



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)



博 士 學 位 論 文

제주에서 근권세균을 이용한
주요 식물병의 방제

Plant Protection by Rhizobacteria
against Major Plant Diseases in Jeju

濟州大學校 大學院

農 學 科

康 素 榮

2012年 2月



제주에서 근권세균을 이용한 주요 식물병의 방제

指導教授 田 溶 哲

康 素 榮

이 論文을 農學 博士學位 論文으로 提出함

2011年 12月

康素榮의 農學 博士學位 論文을 認准함

審査委員長	_____	Ⓜ
副委員長	_____	Ⓜ
委 員	_____	Ⓜ
委 員	_____	Ⓜ
委 員	_____	Ⓜ

濟州大學校 大學院

2011年 12月

목 차

List of Figures	iv
List of Tables	x
ABSTRACT	1
I. 서 론	4
II. 연 구 사	7
III. 연 구 내 용	12
1. 식물근권세균 처리에 의한 감귤궤양병 억제	12
(1) 연구 배경	12
(2) 재료 및 방법	13
1) 감귤궤양병 분리 및 발병조건 규명	
2) 식물근권세균의 항균활성에 의한 선발	
3) 식물근권세균 처리에 의한 감귤궤양병 진전 억제	
4) 식물근권세균 처리에 의한 감귤궤양병 밀도 변화	
(3) 결과 및 고찰	22
1) 감귤궤양병 분리 및 발병조건 규명	
2) 식물근권세균의 항균활성에 의한 선발	
3) 식물근권세균 처리에 의한 감귤궤양병 진전 억제	
4) 식물근권세균 처리에 의한 감귤궤양병 밀도 변화	
2. 식물근권세균 처리에 의한 감귤역병 억제	44
(1) 연구 배경	44
(2) 재료 및 방법	45



1) 식물근권세균의 감귤역병균에 대한 항균 활성	
2) 식물근권세균 처리에 의한 감귤역병 억제	
3) 효과적인 식물근권세균의 유전자염기서열분석을 통한 동정	
(3) 결과 및 고찰	48
1) 식물근권세균의 감귤역병균에 대한 항균 활성	
2) 식물근권세균 처리에 의한 감귤역병 억제	
3) 효과적인 식물근권세균의 유전자염기서열분석을 통한 동정	
3. 식물근권세균 처리에 의한 감귤검은점무늬병에 대한 방제 효과	57
(1) 연구 배경	57
(2) 재료 및 방법	58
1) 감귤검은점무늬병원균의 분리 및 발병조건 규명	
2) 식물근권세균의 항균활성에 의한 선발	
3) 실내에서 식물근권세균 처리에 의한 감귤검은점무늬병 진전 억제 효과	
4) 식물근권세균에 의한 감귤검은점무늬병원균 성장 억제의 광학현미경 관찰	
(3) 결과 및 고찰	64
1) 감귤검은점무늬병원균의 분리 및 발병조건 규명	
2) 식물근권세균의 항균활성에 의한 선발	
3) 실내에서 식물근권세균 처리에 의한 감귤검은점무늬병 진전 억제 효과	
4) 식물근권세균에 의한 감귤검은점무늬병원균 성장 억제의 광학현미경 관찰	
4. 식물근권세균 처리에 의한 마늘흑색썩음균핵병 발병 억제 효과	80
(1) 연구 배경	80
(2) 재료 및 방법	81



1) 마늘흑색썩음균핵병균의 분리 및 발병조건 규명	
2) 식물근권세균의 항균활성에 의한 선발	
3) 식물근권세균 처리에 의한 마늘흑색썩음균핵병 발병 억제효과	
(3) 결과 및 고찰	85
1) 마늘흑색썩음균핵병균의 분리 및 발병조건 규명	
2) 식물근권세균의 항균활성에 의한 선발	
3) 식물근권세균 처리에 의한 마늘흑색썩음균핵병 발병 억제효과	
5. <i>Burkholderia gladioli</i> TRK2-2 및 DL-3-Amino Butyric Acid	
에 의한 감자조직배양묘에서 감자역병 억제 효과	97
(1) 연구 배경	97
(2) 재료 및 방법	98
1) 감자식물체, 식물근권세균 및 병원균	
2) 감자조직 배양묘에서의 식물근권세균 TRK2-2 또는 BABA에 의한 감자역병 억제효과	
3) 식물근권세균 TRK2-2의 유전적 분석에 의한 동정	
(3) 결과 및 고찰	101
1) 감자식물체, 식물근권세균 및 병원균	
2) 감자조직 배양묘에서의 식물근권세균 TRK2-2 또는 BABA에 의한 감자역병 억제효과	
3) 식물근권세균 TRK2-2의 유전적 분석에 의한 동정	
IV. 총 합 고 찰	110
V. 적 요	113
VI. 참 고 문 헌	115

List of Figures

- Fig. 1-1. Occurrence of citrus canker on citrus trees in the field(A) and symptoms on citrus leaf(B), young stem(C) and fruit(D). Dotted line zones indicate the infected part by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.
- Fig. 1-2. Gel electrophoresis of PCR amplified 16S/23S internal transcript spacer regions(ITS) from *X. axonopodis* pv. *citri*(left) and ITS sequencing based on rDNA of *X. axonopodis* pv. *citri* and blast results on the web-site(right). The presented Gel electrophoresis of PCR bands were using primer-2 and primer-3(lane 1 and 2). M: 1kb molecular size marker.
- Fig. 1-3. Observation of citrus leaves by wound inoculation with isolated citrus canker from the infected citrus leaves. The untreated control was H₂O, the concentration of *X. axonopodis* pv. *citri* were 1.0×10^7 cfu/ml, 1.0×10^8 cfu/ml, 1.0×10^9 cfu/ml, respectively. Lesions of the upper leaf surfaces(A) and the lower leaf surfaces(B) of citrus leaves were observed after 20 days.
- Fig. 1-4. Occurrence of citrus canker on citrus leaves(A) at 30 days after sprays-inoculated with *X. axonopodis* pv. *citri* *in vivo* test. The concentration of *X. axonopodis* pv. *citri* was 1.0×10^6 cfu/ml(B), 1.0×10^7 cfu/ml(C), respectively.
- Fig. 1-5. Growth inhibition of *X. axonopodis* pv. *citri* by the selected bacterial 4 isolates on TSA medium. The presented TSA plates were untreated control(H₂O)(A), treated with MRL408-3(B), TRH423-3(C), TRH415-2(D), THJ609-3(E) and commercial fungicide Streptomycin[®] (F). The concentration of anti-bacterial isolates and Streptomycin[®] were 1.0×10^7 cfu/ml and 10 g/L, respectively.

Fig. 1-6. Gel electrophoresis of PCR amplified 16S/23S internal transcript spacer regions from bacterial isolates MRL408-3(lane 1), TRH423-3(lane 2), TRH415-2(lane 3) and THJ609-3(lane 4) using universal primers 38r and 72f. M: 1kb Ladder (iNtRON Bio.)

Fig. 1-7. Disease severity on citrus leaves at 20 days after inoculated with *X. axonopodis* pv. *citri* (1.0×10^7 cfu/ml)(A) and inoculated with mixture of citrus canker and bacterial isolates MRL408-3(B), TRH423-3(C) and pre-treated with commercial fungicide Streptomycin[®](D) *in vivo* test. The concentration of anti-bacterial isolates and Streptomycin[®] were 1.0×10^7 cfu/ml and 1 g/L, respectively.

Fig. 1-8. Disease severity on citrus leaves at 7 days after inoculated with *X. axonopodis* pv. *citri*(1.0×10^7 cfu/ml) in the field experiment in 2010. Bacterial suspension of the isolates was pre-inoculated on citrus leaves 7 days before challenge inoculation with *X. axonopodis* pv. *citri*. The presented leaves were untreated control(A), pre-sprayed with MRL408-3(B), TRH423-3(C), TRH415-2(D), THJ609-3(E) and pre-treated with commercial fungicide Streptomycin[®] (F). The concentration of bacterial isolates and Streptomycin[®] were 1.0×10^6 cfu/ml and 1 g/L, respectively.

Fig. 1-9. Disease severity on citrus leaves at 7 days after inoculated with *X. axonopodis* pv. *citri*(1.0×10^7 cfu/ml) in the field experiment in 2011. Bacterial suspension of the isolates was pre-inoculated on citrus leaves 7 days before challenge inoculation with *X. axonopodis* pv. *citri*. The presented leaves were untreated control(A), pre-sprayed with MRL408-3(B), TRH423-3(C), TRH415-2(D), THJ609-3(E) and pre-treated with commercial fungicide Streptomycin[®] (F). The concentration of bacterial isolates and Streptomycin[®] were 1.0×10^6 cfu/ml and 1 g/L, respectively.

Fig. 2-1. Inhibition of mycelium growth of *Phytophthora citrophthora* by antifungal bacterial isolates MRL409-2(no anti-fungal activity)(A), THJ609-3(B), TRH423-3(C), BRH433-2(D), TRL2-3(E), KRY505-3(F) on the PDA medium. The present photographs were at 10 days after incubation.

Fig. 2-2. Suppression of disease severity on the citrus fruits pre-treated with suspension of antifungal bacterial isolates THJ609-3(C), TRH423-3(D), BRH433-2(E), TRL2-3(F), KRY505-3(G) and commercial fungicide Cyazofamid[®](H) and untreated control(A and B) at 5 days after inoculation with late blight pathogen *Phytophthora citrophthora*. The concentration of antifungal bacterial isolates and Cyazofamid[®] were 1.0×10^7 cfu/ml and 660 μ l/L, respectively. The arrows indicate the measure points of lesion diameter.

Fig. 3-1. Spore formation conditions of *Diaporthe citri*. A, Spore horns emerged from pycnidia on surface of OTA medium treated with light and air conditions; B, OTA medium blocked from light and air conditions.

Fig. 3-2. Symptoms on citrus leaves at 15 days after inoculated with H₂O(A), different concentrations of *Diaporthe citri*(B and C). The concentration of spores suspension from *D. citri* were 1.0×10^6 conidia/ml(B) and 1.0×10^7 conidia/ml (C).

Fig. 3-3. Inhibition of mycelium growth of *Diaporthe citri* by the selected bacterial isolates on PDA medium. The presented PDA plates were untreated control(A), treated with TRH423-3(B), MRL408-3(C), THJ609-3(D), TRH415-2(E) and CRY521-1(no anti-fungal activity) (F). The present photographs were at 10 days after incubation.

Fig. 3-4. Disease severity on citrus leaves at 14 days after inoculated with *Diaporthe citri*(A) and inoculated with mixture of citrus melanos

and rizobacterial isolates TRH415-2(B), THJ609-3(C), MRL 408-3(D), TRH423-3(E) and pre-treated with commercial fungicide Dithianon[®] (F). The concentration of *Diaporthe citri*, anti-bacterial isolates and Dithianon[®] were 1.0×10^6 conidia/ml, 1.0×10^6 cfu/ml and 1 g/L, respectively.

Fig. 3-5. Microscopical observation of mycelium growth inhibition site of plant pathogen *Diaporthe citri* by anti-fungal bacterial isolates from plant rhizosphere. Mycelium morphology were photographed non-inhibition site(A) and inhibition site(B) on PDA after 14 days.

Fig. 3-6. Microscopical observation of α -conidia germinating at 48 hours after inoculated with *Diaporthe citri* in distilled water(A) and inoculated with mixture of citrus melanose and bacterial isolates MRL408-3(A), TRH423-3(B), TRH 415-2(D), THJ 609-3(D) and commercial fungicide Dithianon[®], respectively. The concentration of *Diaporthe citri* and anti-bacterial isolates were 1.0×10^6 conidia/ml and 1.0×10^6 cfu/ml, respectively. The concentration of commercial fungicide Dithianon[®] were 1 mg/L(B), 10 mg/L(C) and 1000 mg/L(D, traditional using). One % of glucose were added in all treatments.

Fig. 4-1. Mycelium growth of *Sclerotium cepivorum* Berk. in culture soil medium(left) or sand medium (right).

Fig. 4-2. Garlic plants infected white rot caused by *Sclerotium cepivorum* Berk. A and B, Occurrence of white rot in soils of garlic plants; C, infected garlic stem.

Fig. 4-3. Inhibition of mycelium growth of *Sclerotium cepivorum* Berk. by the selected bacterial isolates on PDA medium. A, THS602-1(no anti-fungal activity); B, BRH433-2; C, TRH423-3; D, TRL406-3; E, TRH415-2; F, MRL408-3.

Fig. 4-4. Suppression of disease severity on the garlic plants pre-treated with suspension of antifungal bacterial isolates. The presented

plants were untreated control(A), pre-treated with the selected bacterial suspension of TRH415-2(B), TRH423-3(C) and BRH433-2(D), respectively. The bacterial isolates suspension(1.0×10^6 cfu/ml) were treated twice. As a untreated control, H₂O was given instead of the bacterial suspension. Disease severity on the garlic plants were observed at 7 days after inoculation with *Sclerotium cepivorum* Berk. in the plastic pot experiment. In the styrofoam pot experiment(E) and yields of the garlic bulbs(F) on the garlic plant pre-treated with bacterial isolates. The bacterial isolates suspension(1.0×10^6 cfu/ml) were treated 10 times. The garlic bulbs were harvested at 90 days after inoculation with *Sclerotium cepivorum* Berk.

Fig. 5-1. Disease severity of potato seeding untreated control(A), pre-inoculated with bacterial isolate TRK2-2 at 1 day(B) and at 3 days(C) and pre-treated with BABA at 1 day(D) and at 3 days(E) before the fungal inoculation, respectively. The infected potato seeding were presented at 7 days after inoculation with *Phytophthora infestans* at concentration with 1.0×10^4 zoospores/ml.

Fig. 5-2. Under diseases progress curves(AUDPC) of the infected potato seeding in tissue culture. All treatments were potato seeding untreated control, pre-treated with bacterial isolate TRK2-2 at 1 day and at 3 days, BABA at 1 day and at 3 days before the fungal inoculation, respectively. The infected potato seeding were presented at 7 days after inoculation with *Phytophthora infestans* at concentration with 1.0×10^4 zoospores/ml.

Fig. 5-3. Disease severity of potato seeding untreated control(A), post-inoculated with bacterial isolate TRK2-2(B) and post-treated with BABA(C) at 2 hours after the fungal inoculation, respectively. The infected potato seeding were presented at 7 days after

inoculation with *Phytophthora infestans* at concentration with 1.0×10^4 zoospores/ml.

Fig. 5-4. Under diseases progress curves(AUDPC) of the infected potato seeding in tissue culture. All treatments were potato seeding untreated control, post-inoculated with bacterial isolate TRK2-2 and BABA at 2 hours after the fungal inoculation, respectively. The infected potato seeding were presented at 7 days after inoculation with *Phytophthora infestans* at concentration with 1.0×10^4 zoospores/ml.

Fig. 5-5. Gel electrophoresis of total DNA(left) and PCR amplified 16S/23S intergenic spacer regions(right) from bacterial isolate TRK2-2 using universal primers 38r and 72f. M: 1kb molecular size marker.

List of Tables

- Table 1-1. Lesion numbers on citrus leaves spray-inoculated with mixture of *X. axonopodis* pv. *citri* and rhizobacterial isolates *in vivo* test
- Table 1-2. Disease severity and lesion numbers on citrus leaves pre-inoculated with the selected bacterial isolates in the field experiments in 2010
- Table 1-3. Disease severity and lesion numbers on citrus leaves pre-inoculated with the selected bacterial isolates in the field experiments in 2011
- Table 1-4. Total numbers of *X. axonopodis* pv. *citri* in the washed suspension from the citrus leaves surface after treatments of *X. axonopodis* pv. *citri* and mixture of citrus canker and bacterial isolates
- Table 2-1. Mycelium of growth inhibition of plant pathogen *Phytophthora citrophthora* by anti-fungal bacterial isolates from plant rhizosphere
- Table 2-2. Lesion diameter on the citrus fruits pre-treated with effective bacterial isolates, Cyazofamid[®] and untreated control at 5 days after pathogen inoculation with *Phytophthora citrophthora*
- Table 3-1. Spore productions of growed *Diaporthe citri* on OTA medium and PDA medium in conditions treated with light or air
- Table 3-2. Mycelium of growth inhibition of plant pathogen *Diaporthe citri* by anti-fungal bacterial isolates from plant rhizosphere
- Table 3-3. Lesion numbers and control value on citrus leaves spray-inoculated with mixture of *Diaporthe citri* and rhizobacterial isolates *in vivo* test
- Table 3-4. Germination rate and length of geum tubes of the melanose fungus on the inoculums at 24 hours and 48 hours after inoculation with mixture of *Diaporthe citri* and the anti-bacterial

isolates, commercial fungicide Dithianon[®], respectively, *in vivo* test
Table 4-1. Mycelium of growth inhibition of plant pathogen *Sclerotium cepivorum* Berk. by anti-fungal bacterial isolates from plant rhizosphere

Table 4-2. Yields of the garlic bulbs on the garlic plants pre-treated with all four bacterial isolates, respectively

A B S T R A C T

The most popular method to control the diseases has been to apply chemical fungicides. However, environment favorable plant protection comes to the fore as another method, and the number of eco-friendly crop cultivation has been gradually increased in Jeju, where the application of the synthetic organic fungicides is forbidden. Therefore, an alternative strategy to protect various plant pathogens is strongly required in organic farms.

Plant growth promoting rhizobacteria(PGPR) has been known as a biological inducer of resistance against various plant pathogens in many crops. Also biological control of plant diseases was conducted using antagonistic bacteria after having been selected through sequential screening procedures in laboratory. Bacterial strains were isolated from the rhizosphere of annual plants growing in Jeju. In total, 12 bacterial isolates were selected from over 100 bacterial isolates through the tests on resistance induction or biological control efficacy against various plant diseases.

Protective effects to many diseases in crop plants by bacterial isolates were investigated. And resistance mediated by bacterial isolates against various plant diseases were tested in annual crop plants such as cucumbers, potatoes, tomatoes, and peppers. The bacterial isolates were identified through the analysis of the ribosomal DNA sequence in the internal transcribed spacer(ITS) region. Using universal primers 38r and 72f, all the bacterial DNA samples were amplified. Among the effective bacterial isolates, 42% were belonged to genus *Bacillus*. Three of them were identified as *B. cereus* and other 2 isolates as *B. weihenstephanensis* and *B. circulans* in genus *Bacillus*. Three isolates were identified as *Burkholderia gladioli*. And the other 4 isolates were identified as *Acinetobacter Quenomosp*, *Miamiensis avidus*, *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*.

