양병균을 죽인 후에도 ELISA반응이 동일하게 나타나 실험에 사용한 혈청은 죽은 궤양병균에 대해서도 살아있는 세균과 동일하게 반응을 하였다.

Table 7. ELISA of live and dead cells of citrus canker pathogen pathotypes A, B and C

Cell status	Density (cells/ml)	Pathotype A		Pathotype B		Pathotype C	
		O.D. ^a	Reaction	O.D.	Reaction	O.D.	Reaction
Live	3×10^8	4.686	+ ^b	4.690	+	4.635	+
	$\times 10^7$	4.098	+	3.494	+	3.927	+
	$\times 10^6$	1.561	+	1.245	+	1.726	+
	$\times 10^5$	0.362	+	0.323	+	0.220	+
	$\times 10^4$	0.126	-	0.115	-	0.127	-
Dead	3×10^8	4.685	+	4.542	+	4.680	+
	$\times 10^7$	4.718	+	4.717	+	4.609	+
	$\times 10^6$	3.099	+	2.244	+	4.641	+
	$\times 10^5$	0.601	+	0.585	+	1.410	+
	$\times 10^4$	0.121	-	0.150	-	0.214	-
Negative control		0.109					

^a Optical density at 405 nm by the ELISA reader.

^b +; Positive, -; Negative.

나. 병원균 배양이 ELISA 반응에 미치는 효과

과실세척액을 이용하여 ELISA 반응 이하의 저농도의 병원균 0.1ml를 10ml의 액체 배양기(PSB)에서 배양시간을 달리하여 ELISA 검정결과, 24시간 배양구에서는 모든 농도에서 음성반응을 보였으나 48시간에서는 모든 구에서 양성반응을 보였다(표 8).

Table 8. ELISA of the culture of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* with different initial densities in rinse water^a

Initial bacterial density (cells/ml)	24 h culture		48 h culture	
	O.D. ^b	Reaction	O.D.	Reaction
3×10 ⁵	0.148	- ^c	0.641	+
3×10 ⁴	0.239	-	0.583	+
3×10 ³	0.111	-	0.450	+
3×10 ²	0.195	-	0.373	+
3×10 ¹	0.200	-	0.814	+
Negative control	0.123		0.152	

^a Peptone sucrose broth was used for the culture of Xac in fruit rinse water.

^b Optical density at 405 nm by the ELISA reader.

^c +; Positive, -; Negative.

다. 감귤궤양병원균 검출을 위한 배양 배지 연구 및 ELISA 검증시험

배양된 병원균을 희석하지 않고 포장에서 직접 과실을 채취하여 세척한 액을 농축하여 배양한 실험에서도 병원균을 희석하여 배양한 실험에서와 똑같이 24시간 배양구에서는 반응을 보이지 않았으나 48시간 배양한 구에서는 수집된 시료 모두에서 양성 반응을 보였다(표 9 : PSB). 또한 24시간 배양액을 King'B 배지에 도말하여 배지에

증식된 세균을 조사한 결과, 배지에 형성된 대부분의 세균이 형광색소를 띠고 있었다. 그리고 PSB배지에 과실을 세척한 농축액을 배양한 결과, 24시간 후에 병원균 증식은 억제되고 형광성 세균 증식이 왕성하였기 때문에 이 문제를 해결하기 위하여 Fe-EDTA를 첨가하였다. 1ℓ의 PSB에 Fe-EDTA 양을 0.1, 0.25, 0.5, 1.0g 첨가하여 병원균 배양을 하여본 결과 0.1g과 1.0g을 첨가한 구에서는 병원균 증식이 미약하였다. 0.25g과 0.5g을 첨가한 구에서는 병원균 증식이 양호하였으나 0.25g 첨가구가 증식이 더 잘되었다. 또한 병원균 증식을 돕기 위하여 PDB를 25g 더 첨가하여 본 실험에 사용하여 과실농축액을 24시간 배양하여 ELISA 검정결과, 이병된 포장에서 채취한 이병과실 및 건전과실에서는 양성반응을 보였으나, 건전한 포장에서 채취한 과실에서는 음성반응을 보였다(표 9 : MPSB).

Table 9. ELISA of the culture of fruit rinse water in different media for the detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

Sample		PSB ^a				MPSB ^b	
		24 h culture		48 h culture		24 h culture	
Field status	Fruit status	O.D. ^c	Reaction	O.D.	Reaction	O.D.	Reaction
Infected	Infected	0.124	- ^d	0.861	+	0.415	+
	Uninfected	0.135	-	0.941	+	0.283	+
Uninfected	Uninfected	0.189	-	0.556	+	0.142	-
Negative control		0.107				0.109	

^a Peptone sucrose broth.

^b Modified peptone sucrose broth (amended with 0.25g/ℓ Fe-EDTA and 2.5% potato-dextrose broth).

^c Optical density at 405 nm by the ELISA reader.

^d +; Positive, -; Negative.

라. ELISA법과 Bacteriophage법 비교 실증시험

Table 10. Comparison of two methods ELISA and BPT for detecting *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* on citrus fruits from different fields

Area	Fruit status	Field	ELISA		BPT		Reaction
			O.D. ^a	Reaction	No. of plaques		
					Control	Test	
Haean	Infected	A	2.536	+ ^b	119.3	115.0	-
		B	1.881	+	124.3	118.7	-
		C	1.428	+	116.0	150.0	+
	Uninfected	D	0.408	-	120.0	126.0	-
		E	0.277	-	135.3	144.3	-
		F	0.318	-	129.7	126.7	-
Sangga	Infected	G	3.205	+	127.7	160.5	+
		H	3.305	+	120.0	167.0	+
		I	1.555	+	131.3	234.3	+
	Uninfected	J	0.353	-	133.6	146.7	-
		K	0.810	+	124.0	133.3	-
		L	0.325	-	164.3	164.0	-
Uigwi	Infected	M	3.248	+	130.0	153.7	-
		N	3.187	+	140.7	130.3	-
		O	3.255	+	156.7	151.0	-
	Uninfected	P	0.389	-	148.7	149.7	-
		Q	0.286	-	139.7	155.7	-
		R	0.348	-	130.7	145.0	-
Negative control			0.210				

^a Optical density at 405 nm by the ELISA reader.

^b +; Positive, -; Negative.

궤양병균을 빠르게 증식할 수 있는 배지와 ELISA법을 이용하여, 현재 사용하고 있는 bacteriophage법과의 비교실험을 수행하였다(그림 7). 해안단지, 상가단지, 의귀단지에서 궤양병이 발생된 포장과 무발생포장을 각각 3포장씩 선정하고 과실을 채취하여 ELISA 법과 bacteriophage법을 동시에 수행한 결과, ELISA법은 이병포장에서는 9개 포장 전부 양성인 나왔으며, 건전 포장에서는 상가단지 1개 포장에서 양성인 나왔고 나머지 8개 포장은 음성인 나왔다(표 10). 그러나 bacteriophage법에서는 이병포장 가운데 해안단지 1개 포장과 상가단지의 3개 포장에서만 양성인 나왔고 해안단지의 2개 포장과 의귀 단지의 이병된 3개 포장 모두에서 음성인 나왔다. 또한 전지역의 건전포장에서는 음성 이었다.

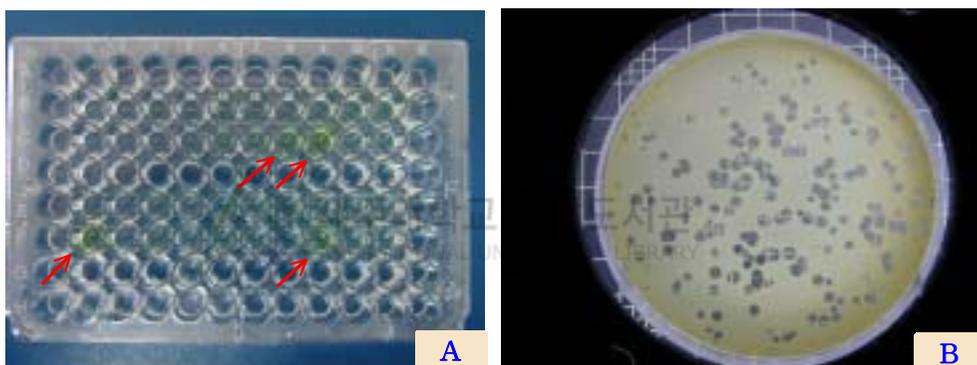


Fig. 7. Reactions of ELISA (A) and bacteriophage plaques (B).

Table 11. Comparison of detection rate and index between ELISA and BPT

	ELISA	BPT	Effect
Rate of detection	94.4%	72.2%	$\Delta 22.2\%$
Index	130.7	100	$\Delta 30.7$

그리고 본 실험에서 검정시료 18개 중에 ELISA법은 17개 시료에서 검출되어 94.4%, bacteriophage법은 13개 시료에서 검출되어 72.2% 검출율을 보였으며(표 11), 또한 검사하는데 소요되는 시간을 추정하여 본 결과 부표 3과 같이 나타났다.