In the first study, bacterial strains isolated from rhizosphere of plant were tested whether they could suppress citrus canker on citrus leaves. Among 17 bacterial strains, 4 bacterial isolates such as MRL408-3, TRH423-3, TRH415-2, and THJ609-3 showed antibacterial effects against citrus canker pathogen *in vitro* and suppression of disease severity on the leaves, compared to the single inoculation treatment with suspension of the citrus canker pathogen *in vivo* test, and in the field experiments.

In the second study, suppression effect against late blight caused by *Phytophthora citrophthora* of the 12 bacterial isolates from plant rhizosphere were investigated on citrus fruits. Among the 12 bacterial isolates, THJ609-3, TRH423-3, BRH433-2, TRL2-3, and KRY505-3, disease suppression was confirmed, after having wound inoculation with the fungal pathogen *in vivo*. Disease severity was determined by measuring the lesion diameter on the inoculated sites of the citrus fruits.

In the third study, 4 bacterial isolates such as THJ609-3, TRH415-2, MRL408-3 and TRH423-3, known as effective microorganism for biological control to the melanose of citrus were investigated *in vitro* as well as *in vivo* test. Disease severity of melanose caused by *Diaporthe citri* was measured up by the number of the appeared lesion on the citrus leaves, spray-inoculated with mixture of *Diaporthe citri* and the bacterial isolates. Only a few lesions were found on the leaves inoculated with mixture of *Diaporthe citri* and the suspension of the bacterial isolates, respectively.

In the fourth study, 4 bacterial isolates as BRH433-2, TRH423-3, TRH415-2 and MRL408-3 were selected through the antagonistic activity against garlic white rot caused *Sclerotium cepivorum* Berk. and testing of resistance induction efficacy against various plant diseases with priority. The highest anti-fungal activity was evaluated by the inhabitation of hyphal growth of plant pathogens adjacent to bacterial isolates as BRH433-2 and TRH423-3. Disease suppression increase of the garlic bulbs on the garlic

plant, in these 4 pre-treated bacterial isolates, were higher than the non-bacterized control plants *in vivo* test.

In the fifth study, it was investigated that the antagonistic effect of the bacterial isolate TRK2-2 against late blight in tissue culture after its pre- or post treatments. Pre-treatment of the bacterial suspension to 1 or 3 days before the fungal inoculation caused suppression of disease severity of late blight, whereas post-treatment behind 2 hours after pathogen inoculation did not control. In pre- or post treatments of DL-3-amino butyric acid (BABA), a well-known resistance inducer, similar results were shown, with those of TRK2-2.

Based on these results it is suggested that the effective bacterial isolates may be very useful to find biological control efficacy or resistance induction agents against major diseases in various crop plants, especially on environment-friendly farm where the application of fungicide was limited.

I. 서 론

인구의 급격한 증가에 대비하여 농약과 비료 등을 사용하여 작물을 보호하고 수확량을 확보할 수 있어 식량난 해결에 지대한 기여를 하였지만, 합성농용자재의 남·오용은 토양과 작물내의 잔류독성, 인축중독사고 등의 자연생태계에 미치는 악영향, 병해충·잡초 등에서 약제 저항성 개체 출현 및 증대 등에 의한 약효 감소 등의 부작용 등 여러 부분에 문제점을 발생시켰다 (Weller, 1988). 또한 지구환경을 보호 유지하려는 국내·외적인 움직임에 의해 합성농용자재에 대한 환경평가의 기준이 강화되고 있다. 그 규제의 강도는 점차 심화되면서 이미 산업 전반에 법적인 제도화가 추진되고 있으며, 2000년대에 세계농업은 환경과 조화를 이루는 형태의 지속가능한 농업을 지향하고 있다. 지금의 우리나라의 농업도 생산에서 소비까지 환경에 영향을 주지 않으면서 소비자의 건강한 삶을 지켜줄 수 있을 것을 요구받고 있으며 이를 극복할 수 있는 대안으로서 환경오염을 최소화 하면서 지속적으로 안전한 농사를 짓는 친환경농업이 제시되고 있다. 정부가 친환경농업을 미래 농업의 성장 동력으로 적극 육성함에 따라 친환경농업의 인증면적은 전체 경지면적 중 차지하는 비중이 2000년에 0.11%였으나, 2005년 2.7%, 2009년 11.6%로 지속적으로 확대되고 있다. 친환경농산물 생산은 2000년대 초반까지 매년 두배 이상의 급증세를 보였고, 최근 5년 동안 증가율이 다소 둔화되었지만 여전히 높은 약 50%의 증가추세를 나타내고 있다. 이러한 농업환경의 변화는 작물의 재배뿐만 아니라 병해충방제에도 환경 친화적인 기술이 절실히 요구되고 있다 (김 등, 2008; 농업경제연구원, 2010).

환경에 대한 부작용을 억제하는 동시에 유기합성 살균제를 대신하여 농작물의 병·해충을 억제하며 농작물의 생장을 촉진시키는 등 길항미생물에 의한 생물적 방제에 대한 관심이 증대되었다. 생물적 방제에 대한 연구는 1980년대 이후에 중요성이 알려지면서 식물병 방제를 위한 길항세균의 사용이 제시되었고, Wilson와 Wisniewski(1989)에 의해 미생물에 의한 생물적방제의 성공가능성은 언급되어졌으며, 환경 친화적 병·해충 및 잡초 방제 기술로의 인식전환이 요구

되면서 많은 연구가 진행되었다. 이를 위하여 미생물의 식물생장촉진기작을 규명하려는 연구가 국내외적으로 활발하게 진행되고 있으며 이와 관련된 몇몇 균주들은 선발되어 농업생산에 이용되고 있다. 이러한 생물적 방제에는 미생물을 자체 이용한 것과 미생물에서 생산된 활성물질을 이용한 생물농약 등이 있다. 미생물 자체를 농약화 시킨, 병해 방제용 생물농약 중 가장 효과적인 것으로 길항미생물인 *Agrobacterium radiacter* strain 84 및 K1026균주를 이용한 Galltrol 등 4개의 제품이 있다. *A. radiobacter*에서 생산되는 아그로신(Agrocin)이라는 항균성 물질은 다년생 목본류의 뿌리에 발생되고 있는 뿌리혹 세균병(Crown gall)의 세포벽 합성을 저해함으로써 확실한 효과를 나타내어 우수한 방제제로 이용되고 있으며, 뿌리혹 세균병에 대해 유기합성농약보다 효과적임을 인정받았다 (Hynes와 Boyetchko, 2005; 박, 2011). 미생물이 생산하는 활성물질을 이용한 생물농약에는 Blasticidin S, Kasugamycin, Polyoxin, Validamycin, Stretomycin, Oxytetracyclin 및 Natamycin 등이 사용되거나 개발 중이며 이러한 활성물질은 미생물이 생산하는 2차대사물질로 배양액에서 분리·정제하여 의약품 및 농업용 항생물질로 활용하고 있다. 국내에서도 식물의 병저항성을 유도하는 미생물로 *Bacillus vallismortis* EXTN-1은 생물농약으로 개발되었으며, 식물이 가지고 있는 자체 방어기작을 활성화시켜 식물이 자체적으로 병 저항성을 가지게 되며, 병 저항성 단백질의 활성화, 세포조직의 강화, 과민성 반응등의 저항성 반응을 보이며 식물생육촉진 효과도 나타내는 것으로 증명되었다 (Park 등, 2007; 박, 2011; 최, 2006).

제주의 1차 산업 비중은 지역산업생산 대비 약 17%로 전국의 4.4%에 비해 높으며 지역전략산업의 중요한 위치를 차지한다. 제주의 농업은 한라산을 중심으로 남부지역은 감귤, 북부지역은 채소류 등의 일반작물, 중산간 지역에서는 목초지가 조성되어 축산업으로 구성되어 있다. 이로 인해 제주의 전략산업으로 친환경농업을 육성하였고 2000년부터 2010년까지 지속적으로 증가되고 있으나, 전국의 친환경인증면적 중 1.2%로 적은 것으로 나타났다 (농업경제연구원, 2010). 제주도는 사면의 바다, 한라산의 정중앙 위치로 고저차에 따른 기후변화 등의 요인으로 한반도에서도 기후변화 영향이 심한 지역이다. 이러한 기후적인 여건에 의해 병충해 발생에 대한 방제수단의 부족으로 인해 친환경농업이 타 지역보다 저

조함을 보이게 된 것으로 판단된다. 아열대 기후로의 전환 가능성이 높아지면서 작물품종의 변화에 따른 다양화로 작부체계가 변화되었고, 작물 재배에 있어 발생하는 병해충을 친환경적으로 방제할 수 있는 생물제제의 개발이 절실한 실정이다. 특히 친환경농가에서 손쉽게 구입하고 안전하게 사용할 수 있는 친환경농업자재의 개발과 이용방법에 대한 정착과 보급이 필요하다.

본 연구는 제주도의 한라산주변, 중산간 지역, 해변가 지역의 자원식물을 채집하여 식물근권에서 식물근권세균을 분리하고 제주의 주요작물인 감귤, 마늘 및 감자에 발생하는 식물병에 대해 효과가 있는 식물근권세균을 선발하였다. 여러 가지 식물병에 직접적인 항균효과가 있는 식물근권세균을 선발하였더라도 이 병된 식물체에서 식물병을 억제할 수 없으면 농가의 실용화가 어려운 실정이다. 이러한 이유로 식물체에서 병을 억제할 수 있는 식물근권세균의 선발이 요구되었다. 실험실뿐만 아니라 포장에서도 식물근권세균을 이용하여 병원균에 대한 방제 가능성을 알아보고, 제주의 친환경농가 및 연구자들에게 친환경적 방제의 기초자료를 제공하기 위해 여러 실험을 통해 실시하였다.

II. 연 구 사

최근에 환경보호와 생태계보존 등이 국제적인 관심이 되면서 농약의 잔류 독성 및 환경오염문제가 크게 부각, 유기합성 농약이 성장세가 크게 둔화되고 있다. 1992년 농약 사용량 중 20%를 생물농약 및 친환경농약으로 대체하도록 리우 세계 환경회의에서 결의하였고, 우리나라도 2014년까지 사용되고 있는 화학농약의 30%를 줄이거나 대체하는 계획이 발표되었다 (Hynes와 Boyetchko, 2005; 농업경제연구원, 2010; 박, 2011). 점차적으로 합성농용자재에 대한 환경평가의 기준이 강화되고, 그 규제의 강도는 심화되면서 환경과 조화를 이루는 형태의 지속 가능한 농업을 추구하게 되었고, 작물 재배뿐만 아니라 병해충방제에도 환경 친화적인 기술이 절실히 요구되고 있다. 환경에 대한 부작용을 억제하는 동시에 농산물의 안전성과 품질을 향상시킬 수 있는 방안으로 생태계에 영향을 주지 않으면서 병·해충을 억제하며 농작물의 성장을 촉진시키는 등 미생물에 의한 생물적 방제에 대한 관심이 증대되었다. 이런 근권미생물은 생물농약뿐만 아니라 토양미생물제로 많이 개발되었으며, plant growth promoting rhizobacteria(PGPR)이라 명한다. PGPR은 뿌리의 표면 또는 내부에 기생하면서 근권 내에 서식하는 식물병을 일으키는 식물생육저해균의 생육을 억제하거나 흙에서 전염되는 병의 침입으로부터 식물을 보호한다. 이들 균주들은 항생물질 생산, 병저항성 유도 유발성 생육촉진물질, 질소고정, 인산가용화 등 식물생육 및 병해방제에 유용한 기능을 직·간접적으로 갖고 있다 (Kloepper, 1980; 박, 2011). 지금까지 보고된 PGPR균주로는 *Azospirillum sp.*, *Azobactor sp.*, *Bacillus sp.*, *Burkholderia sp.*, *Enterobacter sp.*, *Kluyvera sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Serratia sp.*, *Trichoderma sp.*, 등 많은 미생물들이 알려져 있다 (Glick 등, 1995; Kloepper 등, 2004).

PGPR균주들이 식물의 성장을 직접적으로 조절하는 기작으로는 인산가용화, 질소고정, 식물성장촉진호르몬(auxin, cytokinin, gibberelin)의 생산, 에틸렌조절 등이 알려져 있고(Glick 등, 1995), 간접적인 기작으로는 생물적 방제 기작으로 이용되는 5가지 작용이 있다. 첫 번째는 cellulase, chitinase, chitosanase 등을

분비하여 식물병원성 진균의 세포벽을 분해하는 용균작용(Jung 등, 2007)을 한다. chitin은 식물병원성 진균인 *Aspergillus*속과 *Penicillium*속의 세포벽을 형성하는 물질이다. *Bacillus licheniformis* K11은 토마토시들음병을 일으키는 *Fusarium oxysporum*에 대해 억제능을 나타낸 효과적인 균주로 선발되었고, 식물생장을 촉진하는 auxin, 항진균성 siderophore 및 섬유소를 분해하는 cellulase를 분비하는 균주이다. 고추역병을 일으키는 *Phytophthora capsici*의 세포벽이 cellulose와 glucan 등으로 이루어져 있어, 고추역병균에 *Bacillus licheniformis* K11을 처리했더니 세포벽을 분해하였다 (Jung 등, 2007). 두 번째는 *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Streptomyces* sp., 등이 생산하는 항생물질에 의해 직접 식물병원균의 생육을 저해하는 항생작용을 한다. *Bacillus*속은 fungicine, iturin, iturin-like compounds, β -1,3-glucanase, bacillomicine 등과 같은 다양한 항진균성 물질을 분비한다 (Cho 등, 2003; Joo 등, 2002; 우와 김, 2007). 세 번째는 식물병원균에 기생하면서 식물에 대한 진균의 병원성을 억제하는 기생작용이 있다. *Ampelomyces quisqualis*은 흰가루병균에 기생하는 곰팡이 중복기생균(hyperparasite)으로 흰가루병 방제에 이용 가능성이 높다. 오이, 멜론, 호박, 참외, 수박, 박, 딸기, 가지, 토마토, 콩, 팥, 장미 등 12종에 침해하는 흰가루병균 *Sphaerotheca*속 6종과 *Erysiphe*속 1종에 대해 *A. quisqualis*의 기생성이 있고 기주특이성이 없는 것으로 나타나 흰가루병에 대해 광범위하게 적용할 수 있는 생물적 방제용 우수균주로 선발되었다 (Lee 등, 2005). 네 번째는 생육공간에서 영양분과 같은 생육에 필요한 인자를 경쟁함으로써 병원균의 생육 및 증식을 억제하는 경쟁적 길항작용(Jung 등, 2006)이다. *Trichoderma* sp.는 섬유소분해균류로 분해산물의 일부를 영양원으로 이용하여 성장과 효소생산에 필요한 질소를 획득해야만 하기 때문에 다른 균에 비해 경쟁력이 강하다. 퇴비에 접종하였을 때 병원균인 *Fusarium* 및 *Rhizoctonia*의 성장을 억제하였다 (Clarkon 등, 2002; Mclean 등, 2000). 마지막으로 세포대사에 관여하는 철이온(Fe^{3+})의 경쟁에서 우위를 선점하기 위해 생산하는 항진균성 siderophore 물질(Vandenbergh 등, 1984; Zhang 등, 2010)을 비롯하여 미생물이 생산하는 exopolysaccharide(EPS), 2,3-butanediol, lipopolysaccharide(LPS), hydrogen cyanide(HCN), salicylic acid(SA) 등의 물질들에 의해서 식물의 면역기능이 활성화되어 병에 대해 저항

성을 유도하는 작용(Jeun 등, 2004; Jung 등, 2007; Min 등, 2000)등을 들 수 있다.