4. ELISA법과 Bacteriophage법을 이용한 감귤궤양병 예찰

가. 온주밀감 생육단계별 감귤궤양병 예찰

온주밀감 생육단계별로 궤양병균이 활동정도를 알아보기 위하여 ELISA법과 bacteriophage법에 의하여 조사한 결과, 월동한 나무에서 조사한 월동잎은 ELISA법에서는 무방제구에서 5월 17일부터, 방제구에서는 5월 30일부터 병원균이 최초 검출되었고 (표 12), bacteriophage법에서는 무방제구, 방제구 모두가 병원균 검출이 없었다. 또한 무방제구에서는 5월 17일에 병원균이 활동하고 있음을 알 수 있었으나, 방제구에서는 5월 30일에 활동하고 있었다.

Table 12. Detection of pathogen causing citrus canker on overwintered leaves using ELISA and BPT at different developmental stages

Detection date	Chemical treated ^a				No chemical treated				No disease						
	ELISA		BPT		ELISA		BPT		ELISA		BPT				
	O.D. ^b	Reac-tion	Con-trol	Test	Reac-tion	O.D.	Reac-tion	Con-trol	Test	Reac-tion	O.D.	Reac-tion	Con-trol	Test	Reac-tion
4 May	0.138	- ^c	132.2	136.3	-	0.143	-	148.7	151.2	-	0.148	-	146.6	145.6	-
17 May	0.138	-	170.7	169.0	-	1.435	+	173.0	174.7	-	0.150	-	185.0	178.3	-
24 May	0.168	-	188.4	185.9	-	0.416	+	184.9	194.3	-	0.173	-	200.3	194.0	-
30 May	0.233	+	216.3	635.7	-	0.247	+	206.4	211.2	-	0.158	-	211.6	193.6	-

^a Bordeaux mixture (5-5) was applied on 19 April.

^b Optical density at 405 nm by the ELISA reader.

^c +; Positive, -; Negative.

새로 발생한 봄순잎에 대한 병원균활동은 ELISA법에서는 약제처리를 하지 않은 구에서 5월 30일부터 병원균검출이 시작되었으나(표 13), 4월 19일 월동잎에 약제처리를 하였을 경우에는 병원균활동이 6월 7일에 검출되기 시작하였다. 그러나 bacteriophage 법은 무방제구에서 6월 7일부터, 방제구에서 6월 15일부터 병원균이 검출되었다.

Table 13. Detection of pathogen causing citrus canker on spring leaves using ELISA and BPT at different developmental stages

Detection date	Chemical treated ^a					No chemical treated					No disease				
	ELISA		BPT			ELISA		BPT			ELISA		BPT		
	O.D. ^b	Reaction	Con-trol	Test	Reaction	O.D.	Reaction	Con-trol	Test	Reaction	O.D.	Reaction	Con-trol	Test	Reaction
24 May	0.124	- ^c	185.2	187.3	-	0.133	-	184.7	191.2	-	0.124	-	184.9	187.3	-
30 May	0.195	-	202.7	197.1	-	0.358	+	203.7	211.2	-	0.149	-	218.5	209.1	-
7 June	1.293	+	213.6	199.0	-	0.727	+	228.0	955.0	+	0.276	-	224.2	211.9	-
15 June	0.505	+	185.0	224.3	+	0.629	+	188.1	526.6	+	0.258	-	184.6	186.4	-

^a Tribasic copper sulfate 15% (1,000X) was applied on 15 June.

^b Optical density at 405 nm by the ELISA reader.

^c +; Positive, -; Negative.

여름순잎에서 병원균활동은 ELISA법과 bacteriophage법 모두에서 무방제구는 여름순 전개와 동시에 7월 27일부터 활동하고 있었으나, 7월18일 약제 방제구에서는 8월 3일에 병원균 검출이 시작되었다(표 14).

Table 14. Detection of pathogen causing citrus canker on summer leaves using ELISA and BPT at different developmental stages

Detection date	Chemical treated ^a					No chemical treated					No disease				
	ELISA		BPT			ELISA		BPT			ELISA		BPT		
	O.D. ^b	Reaction	Con-trol	Test	Reaction	O.D.	Reaction	Con-trol	Test	Reaction	O.D.	Reaction	Con-trol	Test	Reaction
27 July	0.126	- ^c	171.3	155.3	-	0.768	+	151.5	205.4	+	0.144	-	178.0	175.1	-
3 Aug.	0.389	+	214.0	338.0	+	0.797	+	190.6	617.0	+	0.273	-	180.5	164.7	-
17 Aug.	0.493	+	194.8	293.0	+	3.112	+	202.4	>999	+	0.305	-	218.2	225.2	-

^a Copper hydroxide 77% (1,000X) was applied on 18 July.

^b Optical density at 405 nm by the ELISA reader.

^c +; Positive, -; Negative.

가을순잎에 대한 병원균활동은 ELISA법과 bacteriophage법, 방제구와 무방제구 모두에서 잎 전개시기인 9월 12일부터 병원균활동이 시작되고 있었다(표 15).

Table 15. Detection of pathogen causing citrus canker on autumn leaves using ELISA and BPT at different developmental stages

Detection date	Chemical treated					No chemical treated					No disease				
	ELISA		BPT			ELISA		BPT			ELISA		BPT		
	O.D. ^a	Reaction	Con-trol	Test	Reaction	O.D.	Reaction	Con-trol	Test	Reaction	O.D.	Reaction	Con-trol	Test	Reaction
12 Sept.	0.907	+ ^b	200.0	242.9	+	0.503	+	203.6	654.3	+	0.348	-	170.6	171.4	-
20 Sept.	0.192	+	131.0	184.7	+	0.447	+	109.9	142.2	+	0.098	-	133.1	127.7	-
27 Sept.	0.791	+	128.7	>999	+	0.445	+	130.7	861.2	+	0.153	-	154.0	153.3	-

^a Optical density at 405 nm by the ELISA reader.

^b +; Positive, -; Negative.

나. 감귤궤양병균 검출과 병발생 관계

각 순잎이 생육단계별 궤양병균 최초 검출일은 표 12~15를 종합적으로 정리하였으며, 새로 발생한 잎에서 궤양병의 최초 발생을 조사한 결과, 봄순잎에서는 병발생(그림 8)이 무방제구에서 6월 7일, 방제구에서 6월 15일이었고, 여름순잎에서는 무방제구가 7월 27일, 방제구가 8월 3일이며, 가을순잎에서는 무방제구와 방제구 모두에서 9월 12일이었다(표 16). 동일 시험구 온주밀감 과실에서는 무방제구에서 6월 21일, 방제구는 6월 28일에 궤양병이 최초 발생되었다.

Table 16. First date of citrus canker occurrence at different developmental stages on citrus leaves in 2001^a

Leaf	Date of canker pathogen				Date of disease occurrence	
	ELISA		Bacteriophage		No chemical	Chemical
	No chemical	Chemical	No chemical	Chemical		
Overwintered	17 May	30 May	-	-	-	-
Spring	30 May	7 June	7 June	15 June	7 June	15 June
Summer	27 July	3 Aug.	27 July	3 Aug.	27 July	3 Aug.
Autumn	12 Sept.	12 Sept.	12 Sept.	12 Sept.	12 Sept.	12 Sept.

^a Surveyed at one week interval from 19 April.

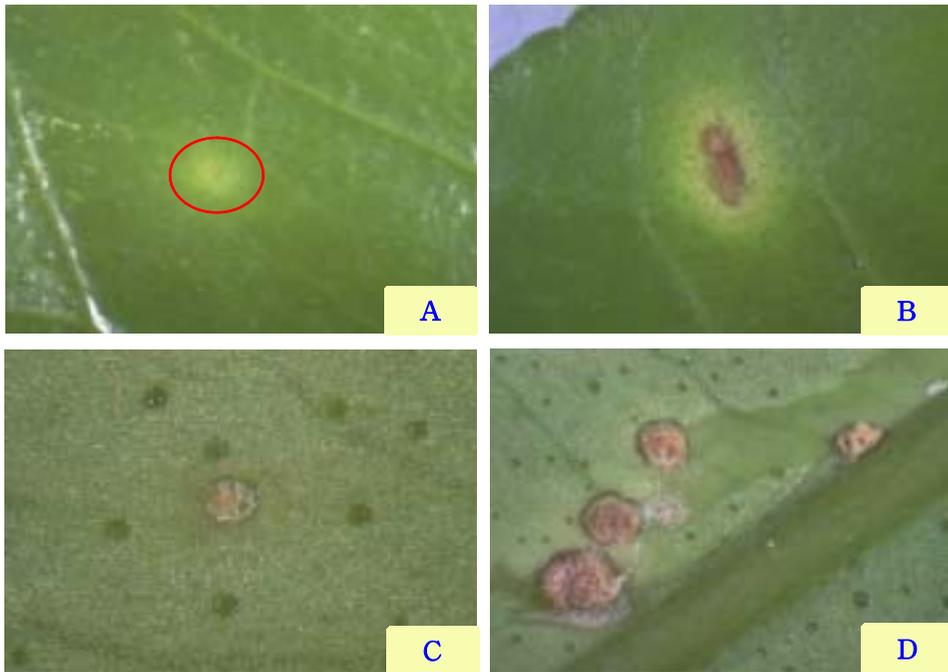


Fig. 8. Visual symptoms of citrus canker and observation with microscope at different stages of infection; Visual symptom of initial and advanced stages, respectively (A and B), Microscopical observation of infected leaves at initial and advanced stages, respectively (C and D).

5. 감귤궤양병 방제방법 연구

가. 감귤궤양병에 대한 약제방제 효과 구명

2001년에 관행방제에 대한 궤양병 방제효과를 알기 위하여 온주밀감 월동잎에 궤양병 이병엽율이 각각 3.3, 0.8%인 방제, 무방제 시험 포장을 선정하여 방제구는 봄순발아기인 4월 19일에 bordeaux mixture(5-5), 6월 15일에 tribasic copper sulfate 15% (1,000X), 7월 18일에 copper hydroxide 77%(1,000X)를 각각 1회씩 살포하고 각 순잎에 대한 약제효과를 조사한 결과(표 17), 약제 살포하였을 경우에는 이병엽율이 봄순잎에서 3.1%, 여름순잎에서 17.3%, 가을순잎에서 2.5%로 무방제구의 봄순잎 8.8%, 여름순잎 78.7%, 가을순잎 18.0%에 비하여 약제방제 효과는 있었다.

Table 17. Effect of chemicals on reduction of citrus canker at different developmental stages in 2001

Treatment	Overwintered leaves (%) ^a	Spring leaf		Summer leaf		Autumn leaf	
		% of diseased leaves	Efficacy	% of diseased leaves	Efficacy	% of diseased leaves	Efficacy
Chemical treated ^b	3.3	3.1	64.7	17.3	78.5	2.5	86.1
No chemical treated	0.8	8.8	-	78.7	-	18.0	-

^a Investigated on overwintered leaves on 19 April, spring leaves on 16 July, summer leaves on 3 September and autumn leaves on 24 October.

^b Bordeaux mixture (5-5) was applied on 19 April, tribasic copper sulfate 15% (1,000X) on 15 June and copper hydroxide 77% (1,000X) on 18 July.

2002년에는 전년도의 관행방제와 병원균은 검출되고 병발생되기 이전에 약제효과를 조사하기 위하여 월동잎 발병율이 무방제구가 3.96%, 관행방제에서 7.13%, 동제구에서 5.21%, 항생제구에서 4.00%, 혼합제구에서 4.38%인 포장을 선정하여 방제효과를 조사한 결과(표 2), 봄순잎에서는 관행 0.29%, 동제 0.38%, 항생제 0.04%, 혼합제 0.25%, 무방제구가 1.25%로서 모든 방제시험구에서 방제가가 69.6~96.8%로 나타났으며(표 18), 관행구, 동제구 및 혼합제구에 비하여 항생제살포구가 병발생이 적었다. 또한 여름순잎에서의 발병율은 관행에서 0.67%, 동제 0.46%, 항생제는 무발생, 혼합제 0.41%, 무방제구는 3.13%로서 방제가가 78.6~100%로 나타났으며, 6월 15일과 7월 18일에 약제살포한 관행보다는 5월 20일과 7월 30일에 동제, 혼합제 약제살포한 방제구에서 낮은 발병율을 보였고, 항생제를 살포한 경우에는 병발생이 없었다.

Table 18. Effect of chemicals on reduction of citrus canker at different developmental stages in 2002.

Treatment	Overwintered leaves (%) ^a	Spring leaf		Summer leaf	
		Diseased leaves (%)	Efficacy	Diseased leaves (%)	Efficacy
Traditional method	7.13	0.29	76.8	0.67	78.6
Copper	5.21	0.38	69.6	0.46	85.3
Antibiotic	4.00	0.04	96.8	0.00	100.0
Copper + antibiotic	4.38	0.25	80.0	0.41	86.9
No chemical treated	3.96	1.25	-	3.13	-

^a Investigated on overwintered leaves on 2 April (before chemical application), spring leaves on 16 July and summer leaves on 6 September.

V. 고 찰

감귤퀘양병은 제주도에서 재배되고 있는 온주밀감에 중도저항성이기 때문에(Stall, 1989; Hayword와 Waterson, 1964) 피해가 적지만 이병성 품종을 재배하는 많은 국가에서 자국의 감귤산업 보호를 위하여 검역병해충(quarantine pest)으로 지정되어(CABI와 EPPO, 1992; NAPPO, 1995) 기주식물 수입을 금지하고 유입을 경계하고 있다.

감귤수출을 위해서는 미국 등에서 경계하고 있는 감귤퀘양병이 없어야 되는데, 현재 대미수출단지에는 산발적으로 감귤퀘양병이 발생되고 있어, 병발생 현황을 파악하고 대책을 마련하는 것이 시급하다고 사료된다.

제주시 해안 등 6개 수출단지 279농가 704개 포장에 대해 2001년 온주밀감 봄순잎을 대상으로 조사하여 본 결과, 105농가(37.6%), 196포장(27.8%)에서 퀘양병이 발생되었다(표 3). 청수, 안성, 상예단지에서는 50% 이상의 농가, 40% 이상의 포장, 2.6%이상의 나무에서 병발생되고 있었는데, 이는 수출단지로 지정되었으나 1998년부터 2000년도까지 수출을 하지 아니하여(부표 2) 퀘양병방제를 하지 않았기 때문에 병발생이 높았던 것으로 생각된다. 그러나 해안, 상가, 의귀단지는 퀘양병발생이 1.2%이하로서 감귤을 수출하기 위하여 퀘양병방제가 이루어진 것으로 사료된다. 이러한 수출단지에서의 퀘양병발생은 Koh 등(1996)이 감귤퀘양병은 수출단지이외에서 제한적으로 경미하게 발생한다는 보고와 Kang(1999)이 해안단지 등 4개 수출단지에서 퀘양병이 발생되었고 상예와 안성단지는 병발생이 없었다고 보고한 것과는 차이가 있었다. 또한 Stall(1989), Hayword와 Waterson(1964)이 보고한 만다린(온주밀감)은 감귤퀘양병에 중도 저항성으로 보고한 것과 같이 퀘양병에 의한 품질 및 수량에 큰 영향을 주지 않기 때문에 수출단지 감귤재배농가가 퀘양병 방제에 대한 관심이 다른 병에 비해 적은 것에 기인된 것으로 사료된다. 그러나 대미감귤 수출증가를 위해서는 퀘양병 방제관리가 철저하게 이루어져야 될 것으로 사료된다.

온주밀감 생육단계별로 조사한 퀘양병발생은 봄순잎에서는 이병주율이 1.3~35.3%이고, 이병엽율은 <0.1~15.6%이었고, 여름순잎을 조사하였을 때 이병주율이 8.7~39.3%이며, 이병엽율은 0.6~23.1%로 병발생이 증가하였는데(표 4), 이는 김(1978)이 보고한 감귤퀘양병 발생은 8월하순에 가장 심하다는 보고와 일치하였으며, 또한 Kang(1999)이

9월에 여름순 이병엽율은 8.8~13.7%로 봄순에서 이병엽율 3.6~4.9%에 비하여 증가하였다는 보고와도 일치하였다. 또한 수출단지별로 조사한 궤양병발생은 상가, 상예단지에서 높은 이병엽율을 보였으나 의귀단지 등 4개단지에서는 병발생이 적었는데, 이는 조사년도 수출단지 시험 포장에 대하여 궤양병방제를 위한 농약살포(표 1) 때문에 나타난 결과라고 사료된다.

6개 수출단지에서 분리한 6개 균주는 Schaad 등(1980)과 Krieg와 Holt(1984)와 Meynell 등(1970)의 방법에 의해서 그람염색반응, King's B 배지배양, 세포형태 등 관찰 결과, *Xanthomonas*속의 특성과 일치하였으며(표 5), 또한 YDC 배지에서 세균 colony 성장, 산생성 검정 등 생화학적 특징은(표 6) Schaad(1988) 및 Krieg 등(1984)의 보고와 일치하여 *X. campestris* pv. *citri*로 동정되었는데, 이는 Vauterin 등(1995)에 의하여 *X. axonopodis* pv. *citri*로 분류한 것과 동일하였다. 그리고 분리한 병원균을 온주밀감 잎에 접종한 결과, 병원성이 인정되어(그림 6) 감귤궤양병균으로 동정되었다.