생물적 방제에는 미생물을 이용한 미생물농약 등의 생물적 방제와 유도저항성을 이용한 방법 등이 있으며, 생물적 방제에는 미생물을 자체 이용한 것과 미생물에서 생산된 활성물질을 이용한 생물농약 등이 있다. 미생물을 이용한 식물병 방제 연구는 1927년 미국에서 감자 더듬이병 방제용으로 방선균을 이용한 것을 시작으로, 1960년 이후 농약의 형태로 실용화되기 시작하였다. 과수 근두암 증병의 방제를 위한 길항미생물인 *Agrobacterium radiacter* K84 및 K1026균주 자체를 농약화 시켰다. *A. radiacter*을 이용한 *A. radiobacter*에서 생산되는 아그로신(Agrocin)이라는 항균성 물질은 다년생 목본류의 뿌리에 발생되고 있는 뿌리혹 세균병(Crown gall)의 세포벽 합성을 저해함으로써 확실한 효과를 나타내어 우수한 방제제로 이용되었고, Galltrol 등 4개의 제품으로 개발되었다. 뿌리혹 세균병에 대해 유기합성농약보다 효과적이며, 병해 방제용 생물농약 중 가장 효과적임을 인정받았다. 또한, 원예작물병 방제를 위해 Quantum4000, Kodiak, Serenade 등으로 제품화된 *Bacillus subtilis*는 현재 미국 등에서 종자처리제나 엽면살포제로 사용되고 있으며, *Pseudomonas sp.*에 의한 토양병원균의 생물적방제 연구도 진행 중이다 (Keer, 1980; Mena, 2007; Schisler 등, 2004; Siddiqui, 2003). 미국 코넬대에서 연구된 길항곰팡이 *Trichoderma harzianum*은 Gustafson 회사에 의해, 잘록병에 대한 길항진균인 *Gliocladium virens*는 Garace회사에 의해 제형화 되었다 (Spadaro, 2005; 박, 2011). 세계적으로 실용화되고 있는 생물농약들은 육묘 중 발생하는 모잘록병 방제용으로 개발된 것들이 대부분이다. 미생물농약에는 실용화된 것으로 *Agrobacterium radiobacter* strain 84등 16종, 실용화로 추진 중인 것이 *Bacillus sp.* 등이 29종이 알려져 있다. 이들은 각종 식물병원균 증식을 억제, 기생하거나, 항생작용 및 포식작용을 토대로 한 생물학적 방제이다. 국내에서도 미생물 자체를 이용한 병 방제용 미생물 개발은 1985년 Virulence virus에 의해 담배의 모자이크병(TMV) 방제에 대한 연구를 시작으로, *Bacillus ehimensis*를 이용하여 무와 수박에 *Rhizoctonia solani*와 *Pytium ultimum*에 의해 발생하는 모잘록병(김 등, 2002)을 방제하였다. 참다래 꽃썩음병에 대한 *Streptomyces sp.* 의 생물적 방제효과를 확인하였고, *Pseudomonas*

*gladioli*에 의한 오이의 시들음병(*Fusarium wilt*) 방제, *Bacillus* sp.(AC-1)에 의한 고추의 역병(*Phytophthora blight*) 방제, *Trichoderma harzianum*에 의한 딸기의 시들음병 방제 등 주요작물의 식물병 방제에 관한 연구가 보고되었다(Cho 등, 2007; Moon 등, 1988; Spadaro, 2005)

미생물이 생산하는 활성물질을 이용한 생물농약에는 Blasticidin S, Kasugamycin, Polyoxin, Validamycin, Stretomycin, Oxytetracyclin 및 Natamycin 등이 사용되거나 개발 중이며 이러한 활성물질은 미생물이 생산하는 2차대사물질로 배양액에서 분리·정제하여 의약품 및 농업용 항생물질로 활용하고 있다. 1958년 *Streptomyces griseochsomogenes* 에서 유래된 Blasticidin S는 벼도열병 약제로 현재까지 쓰이고 있으며 항암 및 항바이러스 효과도 보고되었다. Polyoxin은 *St. cacaoi* var. *asoensis* 에서 분리된 물질로 14개의 유도체가 혼합된 형태로 병원균의 세포벽 키틴질의 합성저해에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 사과와 배의 껍질병(canker), 오이의 흰가루병(Powdery mildew)등 다양한 식물병원균에 억제효과를 나타냈다. 농업용 살균제로 개발된 미생물에는 방선균(*Actinomycetes*) 중 *Streptomyces*속 균주가 대부분으로 농업용 항생물질을 생산하는 주체가 되었다(Lee 등, 2005). 항생물질은 약 8,000종 이상이 알려져 있으며 이중 실용화 추진 중인 것은 약 600여종이며 농업용으로 활용되는 것은 20여종, 그중 병해방제용으로 많이 사용되고 있는 것은 6종이 실용화되고 있다 (Hynes와 Boyetchko, 2005; 박, 2011)

유도저항성은 병원체에 의한 감염 또는 화학물질에 의해 생기는 것으로 식물체의 피사된 부위에 제한적인 국부적 획득저항성(local acquired resistance)과 병원체, 비병원체에 감염되거나 또는 자연에서 존재하는 특정 생화학물질에 의해서 유도되는 저항성 systemic acquired resistance(SAR) 또는 식물근권에 존재하여 식물의 성장을 촉진시키는 길항세균(plant growth promoting rhizobacteria, PGPR)에 의해 유도되는 저항성 induced systemic resistance(ISR) 등의 전신적 유도저항성으로 구분한다. 전신적 유도 저항성에서 SAR과 ISR은 식물에 저항성이 유도되는 신호전달체계와 저항성이 발현되는 저항성 기작에 차이가 있다. 신호전달 체계에 있어서 salicylic acid(SA)의 축적에 의해 SAR발현이 되지만, ISR의 신호전달체계는 SA의 축적과는 상관없이 길항근권세균의 처리에 의해 저항성이 진

행된다. ISR 발현 식물에서는 병 관련 단백질의 축적 없이도 저항성을 나타내며, 유도저항성의 신호전달과정에서 식물호르몬인 ethylene, jasmonic acid이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Van Loon 등, 1998). 저항성 유도 인자인 길항근권세균은 항생물질 등의 많은 2차 대사물질을 생산하므로 병원체에 대한 직접적인 항균 효과가 있고 식물에 ISR을 유발하여 식물병원진균 및 세균을 저해하기도 하며, 저항성 발현 정도로 인해 철(Fe)의 영향으로 식물의 성장을 촉진한다 (De La Fuente 등, 2004; Jeun 등, 2002; Kloepper 등, 1980). 생물적 방제 인자로는 *Bacillus pumilus*(Mari 등 1996), *Pseudomonas fluorescens*(Nielsen 등, 1998), *Trichoderma harzianum* (Latorre 등, 1997), *Paenibacillus*와 *Bacillus*속 등으로 농업용으로 사용되는 미생물은 항생물질 및 세포벽 분해효소 생산, ISR유도 등의 다양한 대사작용을 통해 식물병원균의 성장을 저해한다 (Winding 등, 2004). 유도저항성을 기반으로 한 미생물제제 개발에는 바실러스 속 미생물이 주로 개발되었으며, *Bacillus subtilis*가 가장 많고, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens* 등 상용화 되고 있다. 국내에서도 식물의 병저항성을 유도하는 미생물로 *Bacillus vallismortis* EXTN-1은 생물농약으로 개발되었으며, 식물이 가지고 있는 자체 방어기작을 활성화시켜 식물이 자체적으로 병 저항성을 가지게 되며, 병 저항성 단백질의 활성화, 세포조직의 강화, 과민성 반응등의 저항성 반응을 보이며 식물생육촉진 효과도 나타내는 것으로 증명되었다(Park 등, 2007). 친환경 재배 농가에서 유도저항성의 이용은 SAR의 이용보다는 식물의 근권에 존재하는 길항세균을 이용함으로써 식물의 성장을 촉진시키며 저항성을 유도하는 ISR을 이용(Kloepper 등, 1980) 하는 것이 더 유리할 것으로 생각된다. SAR의 이용에 있어서 병 방제용으로 병원체, 비병원체가 사용되었으나, 이것으로 인한 포장에서의 작물에 병 발생 등에 의한 피해, 생화학물질의 농도조절의 어려움 등이 있다.

Ⅲ. 연구 내용

1. 식물근권세균 처리에 의한 감귤궤양병 억제

(1) 연구배경

감귤궤양병은 주로 잎에 발생하나 심할 때에는 과실이나 어린가지에도 발생을 한다. 잎과 줄기가 자라기 시작한 6주 이내로 발생하며, 이후에는 병원균에 감염이 되어도 병 발생이 되지 않거나 아주 작은 돌기만이 형성된다. 병징은 작은 반점(pinpoint spot)으로 시작되어 2~10mm의 원형반점이 되며 병징의 융합에 의해 불규칙하게 되기도 한다. 병이 심하게 발생된 잎이나 과실에서는 낙엽 또는 낙과도 되지만, 주로 이병과는 수확기까지 남아 있어 상품가치를 떨어뜨리고 다른 지역으로 병원균을 전파시킬 수 있다. 바람에서 발병은 조장하기 어렵지만, 6.5m/s를 넘으면 잎과 과실에 상처가 많아져 발병이 높아진다 (Kang, 2002; Timmer 등, 2000).

감귤궤양병은 오렌지류에 발생한 세균병을 citrus canker로 Hasse(1915)에 의해서 최초로 명명하였으며, 분리·동정된 병원세균을 *Pseudomonas citri* Hasse로 보고되었다. 미국의 플로리다와 텍사스 등에서 처음 발견되면서 병징이 더뎡이병과 혼동되었지만, 감귤품종에 따라 발병상황이 다른 것과 병원성 및 전염력이 매우 강한 것에 의해 새로운 병으로 인정되었다. Vauterin 등(1995)에 의해 DNA상동성과 biolog automated system 내의 영양원 이용 양상 등을 근거로 재분류하였고, *Xanthomonas campestris* pv. *citri*의 pathotype A는 *X. axonopodis* pv. *citri*로, B, C와 D는 *X. axonopodis* pv. *aurantifolii*로, pathotype E는 *X. axonopodis* pv. *citrumelo*로 분류되어 현재까지 사용되고 있다. 온주밀감은 감귤궤양병에 대해 중도저항성으로서 다른 병에 비해 피해가 적지만, 영국을 포함한 주변의 많은 국가에서 자국 내의 감귤산업을 보호하기 위하여 검역병해

로 지정하였고, 기주식물 수입을 금지하고 유입을 경계하고 있다. 제주의 감귤재배농가는 원활한 수출을 위해서 영국 및 유럽 수출용 감귤 재배시 감귤퀘양병 방제에 힘을 쏟고 있는 실정이며, 적절한 관리대책이 필요한 때이다. 감귤재배에 있어서 병해충 방제 수단으로 합성농약을 이용한 화학적 방제가 용이하여 주로 이루어졌으며, 집중적인 화학적 방제는 병원균의 저항성 발현, 주변 환경의 오염 및 인축독성 등 많은 부작용을 초래했다. 작물의 다수확을 목적으로 과도한 농약 사용의 증가로 인해 병원균의 약제 저항성이 발생되면서 농약은 약효를 잃고 그 사용에 제한이 따르게 되었으며, 감귤퀘양병에 대해서도 지역에 따라 약제내성을 나타냈다 (Hynes와 Boyetchko, 2005; Timmer 등, 2000). 한편, 농산물에 사용된 농약 등이 잔류에 의한 위험성이 표면화되었고, 수출입시의 검역에서 농산물에 잔류된 농약으로 인해 통관 문제가 대두되어 보건당국에서도 그에 대한 규정을 강화시키고 있다. 과채류는 생식하기 때문에 더욱 문제가 되어, 농약을 사용하지 않거나 최소한으로 사용한 친환경농산물에 대한 국내·외 소비자들의 요구가 점차 커지고 있다.

친환경 감귤산업의 육성은 제주도 지역전략 산업 육성을 위한 핵심정책과제의 한 부분이며, 친환경 감귤 재배 기술은 농가의 평균소득을 보전할 수 있기 때문에 본 연구는 감귤퀘양병 예방 및 방제를 하기 위해 미생물을 활용함으로써 친환경적인 방제수단을 탐구하고자 수행하였다.

(2) 재료 및 방법

1) 감귤퀘양병 분리 및 발병조건 규명

a. 병원균 분리

제주지역의 하효리, 남원리 및 회천동 등의 감귤원에서 온주감귤(품종: 궁천조생)과 하귤, 청견, 팔삭 등의 잡귤목에서 퀘양병균에 의해 용균반이 형성된 잎을 채집(Fig. 1-1)하여 병원균 분리를 하였다. 채집된 이병 잎은 병징을 중심으

로 5 × 5mm 크기의 정방형으로 자르고 1.0% sodium hypochlorite solution (NaOCl)에서 30초간 표면 소독하였다. 증류수에 1분씩 3회 세척하고 70% ethanol에 30초 담근 후 증류수에서 1분씩 3번 세척하였다. 소독된 시료를 살균된 흡습지에서 물기를 제거하고 매스로 4등분하여 tryptic soy agar¹⁾(TSA; Becton, Dickson and Company, France)와 nutrient agar²⁾(NA; Becton, Dickson and Company, France)에 치상 후 28 ± 1°C의 항온기에서 3일간 배양하였다. 또한 조직속의 병원균을 누출하기 위해 소독된 시료를 멸균된 filter paper로 물기 제거하고 매스로 4등분하여 5%의 peptone액 1ml에 넣고 2시간 동안 조직속의 병원균을 용출시켰다. 그 액을 TSA와 NA에 100 μ l을 넣고 도말하여 28 ± 1°C의 항온기에서 3일간 배양하였으며, 계양병균으로 추정되는 노란 colony를 분리 배양하였다. 보관균주를 작성하기 위해 분리된 병원균을 TSA에 도말하고 28°C에서 48시간 동안 배양 후 멸균된 loope를 이용하여 병원균을 수집한 다음 glycelin 이 15% 함유된 tryptic soy broth³⁾(TSB; Becton, Dickson and Company, France)에 넣어 균일하게 섞은 후 -20°C와 -80°C에 보관하고 다음 실험에 사용하였다.

1) tryptic soy agar(TSA)제조

: casein 15.0g, soybean 5.0g, sodium chloride 5.0g, agar 15.0g 등 이 포함된 TSA 40.0g를 D.W 1L를 섞어 멸균하여 사용하였다.

2) nutrient agar(NA) 제조

: beef extract 3.0g, peptone 5.0g, glucose 2.5g, agar 15.0g이 포함된 NA 23g을 D.W 1L를 섞어 멸균하여 사용하였다.

3) Tryptic Soy Broth(TSB)

: casein 17.0g, soybean 3.0g, dextrose 2.5g, sodium chloride 5.0g, dipotassium phosphate 2.5g 등 이 포함된 TSB 30.0g를 D.W 1L를 섞어 멸균하여 사용하였다.

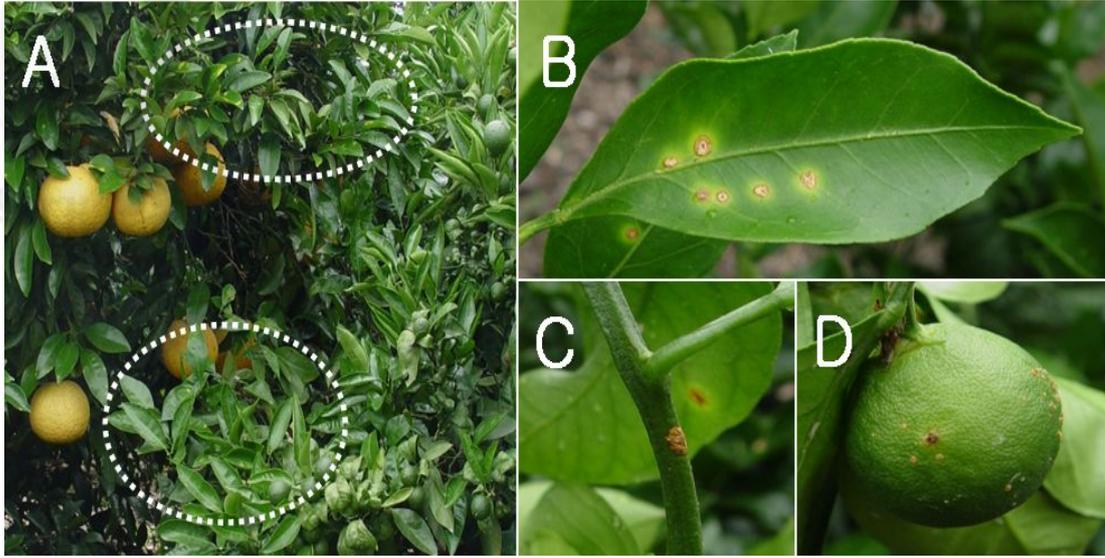


Fig. 1-1. Occurrence of citrus canker on citrus trees in the field(A) and symptoms on citrus leaf(B), young stem(C) and fruit(D). Dotted line zones indicate the infected part by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.

b. 감귤궤양병균의 유전자염기서열분석을 통한 동정

이병된 잎에서 분리된 감귤궤양병원균을 분자생물학적 방법에 의한 동정을 위하여 TSB배지에 옮겨 28℃에서 24시간동안 100rpm으로 진탕 배양하였다. 병원균의 total DNA의 추출은 NucleoSpin® kits(Macherey- Nagel, Germany)를 이용하였으며, 그 절차에 따라 분리하였다. 감귤궤양병원균의 DNA에서 특정염기서열을 증폭하기 위해 primer로 primer-2(5'-ACGGGTGCAAAAATCT-3')와 primer-3(5'-TGGTGTCGCTTGTAT-3')을 이용(Shiotani 등, 2009)하였다. PCR 반응액은 2 μ l의 분리된 DNA(5~10 ng/ml), 2.5mM의 dNTP 1 μ l, 10pmol의 primer 각 1 μ l, 10 × Buffer 4 μ l, 5 unit/ μ l의 Taq DNA polymerase(iNtRON Co., Korea)를 1 μ l 첨가하고, 멸균수로 반응용액의 부피를 최종 40 μ l가 되게 하였다. PCR증폭 조건은 PCR Thermal Cycler Dice TP600(TaKaRa, Japan)을 사용하여 95℃에서 10분간 처리 후, 95℃에서 70초, 58℃에서 60초, 72.0℃에서 60초의 조건에서 30회 반복하였으며, 마지막으로 72.0℃ 2분 동안 처리하였다. DNA 증폭산물의 8 μ l를 ethidium bromide(EtBr)이 함유된 1% agrose gel에서 전기 영동한 후 UV하에서 증폭 유무를 확인하였다. DNA elution은 NucleoSpin® kits(Macherey-Nagel, Germany)에 기술된 방법대로 수행하였다. DNA sequence는 Genetic Analyzer(Applied Biosystems 3130xl, USA)에 의해 시행 후 Applied Biosystems(AB, version 1.0)을 이용하여 분석하였고 분석된 자료는 National Center for Biotechnology Information(NCBI)의 홈페이지의 Basic Local Alignment Search Tool (Blast; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)를 이용하여 이미 등록된 염기서열과 상동성을 비교하여 감귤궤양병원균을 동정하였다.

c. 감귤궤양병 발병조건 규명

탱자에 접목한 2년생 감귤 묘목(품종: 궁천조생)을 직경 250 mm의 화분에 상토와 일반토양을 1 : 2 의 비율로 섞은 흙을 넣어 옮겨 심었으며, 주간 25 ± 1℃, 야간 18 ± 1℃가 유지되는 유리온실에서 생육을 유지하였다. 실험에 사용된 감귤나무의 새순은 유리온실에서 생육 중인 감귤나무를 28 ± 1℃의 식물배양실에서 옮겨 생육하면서 새순이 발생할 수 있도록 습도를 조절하였다.

식물체에 발병되는 병원균의 접종 농도를 조사하기 위해 감귤의 잎(품종:

궁천조생)에서 분리된 병원균을 TSA에 도말하여 $28 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 항온기에서 2일간 배양하였다. 온실에서 생장 중인 감귤나무(품종: 궁천조생)에서 30일이 경과된 신초로, 경화되기 시작한 잎을 살균된 가위로 한 장씩 절취하여 처리에 따라 3장을 준비하였다. UV-Visible Spectrophotometer (Varian Aust, AU/CARY 50 Conc.)을 이용하여 감귤궤양병원균의 현탁액을 $1.0 \times 10^{4\sim 9}$ colony forming unit(cfu)/ml로 준비하여 멸균된 이쑤시개에 묻혀 감귤 잎(품종: 궁천조생)에 상처 접종하였다. 직경 90 mm의 멸균된 용기에 흡습지를 깔고 멸균수로 적셔 습윤한 환경을 조성하여 접종된 감귤 잎을 보관하였으며, $28 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 항온기에서 병반의 진행을 20일 동안 관찰하였다.

식물배양실에서 생장 중인 감귤나무(품종: 궁천조생)에서 20일이 경과된 신초 6장의 잎이 있는 가지를 절취하여 멸균수가 담긴 삼각플라스크에 꽂았다. 감귤궤양병원균의 현탁액을 1.0×10^6 cfu/ml, 1.0×10^7 cfu/ml, 1.0×10^8 cfu/ml 등으로 준비하고 tween 20을 총부피의 0.01%가 되도록 첨가한 후 각각 감귤의 신초에 분무 접종하였다. 접종된 감귤의 잎을 100%의 습도처리가 된 28°C 의 dew chamber에서 48시간 습실 처리 후 $28 \pm 1^\circ\text{C}$ 가 유지되는 식물배양실의 습실 처리 된 상자에 보관하여 병반의 진행을 30일 동안 관찰하였다.

2) 식물근권세균의 항균활성에 의한 선발

a. 식물근권세균의 분리

제주의 한라산을 중심으로 2003년부터 2007년까지 산간지역, 중산간 지역, 해안지역에서 자생하고 있는 일년생식물을 채집하였고, 채집 과정에서 뿌리의 손상이 적게 하였다. 잔뿌리가 포함된 식물체를 습실 처리된 지퍼팩에 넣어 저온상자에서 보관하여 이동하였다. 식물근권세균의 분리는 Lee 등 (2003)이 제시한 방법에 따라 진행하였다. 식물의 근권에서 세균을 분리하기 위하여 채집된 식물의 뿌리를 흐르는 물에서 흙을 제거하였다. 뿌리의 수분을 제거 후 식물의 뿌리는 전자저울을 이용하여 1 g 이상이 되도록 측정하였고, 뿌리는 가위를 이용하여 10 mm 정도씩 절단했다. 뿌리를 막자사발을 이용하여 으갠 다

음 10 ml의 멸균수를 넣어 마쇄하였다. 마이크로 피펫으로 막자사발에 있는 뿌리 추출액 1ml를 수집하여 멸균된 filter paper(90 mm)에 의해 여과하였다. 여과액을 희석법을 이용하여 미리 준비된 멸균수 9 ml이 들어있는 test tube에 넣어 10^{-8} 의 비율까지 희석하였다. 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} 및 10^{-8} 의 비율로 희석된 희석액을 각각 100 μ l씩 추출하여 TSA배지에 전체적으로 도말하고 28°C에서 48시간 배양하였다. 형성된 colony 중 성장하는 형태, 색, 모양 등 식물근권세균의 형태학적 특징에 의해 TSA배지에 단포자 분리를 하였다. 분리된 식물근권세균은 다시 TSA배지에 옮겨 생육시켰다. 최종 108개의 세균 계통이 분리되었고, 분리된 세균은 endorf tube에 15%의 glycerol이 포함된 TSB에 넣어 균일하게 섞은 후 -20°C와 -80°C에 사용되기 전까지 보관하였다.

b. 항균활성에 의한 선발

식물뿌리의 근권에서 분리된 식물근권세균 중에서 감자역병, 감귤역병, 고추역병, 오이탄저병 등의 식물병원균에 대해 항균효과와 식물체 병 억제효과가 확인된 식물근권세균을 우선적으로 선택하여 실험에 이용하였다. 식물 뿌리의 근권에서 분리된 식물근권세균의 항균 효과를 알아보기 위해 TSA배지가 채워져 있는 페트리디쉬에 준비된 감귤궤양병원균의 현탁액 1.0×10^7 cfu/ml을 50 μ l을 전체적으로 고르게 도말한 후 1시간 동안 실온의 무균실험대 안에 보관하였다. 식물근권세균은 TSB에서 2일간 배양 후 1분간 10000rpm으로 원심분리하여 상층액을 준비하였고, 감귤궤양병이 도말된 배지의 중앙에 멸균된 paper disc(8 mm)을 올려놓은 후 미생물이 배양된 액을 70 μ l을 처리하였다. 대조구로 멸균수와 농도별에 따른 스트렙토마이신을 70 μ l씩을 각각 처리하였다. streptomycin(유효성분 20%, 농용신®, 동부정밀)은 사용약량이 20g/20L의 기준으로, 10 g/L, 1 g/L, 0.10 g/L을 처리하였다. 처리한 배지를 28°C의 배양기에서 2일간 배양 후 감귤궤양병의 성장억제정도(inhibition zone)를 확인 후 길항효과가 우수한 균주를 1차적으로 선발하였다.

c. 선발된 식물근권세균의 유전자염기서열분석을 통한 동정

선발된 식물근권세균 중 감귤궤양병에 억제효과가 있는 MRL408-3,

TRH423-3, TRH415-2, THJ609-3 등의 균주를 각각 TSB배지에 옮긴 후 28°C에서 24시간동안 100rpm으로 진탕 배양하였다. 분자생물학적인 동정을 위하여 total DNA의 추출은 Ausubel 등(1987)의 제시된 방법에 따라 추출하였다. 식물근권세균의 배양액 1.5ml를 10,000rpm으로 1분간 원심분리한 후 상층액은 제거하고 500 μ l TE-buffer(10mM Tris-HCl, pH8.0., 1mM EDTA)를 첨가하여 잘 섞은 후 -80°C에 10분간 냉동하였다. 냉동된 세포가 녹은 후 10 mg/ml의 lysozyme 을 포함한 250mM tris buffer 50 μ l을 첨가하여 천천히 섞은 후 4°C에 45분 동안 보관하였다. 다음으로 증류수 110 μ l, 10% SDS 13 μ l, 10N NaOH 3 μ l 각각 첨가하여 제조한 solution 10 μ l를 첨가하고 세포가 녹을 때까지 50°C water bath에 두었다. 투명해진 시료에 최종농도가 1 mg/ml가 되도록 proteinase K를 첨가한 후 천천히 섞어준 후 tris saturated phenol을 시료의 총량과 1 : 1 비율로 섞은 다음 10,000rpm 15분간 원심 분리하였다. 상층액을 취하고, 총량에 대해 0.1 volume의 3M sodium acetate와 0.7 volume의 isopropanol을 넣고 천천히 섞어서 실온에 10분 동안 두었다. 이후 10,000rpm으로 4°C에서 5분간 1차의 원심 분리하여 상층액을 제거하고 70%의 에탄올 500 μ l을 넣고 -20°C에서 10분간 보관하였다. 2차의 원심분리도 10,000rpm으로 4°C에서 10분간 진행하였고 상층액을 완전히 제거한 후 37°C의 건조기에서 30분간 두었다. 건조된 DNA를 TE-buffer 30 μ l로 녹여 수집하였고 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

PCR제작 및 DNA 염기서열분석은 'Ⅲ. 연구내용; 1. 식물근권세균 처리에 의한 감귤퀘양병 억제; (2) 재료 및 방법; 1) 감귤퀘양병 분리 및 발병조건 규명; b. 감귤퀘양병균의 유전자염기서열분석을 통한 동정'에서와 동일하게 수행하였다. 식물근권세균의 rDNA의 internal transcribe spaces(ITS) 염기서열을 universal primer의 38r(5'-CCGGGTTTCCCCATTCGG-3')와 72f(5'-TGCGGCTGGATCTCCTT-3')(Martin-Laurnet 등, 2001)를 이용하여 분석하였다. universal primer의 PCR증폭 조건은 PCR Thermal Cycler Dice TP600(TaKaRa, Japan)을 사용하여 96°C에서 2분간 처리 후, 94°C에서 30초, 55.9°C에서 30초, 72.0°C에서 30초의 조건에서 30회 반복하였으며, 마지막으로 72.0°C 2분 동안 처리하였다.

3) 식물근권세균 처리에 의한 감귤궤양병 진전 억제

a. 실내에서의 식물근권세균 처리에 의한 감귤궤양병 진전 억제

감귤나무(품종: 궁천조생)에서 20일이 경과된 신초 6장의 잎이 있는 가지를 절취하여 멸균수가 담긴 삼각플라스크에 꽂았다. 실험실에서 선발된 4개의 식물근권세균 MRL408-3, TRH423-3, TRH415-2, THJ609-3의 감귤궤양병원균과 1 : 1로 혼합하여 tween 20을 총부피의 0.01%가 되도록 첨가한 후 신초에 살포했다. 이 때 감귤궤양병원균과 식물근권세균의 현탁액 농도가 최종적으로 각각 2.0×10^7 cfu/ml로 조절하였다. 대조구로 식물근권세균 대신 살균수를 섞어, 감귤궤양병원균의 농도가 1.0×10^7 cfu/ml를 살포하였다. streptomycin[®](유효성분 20%, 농용신[®], 동부정밀)을 1 g/L(사용약량 20g/20L)을 준비하여 감귤 신초에 처리하고 2시간 동안 음건한 다음 감귤궤양병원균의 현탁액 1.0×10^7 cfu/ml를 살포하였다. 접종된 감귤의 잎을 28°C의 dew chamber에서 24시간 습실 처리 후 $28 \pm 1^\circ\text{C}$ 가 유지되는 식물배양실의 습실처리 된 상자에 보관하여 병반의 진행을 30일 동안 관찰하였다. 실험은 3반복 시행하였으며, 30일이 경과 후 감귤 궤양병원균에 의해 감염된 병반수를 측정하였다. 시험결과는 분산분석과 처리평균 사이의 비교를 위하여 Duncan검정(P=0.001)을 실시했으며, Statistical Analysis System(SAS Institute, version 8.02) program을 이용하였다. 병반수는 [전체 병반수/조사엽수]로 계산하였다.

b. 포장에서 식물근권세균 처리에 의한 감귤궤양병 진전 억제

감귤궤양병 시험포장별로 무처리구, 대조약제로 streptomycin 계열의 농용신[®]을, 선발된 식물근권세균 TRH423-3, MRL408-3, THJ609-3 및 TRH415-2을 각각 10m 이상 떨어진 3주를 선정하고, 3반복 완전임의 배치하였다. 시험은 2년 동안 2회에 걸쳐 진행하였으며, 시험기간은 2010년 5월부터 7월까지(6월 1일, 6월 16일, 6월 30일, 7월 17일 처리; 총 4회)였다. 감귤나무에서 새순이 발생 후 새순이 굳기 전에 15일 간격으로 식물근권세균의 현탁액을 1.0×10^6 cfu/ml의 농도로 처리하였다. 식물근권세균의 현탁액을 3회 처리하고 7일 뒤에 감귤궤양병원균 현탁액을 1.0×10^7 cfu/ml의 농도로 준비하여 감귤나무에 분무 접종하였다.

접종 7일 뒤에 4회째의 식물근권세균을 처리하고 15일 뒤에 궤양병의 병반을 조사하였다. 2010년 발생한 봄순 잎을 대상으로 주당 200엽씩 4방향 조사하였다. 궤양병에 대한 이병엽율(%) = [(이병엽수/조사엽수) × 100] 이였고, 병반수 = [전체 병반수/조사엽수] 이었다. 감귤원에서의 2차 실험은 2011년 5월부터 9월까지(6월 1일, 6월 15일, 7월 1일, 7월 15일, 8월 1일, 8월 15일, 9월 1일, 9월 15일 처리; 총 8회) 실시하였으며, 식물근권세균의 현탁액 처리는 2010년과 동일한 방법으로 처리하였다. 7회째의 식물근권세균의 현탁액을 처리 한 다음 7일 뒤에 감귤궤양병원균 현탁액을 1.0×10^6 cfu/ml의 농도로 준비하여 감귤나무에 살포하였다. 병원균 접종 7일 뒤에 8회째의 식물근권세균의 현탁액을 처리하였다. 감귤 잎에 발생한 궤양병의 병반은 약제 및 식물근권세균 4회 처리 후 15일 경과시점에 1회, 총 8회 처리 후 15일 경과시점에 2회로 총 2번 조사하였으며, 동일한 방법으로 이병엽율(%)과 병반수를 조사하였다. 시험결과는 분산분석과 처리평균사이의 비교를 위하여 Duncan검정(P=0.001)을 실시했으며, Statistical Analysis System(SAS Institute, version 8.02) program을 이용하였다.

4) 식물근권세균 처리에 의한 감귤궤양병 밀도 변화

a. 감귤궤양병원균 접종 후 식물근권세균 처리에 의한 감귤궤양병원균 밀도 변화 조사

선발된 식물근권세균과 병원균의 혼합접종방법은 ‘Ⅲ. 연구 내용; 1. 식물근권세균 처리에 의한 감귤궤양병 억제; (2) 재료 및 방법; 3) 식물근권세균 처리에 의한 감귤궤양병 진전억제; a. 실내에서의 식물근권세균 처리에 의한 감귤궤양병 진전 억제’에서와 동일하게 수행하였다. 선발된 식물근권세균 현탁액과 감귤궤양병원균현탁액을 준비한 후 혼합하여 각각의 농도가 1.0×10^7 cfu/ml으로 조정하였다. 20일이 경과된 신초 6장의 잎이 있는 가지를 절취하여 준비하였고, 병원균과 식물근권세균의 혼합액을 분무하였다. 접종된 감귤의 잎을 28℃의 dew chamber에서 24시간 습실 처리 후 $28 \pm 1^\circ\text{C}$ 가 유지되는 식물배양실의 습실 처리된 상자에 보관하여 병반의 진행을 14일 동안 관찰하였다. 한편, X.

axonopodis pv. *citri*의 단독처리 및 *X. axonopodis* pv. *citri*과 식물근권세균을 혼합하여 감귤 잎에 접종하고 1일이 경과한 다음 잎을 채취하여 멸균수 5ml이 들어있는 용기에 넣어 5분간 흔들여 감귤 잎을 세척하였다. 그 세척액을 TSA배지에 50 μ l을 고르게 도말한 후 28 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 배양하였다. colony가 형성된 배지를 15 \pm 1 $^{\circ}$ C에서 6일 동안 저온처리하여 궤양병원균의 수를 측정하였고, 접종 7일째, 14일째도 1일째와 동일한 방법으로 세척하여 미생물 수를 확인하였다.

b. 감귤궤양병원균 접종 후 분리된 세균의 유전자염기서열분석을 통한 동정

계측된 미생물이 감귤궤양병원균임을 확인하기 위해 *X. axonopodis* pv. *citri*이 접종된 잎을 1일째, 7일째, 14일째에 세척하여 그 액을 배양하였고, 형성된 colony에서 감귤궤양병원균으로 추정되는 균주를 TSA배지에 단포자 분리하여 28 $^{\circ}$ C의 항온기에서 2일 동안 배양하였다. 레몬 빛의 연한 노란색의 colony를 형성하는 균주를 TSB배지에 옮긴 후 28 $^{\circ}$ C의 항온기에서 24시간 동안 진탕 배양하였다. 감귤궤양병원균의 분자생물학적 분석방법은 ‘Ⅲ. 연구내용; 1. 식물근권세균 처리에 의한 감귤궤양병 억제; (2) 재료 및 방법; 1) 감귤궤양병 분리 및 발병조건 규명; b. 감귤궤양병원균의 유전자염기서열분석을 통한 동정’에서와 동일하게 수행하였다. DNA증폭산물의 5 μ l를 ethidium bromide(EtBr)이 함유된 1% agrose gel에서 전기 영동한 후 UV하에서 증폭 유무를 확인하여 궤양병 추정균이 감귤궤양병원균임을 검토하였다.

(3) 결과 및 고찰

1) 감귤궤양병 분리 및 발병조건 규명

a. 병원균의 분리

표면 살균된 이병된 잎을 4등분하여 TSA 및 NA배지에 치상했더니, 2일째

는 조직의 절편 주위로 투명한 환이 형성되더니, 3일째 전형적인 연한 노랑색을 나타냈다. 또한 표면 살균된 잎을 4등분하여 5%의 pepton에 2시간 동안 조직속의 병원균을 누출시켜 TSA 및 NA배지에 도말하였더니, 2일째 투명한 colony가 형성되었으며, 3일째 레몬 빛의 연한 노랑색을 나타냈다. 이병된 조직에서 누출시키는 방법 또한 치상했을 때와 비슷한 결과를 보였으며, 병원세균을 분리할 때 누출시키는 방법을 고려해도 무난할 수 있을 것이라 생각된다. 두 가지 방법의 의해 분리된 병원균은 TSA배지에서 NA배지보다 더 잘 자라는 것을 확인할 수 있었고, 배양된 세균의 수는 2배가량 차이를 나타냈다. 이로 인해 병원성 검정시 TSA배지에 도말하여 $28 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 항온기에서 2일간 배양하여 사용하였다.

b. 감귤궤양병균의 유전자염기서열분석을 통한 동정

온주밀감 및 잡귤목 등의 잎에서 감귤궤양병에 이병된 병반들을 채집하여 병원균을 분리 후 DNA를 추출하여 *Xanthomonas* 특정 primer-2와 primer-3을 이용하여 특정유전자를 증폭하였고 250bp정도의 염기단편을 확인할 수 있었다 (Fig. 1-2). NCBI의 Gene Bank에 등록된 균주들의 database에 대해 병원균의 DNA의염기서열을 비교한 결과 100%로 *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* str으로 동정되었다.

c. 감귤궤양병 발병조건 규명

감귤궤양병에 감염된 온주감귤의 잎에서 분리된 병원균을 온주감귤의 잎 뒷면에 상처 접종하였더니, 접종 10일째에 균 농도 $1.0 \times 10^{8-9}$ cfu/ml에서 접종된 부위가 천천히 황변 되는 것을 관찰하였고, 1.0×10^7 cfu/ml에서는 미약하게 노랗게 변한 것을 관찰하였다. 접종 20일째에 $1.0 \times 10^{7-9}$ cfu/ml에서 접종부위가 노란색의 병반을 뚜렷하게 관찰하였고(Fig. 1-3), 1.0×10^6 cfu/ml에서도 미약하게 노란색의 병반을 확인할 수 있었다. $1.0 \times 10^{4-5}$ cfu/ml에서는 병반을 관찰할 수 없었다. 또한, 궤양병에 감염된 하귤의 잎에서 분리된 병원균을 분리하여 온주밀감의 잎에 상처 접종하였더니 접종 10일째부터 접종부위가 황변 되는 것을 관찰할 수 있었으며, 접종 20일째 현탁액 $1.0 \times 10^{6-9}$ cfu/ml까지 병반을 관찰할 수 있었다. 한편, 코흐의 법칙에 의하여 상처 접종된 잎에서의 병반을 재분리 하

였더니 레몬 빛의 노란색 colony를 형성하는 균을 검출할 수 있었으며, DNA분리 및 염기서열분석에 의해 동일한 균주로 동정되었다.