현재 미국으로 수출하는 감귤은 과실에 감귤궤양병균이 없다는 증명을 위하여 bacteriophage 검사를 하고 미국에 통보 후에 수출하게 된다. 이런 수출과정에서 bacteriophage 검사는 복잡하고 인력이 과다하게 소요되어 제한된 인력을 가지고 많은 물량을 검사하기에는 어려움이 있어, 보다 쉬운 방법인 ELISA법을 이용한 검사방법을 개발하였는데, 사용한 혈청은 감귤궤양병균 pathotype A, B, C의 죽은 균이나 살아있는 균 모두 3×10^5 cells/ml 이상의 농도에서 양성반응이 나타났다(표 7). ELISA는 세균의 밀도 또는 단백질량에 동일하게 반응하는 것으로써 세균의 상태에 따라 변하지 않는다는 보고같이 병원세균이 죽더라도 살아있는 세균과 똑같이 ELISA에 반응하는 것과 일치하였다(Seattler 등, 1989; Simbert와 Kieg, 1981). ELISA에 의한 감귤궤양병균 검출은 Civerolo와 Fan(1984)에 의해 보고되었으며 검출한계는 $10^5 \sim 10^6$ cfu/ml이하라고 하였는데, 본 실험에서 과실세척액의 궤양병균농도가 10^5 cfu/ml이하에서는 제한적이었다. 이병잎 세척액에서 감귤궤양병균 농도는 $10^4 \sim 10^6$ cfu/ml로 다양하다는 보고가 있으며(Stall등, 1980), 또한 Timmer 등(1991)은 병반의 코르크화(suberization) 때문에 오래된 병반에서는 분출되지 않는다고 하였다. 일반적으로 병징이 없는 감귤나무에서 궤양병균의 농도는 ELISA에 반응하지 않는 저농도로 존재하기 때문에, 저농도의 궤양병균을 증식시키기 위해 액체배양기(PSB)에서 배양한 후 ELISA 검정결과, 24시간 배양액에서는 ELISA에 음성이었으나 48시간 배양액에서는 양성을 보였다(표 8). 이는 액체배지에서 호기성세균의

증식은 형광성 Pseudomonads균과 같이 존재했을 때는 철분결핍에 의해서 초기에 생육이 저지 받는 것으로 보여지나(Bakker 등, 1990), 장시간 배양했을 경우에는 모든 농도에서 ELISA 반응점 이상으로 증식됨을 알 수 있었다. 또한 24시간 배양액에서는 형광성 Pseudomonads균의 증식이 우점화되는 것으로 사료되었다. 이 문제를 해결하기 위하여 1ℓ의 PSB에 Fe-EDTA를 첨가한 결과, 0.25g을 첨가한 구에서 병원균 증식이 가장 양호하였으며, 병원균 증식을 돕기 위하여 PDB를 25g 더 첨가하고(MPSB), 과실농축액을 24시간 배양하여 ELISA 검정하였더니 이병된 포장에서 채취한 이병과실 및 건전 과실에서는 양성반응을 보였으나 건전한 포장에서 채취한 과실에서는 음성반응을 보였다(표 9). 감귤퀘양병균은 호기성세균이며(Krieg와 Holt, 1984), 모든 호기성세균은 Fe 결합체인 ferrichrome이 hydrogen- 및 electron-carrier system의 구성물질로써 호흡에 영향을 준다고 하였다(Neidhardt 등, 1990; Guirad와 Smell, 1981). 기존배지(PSB)에 Fe-EDTA 및 PDB의 첨가는 형광성 Pseudomonads로부터 감귤퀘양병균의 철흡수 활성화를 증진시키고 철의 독소를 완화시켜주는 것으로 사료되었다.

새로 개발된 MPSB배지를 이용하여 병원균증식 후 ELISA법과 현재 대미 감귤수출 검사에 사용하고 있는 bacteriophage법을 비교하기 위하여 수출단지 과실을 채취하여 시험한 결과, ELISA법은 이병포장에서는 9개 포장 전부 양성이 나왔으며, 건전포장에서는 1개 포장에서 양성이 나왔고 8개 포장은 음성이 나왔다(표10). 그러나 bacteriophage법에서는 이병포장 가운데 4개 포장에서만 양성이 나왔고 5개 포장에서 음성이 나왔다. 또한 전지역의 건전포장에서는 음성이었다. ELISA법은 이병된 과실 모두에서 퀘양병균이 검출되어 bacteriophage법에 비하여 더 정확하게 검출할 수 있음을 알 수 있었다. 이번 비교 시험에서 ELISA법이 bacteriophage법에 비하여 검정효율면에서 30.7% 포인트 향상되었으며(표 11), 검사시간 단축효과도 있었다(부표 3).

월동잎과 새로운 잎에 대한 생육단계별로 ELISA법과 bacteriophage법에 의한 퀘양병 예찰조사에서 월동잎은 ELISA법에서는 무방제구에서 최초 5월 17일부터, 방제구에서는 5월 30일부터 병원균이 활동하고 있었으나(표 12), 새순 발아기에 약제 살포효과가 병원균 활동을 2주일 정도 지연시키고 있었으며, bacteriophage법에서는 무방제구, 방제구 모두가 병원균 검출이 없어 ELISA법이 bacteriophage법보다 병원균 검출에 있어서 보다 효과적임을 알 수 있었다. 새로 발생한 봄순잎에서는 무방제구에서 5월 30일부터 병원균검출이 시작되었으나(표 13), 새순 발아기에 약제처리를 하였을 경우에는

병원균활동이 1주일 지연되어 6월 7일에 검출이 시작되었으며, ELISA법이 bacteriophage법보다 1주일정도 빠르게 검출할 수 있었다. 비록 봄순잎이 발생하기 이전에 약제를 살포한 것이지만 봄순잎에 까지 병원균 활동에 영향을 준 것은 월동잎에서 병원균이 봄순잎으로 전이되는 것을 약제처리에 의하여 지연시켰던 것으로 사료된다. 봄순잎에 대해 약제살포는 병원균활동에는 영향이 없는 것으로 나타나고 있어 관행 약제처리시기가 너무 늦게 이루어지고 있음을 알 수 있었다. 여름순잎은 ELISA법과 bacteriophage법 모두에서 무방제구는 여름순 전개와 동시에 7월 27일부터 활동하고 있었으나(표 14), 봄순신장기와 여름순발아기에 약제 처리하였을 경우에는 1주일 늦게 병원균 검출이 시작되었으며, 가을순잎은 약제처리의 영향을 받지 않고 ELISA법과 bacteriophage법 모두에서 잎 전개시기인 9월 12일부터 병원균활동이 시작되고 있었다(표 15). 이는 관행 약제처리는 가을순잎 궤양병방제를 하지 않으므로 다음해 궤양병발생을 일으키는 전염원이 되는 것으로 사료된다. 또한 각 순잎 모두에서 궤양병이 없는 포장에서는 병원균 검출이 없는 것으로 보아 감귤궤양병균은 외부에서 전염되는 것보다는 포장 내부에서 전염되는 것으로 사료된다.

새로 발생한 잎에서 궤양병의 최초 발생(그림 8)은 봄순잎에서는 무방제구에서 6월 7일, 방제구에서 6월 15일로서 월동잎에서 병원균 검출일보다 무방제구에서는 20일, 방제구에서는 15일 후에 병이 발생되었고(표 16), 봄순잎에서의 병원균 검출일보다는 무방제구와 방제구 모두에서 1주일 후에 병이 발생되었다. 여름순잎에서는 병원균 검출과 병발생일이 무방제구는 7월 27일, 방제구는 8월 3일로 같았으나 방제에 의해 1주일 지연되고 있었다. 또한 가을순잎에서는 병원균 검출과 병발생일이 무방제구와 방제구 모두에서 9월 12일로서 가을순잎에는 약제처리에 의한 병원균검출 및 병발생 지연 효과가 없었는데, 이는 가을순잎 발생시기에는 약제살포가 없었기 때문인 것으로 사료된다. 본 시험에서의 궤양병 최초 발생은 김(1978)이 봄순잎에서 6월상순 부터 발병한다는 보고, 문 등(1994)과 문 등(1996)이 6월부터 발생하였다는 보고와 비슷한 경향을 보이고 있으나, 김 등(1996)이 보고한 궤양병의 최초발생시기가 7월 5일이라고 한 것과는 차이가 있었다. 또한 온주밀감 과실에서의 궤양병이 최초발생은 무방제구에서는 6월 21일, 방제구는 6월 28일로 봄순잎에서의 궤양병 활동시작 3주일 정도 후에 발생하는 것으로 사료되며, 이러한 과실에서 병발생 시기는 지금까지 보고한 김(1978), 문 등(1994)과 문 등(1996), 김 등(1996)이 7월부터 발생한다는 것과는 약 1개월 정도 빠르게

발생되고 있었는데 이는 조사기간 동안의 기후와 조사방법 등이 차이에 의한 것으로 사료된다.

2001년도에 관행방제를 하였을 때에는 이병엽율이 봄순잎에서 3.1%, 여름순잎에서 17.3%, 가을순잎에서 2.5%로 무방제구의 봄순잎 8.8%, 여름순잎 78.7%, 가을순잎 18.0%에 비하여 병발생을 줄일 수 있었으며(표 17), 이는 Kang(1999)이 보고한 약제방제 할 경우에 봄순잎에서 1.5~3.8%, 여름순잎에서 6.3~7.4%이고, 무방제는 봄순잎에서 3.6~6.3%, 여름순잎에서 8.8~13.7%로서 약제방제시 무방제에 비하여 발병율이 낮았다고 보고한 것과 같은 경향을 보였다. 또한 Lee(1920)와 川上(1921) 등도 약제로 감귤퀘양병 방제가 가능하다고 하였으며, 卜藏과 金野(1938)는 감귤의 생장과 관련하여 순발생에 따라 년 3~4회 약제 방제하는 것이 효과가 있다고 보고하였으나 관행 방제로는 완전 방제가 어려울 것으로 사료된다.