감귤(품종: 궁천조생) 및 오렌지 나무(품종: 네블오렌지)에서 절취된 신초에 감귤의 잎(품종: 궁천조생)에서 분리된 감귤궤양병원균의 현탁액을 1.0×10^6 cfu/ml, 1.0×10^7 cfu/ml, 1.0×10^8 cfu/ml으로 준비하여 분무 접종하였고, 접종 7일까지는 멸균수 처리 및 감귤궤양병원균의 현탁액을 접종한 식물체에서 육안으로 보이는 생리적 장애는 관찰되지 않았다. 병원균 현탁액 1.0×10^8 cfu/ml의 농도로 접종된 식물체에서 접종 10일부터 6개의 잎 중에 가장 어린잎부터 병반이 형성됨을 관찰할 수 있었다. 접종 21일에는 잎에 병반이 전체적으로 조밀하게 많이 발생했고 잎이 떨어져버리는 등 30일 동안 관찰하기 힘들었으며, 병 진전 속도가 빠르게 진행되었다. 병원균 현탁액 1.0×10^7 cfu/ml의 농도를 접종된 식물체에서는 접종 15일부터 어린잎에서 병반이 형성됨을 확인했으며, 접종 21일 후부터 노랗게 형성된 병반을 관찰할 수 있었다. 접종 30일 후 발병된 병반의 색이 진해졌으며, 잎이 떨어지는 현상은 10배 농도인 1.0×10^8 cfu/ml에 비해 저조했다 (Fig. 1-4A와 C). 감귤궤양병원균의 현탁액을 1.0×10^7 conidia/ml의 농도로 했을 때 6개의 잎이 포함된 가지에 평균적으로 3~4개의 잎에서 병에 감염되어 이병엽율이 50%이상 발생하는 것을 관찰했다. 병원균 현탁액 1.0×10^6 cfu/ml의 농도로 접종된 식물체에서는 최근에 발생한 잎에서만 병에 감염되었고, 1~2개의 잎에 병반이 형성되어 전체적으로 이병엽율이 30%이하로 측정되었다 (Fig. 1-4B). 한편, 절취된 6개의 잎의 있는 신초에서 잎이 발생한 순서에 따라 잎의 경화도의 차이로 인해 가지 위의 어린잎에서는 병에 감염되었으나, 가지의 아래 잎은 경화되어 궤양병에 감염되지 않는 경우도 발생하였다.

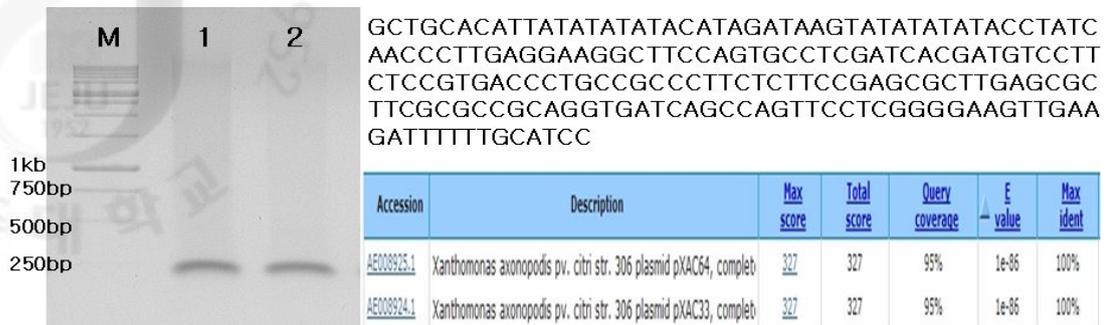


Fig. 1-2. Gel electrophoresis of PCR amplified 16S/23S internal transcript spacer regions(ITS) from *X. axonopodis* pv. *citri*(left) and ITS sequencing based on rDNA of *X. axonopodis* pv. *citri* and blast results on the web-site(right). The presented Gel electrophoresis of PCR bands were using primer-2 and primer-3(lane 1 and 2). M: 1kb molecular size marker.

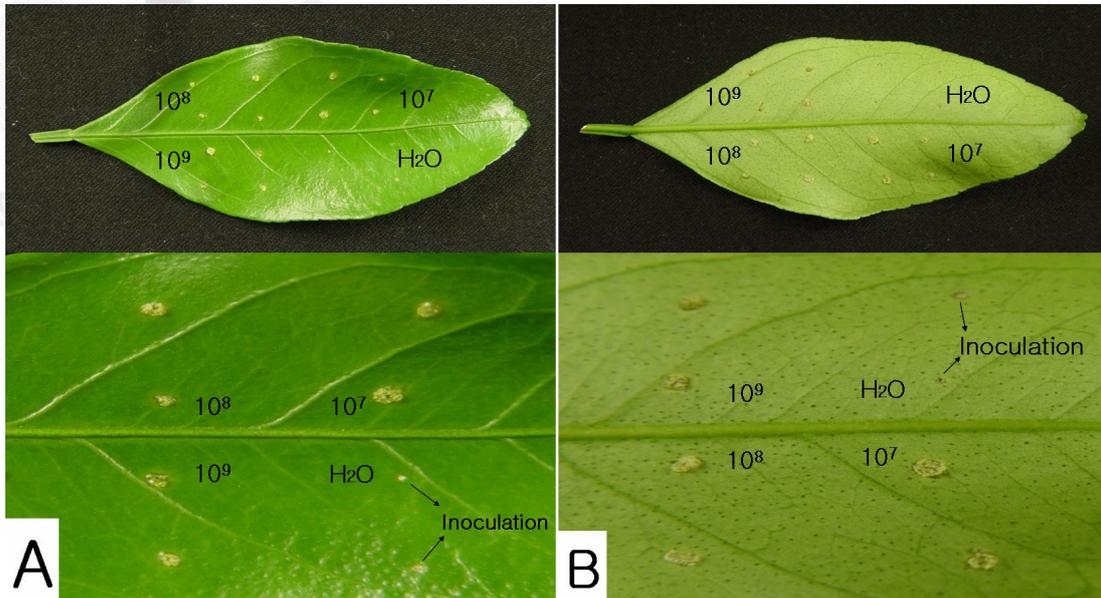


Fig. 1-3. Observation of citrus leaves by wound inoculation with isolated citrus canker from the infected citrus leaves. The untreated control was H₂O, the concentration of *X. axonopodis* pv. *citri* were 1.0×10^7 cfu/ml, 1.0×10^8 cfu/ml, 1.0×10^9 cfu/ml, respectively. Lesions of the upper leaf surfaces(A) and the lower leaf surfaces(B) of citrus leaves were observed after 20 days.

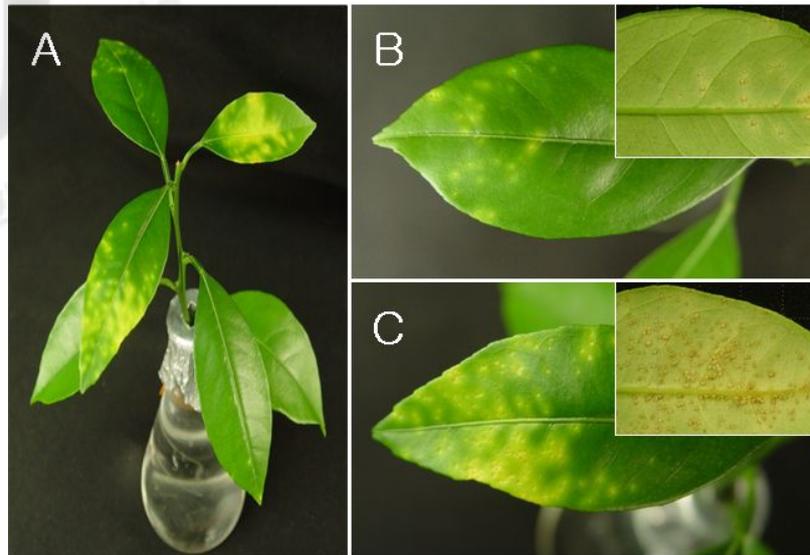


Fig. 1-4. Occurrence of citrus canker on citrus leaves(A) at 30 days after sprays-inoculated with *X. axonopodis* pv. *citri* *in vivo* test. The concentration of *X. axonopodis* pv. *citri* was 1.0×10^6 cfu/ml(B), 1.0×10^7 cfu/ml(C), respectively.

2) 식물근권세균의 항균활성에 의한 선발

a. 항균활성에 의한 선발

감귤궤양병원균이 도말된 TSA배지에서 중앙에 놓여진 식물근권세균의 현탁액이 처리된 8 mm의 paper 주변으로 저지원이 생겼다. 분리된 식물근권세균 중에 MRL408-3, TRH423-3, THJ609-3과 TRH415-2 등 4개의 균주가 병원균에 대해 생장저해효과가 있었으며, 저지원은 약제가 처리된 배지 중 streptomycin 0.1 g/L에서 생긴 저지원의 크기보다 비슷하거나 더 넓게 형성되었다 (Fig. 1-5).

한편, 병원균에 대한 효과적인 식물근권세균의 선발은 항진균 실험을 통해 1차적으로 이뤄졌으며, 시들음병을 유발하는 *Fusarium oxysporum*에 대해 저지원이 형성된 미생물을 선발하였고(오와 김, 2003; 강 등, 2005), 길항미생물에서 2,4-diacetylphloroglucinol, pyoluteorin, pyrrolnitrin 등의 항생물질이 생성되어 식물병원균에 대해 항균효과를 나타낸다고 보고되었다 (Raaijmakers 등, 2000).

b. 선발된 식물근권세균의 유전자염기서열분석을 통한 동정

감귤 궤양병원균에 대해 길항능력이 있는 식물근권세균 MRL408-3, TRH423-3, TRH415-2 및 THJ609-3을 ITS 38F와 72R의 primer를 이용하여 rDNA의 특정유전자를 증폭하였더니 MRL408-3와 TRH423-3는 700 bp에 유전자가 증폭되었고 TRH415-2와 THJ609-3은 각각 538 bp과 320 bp의 유전자가 증폭되었다 (Fig. 1-6). 증폭된 유전자의 염기서열 분석을 AB program에 의해 진행하고 NCBI의 Gene Bank에 등록된 균주들의 database에 대해 분석된 균주들의 DNA의 염기서열을 각각 비교한 결과 MRL408-3와 TRH423-3는 *Burkholderia gladioli*로 동정되었다. TRH415-2는 *Pseudomonas fluorescens*로, THJ609-3는 *Pseudomonas pudia*로 동정되었다.

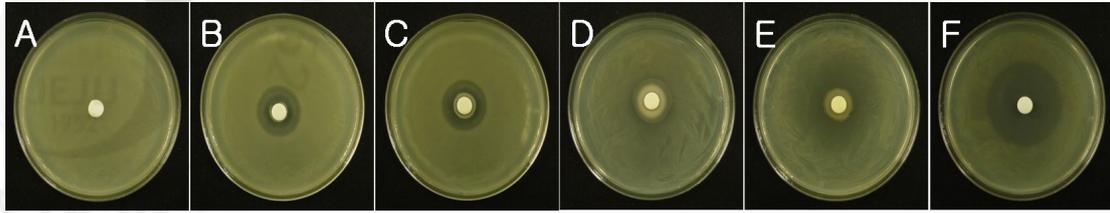


Fig. 1-5. Growth inhibition of *X. axonopodis* pv. *citri* by the selected bacterial 4 isolates on TSA medium. The presented TSA plates were untreated control(H₂O)(A), treated with MRL408-3(B), TRH423-3(C), TRH415-2(D), THJ609-3(E) and commercial fungicide Streptomycin[®](F). The concentration of anti-bacterial isolates and Streptomycin[®] were 1.0×10^7 cfu/ml and 10 g/L, respectively.

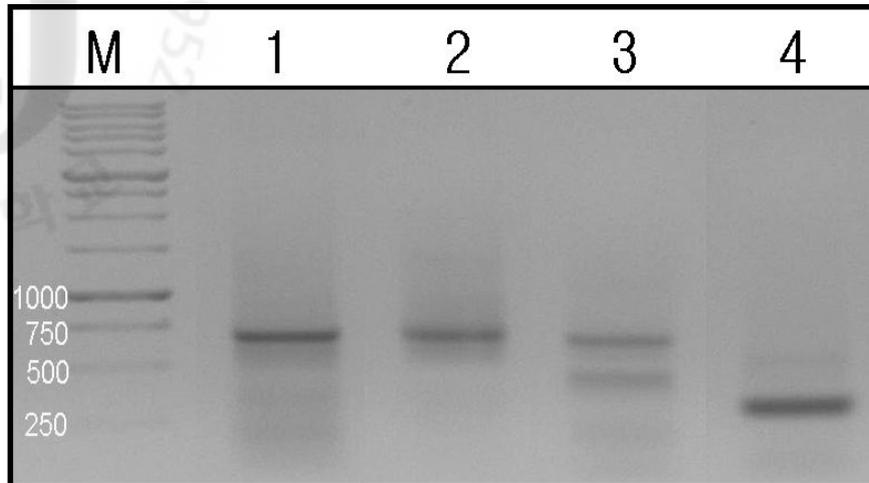


Fig. 1-6. Gel electrophoresis of PCR amplified 16S/23S internal transcript spacer regions from bacterial isolates MRL408-3(lane 1), TRH423-3 (lane 2), TRH415-2(lane 3) and THJ609-3(lane 4) using universal primers 38r and 72f. M:1kb Ladder (iNtRON Bio.)

3) 식물근권세균 처리에 의한 감귤궤양병 진전억제

a. 실내에서의 식물근권세균 처리에 의한 감귤궤양병 진전 억제

X. axonopodis pv. *citri*을 단독으로 절취된 6장의 감귤 잎이 있는 식물체에 처리하였더니 접종 7일에는 식물체의 가장 어린잎에도 병반이 발생하지 않았으며, 접종 15일부터 가장 어린 잎 뒷면에 병반이 형성되기 시작하였다. 접종 21일에는 병원균에 접종된 식물체의 6개의 잎 중 3~4개 이상, 잎 전체적으로 노랗게 형성된 병반을 확인하였다. 감귤 잎 한 개당 평균적으로 35개 이상의 병반이 발생하였다.

MRL408-3, TRH423-3, TRH415-2와 THJ609-3 등 4개의 식물근권세균을 *X. axonopodis* pv. *citri*와 각각 혼합하여 식물체에 처리하였더니 접종된 감귤 잎에 발생한 병반수가 *X. axonopodis* pv. *citri*을 단독으로 처리한 것보다 비교적 적게 발생되었다. 병원균과 각각 혼합 처리된 4개의 식물근권세균 중 MRL408-3과 TRH 423-3이 혼합처리가 가장 효과적으로 병반이 적게 발생되었다 (Fig. 1-7과 Table 1-1).

식물근권세균 MRL408-3, TRH423-3과 THJ609-3은 감귤궤양병원균의 생장을 억제했으며, 형성된 저지원을 형성하여 항진균 효과가 있음을 확인하였다. THJ609-3은 병원균에 대한 저지원 형성이 MRL408-3과 TRH423-3 보다 비슷하거나 넓게 형성되어 병원균에 대해 직접적으로 강한 군사 억제효과를 나타낸다고 생각되었으나, 병 진전 억제 실험의 THJ609-3은 병원균의 단독처리보다 식물병에 대한 억제력은 유의성 있게 나타났지만 MRL408-3과 TRH423-3에 비해 효과가 다소 낮았다.

식물근권세균에 의한 병원균의 군사생장억제력과 병 진전 억제력 사이에 항상 양의 상관관계가 성립하지는 않았다. 그 예로 *B. cereus*로 동정된 TRL2-3인 경우 감귤궤양병에 대해 항진균효과에 의해 선발되어 감귤열매에 접종된 역병원균의 진전을 억제하는 효과는 있었다. 반면, 감자궤양병에 대해서는 항진균 효과가 없었으나, 감자식물체에 처리하였더니 감자궤양병에 저항성이 유도되었다. 이러한 결과는 식물근권세균의 종 특이적인 성질로 식물근권세균의 처리에 의한 식물에서의 페놀화합물의 증가와 callose의 형성(Jeun 등, 2004), 식물근권세균에 의해

생성되는 siderophore, exopolysaccharide, Lipopolysaccharide(LPS)등의 물질(Jeun 등, 2004; Jung 등, 2007; Min 등, 2000) 또는 항생물질(Agrios, 2005; Joo 등, 2002) 등에 의해 병원균에 작용하여 포자수 및 발아관의 형성이 저하되는 것으로 보고되어 있어 식물체와 처리된 식물근권세균과의 상호작용으로 인한 것으로 생각되어진다.

in vivo 실험에서 *X. axonopodis* pv. *citri*과 식물근권세균을 각각 혼합하고 감귤의 신초에 분무하여 감귤궤양병 발병억제에 효과 있는 식물근권세균 MRL408-3, TRH423-3, TRH415-2와 THJ609-3 등 4개를 선발하였다.

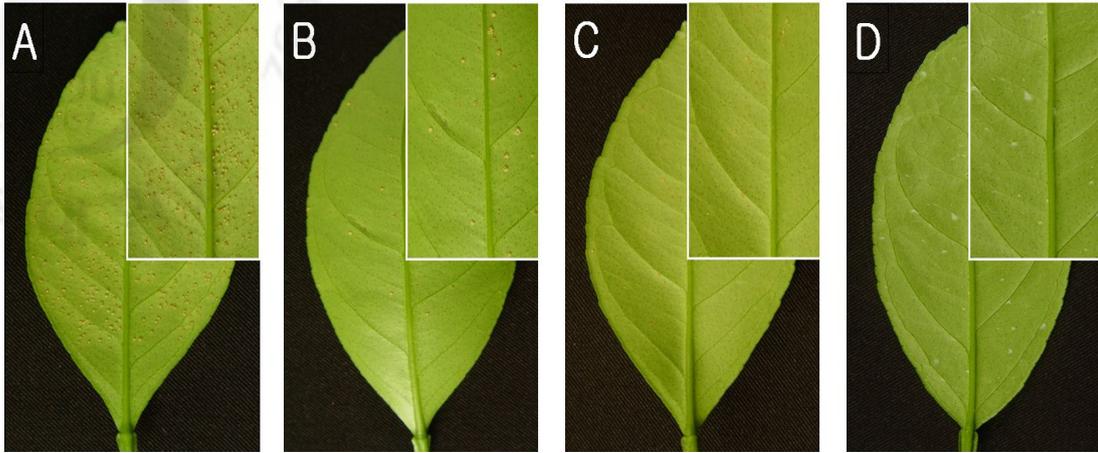


Fig. 1-7. Disease severity on citrus leaves at 20 days after inoculated with *X. axonopodis* pv. *citri* (1.0×10^7 cfu/ml)(A) and inoculated with mixture of citrus canker and bacterial isolates MRL408-3(B), TRH423-3(C) and pre-treated with commercial fungicide Streptomycin[®](D) *in vivo* test. The concentration of anti-bacterial isolates and Streptomycin[®] were 1.0×10^7 cfu/ml and 1 g/L, respectively.

Table 1-1. Lesion numbers on citrus leaves spray-inoculated with mixture of *X. axonopodis* pv. *citri* and rhizobacterial isolates *in vivo* test

Treatment ^a	Lesion number	Duncan ' s-test
<i>X. axonopodis</i>	35.2 ± 4.8 ^c	a ^d
MRL408-3	2.3 ± 0.7	c
TRH423-3	3.7 ± 1.8	c
TRH415-2	7.1 ± 1.6	c
THJ609-3	17.0 ± 2.5	b
Streptomycin ^{®b}	0.0 ± 0.0	c

^aThe inoculums were 1 : 1 mixture of *X. axonopodis* pv. *citri* and the bacterial isolates. The concentration of the bacterial isolates suspension and citrus canker of bacterial suspension *X. axonopodis* pv. *citri* were 2.0×10^7 cfu/ml. The untreated control, water was given instead of the bacterial isolates and sprays-inoculated with an only *X. axonopodis* pv. *citri* (1.0×10^7 cfu/ml).

^bThe concentration of the fungicide was 1 g/L.

^cValues represent means ± standard error of three separated experiments, each containing three plants of six leaves per treatment.

^dThe different letters are significantly ($P=0.001$) different according to Duncan's multiple test.

b. 포장에서 식물근권세균 처리에 의한 감귤궤양병 진전 억제

실험실에서 항균효과 및 감귤의 신초에 접종하여 발병억제 효과에 의해 선 발된 4개의 식물근권세균 MRL408-3, TRH423-3, THJ609-3과 TRH415-2 등의 현탁액을 감귤나무(품종: 궁천조생)의 2010년 출아된 신초에 각각 총 4회 분무했으며, 감귤궤양병의 이병엽율(%)과 병반수를 측정하였더니 무처리에 비해 식물근권세균을 전처리한 것이 감귤궤양병의 병반 발생이 현저히 감소하였다. 무처리는 3.0%로 다른 처리에 비해 신초의 이병엽률(%)이 높았으며, 이병된 잎에서도 병반이 3~4개 정도, 이병된 1개의 잎에서 최대 9~10개의 병반이 있는 잎도 관찰되었으며, 평균적으로 잎 1개당 1.53의 병반수를 확인할 수 있었다. 식물근권세균이 처리된 나무에서의 이병엽율이 0.3~1.5%로 비슷한 양상을 보였으며, 이병된 잎에서의 병반은 대부분이 1개였고, 평균적으로 잎 1개당 0.03~0.38의 병반수가 확인되었다. 식물근권세균 THJ609-3과 TRH415-2는 이병엽율에서는 차이가 없었지만, 잎에 발생된 감귤궤양병 병반수는 차이를 보였다. 그러나 두 세균은 이병수 및 병반수에서 무처리에 비해 유의적인 차이를 보였고, 두 그룹간의 유의적인 차이는 없었다 (Fig. 1-8과 Table 1-2). 실내시험 결과와 유사한 경향을 보였으며, 포장에서 전처리된 식물근권세균 MRL408-3과 TRH423-3은 4개의 식물근권세균 중 감귤궤양병에 대해 가장 효과적으로 병을 억제하였다.

2011년의 포장실험은 2010년과 동일한 감귤원에서 시행했으며, 동일한 방법으로 2011년에 발생한 신초가 굳기 전 4개의 식물근권세균을 각각 처리하였고, 8회의 약제 및 식물근권세균의 현탁액 처리 후 감귤궤양병의 병반수를 측정하였더니 무처리에 비해 식물근권세균을 전처리한 것이 감귤궤양병의 병반 발생이 현저히 감소한 것으로 나타나 2010년과 비슷한 결과를 확인하였다 (Fig. 1-9과 Table 1-3).

2010년에 시행된 포장실험은 봄에 발생한 신초에 주로 감귤궤양병이 발생되는 점을 고려하여 봄순을 대상으로 4회 처리하여 접종된 감귤궤양병에 대해 발병억제효과를 확인하였으나, 여름순과 가을순에는 효과를 확인하지 못했다. 2010년 8월의 집중호우 및 태풍 등의 영향으로 대조구, 약제처리 및 식물근권세균의 처리된 나무의 여름 및 가을에 발생한 신초에 감귤궤양병이 발생하였다. 2011년에는 감귤궤양병 방제시기인 6월초부터 봄순부터 여름순, 가을순이 발생하

는 9월까지 궤양병 방제기간을 설정하여 2010년과 동일하게 실험을 하였으며, 약제 및 식물근권세균을 8회 처리하여 봄순, 여름순, 가을순에 발병억제효과를 확인하였다.

*Burkholderia gladioli*는 오이에 발생하는 *Colletotrichum orbiculare*에 의한 오이탄저병과 *Pythium ultimum*에 의한 모잘록병 방제에 이용되고 있다 (Raupach and Kloepper, 1998; Bae 등, 2007). *Pseudomonas gladioli*는 오이덩굴쫄김병균인 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* 대한 억제 효과가 보고되었고(조 등, 1992), 토마토, 감자 등의 작물에 *Ralstonia solanacearum*에 의해 발생하는 풋마름병 피해를 *Pseudomonas putida* P84를 이용하여 억제했다고 보고되었다 (박 등, 2008). *Burkholderia gladioli*으로 동정된 MRL408-3과 TRH 423-3과 *Pseudomonas* 속으로 동정된 TRH415-2와 THJ609-3은 *in vivo* 실험뿐만 아니라 포장실험에서도 감귤궤양병에 대해 발병억제효과를 확인할 수 있었으며, 감귤원에서의 포장적용가능성을 시사해주고 있다.

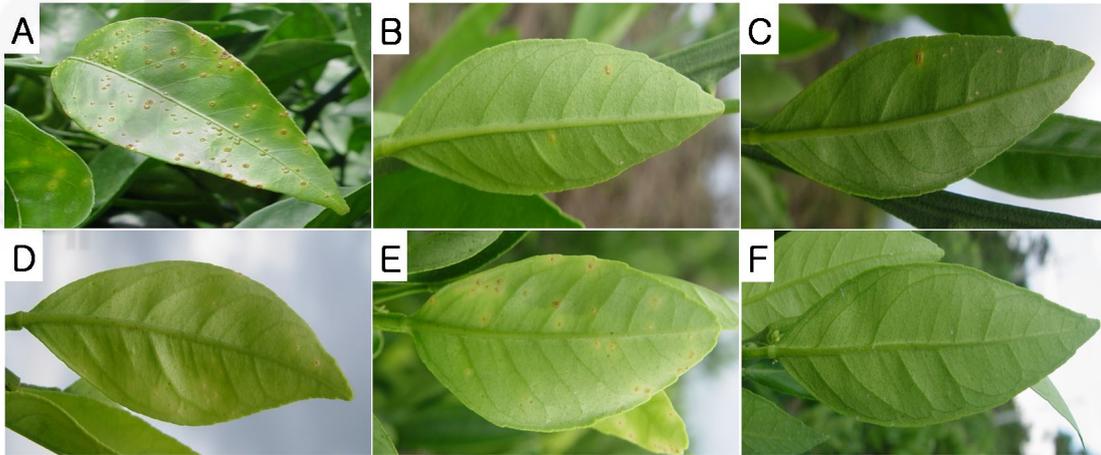


Fig. 1-8. Disease severity on citrus leaves at 7 days after inoculated with *X. axonopodis* pv. *citri* (1.0×10^7 cfu/ml) in the field experiment in 2010. Bacterial suspension of the isolates was pre-inoculated on citrus leaves 7 days before challenge inoculation with *X. axonopodis* pv. *citri*. The presented leaves were untreated control (A), pre-sprayed with MRL408-3 (B), TRH423-3 (C), TRH415-2 (D), THJ609-3 (E) and pre-treated with commercial fungicide Streptomycin[®] (F). The concentration of bacterial isolates and Streptomycin[®] were 1.0×10^6 cfu/ml and 1 g/L, respectively.

Table 1-2. Disease severity and lesion numbers on citrus leaves pre-inoculated with the selected bacterial isolates in the field experiments in 2010

Treatment ^a	Disease severity(%)	Lesion number
<i>X. axonopodis</i>	3.00 ± 0.30 ^c a ^d	1.53 ± 0.37 a
MRL408-3	1.17 ± 0.30 c	0.11 ± 0.09 b
TRH423-3	0.33 ± 0.22 c	0.03 ± 0.03 b
TRH415-2	1.50 ± 0.26 b	0.18 ± 0.06 b
THJ609-3	1.50 ± 0.26 b	0.38 ± 0.15 b
Streptomycin ^{®b}	0.17 ± 0.17 c	0.00 ± 0.00 b

^aThe bacterial isolates were pre-inoculated at 7 days before pathogen inoculation with *X. axonopodis* pv. *citri*(1.0×10^7 cfu/ml). The untreated control was sprays-inoculated with an only *X. axonopodis* pv. *citri*. The concentration of the bacterial isolates suspension was 1.0×10^6 cfu/ml. The bacterial isolates suspension and the commercial fungicide Streptomycin[®] were treated four times.

^bThe concentration of the fungicide was 1 g/L.

^cValues represent, means and standard error calculated using two hundred leaves per tree and three trees per treatment.

^dThe different letters are significantly ($P=0.001$) different according to Duncan's multiple test.

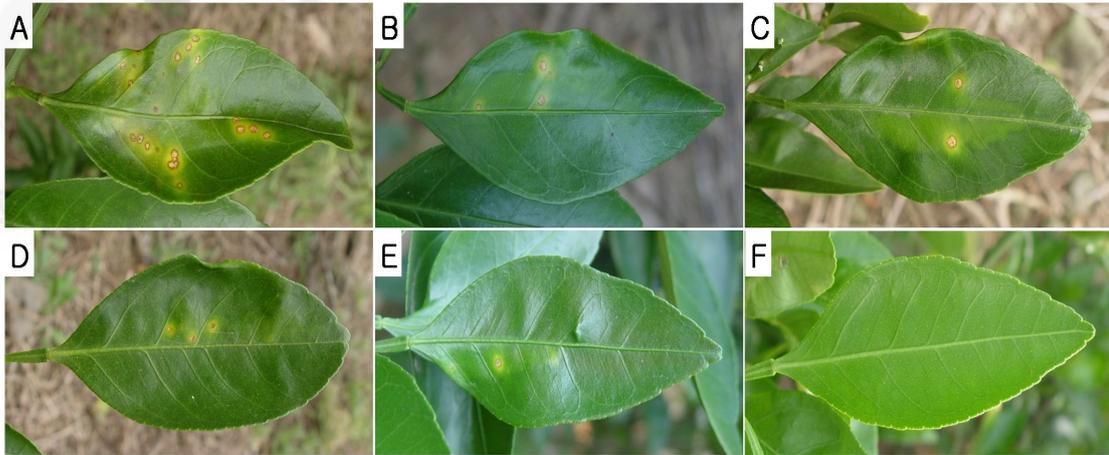


Fig. 1-9. Disease severity on citrus leaves at 7 days after inoculated with *X. axonopodis* pv. *citri* (1.0×10^7 cfu/ml) in the field experiment in 2011. Bacterial suspension of the isolates was pre-inoculated on citrus leaves 7 days before challenge inoculation with *X. axonopodis* pv. *citri*. The presented leaves were untreated control(A), pre-sprayed with MRL408-3(B), TRH423-3(C), TRH415-2(D), THJ609-3(E) and pre-treated with commercial fungicide Streptomycin[®](F). The concentration of bacterial isolates and Streptomycin[®] were 1.0×10^6 cfu/ml and 1 g/L, respectively.

Table 1-3. Disease severity and lesion numbers on citrus leaves pre-inoculated with the selected bacterial isolates in the field experiments in 2011

Treatment ^a	Disease severity(%)	Lesion number
<i>X. axonopodis</i>	68.67 ± 4.33 ^c a ^d	3.00 ± 1.10 a
MRL408-3	17.67 ± 9.68 bc	0.51 ± 0.18 b
TRH423-3	29.67 ± 12.25 b	0.70 ± 0.28 b
TRH415-2	6.33 ± 2.84 c	0.22 ± 0.16 b
THJ609-3	5.00 ± 2.65 c	0.07 ± 0.04 b
Streptomycin ^{®b}	1.33 ± 0.33 c	0.02 ± 0.01 b

^aThe bacterial isolates were pre-inoculated at 7 days before pathogen inoculation with *X. axonopodis* pv. *citri* (1.0×10^6 cfu/ml). The untreated control was sprays-inoculated with an only *X. axonopodis* pv. *citri*. The concentration of the bacterial isolates suspension was 1.0×10^6 cfu/ml. The bacterial isolates suspension and the commercial fungicide Streptomycin[®] were treated eight times.

^bThe concentration of the fungicide was 1 g/L.

^cValues represent, means and standard error calculated using two hundred leaves per tree and three trees per treatment.

^dThe different letters are significantly ($P=0.001$) different according to Duncan's multiple test.

4) 식물근권세균 처리에 의한 감귤궤양병 밀도 변화

X. axonopodis pv. *citri*와 식물근권세균을 혼합하여 절취된 6장의 감귤 잎이 있는 식물체에 접종하고 1일, 7일, 14일째에 접종된 잎 표면을 세척하여 그 액을 TSA배지에 배양하여 *X. axonopodis* pv. *citri*의 colony를 관찰하였더니, *X. axonopodis* pv. *citri*를 단독처리하였을 때는 접종 잎 표면에서 접종 1일째보다 7일째에서 *X. axonopodis* pv. *citri*의 수가 점차적으로 증가됨을 보였다. 14일째는 7일째와 유사한 균 밀도를 확인하였고 1일째보다 20배 이상의 균 증가를 보였다.

X. axonopodis pv. *citri*와 식물근권세균 MRL408-3의 혼합처리에서는 *X. axonopodis* pv. *citri*의 수가 접종 1일째, 7일째, 14일째 뚜렷한 차이 없이 비슷하였다. *X. axonopodis* pv. *citri*와 식물근권세균 TRH423-3의 혼합처리에서는 *X. axonopodis* pv. *citri*와 식물근권세균 MRL408-3의 혼합처리와 유사한 결과를 보였다. *X. axonopodis* pv. *citri*와 식물근권세균 TRH415-2의 혼합처리, *X. axonopodis* pv. *citri*와 식물근권세균 THJ609-3의 혼합처리에서도 접종 1일째보다 7일째에 병원균의 수가 증가되었으나, 14일째는 7일째와 유사하였다. *X. axonopodis* pv. *citri*와 식물근권세균의 처리는 *X. axonopodis* pv. *citri*의 단독처리보다 1일째에 *X. axonopodis* pv. *citri*의 수가 적었으며 7일째, 14일째에도 큰 차이로 감소함을 확인하였다. *X. axonopodis* pv. *citri*의 단독처리에서는 접종 1일째보다 14일째에 병원균의 밀도가 증가하였지만, 병원균과 식물근권세균의 혼합처리에서는 증가되지 않았기 때문이라 생각된다.

한편, 감귤 잎을 세척한 액에서의 총미생물 수는 *X. axonopodis* pv. *citri*의 단독처리, *X. axonopodis* pv. *citri*과 식물근권세균 혼합처리에서 접종 1일째부터 7일째까지 점차적으로 증가하였고, 7일째와 14일째는 뚜렷한 차이 없이 비슷하였다(결과미제시). 또한 *X. axonopodis* pv. *citri*의 단독처리와 *X. axonopodis* pv. *citri*과 식물근권세균의 혼합처리를 비교하였더니 큰 차이를 나타내지 않았다. 이러한 결과는 처리된 식물근권세균에 의해 생성되는 항생물질뿐만 아니라 종 특이적인 성질에 의해 병원균에 작용하여 포자의 형성이 저하되는 것으로 생각되어진다.

접종 1일째, 7일째, 14일째의 세척액을 TSA배지에 배양하여 형성된 colony

중 *X. axonopodis* pv. *citri*로 추정되는 균을 각각 12개씩, 총 36개의 미생물을 선별하였고, 분자생물학적 방법에 의해 추출된 DNA에서 *X. axonopodis* pv. *citri*의 특정 primer로 PCR을 하였더니 36개의 미생물에서 250bp에서 밴드를 확인하였다. 세척액을 배양한 배지에서 생긴 colony를 육안으로 관찰하여 분리된 미생물들이 분자생물학적 방법에 의해 *X. axonopodis* pv. *citri*임을 확인할 수 있었고, 병원균의 수를 객관적으로 측정되어졌다고 판단된다.

Table 1-4. Total numbers of *X. axonopodis* pv. *citri* in the washed suspension from the citrus leaves surface after treatments of *X. axonopodis* pv. *citri* and mixture of citrus canker and bacterial isolates

Treatment ^a	Total numbers of <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> (cfu/ml) ^b		
	1 days	7 days	14 days
<i>X. axonopodis</i>	5.2×10^4 ^c	1.2×10^6	1.3×10^6
MRL408-3	2.1×10^4	2.4×10^4	1.7×10^4
TRH423-3	1.9×10^4	4.7×10^4	1.0×10^4
TRH415-2	1.1×10^4	3.1×10^5	2.1×10^5
THJ609-3	1.7×10^4	5.5×10^4	5.4×10^4

^aThe inoculums were 1 : 1 mixture of *X. axonopodis* pv. *citri* and the bacterial isolates. The concentration of the bacterial isolates suspension and citrus canker of bacterial suspension *X. axonopodis* pv. *citri* were 2.0×10^7 cfu/ml. The untreated control, water was given instead of the bacterial isolates and was sprays-inoculated with an only *X. axonopodis* pv. *citri* (1.0×10^7 cfu/ml).