2002년에는 전년도의 관행방제외에 새순발아기에는 모두 bordeaux mixture(5-5식)을 살포하였고, 봄순잎과 여름순잎은 병원균 검출 예찰시기에 각각 동제, 항생제, 혼합제를 살포한 약제효과 조사에서 월동잎 발병율이 무방제구가 3.96%, 관행방제에서 7.13%, 동제구에서 5.21%, 항생제구에서 4.00%, 혼합제구에서 4.38%인 것이 봄순잎에서는 관행 0.29%, 동제 0.38%, 항생제 0.04%, 혼합제 0.25%, 무방제구가 1.25%로서 모든 방제 시험구에서 약제효과가 인정되었으며(표 18), 관행, 동제, 혼합제 약제를 살포한 방제구는 비슷한 발병율을 보였으나, 동제와 혼합제 살포시기에 항생제를 살포한 것은 발병율이 훨씬 낮았다. 그리고 여름순잎 발병율은 관행에서 0.67%, 동제 0.46%, 항생제는 0.00%, 혼합제 0.41%, 무방제구는 3.13%로서 봄순잎에서와 동일하게 모든 방제시험구에서 약제효과가 인정되었으며, 관행보다는 동제, 혼합제 살포한 경우에 낮은 발병율을 보였고, 항생제를 살포한 경우에는 병발생이 없었는데, 이는 퀘양병원균이 검출된 예찰시기에 병발생전 약제살포가 효과를 나타낸 것으로 사료되며, 또한 지금까지는 미국에서 금지된 항생제 잔류가 염려되어 동제로 퀘양병방제가 수행되어 왔으나, 본 실험에서 보는 바와 같이 항생제살포에 의한 병방제 효과가 96.8~100%로서 수출단지 퀘양병 관리가 가능할 것으로 사료되고, 또한 Koh 등(2001)의 보고와 같이 항생제를 기준 사용량 2배로 살포한 후 15일이 지나면 불검출되므로 병원균 예찰시기에 예방위주의 감귤퀘양병 방제약제로 사용할 수 있을 것으로 사료된다. 그러나 김 등(2000)은 제주도 감귤재배지에 streptomycin 내성균이 존재한다는 보고가 있어 앞으로 약제내성균 등을 고려한 퀘양병방제 시험연구가 수행되어야 한다고 사료된다.

VI. 적 요

Xanthomonas axonopodis pv. *citri*에 의해 병을 일으키는 감귤퀘양병은 이병성품종을 재배하고 있는 서양에서 피해가 크기 때문에 감귤무역에 있어서 중요시하는 병이다. 본 연구는 대미수출 감귤재배지역에서 감귤퀘양병의 발생정도와 그 지역에 분포하는 병원균을 분리 동정하고, 온주밀감 잎과 열매에서 병원균을 검출할 수 있는 방법을 개발하고, 병발생 예찰 및 약제 방제법을 연구하였다.

1. 감귤퀘양병 발생정도를 6개 수출단지 279농가 704포장에 대하여 2001년 봄순잎에서 조사한 결과, 105농가의 196포장에서 퀘양병이 발생되고 있었고, 각 수출단지의 이병주율은 해안 0.7%, 상예 2.6%, 청수 5.6%, 상가 1.2%, 안성 5.4% 그리고 의귀 0.2%이었다. 또한 각 수출단지의 3개 포장에 대한 온주밀감 생육단계별 퀘양병 발생은 봄순잎에서는 이병주율이 1.3~35.3%이고 이병엽율은 <0.1~15.6%이었고, 여름순잎에서는 이병주율 8.7~39.3%이며 이병엽율은 0.6~23.1%이고, 가을순잎에서는 이병주율 3.4~36.3%이고 이병엽율은 <0.1~11.5%이었다.

2. 수출단지에서 분리한 병원균은 모든 균이 그람음성이고 NBY배지에서 황색 색소를 형성하고, KB배지에서 형광색소를 형성하지 않으며, 혐기적 성장을 하지 않고, 간형이고 한쪽 끝에 1개의 편모가 있고, 내생포자를 형성하지 않은 *Xanthomonas*속이었으며, 병원균의 종은 YDC 배지에서 mucoid 성장을 하며, 35℃에서 성장을 하고 asculin 가수분해를 하고 gelatin을 액화시키지 않고 glucose에서 산을 생성하나, arabinose, mannose에서는 산생성이 안되었다. 그리고 온주밀감에 병원성을 가지는 *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*로 동정되었다.

3. 감귤퀘양병균 검출에 이용한 ELISA 검정은 pathotype A, B, C 모두에서 병원균이 살아있거나 죽어있거나 3×10^5 cell/ml 이상의 농도에서 양성반응을 보였으며, 3×10^5 cell/ml 이하 농도의 병원균을 PSB 배지에 24시간 배양했을 때는 ELISA 음성이었으나, 48시간 배양했을 때는 모든 농도에서 양성이었다. PSB 배지에 0.25g의

Fe-EDTA를 첨가하였을 때 0.1, 0.5, 1.0 g 을 첨가한 것보다 24시간 배양 시 병원균 배양이 양호하였으며, 또한 PDB 25g를 첨가하여 실증실험을 한 결과, 이병포장에서 수집한 이병과실이나 이병되지 않은 과실세척액은 24시간 배양액에서 ELISA 양성이었다, 무병포장에서 채집한 과실세척액을 24시간 배양액에서 ELISA 음성이었다.

4. 이병포장에서 수집된 과실시료에서 ELISA법 검정결과 100% 양성이었으나 bacteriophage법은 44% 양성이었고, 무병포장의 과실시료에서는 ELISA법에서는 11%에서 양성이었으나, bacteriophage법에서는 100% 음성이었다. 이는 ELISA법을 이용한 검사가 bacteriophage법을 이용한 검사보다 30.7% 검사효율이 높은 것이며 검사 과정이 간편하고 시간이 절약되어 감귤퀘양병균 검사 및 병예찰에 적합하였다.

5. 감귤퀘양병 발생하기 전에 병원균의 활동정도 조사에서 ELISA법은 월동잎의 무방제구에서는 5월 17일, 방제구에서는 5월 30일에 병원균 검출이 되었으나, bacteriophage법은 월동잎에서 병원균 검출이 없었다. 봄순잎에서 ELISA법은 무방제구에서 5월 30일, 방제구에서는 6월 7일에 병원균이 검출되었으나, bacteriophage법은 무방제구에서 6월 7일, 방제구에서 6월 15일에 병원균이 검출되어 ELISA법보다 1주일 늦었다. 또한 여름순잎에서는 ELISA법과 bacteriophage법 모두가 무방제구에서는 7월 27일, 방제구에서는 8월 3일에 검출되었고 가을순잎에서는 ELISA법과 bacteriophage법이 방제구, 무방제구에서 모두 9월 12일에 검출되었다.

6. 감귤퀘양병은 봄순잎에서 무방제구는 6월 7일, 방제구에서는 6월 15일에 최초 발생되어 월동잎에서 병원균 검출일보다 방제구에서는 15일, 무방제구에서 20일 후에 발생되었고, 봄순잎에서는 방제구 무방제구 모두에서 1주일 늦게 발병되었다. 여름순잎과 가을순잎에서는 병원균 검출일과 병발생일이 동일하였다. 그러나 여름순잎에서 방제구의 병 발생과 병원균 검출일은 무방제구에 비하여 1주일 늦었다.

7. 2001년도에 관행방제에 의한 약제방제 효과는 약제처리구의 발병율이 봄순잎 3.1%, 여름순잎이 17.3%, 가을순잎이 2.5%의 이병엽율을 보여 무방제구 봄순잎 8.8%, 여름순잎 78.7%, 가을순잎 18.0%의 이병엽율보다 낮아 방제가가 봄순잎 64.7%, 여름순잎 78.5 % 가을순잎이 86.1%이었다.

8. 2002년도에 관행방제와 약제 및 살포시기를 달리한 시험에서의 방제효과는 봄순잎에서는 관행구 0.29%, 동제구 0.38%, 항생제구 0.04%, 혼합제구 0.25%로서 무방제구 1.25%의 이병엽율보다 효과가 69.6~96.8%이었고, 여름순잎에서는 관행구 0.67%, 동제구 0.46%, 항생제구 0.00%, 혼합제구 0.41%로서 무방제구 3.13%의 이병엽율에 비하여 낮았으며 방제가는 78.6~100%이었다. 항생제 처리구는 방제가가 봄순잎에서 96.8%, 여름순잎에서 100%으로 가장 효과가 좋았다.