^bPlates of TSA medium treated with the washed suspension from the citrus leaves were incubated at 28°C for one day and then the total number of *X. axonopodis* pv. *citri* was counted after incubation at 15°C for 5 days.

^cValues represent means of three separated experiments, each containing three plants of six leaves per treatment.

2. 식물근권세균 처리에 의한 감귤역병 억제

(1) 연구배경

전 세계적으로 감귤 역병은 *P. citrophthora*, *P. nicotianae*, *P. citricola*, *P. palmivora* 등에 의해 발생되며(Erwin and Ribeiro, 1996; Graham and Menge, 2000), 그 중에서 *P. citrophthora*는 유자, 레몬, 오렌지, 부지화, 감귤, 복숭아 등에 감염하여 넓은 기주범위를 갖는다 (Hyun 등, 2004; Jee, 1999; Thomidis, 2002). *Phytophthora*(역병균)는 토양 내에서 발생하는 주요 토양전염성 병원균으로, 토양 내에 난포자(卵孢子) 상태나 썩은 과실에서 월동하여 2년 이상 생존이 가능하며, 강우량이 많을 때 유주자낭이 과실로 튀기면서 전염되기 때문에 수관 하부의 과실부터 주로 전염된다. 감귤역병의 초기 병징은 불규칙한 갈색점무늬가 나타나면서 과실전체에 빠르게 확산 된다. 습한 조건에서 하얀 균사가 과실 표면에 급속하게 자라고, 병이 진전되면서 과실을 썩히게 한다. 역병균은 물속에서 유주자낭과 난포자를 쉽게 대량으로 형성하는 수생균의 일종으로 관개수가 오염이 되면 관수된 포장에 발생하는 경우도 많다 (Song 등, 1997; Zitko 등, 1991). 제주에서 최근에 발생한 감귤역병을 조사하였더니 주로 과실의 병반에서는 *P. citrophthora*, 땅가줄기썩음병반에서는 *P. nicotianae*만 분리 되었다 (Hyun 등, 2001).

제주의 온주밀감은 *Phytophthora sp.*에 저항성인 탕자를 주로 대목으로 사용하여 품종을 육성하므로써 뿌리 또는 지재부, 수지 등에 발생하는 병이 크게 문제가 되지는 않았다. 하지만 태풍 또는 폭우 등 기상의 악조건으로 인해 1998년, 1999년에 돌발적으로 과실에 역병이 대발생하여 50%이상 감귤이 낙과되는 등 큰 피해를 입은 과원이 발생했으며, 또한 하우스재배에서도 포장에 따라 종종 역병이 심하게 발생했다 (Hyun 등, 2001). 주로 6~7월의 장마철뿐만 아니라 기후변화에 의해 9, 10월에 돌풍 및 폭우로 인해 강우량이 증가되는 경향을 보이고

있다. 장마철에 비해 병해충 발생빈도는 크지는 않지만, 강우일수와 강우량의 증가로 과원 및 지역에 따라 침수지역이 발생하고 있으며, 이로 인해 감귤역병이 발생하고 있으며 주로 화학적 방제가 이루어지고 있다 (Hyun 등, 2004; 현, 2008). 감귤역병에 대해 방제는 cyazofamid(미리카트[®], 경농) 또는 dimethomorph(포름[®], 동방아그로) 등의 농약을 이용한 화학적 방제가 주로 이루어진다 (제주도특별자치도 제주·서귀포시청 친환경감귤농정과, 2007).

본 연구는 감귤역병에 대해 친환경적인 방제 수단을 탐구하고자 식물에서 분리한 식물근권세균들을 이용하여 *in vitro*에서 활성 검증 및 생물검정 시험을 통해 역병에 대한 효과적인 예방 및 방제 가능성을 확인했으며, 생물적 방제제로 유용될 수 있는 식물근권세균을 중심으로 DNA의 특정부위 염기서열 분석을 통한 동정을 수행하였다.

(2) 재료 및 방법

1) 식물근권세균의 감귤역병균에 대한 항균 활성

a. 식물근권세균의 분리

식물근권세균의 분리 및 보관은 ‘Ⅲ. 연구내용; 1. 식물근권세균 처리에 의한 감귤궤양병 억제; (2) 재료 및 방법; 2) 식물근권세균의 항균활성에 의한 선발; a. 식물근권세균의 분리’에서의 방법과 동일하게 수행하였다.

b. 항균활성에 의한 선발

식물근권세균 중에서 여러 가지 식물병원균에 대해 항미생물 효과가 확인된 12가지의 균주를 선택하여 실험에 이용하였다. 선택된 식물근권세균을 각각 tryptic soy agar(TSA)배지에 옮긴 후 28℃에서 48시간 동안 배양하였다. 감귤역병을 일으키는 *Phytophthora citrophthora*을 Korea Agricultural Culture Collection(KACC)에서 분양받아 V-8 agar(V8A)⁴⁾에 옮긴 후 25℃에서 7일 동안

배양하였다.

미리 준비된 potato dextros agar(PDA; Becton, Dickson and Company, France)⁵⁾에 감귤역병균이 배양된 배지(직경 5 mm)를 절취하여 PDA의 직경 1/3 지점에 병원균을 치상하였다. 2일 경과 후 각각의 식물근권세균이 배양된 TSA배지를 병원균과 같은 방법으로 절취하였고 병원균이 치상된 배지에서 반대편의 직경 1/3지점에 치상하여 25℃에서 8일 동안 대치 배양하였다.

식물근권세균의 감귤역병균에 대한 항균 활성은 대치된 식물근권세균의 반대편에서 생장한 감귤역병균사체의 길이에 대한 식물근권세균과 대치 배양으로 인해 생장이 억제된 균사체의 길이의 비로 나타내었다.

2) 식물근권세균 처리에 의한 감귤역병 억제

a. 식물근권세균 현탁액 작성

선발된 식물근권세균을 각각 TSA배지에서 28℃에서 48시간 동안 배양하였다. 배양된 배지에 10ml의 살균수를 넣고 loope를 이용하여 현탁액을 만든 후 UV-Visible Spectrophotometer (Varian Aust, AU/CARY 50 Conc.)를 이용하여 세균농도를 측정 한 후 농도를 1.0×10^7 cfu/ml가 되도록 조정하였다. 감귤역병에 대한 식물근권세균의 억제효과를 비교하기 위해 한국작물보호협회에 등록되어 있는 살균제 cyazofamid(유효성분 10%, 미리카트[®], 경농)를 농약사용지침서에 따라 660 μ l/L의 농도(사용약량 13.3 ml/20L)로 조정하여 준비하였다.

b. 감귤열매에 식물근권세균 현탁액 처리

2009년 9월부터 2010년 1월까지 제주도 서귀포시 남원리 소재의 무농약 재

4) V-8 agar(V8A) 제조

: V8 juice 100ml, CaCO₃ 1g, D.W 900ml을 섞어 pH 7.0을 보정한 다음 agar 15g을 넣고 멸균하여 사용하였다.

5) potato dextros agar(PDA) 제조

: potato starch 4.0g, dextrose 20.0g, agar 15.0g이 포함된 PDA 39.0g을 D.W 1L에 섞어 멸균하여 사용하였다.

배된 과원에서 감귤열매의 8번과(직경 70 mm)에 해당하는 감귤을 채집하여 실험에 사용하였다. 준비된 식물근권세균의 현탁액(1.0×10^7 cfu/ml)에 tween 20을 총부피의 0.01%가 되도록 첨가한 후 감귤의 과피가 흥건히 젖을 정도로 분무하였다. 감귤의 과피에 처리된 현탁액이 건조될 때까지 실온(20°C)에서 자연 건조하였다.

식물근권세균의 현탁액에 대신하여 음의 비교구로 살균수를 처리하였고, 양의 비교구로서 cyazofamid를 동일한 방법으로 처리하였다.

c. 감귤역병균 접종

감귤역병 접종원은 항균활성을 위한 실험과 동일하게 작성하였으며 배양된 역병균 균사체를 cork borer(직경 7 mm)로 떼어내어 접종원으로 준비하였다. 감귤의 과피에 처리된 식물근권세균 현탁액이 건조된 후 한 개의 감귤 열매에 서로 다른 3부분의 각각 4개씩 살균된 침으로 과피에 상처를 냈다. 상처를 낸 직후 접종원으로 준비된 배지조각을 역병균의 균사가 감귤의 과피 표면에 닿게 접종하였다. 접종된 열매를 습도 100%를 유지하도록 습실 처리된 용기(340 × 270 × 93 mm; 가로×세로×높이)에 넣고 28°C 배양기에서 보관하였다.

시험구는 완전임의법에 의해 배치하였으며, 각 처리는 감귤열매 9개씩 완전 분리된 실험으로 4반복하였다.

d. 감귤역병 감염정도 조사

감귤역병균에 의해 감염된 병반의 직경을 접종 5일 후에 버니어캘리퍼스로 측정하였다. 시험결과는 분산분석과 처리평균 사이의 비교를 위하여 Duncan검정 ($P=0.001$)을 실시했으며, Statistical Analysis System(SAS Institute, version 8.02) program을 이용하였다.

3) 효과적인 식물근권세균의 유전자염기서열분석을 통한 동정

감귤역병균에 대해 항진균 효과 및 열매에 접종된 역병균의 발병억제효과

가 있는 식물근권세균을 분자생물학적 분석방법으로 제시된 'Ⅲ. 연구내용; 1. 식물근권세균 처리에 의한 감귤궤양병 억제; (2) 재료 및 방법; 2) 식물근권세균의 항균활성에 의한 선발; c. 선발된 식물근권세균의 유전자염기서열분석을 통한 동정'과 동일하게 수행하였다.

(3) 결과 및 고찰

1) 식물근권세균의 감귤궤양병균에 대한 항균 활성

식물근권세균의 항진균성을 조사하기 위해 감귤궤양병과 대치 배양하였더니, 배양 10일 후 병원균의 생장에 뚜렷한 차이가 나타나서 식물근권세균의 반대쪽에서 성장한 감귤궤양병의 균사체의 길이가 평균 32.6~34.9 mm인데 반해 식물근권세균 쪽 방향으로 성장하는 균사체의 길이는 평균 13.9~22.5 mm로 균사 생장이 억제되었다 (Fig. 2-1와 Table 2-1). 대부분의 식물근권세균에 의해 균사생장 억제가 50%이상을 나타냈었으나 TRL2-3과 KRY505-3는 평균 33.0%로 가장 낮은 항진균활성을 나타내었다 (Fig. 2-1E, 1F와 Table 2-1).

한편, 병원균에 대한 효과적인 식물근권세균의 선발은 항진균 실험을 통해 1차적으로 이뤄졌으며, 이러한 연구는 *Fusarium oxysporum*에 의해 발병되는 시들음병균에 대해 항진균효과 실험을 통해 저지원이 형성된 미생물을 선발했으며(오와 김, 2003; 강 등, 2005), 길항미생물에서 2,4-diacetylphloroglucinol, pyoluteorin, pyrrolnitrin 등의 항생물질이 생성되어 식물병원균에 대해 항균효과를 나타낸다고 보고되었다 (Raaijmakers 등, 2000).

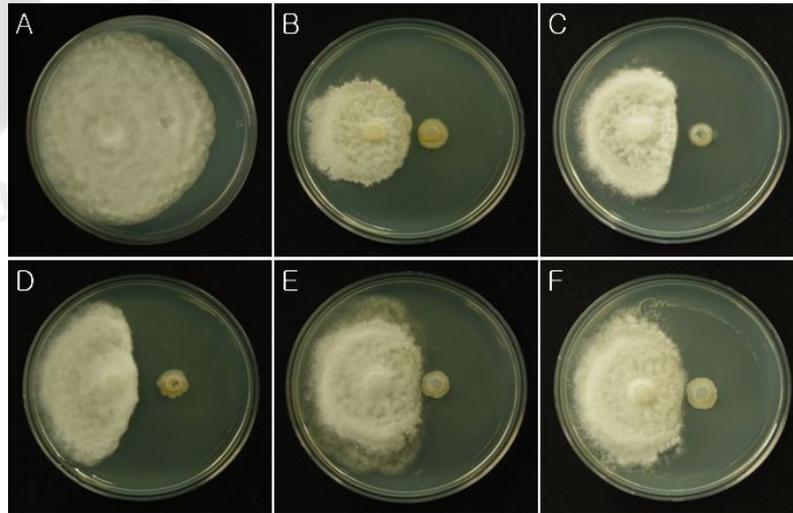


Fig. 2-1. Inhibition of mycelium growth of *Phytophthora citrophthora* by antifungal bacterial isolates MRL409-2(no anti-fungal activity)(A), THJ609-3(B), TRH423-3(C), BRH433-2(D), TRL2-3(E), KRY505-3 (F) on the PDA medium. The present photographs were at 10 days after incubation.

Table 2-1. Mycelium of growth inhibition of plant pathogen *Phytophthora citrophthora* by anti-fungal bacterial isolates from plant rhizosphere

Bacterial strains	Growth on PDA(mm)		Inhibition rate ^a of mycelium growth(%)
	Site of rhizobacteria	Opposing site of rhizobacteria	
MRL409-2 ^b	42.34 ± 0.76 ^c	34.66 ± 0.40	-0.22
THJ609-3	15.21 ± 1.30	33.19 ± 0.87	54.2
TRH423-3	13.90 ± 1.04	32.61 ± 1.36	57.2
BRH433-2	15.43 ± 0.96	34.88 ± 0.46	55.8
TRL2-3	22.86 ± 1.48	34.20 ± 0.64	33.2
KRY505-3	22.50 ± 1.95	33.82 ± 0.34	33.5

^aInhibition rate(%) = [1 - (length of fungal colony near the strain / length of fungal colony opposite of the strain)] × 100.

^bNo anti-fungal activity.

^cValues represent means ± standard deviation of three separated experiments, each containing four plates per treatment.

2) 식물근권세균 처리에 의한 감귤역병 억제

식물병원균에 대해 항미생물 효과가 있는 12개의 균주를 감귤의 과피에 분무 처리 후 감귤역병을 접종한 결과 THJ609-3, TRH423-3, BRH433-2, TRL2-3, KRY505-3 등 5개의 균주에서 역병 진전 억제효과를 확인하였다 (Fig. 2-2와 Table 2-2).

무처리에서 감귤역병균에 의해 발생된 과피의 병반 크기는 평균 36.6 mm였으며, 발병된 병반에서 다시 병원균을 분리하여 검정한 결과 감귤역병의 특징과 동일함을 확인할 수 있었다. 무처리에서의 병진전은 접종 2일째부터 과피가 연한 갈색으로 변하면서 점차 흑갈색으로 변하면서 괴사되었다. 접종 3일째 과피가 물러졌던 병반부위의 표면에서 감귤역병의 흰색 균사를 확인했으며, 접종 5일째 병징이 진행됨에 따라 병반부위에 역병의 균사가 도포되는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2-2A, 1B).

그러나 식물근권세균 TRH423-3, BRH433-2, TRL2-3, KRY505-3을 처리한 감귤에서는 병진전이 지연되어 무처리보다 하루 늦은 접종 3일째에 과피에 병징이 나타나기 시작했으며, 접종 5일째에는 단지 소수의 병반에서만 역병의 표징을 관찰할 수 있었다. 병반 크기도 작아져서 TRH423-3, BRH433-2, TRL2-3, KRY505-3을 처리한 감귤에서 병반의 직경은 평균 각각 31.4 mm, 30.0 mm, 27.1 mm, 27.6 mm로 무처리한 비교구에 비해 유의성 있게 병 발생이 억제되었다 (Fig. 2-2D, 1E, 1F, 1G와 Table 2-2). THJ609-3을 처리한 감귤에서의 병반은 33.3 mm로 유의성은 없었지만 역병 억제효과는 나타났다 (Fig. 2-2C와 Table 2-2). 양의 비교구로 시판농약인 cyazofamid가 함유된 약제를 처리한 감귤에서는 병진전이 매우 억제되어 병반크기가 평균 20.0 mm로 식물근권세균을 처리한 감귤보다 높은 방제효과를 나타냈다 (Fig. 2-2H과 Table 2-2). 각 근권세균들은 감귤역병에 대해 반복 간에 균일한 발병지연효과를 나타냈다 (Table 2-2).

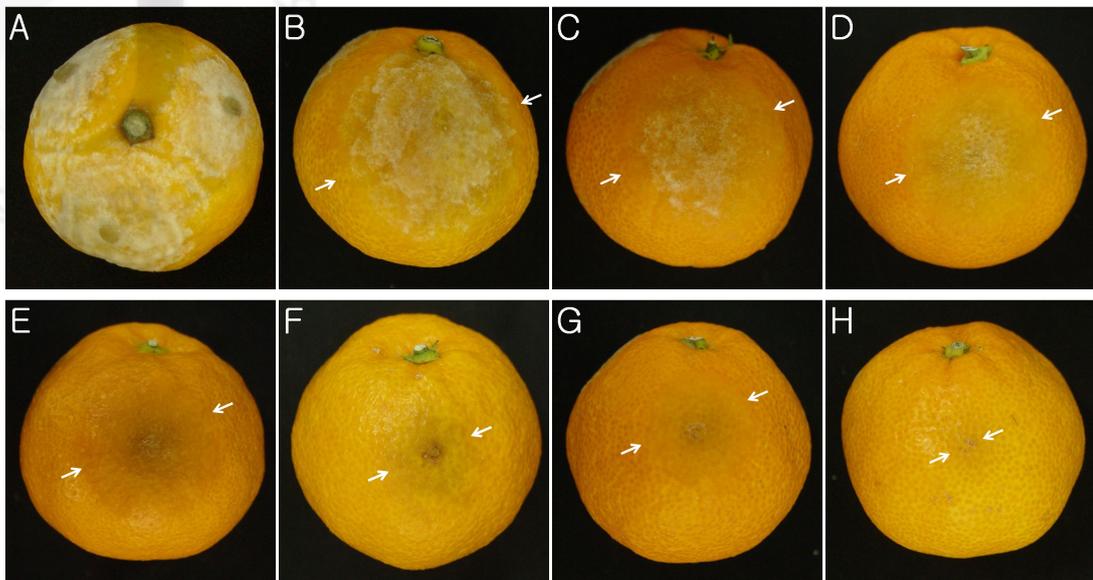


Fig. 2-2. Suppression of disease severity on the citrus fruits pre-treated with suspension of antifungal bacterial isolates THJ609-3(C), TRH423-3(D), BRH433-2(E), TRL2-3(F), KRY505-3(G) and commercial fungicide Cyazofamid[®](H) and untreated control(A and B) at 5 days after inoculation with late blight pathogen *Phytophthora citrophthora*. The concentration of antifungal bacterial isolates and Cyazofamid[®] were 1.0×10^7 cfu/ml and $660 \mu\text{l/L}$, respectively. The arrows indicate the measure points of lesion diameter.