인용문헌

- Alvarez, A. M., A. A. Benedict, C. Y. Mizumoto, L. W. Pollard, and E. L. Civrolo. 1991. Analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* and *X. a.* pv. *citromello* with monoclonal antibodies. *Phytopathology* 81 : 857~865.
- Annette, E., H. A. Bazows, W. J. Hausler, and H. J. Shadomy. 1985. Manual of clinical microbiology. Am. Soc. Microbiol. Washington, D. C. 4th ed.
- APHIS, PPQ. 2001. Surveillance and emergency program planning and coordination. USDA.
- Bakker, P. A. H. M., P. van Bob and B. Schippers. 1990. Specificity of siderophores and siderophore receptors and biocontrol by *Pseudomonas* spp. pp. 131~142 In: Biological Control of Soil-borne Plant Pathogens. ed. by D. Hornby CAB International.
- Berger, E. W., H. E. Stervens and F. Silver. 1914. Citrus canker II. Fla. Agric. Exp. Stn. Bull. 124. 53 pp.
- Bergey, D. H., F. C. Harrison, R. S. Breed, B. W. Hammer and F. M. Muntoon. 1923. Bergey's manual of determinative bacteriology. 1st ed. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Bittancourt, A. A. 1957. O cancro citrico. *O Biologico* 23 : 101~111.
- 卜藏梅之丞. 1936. 柑橘潰瘍病防除上注意すべき事項. *病虫雜* 23 : 431~435.

北島博. 1965. 칸킥트카이요우병에對する抗生物質劑の效果に關する 連絡試驗成績. 日植防協會 pp. 1~23.

CABI and EPPO. 1992. Data sheets on quarantine pest *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. In Quarantine pest for Europe pp. 801~807.

Carrera, C. 1933. Informe preliminar sobre una enfermedad nueva comprobada en los citrus de Bella Vista(Corrientes). Bol. Mens. Min. Agric. Nac. Buenos Aires 34 : 275~280.

川上孝一郎. 1921a. 柑橘潰瘍病. 植物病理論文集 pp. 1~114.

川上孝一郎. 1921b. 柑橘潰瘍病原細菌に對する藥劑の殺菌作用. 植物病理論文集 pp. 115~155.

조용섭, 박창석, 이순구, 이영근, 임춘근, 차재순, 최용철, 최재을, 허성기, 황인규. 1999. 식물세균병학. 서울대학교 출판부 455 pp.

Civerolo, E. L. 1984. Bacterial canker disease of citrus. J. Rio. Grande Valley Horticultural Society. 37 : 127~146.

Civerolo, E. L. and F. Fan. 1982. *Xanthomonas campestris* pv. *citri* detection and identification by enzyme linked immunosorbent assay. Plant Dis. 66 : 231~236.

Commonwealth of Australia. 1984. Citrus canker *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. Plant Quarantine Leaflet No. 12. Commonwealth Dep. of Health, Australia.

Coons, G. M. and J. E. Kotila. 1925. The transmissible lytic principle (bacteriophage) in relation to plant pathogens. Phytopathology 15 : 357~376.

- Cowan, S. T. 1974. Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria. 2nd ed. Cambridge Press, London.
- Curry, D. W. 1989, Eradication of citrus canker from Thursday Island. Queensland Agric. J. 115 : 78~79.
- Dowson, W. J. 1939. On the systematic position and generic names of the gram negative bacterial plant pathogens. Zentrabl. Bacteriol. Parasitenk infektionskr. Hyg. Abt. II 100 : 177~193.
- Dye, D. W. 1968. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. I. The "Amylovora" group. N.Z. J. Sci. 11 : 590~607.
- Dye, D. W. 1969. Eradicating citrus canker from New Zealand. N.Z. J. Agric. Res. 11 : 20~21.
- Dye, D. W. 1978. Genus IX *Xanthomonas* Dowson 1939. In. J. M. Young., D. W. Dye, J. F. Bradbury, C. G. Panagopoulos and C. F. Robbs. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. N.Z. J. Agric. Res. 21 : 153~177.
- Ercolani, G. L. 1968. Effettivita e misura della trasmissione di *Xanthomonas vesicatoria* e di *Corynebacterium michiganense* attraverso il seme del pomodoro. Industria Conserve 43 : 15~22.
- Fawcett, H. S. 1936. Citrus diseases and their control. Mc Graw-Hill Book Co., New York. 656 pp.

Fawcett, M. S. and H. E. Jenkins. 1933. Records of citrus canker from herbarium specimens of genus citrus in England and the United States. *Phytopathology* 23 : 820~824.

FDA. 2000. Pesticide analytical manual Vol. II-VII.

Gitaitis, R. D., R. W. Beaver and B. N. Dhanvantari. 1989. Detection of *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* in tomato transplants. In: Saettler et al.. Detection of bacteria in seed and other planting material. (eds) APS press. St. Paul, Minnesota.

Gerhardt, P., R. G. E. Murray., R. N. Costilow., E. W. Nester, W. A. Wood, N. R. Krieg and G. B. Phillips. 1981. Manual of methods for general bacteriology. Am. Soc. Microbiol. Washington.

Goto, M. 1965. Phage-typing of the causal bacteria of bacterial leaf blight (*Xanthomonas oryzae*) and bacterial leaf streak (*X. translucence* f. sp. *oryzae*) of rice. *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.* 30 : 253~257.

Goto, M., K. Ohata and N. Okabe. 1975. Studies on saprophytic survival of *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson. 2. Longevity and survival density of the bacterium on artificially infested weeds, plant residues and soils. *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.* 41 : 141~147.

Goto, M. and M. P. Starr. 1972a. Phage-host relationships of *Xanthomonas citri* compared with those of other *Xanthomonas*. *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.* 38 : 226~248.



Goto, M. and M. P. Starr. 1972b. Lysogenization of *Xanthomonas phaseoli* and *Xanthomonas begoniae* by temperate *X. citri* bacteriophage : Effect on virulence, phage sensitivity, and other bacteriological properties Ann. Phytopath. Soc. Jpn. 38 : 267~274.

Guirad, B. M. and E. E. Smell. 1981. Biochemical factors in growth. In: manual of methods for general bacteriology. ed by P. Gerhardt, R. G. E. Murray, R. N. Costilow, E. W. Nester, W. A. Wood, N. R. Krieg, G. B. Phillips. pp. 79-111. Am. Soc. Microbiol. Washington, DC. 524 pp.

Guthrie, J. W., D. M. Huber and H. S. Fenwick. 1965. Serological detection of halo blight. Plant Dis. Rep. 49 : 297~299.

行方敬郎, 小泉銘冊. 1966. カンキツかいよう病菌のストレプトマイシン耐性菌. 日植兵報 32 : 316.



한해룡, 권오균. 1974. 감귤재배신서. 선진문화사 613 pp.

한국식물보호학회 편집위, 식물방역원. 1963. 1963년도 주요 병해충 발생 및 방제상황. 한국식물보호학회지 2 : 1~3.

한국식물병리학회. 1998. 한국식물병명목록 pp.201~203.

Hartung, J. S. 1992. Plasmid based hybridization probes for detection and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. Plant Dis. 76 : 889~893.

Hasse, C. H. 1915. *Pseudomonas citri*, the cause of citrus canker. J. Agric. Res. 4 : 97~100.

Hayward, A. C. and J. M. Waterson. 1964. C.M.I. Description of pathogenic fungi and bacteria No.11. *Xanthomonas citri*. CAB. Ferry lane, Kew, Surrey, England.

Holland, D. F. 1920. V. Generic index of the commoner forms of bacteria. In: The families and genera of the bacteria, C. E. A. Winslow, J. Broadhurst, R. E. Buchanan, C. Krumwiede, Jr., L. A. Rogers and G. H. Smith, J. Bacteriol. 5 : 191~229.

Hopper, B. E. 1995. NAPPO compendium of phytosanitary terms.(국립식물검역소 번역. 1995. 북미식물보호기구의 식물위생용어해설집).

後藤正夫. 1962. 칸킥트潰瘍病 1. 靜大農研報 12 : 3~72.

後藤正夫. 1972. 칸킥트かいよう病菌フェージ型間の相互作用と病斑内消長. 日植病報 39 : 178.



後藤正夫, 豊島明彦, 田中俊一. 1978. 칸킥트かいよう病菌 *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson の腐生的生存 3. 腐生的生存菌の感染菌量. 日植病報 44 : 197~201.

Hugh, R., and E. Leifson. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram-bacteria. J. Bacteriol. 66 : 24~26.

제주도. 2001. 제주통계연보 pp.122~125.

Kang, I. B. 1999. Epidemiological studies of citrus canker on designated mandarin groves for fruit export to USA in Korea. MS Thesis, Cheju National University 50 pp.

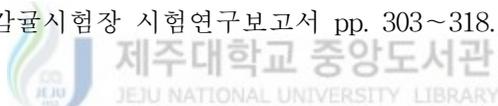
김창원. 1978. 감귤병해 방제에 관한 시험. 1977년도 농진청 제주시시험장 시험연구보고서 pp. 240~255.

김창원. 1979. 감귤 주요병해 발생소장조사. 1978년도 농진청 제주시시험장 시험연구보고서 pp. 125~147.

김대현, 권혁모, 김동환, 이성찬, 김광식. 1996. 감귤퀘양병의 발생생태 및 조기진단연구 1995년도 농진청 원예연구소 시험연구보고서 pp. 980~983.

김인학, 문재현. 1967. 감귤퀘양병 방제시험. 1966년도 제주도농촌진흥원 시험연구보고서 pp. 223~230.

김광식, 이성찬, 현재욱. 2000. 감귤퀘양병의 발생생태 및 방제법 구명. 1999년도 제주 농업시험장 제주감귤시험장 시험연구보고서 pp. 303~318.



King, E. O., M. K. Ward, and D. E. Raney. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. J. Lab. Clin. Med. 44 : 301~307.

Koh, S. H. S. M. Oh, I. C. Kwak, C. H. Lee and I. B. Kang. 2001. Determination of residual streptomycin using microbial assay in citrus. Report of Jeju Provincial Institute of Public Health and Environmental Research 12 : 49-59.

Koh, Y. J, J. H. Song, H. M. Kwon, D. Y. Moon, D. K. Moon and H. R. Han. 1996. Current status of the occurrence of major diseases of satsuma mandarins in Korea. Korean J. Plant Pathol. 12(4) : 466~470.

金野敬三. 1938. 早生温州蜜柑潰瘍病豫防の效果. 病虫雜 25 : 375~377.

芹澤拙夫, 井上一男. 1974. 칸킥츠카이요우병 3. 感染に及ぼす風の影響. 静岡柑試研報 11 : 54~67.

Krieg, N. R. and J. G. Holt. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology Vol. 1. Williams and Wilkins, Baltimore/London 964 pp.

국립식물검역소. 1999. 한국산 감귤 생과실의 대미수출 검역요건. 식물검역규정집 pp.300~314.

Lee, H. A. 1920. Action of some fungicides on the citrus canker organism. Phill. J. Sci. 17(4) : 325~341.

Lee, H. A. 1921. The increase in resistance to citrus canker with the advance in maturity of citrus leaves. Phytopathology 11 : 70~73.

이성찬, 송장훈, 김대현, 권혁모. 1997. 감귤퀘양병의 발생 생태 및 조기진단 연구. 1996년도 농진청 원예연구소 제주감귤연구소 시험연구보고서 pp. 1250~1254.

Loucks, K. W. 1934. Citrus canker and its eradication in Florida. Fla. State Dept. Agric. Consum. Serv. Gainesville, Fl.

Matsumoto, T. and N. Okabe. 1937. Agric. and Hort. Jpn. 12 : 2055~2059.

Meynell, G. G. and E. Meynell. 1970. Theory and practice in experimental bacteriology 2nd ed. Cambridge University Press. London.

문덕영, 권혁모, 김광식, 윤상태, 권오균. 1994. 수출감귤의 문제병해충 방제를 위한 생태 연구. 농진청 과수연구소 제주감귤연구소 85 pp.

문덕영, 권혁모, 김광식, 권오균. 1996. 수출감귤의 문제병해충 방제를 위한 생태연구. 농진청 원예연구소 제주감귤연구소 65 pp.

Myung, I. S. 1997. Classification of *Xanthomonas axonpodis* causing bacterial canker of citrus and development of detection method for *X. a.* pv. *citri* using polymerase chain reaction. 서울대학교 박사학위논문.

명인식, 이영희, 조용섭. 1995a. 감귤퀘양병균(*Xanthomonas campestris* pv. *citri*) bacteriophage(CPK-P5)의 배양적 특성. 한국식물병리학회지 11 : 191(요지).

명인식, 이영희, 조용섭, 이은종. 1995b. 국내 감귤퀘양병균(*Xanthomonas campestris* pv. *citri*) 의 phagetype 조사. 한국식물병리학회지 11 : 190~191(요지).

Namekata, T. and A. R. de Oliveira. 1972. Comparative serological studies between *Xanthomonas citri* and a bacterium causing canker on Mexican lime. pp.151-52. Proc. Int. Conf. Plant Pathog. Bact., 3rd. Wageningen, The Netherlands.

Neidhardt, F. C., J. L. Ingraham and M. Schaechter. 1990. Physiology of the bacterial cell: A molecular approach. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts, USA. 506 pp.

농림부. 2001. 농림통계연보 pp. 116~117.

농약공업협회. 1999. 농약사용지침서 pp. 37~192.

Obata, T. 1974. Distribution of *Xanthomonas citri* strain in relation to the sensitivity to phage CP₁ and CP₂. Ann. Phytopath. Soc. Jpn. 40 : 6~13.

박종성 등. 1996. 신고 식물병리학. 향문사, 서울 pp.203~204.

Permer, T. A. and T. R. Gottwald, 1989. Specific recognition of a *Xanthomonas campestris*. Florida citrus nursery strain by a monoclonal antibody probe in a microfiltration enzyme immunoassay. *Phytopathology* 79 : 780~783.

Rodriguez G. S., J. G. Garza-lopez, J. J. Stapleton and E. L. Civerolo. 1985. Citrus bacteriosis in Mexico. *Plant Dis.* 69 : 808~810.

Saettler, A. W. 1989. The need for detection assay. In: *Detection of bacteria in seed and other planting material.* (eds). Saettler et al. APS press. St. Paul, Minnesota.

Saettler, A. W., N. W. Schaad and D. A. Roth. 1989. *Detection of bacteria in seed and other planting material.* APS press. St. Paul, Minnesota, USA. 122 pp.

山本滋. 1959. 柑橘潰瘍病に對する抗生物質の防除効果. 九州農業研究 21 : 120~121.

Schaad, N. W. 1988. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria.* pp. 61~62.

Schaad, N. W. and R. C. Donaldson. 1980. Comparison of two methods for detection of *Xanthomonas campestris* in infected crucifer seeds. *Seed Sci. Technol.* 8 : 383~392.

Schaad, N. W. and R. L. Forster. 1985. A semiselective agar medium for isolation *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* from wheat seeds. *Phytopathology* 75 : 260~263.

Schaad, N. W., W. R. Sitterly and H. Hymaydan. 1980. Relationship of incidence of seedborne *Xanthomonas campestris* to black rot of crucifers. *Plant Dis.* 64 : 91~92.

Schaad, N. W., H. Azad, R. C. Peet and N. J. Panopoulos. 1986. Cloned phaseolotoxin gene as a hybridization probe for identification of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Phytopathology* (Abstr.) 76 : 846.

Schoulties, C. L., E. L. Civerolo, J. W. Miller, R. E. Stall and C. J. Krass. 1987. Citrus canker in Florida. *Plant Dis.* 71 : 388~395.

Simbert, R. M. and Krieg. N. R. 1981. General characterization. In: *Manual of methods for general bacteriology*. ed. by P. Gerhardt, R. G. E. Murray, R. N. Costilow, E. W. Nester, W. A. Wood, N. R. Krieg, G. B. Phillips. pp 409-443. Am. Soc. Microbiol. Washington, DC. 524 pp.

松本英紀, 大森尚典, 右井卓男. 1976. カンキツかいよう病菌のストレプトマイシン耐性菌の検定方法とは場における分布. *日植病報* 42 : 79~80.



小泉銘冊, 山田峻一. 1972. カンキツかいよう病菌の薬劑耐性. *園試報* B12 : 245~256.

Stall, R. E. 1989. Canker. *Compendium of citrus disease*. pp. 6-7. APS press St. Paul. Minnesota.

Stall, R. E. and E. L. Civerolo. 1991. Research relating to the recent outbreak of citrus canker in Florida. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29 : 399~420.

Stall, R. E. and C. P. Seymour. 1983. Canker, a treated to citrus in the gulfcost states. *Plant Dis.* 67 : 581~583.

Stall, R. E., J. W. Miller, G. M. Marco and B. I. Canteros de Echenique. 1980. Population dynamics of *Xanthomonas citri* causing canker of citrus in Argentina. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 93 : 10~14.

Stevens, H. E. 1914a. Citrus canker 1. Fla. Agric. Exp. Stn. Bull. 122.

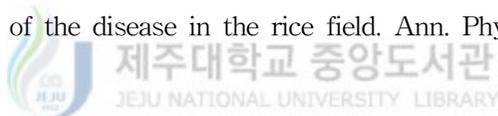
Stevens, H. E. 1914b. Citrus canker 2. Fla. Agric. Exp. Stn. Bull. 124.

Stevens, H. E. 1915. Citrus canker 3. Fla. Agric. Exp. Stn. Bull. 128.

Sutton, M. D. and H. Katznelson. 1953. Isolation of bacteriophage for the detection and identification of some seed-borne pathogenic bacteria. Can. J. Bot. 31 : 201~205.

太田孝彦. 1980. 病原細菌等のカンキツ葉への接種直後における細菌濃度の底下. 日植病報 47 : 109.

Tagami, Y. 1959. Quantity of bacteriophage in the water of the seedbed in relation to the occurrence of the disease in the rice field. Ann. Phytopath. Soc. Jpn. 24 : 6.



Timmer, L. W., T. R. Gottwald and S. E. Zitko. 1991. Bacterial exudation from lesions of asiatic citrus canker and citrus bacterial spot. Plant Dis. 75 : 192~195.

Uppal, B. N. 1933. Ann. Report. Dept. Agric. Bombay Presidency for the year 1931~1932 : 225-230. Rev. Appl. Mycol. 12 : 551.

Van Vuurde, J. W. L., G. W. van den Bovenkamp and Y. Birnbaum. 1983. Immunofluorescence microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay as potential routine tests for the detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in bean seed. Seed Sci. Technol. 11 : 547~559.

Vauterin, L., B. Hoste, K. Kersters and J. Swings. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. Int. J. Sys. Bact. 45 : 472~489.

- Vidaver, A. K. 1976. Prospects for control of phytopathogenic bacteria by bacteriophages and bacteriocins. *Annu. Rev. Phytopathol.* 14 : 451~465.
- Wakimoto, S. 1960. An antibacterial serum method for the purification of phages which attack phytopathogenic bacteria. *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.* 25 : 205~208.
- Wakimoto, S. 1967. Some characteristics of citrus canker bacteria, *Xanthomonas citri*(Hasse) Dowson, and the related phages isolated from Japan *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.* 33 : 301~310.
- Wilson, E. E., F. M. Zeitoun, and D. L. Fredrickson. 1967. Bacterial phloem canker, a new disease of persian walnut trees. *Phytopathology* 57 : 618~621.
- Wu, W. C. 1972a. Phage-induced alteration of colony type in *Xanthomonas citri*. *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.* 38 : 146~155.
- Wu, W. C. 1972b. Phage-induced alteration of cell disposition, phage adsoption and sensitivity and virulence in *Xanthomonas citri*. *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.* 38 : 333~341.

Appendix 1. Lists of citrus cultivating areas for export to USA in Jeju

Area	Address	Area (ha)	No. of farmers	No. of fields	Total production (M/T)	No. of trees (thou.)	Investment(mil -lion won)	Desig -nated year
Haean	Jeju-shi	24.6	38	107	544	26	2,689	1996
Sangyaе	Sogwipo-shi	28.4	54	95	866	35	1,640	1996
Chongsu	Bukjeju-gun	31.2	22	112	838	27	2,102	1996
Sangga	Bukjeju-gun	49.1	63	165	1,287	53	1,305	1997
Ansung	Namjeju-gun	37.4	49	105	838	37	1,675	1996
Uigwi	Namjeju-gun	54.4	53	120	938	75	2,313	1995
Total		225.1	279	704	5,311	253	11,724	

Appendix 2. Amount of citrus fruits exported to USA from 1995 to 2001

Area	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001
Haean	-	111.3 ^a	200.3	-	-	97.2	291.4
Sangyaе	-	14.4	140.4	-	-	-	-
Chongsu	-	27.5	109.2	-	-	-	86.4
Sangga	-	-	218.5	31.2	376.2	97.2	488.3
Ansung	-	39.5	297.6	-	-	-	155.5
Uigwi	85.6	21.8	218.4	-	-	38.9	412.6
Total	85.6	214.5	1184.4	31.2	376.2	233.3	1434.2

^a Unit; M/T.

Appendix 3. Comparison of time consumptions of laboratory work between ELISA and BPT test

No. of sample test	Type of work	ELISA(A)	BPT(B)	Effect(B-A)
18	Rinse of fruit	2 man×4h=8h	2 man×4h=8h	
	Centrifuge	2 man×6h=12h	2 man×24h=48h	
	Culture	1 man×24h=24h	1 man×12h=12h	
	Test	1 man×8h=8h	2 man×12h=24h	
	Total	52h	92h	▽40h
	Index	56.5	100	▽43.5

Appendix 4. Gelatin 액화 검정용 배지(Cowan, 1974)

Beef extract	 제주대학교 중앙도서관 JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY	<u>g/ℓ</u>
Peptone		3.0
		5.0
Gelatin		120.0

Appendix 5. King's B medium(KB)(King 등, 1954)

	<u>per/ℓ</u>
Protose peptone #3	20.0g
K ₂ HPO ₄	1.5g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.5g
Agar	15.0g
Glycerol	15.0ml

Appendix 6. Medium C of Dye(Dye, 1968)

	<u>g/l</u>
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.5g
K ₂ HPO ₄	0.5g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2g
NaCl	5.0g
Yeast extract	1.0g
Agar	12.0g
Bromcresol purple of 1.5% alcohol solution	0.7ml

pH 6.8로 조정하고 탄수화물은 별도 살균하여 0.5%(v/v) 첨가

Appendix 7. Nutrient agar(NA)

	<u>g/l</u>
Beef extract	3.0
Bact peptone	5.0
Glucose	2.5
Agar	15.0



Appendix 8. Nutrient-broth yeast extract agar(NBY)

	<u>g/l</u>
Nutrient broth	8.0
Yeast extract	2.0
K ₂ HPO ₄	2.0
KH ₂ PO ₄	0.5
Glucose	2.5
Agar	15.0

pH 7.2로 조정하여 살균 후 1M MgSO₄ · 7H₂O의 살균액을 1.0ml 더한다.

Appendix 9. Pepton sucrose agar(PSA)

	<u>g/ℓ</u>
Bacto peptone	10.0
Sucrose	10.0
Na-glutamate	1.0
Agar	10.0

PSB(pepton sucrose broth)배지는 agar를 제외함.

Appendix 10. Wakimoto potato semi-synthetic agar(WPSA)

	<u>g/ℓ</u>
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	2.0
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	0.5
Bacto peptone	5.0
Sugar	20.0
Bacto agar	15.0



감자 300g/ℓ을 끓여 거즈로 여과한 액에 상기 재료를 넣어 조제한 배지를 NaOH로 pH 6.5로 조정하여 고압살균기에서 121℃/20분간 살균한 후 사용하였다. 그리고 wakimoto potato semi-synthetic broth(WPSB)는 bacto agar를 넣지 않고 사용하였다. 또한 wakimoto potato semi-synthetic agar(WPSSA)는 bacto agar 7.5g 넣고 조제하여 48~50℃ water bath에 정치하여 굳는 것을 방지하여 사용하였다.

Appendix 11. Yeast extract-dextrose-CaCO₃(YDC)(Wilson 등, 1967)

	<u>g/ℓ</u>
Yeast extract	10.0
Dextrose	20.0
Calcium carbonate USP light powder	20.0
Agar	15.0

Appendix 12. Yeast salt 액체 배지

	<u>g/l</u>
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.5
K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2
NaCl	5.0
Yeast extract	5.0

Appendix 13. 혐기적 성장 시험용 배지(Hugh와 Leifson, 1953)

	<u>per/l</u>
Peptone	2.0g
NaCl	5.0g
KH ₂ PO ₄	0.3g
Agar	3.0g
Bromthymol blue(1%)	3.0ml



Appendix 14. Hucker's ammonium oxidate crystal violet

Solution A

Crystal violet	2.0g
Ethyl alcohol(95%)	20.0ml

Solution B

Ammonium oxalate	0.8g
Distilled water	80.0ml

사용 24시간 전에 두 용액을 섞어라. 흡습지에 거른 다음 저장병에 보관하라.

Appendix 15. Gram's modification of Lugol's solution

Iodine	1.0g
Potassium iodide	2.0g
Distilled water	300.0ml

Appendix 16. Decolorizers(탈색제)

Ethyl alcohol(95%) : slowest agent

Acetone : fastest agent

Acetone-alcohol : intermediate [ethyl alcohol(95%), 100ml; acetone, 100ml]

Appendix 17. Counter stain

Stock solution

Safranin O 2.5g

Ethyl alcohol(95%) 100.0ml

Working solution

Stock solution 10.0ml

Distilled water 90.0ml



감사의 글

오늘의 영광스러운 학위를 받게된 것은 곁에서 저를 지켜봐 주시고 격려와 용기를 북돋워 주신 수많은 분들이 도움이며, 그 분들께 고마움을 드리고 기쁨을 함께 나누고 싶습니다.

먼저 학위과정에서부터 지도교수를 맡아주시고 마지막 논문교정에 이르기까지 자상한 지도를 아끼지 않으신 강영길 교수님께 마음속 깊이 감사를 드립니다. 그리고 그간 끊임없는 학업지도는 물론 논문을 심사하여 주신 조남기, 송창길, 전용철 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 또한 학업을 마치도록 격려해주신 박양문, 권오균, 오현도 전교수님과 김한림, 고영우 교수님께도 감사를 드리며, 그동안 많은 성원을 해주신 고동완, 고지병 조교님과 제주대학교 농학과 대학원생 여러분께도 고마운 말씀을 전합니다.

이번 논문연구를 함에 있어서 많은 지도와 격려와 전문가정신을 가르쳐 주시고 심사에 이르기까지 온갖 정성을 쏟아주신 진경식 박사님께 마음속 깊이 고마움을 느끼고 있습니다.

연구시험의 기회를 주시고 격려를 해주신 김병기 국립식물검역소장님, 김규호 제주지소장님, 국립식물검역소 선배 및 후배 여러분께도 감사를 올립니다. 특히 연구시험과정에서 함께 토론하고 자료정리에 도움을 주신 강병효, 현경탁, 강민수, 강은희님과 제주지소 직원들께 진심으로 감사를 드립니다.

오로지 평생 자식들을 위하여 희생하시는 어머니, 형제우애를 먼저 생각하는 익상, 익성, 정화, 윤실, 윤숙 내외분과 조카들, 그리고 장모님과 처남 내외분, 친지분들과 함께 기쁨을 나누고 싶습니다. 때늦은 학업을 하는 동안 묵묵히 도와주고 지켜봐 준 아내 최현주님, 사랑하는 은정, 은삼, 문정이에게 죄송함과 고마운 마음을 잊을 수 없습니다.

먼저 세상을 떠나신 아버지님, 장인 어른께 이 논문을 바칩니다.