Table 2-2. Lesion diameter on the citrus fruits pre-treated with effective bacterial isolates, Cyazofamid[®] and untreated control at 5 days after pathogen inoculation with *Phytophthora citrophthora*

Treatments	Lesion diameter (mm)	Duncan's test ^d
Untreated control	36.58 ± 1.14 ^c	a
THJ609-3 ^a	33.29 ± 1.51	ab
TRH423-3	31.39 ± 1.34	bc
BRH433-2	30.02 ± 1.65	bc
TRL2-3	27.12 ± 1.15	c
KRY505-3	27.61 ± 1.72	c
Cyazofamid ^{®b}	20.07 ± 1.49	d

^aThe bacterial isolates were pre-inoculated at 2 hours before pathogen inoculation with *Phytophthora citrophthora*. The concentration of the bacterial suspension was 1.0×10^7 cfu/ml. The untreated control, H₂O was given instead of the bacterial suspension.

^bThe concentration of the fungicide was 660 µl/L.

^cValues represent means ± standard error of four separated experiments, each containing nine fruits per treatment.

^dThe different letters are significantly ($P=0.001$) different according to Duncan's multiple test.

3) 효과적인 식물근권세균의 유전자염기서열분석을 통한 동정

감귤역병에 대한 억제력이 있는 식물근권세균을 ITS primer를 이용하여 rDNA의 특정유전자 염기가 증폭하여 동정하였다. 증폭된 유전자의 염기서열분석을 AB program에 의해 진행하여 TRH423-3, TRL2-3, KRY505-3은 각각 761bp, 268bp, 266bp의 sequence을 확인하였고, BRH433-2는 340bp와 241bp 두개의 sequence가 나타났다. NCBI의 Gene Bank에 등록된 균주들의 database에 대해 분석된 균주들의 DNA 염기서열을 각각 비교했더니, TRH423-3(NCBI NO. EF552070.1)은 *Burkholderia gladioli*로 동정되었고, TRL2-3(NCBI NO. EJ932354.1)와 KRY505-3(NCBI NO. EV915688.1)는 *Bacillus cereus*로 동정되었으며 BRH433-2의 두개의 sequence는 *Bacillus circulans*(NCBI NO. AF478111.1)로 동정되었다.

여러 가지 작물에서 피해를 주는 식물병에 대해 방제를 목적으로 선발된 미생물에는 *Bacillus*속, *Burkholderia*속 그리고 *Pseudomonas*속 등 여러 종이 포함되어 있다 (Jung 등, 2007; Raupach and Kloepper, 1998; Winding 등, 2004). 그중 *Bacillus*속 세균을 단독으로 사용하거나 다른 살균제와 혼합 또는 교차 적용하여 인삼의 점무늬병과 잔디의 피시움마름병 등 다양한 식물 병의 진전을 저해하였다 (Li 등, 2008; Jung 등, 2006). 특히 *Bacillus cereus*는 널리 알려진 길항세균으로 벼·오이에서 발생하는 *Pythium* spp.에 의한 모잘록병에 대한 억제 효과가 보고되었으며(Sim 등, 2008; Smith 등, 1993), 담배 및 알파파에서 *Phytophthora* spp.에 의한 역병에서도 방제력이 있는 것으로 나타났다 (Handelsman 등, 1991; Handelsman 등, 1990). 또한, *Burkholderia*속에 속하는 세균도 콩과식물에 발생하는 oomycete의 병원체에 의한 모잘록병과 노균병에 효과가 있었다 (Clark and Parke, 1996; Heunguns and Parke, 2000).

*Bacillus*속에는 plant growth promoting rhizobacterium (PGPR)에 속하는 세균이 여러 종이 있으며(Jung 등, 2007; Park 등, 2007) 이들은 주로 식물 뿌리 주변에 생육하면서 식물에 직·간접적으로 영양(Kloepper 등, 2004)을 미치면서 생물적 방제에 이용되는 중요한 미생물그룹이다. *Bacillus*속 세균을 이용해 토양 중의 잔류된 농약을 분해(Yang 등, 2007)하거나 다양한 항생물질의 생산으로 생

물적 방제제(Bae 등, 2004; Jung 등, 2007; Weller, 1988)로 활용되고 있으며, *Bacillus* 단독으로 사용할 수 있을 뿐만 아니라 다른 살균제와 혼합 또는 교차 방제하여도 효과가 증진되었다 (Li 등, 2008).

이 중 *Bacillus cereus*를 식물에 처리했더니, 콩(Halverson 등, 1991)의 뿌리생장을 발달시켰고, 벼(Gilbert 등, 1996; Sim 등, 2008)에서 발생하는 *Pythium* spp을 비롯하여, 담배(Handelsman 등, 1991), 오이(Smith 등, 1993), 알과파(Handelsman 등, 1990), 토마토(Smith 등, 1999) 등 oomycete 병원체에 의해 발생하는 식물병을 억제하였다. 이와 관련된 몇몇 균주들은 선발되어 고추 (Shen 등, 2005), 배추(Murakami 등, 2000), 토마토(Park 등, 2007)등 다양한 작물의 농업생산에 이용되고 있다.

한편, 식물근권세균 THJ609-3는 감귤역병균에 대해 높은 균사생장억제활성을 나타냈지만 다른 식물근권세균에 비해 감귤역병에 대한 발병 억제효과가 다소 낮았다 (Table 2-2). 반대로 KRY505-3에 의한 감귤열매의 역병억제력은 유의성있게 나타났으나 역병균의 균사생장억제력을 낮았다. 이는 식물근권세균에 의한 역병균 균사생장억제력과 병진전 억제력 사이에 항상 양의 상관관계가 성립하지는 않는다는 것을 의미한다. 이와 유사한 결과로 건전한 잔디의 근권에서 미생물을 분리하여 *Fusarium oxysporum*과 *Rhizoctonia solani*에 대한 길항효과 실험 및 multi well tissue culture plate 실험(*Pythium* spp.와 *Rhizoctonia solani* 등의 병원균이 각각 혼합된 배양토에 잔디의 종자를 파종 후, 길항미생물을 관주)으로 잔디뿌리의 병 발생억제를 조사한 결과 최종 bacteria 8균주와 actinomycetes 2균주를 선발하였고, 이 결과를 토대로 Pot에서 파종 30일된 잔디의 토양에 병원균을 접종하고 길항미생물을 관주하여 *Pythium* spp.에 의한 잔디의 피시움마름병과 *Rhizoctonia solani*에 의한 갈색마름병에 대해서 방제효과를 조사하였더니 bacteria 4균주는 길항효과, Plate 실험 및 Pot 실험 등 모두에서 효과가 있었으나, 또 다른 bacteria 4균주와 actinomycetes 2균주는 길항효과실험과 Plate 실험에서 병 발생 억제효과를 보였으나 Pot 실험에서 효과가 미미했다고 보고하였다 (Lee 등., 1997).

최근까지 감귤역병에 대해 농약 이외엔 특별한 방제대책이 없지만 환경요인에 의해 돌발적으로 병이 발병했을 때 생물적 방제인자로 개발되는 미생물을

이용한다면 농약 사용량의 절감 및 잔류를 방지하는데 적합하며, 농약 사용이 제한된 친환경농업 실천 농가에서 농약 대체 수단으로 매우 유용하게 활용될 수 있다고 생각된다.

3. 식물근권세균 처리에 의한 감귤검은점무늬병에 대한 방제 효과

(1) 연구배경

감귤류에 발생하는 식물병에는 바이러스를 포함하여 세계적으로 68종 이상의 병이 보고되었으며(Timmer 등, 2000), 우리나라의 제주지역에서 재배되고 있는 감귤류에는 바이러스 병을 포함하여 35종이 병이 보고되었다 (현 등, 2002). 감귤원에서 발생하는 병해는 많지만, 주로 문제가 되는 식물병으로는 검은점무늬병, 더덩이병 및 궤양병 등이며, 특히 *Diaporthe citri*에 의해 발병되는 검은점무늬병은 잎, 가지, 과실에 발생하고, 과실의 수량 및 과실표면에 흑점형, 니괴형, 누반형 등의 증상으로 과실의 품질에 관여된 상품성을 크게 떨어뜨려 감귤재배 농가의 경제적 피해를 발생시키는 원인이 된다. 제주지역에서 검은점무늬병은 감귤나무에서 새순이 5월에 발생한 후 새순이 굳기 직전인 6월 상순부터 발생하기 시작하여 강우가 많은 시기인 6월 중순부터 8월까지 잎, 가지, 열매 등에 발생량이 많으며, 9월 하순까지 발병하기도 하여 검은점무늬병의 방제를 농가에서는 크게 신경을 쓰고 있는 실정이다(권, 1996; 권 등, 2003).

검은점무늬병의 발병에 의한 피해는 무방제구에서 95%이상의 피해과율이 발생되는데, 유목에서는 거의 발생하지 않고, 15년 이상 된 성목에서 많이 발생한다고 보고되었다. 이는 마른가지나 과경 등이 오래된 성목에 많이 분포하고 있기 때문이라 판단되며, 1980년대에 들어오면서 감귤재배 면적의 증가, 감귤나무가 성목화 되면서 감귤원이 밀식되었고, 검은점무늬병의 발생 원인이 되어 주요 방제 대상이 되고 있다 (고 등, 1998; 권 등, 2003; 허와 박, 2005).

국내 주요 과수류 중 감귤은 단위면적당 농약사용량이 가장 많은 것으로 조사됐으며, 감귤에 발생하는 식물병 방제를 위해 농약을 과다사용하고 있는 실정이다. 감귤 재배시 사용되는 농약 중 Mancozeb의 사용량이 전체 65%를 차지하는데, Mancozeb 유래된 농약은 감귤뿐만 아니라 과수 수출시 상대국의 농약잔

류허용기준에 의해 사용을 제한하거나 검출되어서는 안되는 농약으로 분류되어 사용을 금하고 있다 (고 등, 1998; 김 등, 2005; 임 등, 2003). 농산물의 안전성의 요구는 점차 채소에서 과실류로 확대되었고, 감귤의 친환경 재배에 대한 관심도가 높아졌다. 유기농이나 무농약 재배 감귤원에서 친환경자재로 석회보르도액을 포함한 구리제가 상대적으로 일반화되어 사용하고 있고, 사용량이 증가하고 있는 추세다. 구리제와 기계유제를 혼용하여 감귤에 발생하는 감귤검은점무늬병, 감귤 궤양병, 감귤더듬이병 등의 발생 적기에 보호 살균제로 사용하고 있으나 감귤나무의 어린 새순 또는 과실에 구리제에 대한 약해가 발생하여 주의를 요구한다고 보고되었다 (현 등, 2005).

본 실험실 내에서 반복적인 screening 과정을 통해 선발된 식물근권세균을 이용하여 식물병의 생물적 방제를 이끌어냈으며, 선행연구에서 식물근권세균 중 *Burkholderia gladioli*로 동정된 MRL408-3과 TRH423-3, *Pseudomonas fluorescens* TRH415-2와 *Pseudomonas pudia* THJ609-3 등은 *X. axonopodis* pv. *citri*에 의한 감귤궤양병과 *Elsinoe fawcettii*에 의해 발병되는 감귤더듬이병에 대해 항균효과 및 식물체에서 발병 억제효과를 확인하였다. 이를 바탕으로 *D. citri*에 의해 발병되는 검은점무늬병에 대해 효과적인 식물근권세균을 선발하고, 생물적방제의 가능성을 확인하여 친환경 감귤 재배 농가의 포장에 적용하고자 본 연구를 실시하였다.

(2) 재료 및 방법

1) 감귤검은점무늬병원균의 분리 및 발병조건 규명

a. 병원균 분리

제주지역의 회천동에 위치한 친환경재배 감귤원에서 감귤나무(품종: 궁천조생)의 당일년도에 발생된 신초로, 잎의 전면에 감귤검은점무늬병이 발생한 것

을 채집하였다. 채집된 이병 잎은 병징을 중심으로 5 × 5mm 크기의 정방형으로 자르고 1.0% sodium hypochlorite solution (NaOCl)에서 30초간 표면 소독하였다. 증류수에 1분씩 3회 세척하고 70% ethanol에 30초 담근 후 증류수에서 1분씩 3번 세척하였다. 소독된 식물체의 감염조직을 살균된 흡습지에서 물기를 제거하고 매스로 2등분하여 water agar(WA; Becton, Dickson and Company, France)⁶⁾에 치상한 후 25 ± 1°C의 항온기에서 3일간 배양하였다. 잎 조직의 절편 주위에 자라는 균사를 채취하여 potato dextrose agar(PDA)에 이식하였다. 25 ± 1°C의 항온기에서 14일간 배양하였으며, 균총을 지속적으로 관찰하여 기타 균과 구분하였다. 분리된 감귤검은점무늬병원균을 PDA와 oatmeal agar(OTA; Becton, Dickson and Company, France)⁷⁾에 배양하였다. 또한, Korea Agricultural Culture Collection(KACC, 한국농업미생물자원센터)에서 *Diaporthe citri* (KACC 45782: 감귤검은점무늬병원균)을 분양 받아 PDA와 OTA에 배양하였다. 분리되었거나 분양된 병원균이 자라고 있는 배지에 포자발생조건을 동일하게 처리하여 발생한 포자를 현미경으로 비교하여 이병된 잎에서 분리된 병원균이 감귤검은점무늬병원균을 확인하였다.

분리 또는 분양된 감귤검은점무늬병원균은 PDA에서 치상하고 25°C에서 7일간 배양한 다음, 균사 선단부에서 지름 5 mm의 균사 조각을 떼어내어 PDA의 사면배지에 접종하고 25°C에서 7일간 배양한 후 4 ± 1°C의 저온에 보관하여 실험에 사용하였다.

b. 감귤검은점무늬병원균의 포자형성조건

PDA에 배양된 병원균의 균사를 직경 10 mm의 cork borer로 절취하여 PDA, green bean agar(GBA)⁸⁾, V8배지, OTA 및 WA 등의 5종류의 배지에 치

6) water agar(WA) 제조
: bacto agar 15g을 D.W 1 L와 섞은 다음 멸균하여 사용하였다.

7) oatmeal agar(OTA)제조
: oatmeal 60.0g, agar 12.5g이 포함된 OTA를 D.W 1L에 섞어 1분 이상 끓여 준 다음 멸균하여 사용하였다.

8) green bean agar(GBA)제조
: 믹서기를 사용하여 GREEN BEANS[®] (Saha Prachinburi Foods Industry, Thailand)의 내용물을 갈아서 D.W로 총량을 1L로 조정하였고, agar 20.0g을 넣은 다음 멸균하여 사용하였다.

상하였다. 90 mm의 petri dish에 균사가 전체적으로 자랄 때까지 배양하는 것으로 기준을 정하였고, PDA, V8, WA배지인 경우 25℃에서 14일 동안 배양한 후 광도와 공기 환경에 노출시켜 포자발생을 유도하였으며, OTA과 GBA인 경우 25℃에서 7일 동안 배양한 후 광과 공기 환경에 노출시켜 포자발생을 유도하였다.

배지의 표면에 검은점무늬병의 병자각이 형성되고, 포자가 형성이 될 때까지 25℃의 배양기에서 24시간씩 광이 비치는 조건으로 진행했으며, 공기환경의 노출은 petri dish의 감겨놓은 파라필름에 좌우로 2개의 구멍을 뚜껑과 맞닿는 곳에 멸균된 핀셋으로 작은 구멍을 내어 공기가 순환하도록 하였다. 포자가 형성되면 현미경에 의한 관찰을 통해 검은점무늬병원균의 진위를 확인하였다. OTA 배지에 치상된 병원균의 균사가 petri dish에 전체적으로 성장되면 petri dish의 양쪽에 구멍을 뚫은 후 광조건과 암조건의 배양기, petri dish의 파라필름을 감겨놓은 상태로 광조건과 암조건의 배양기 등의 4그룹으로 나눈 후 25℃에서 10일 동안 두었다. 10일이 경과하고 포자가 발생된 각각의 배지에 멸균수 10ml를 넣고 멸균된 루프로 포자를 잘 긁어 현탁액을 만들었다. 삼각플라스크에 깔때기를 끼우고 mira-cloth 3겹을 포갠 후 현탁액을 부어 거른 다음 hemacytometer에서 포자수를 측정하였다. 또한 PDA배지에 성장된 병원균의 포자형성도 동일한 방법으로 진행하였다.

c. 감귤검은점무늬병 발병조건 규명

식물배양실에서 생육중인 감귤나무(품종: 궁천조생)에서 신초가 발생하고 경화되기 직전의 상태인 25일이 경과된 신초를 6장의 잎이 있도록 가지를 절취하였고 멸균수가 담긴 삼각플라스크에 꽂았다. OTA배지에 형성된 감귤검은점무늬병원균의 포자를 수집하여 현탁액을 만들고 hemacytometer로 측정하였고, 포자현탁액을 1.0×10^5 cfu/ml, 1.0×10^6 cfu/ml, 1.0×10^7 cfu/ml, 1.0×10^8 cfu/ml의 농도로 준비하였다. 무처리는 살균수를, 병원균의 포자현탁액에 tween 20을 총부피의 0.01%가 되도록 첨가한 후 단독으로 신초에 분무 접종하였다.

감귤검은점무늬병원균이 접종된 감귤의 잎은 'Ⅲ. 연구내용; 1. 식물근권세균 처리에 의한 감귤궤양병 억제; (2) 재료 및 방법; 1) 감귤궤양병 분리 및 발병조건 규명; c. 감귤궤양병 발병조건 규명'에서의 분무 접종방법과 동일하게 수행

하였으며, 습실 처리된 상자에 보관된 감귤 잎을 15일 동안 병반의 진행을 관찰하였다.

여러 번의 반복실험에 의해 감귤검은점무늬병원균의 포자현탁액을 1.0×10^6 conidia/ml의 농도로 했을 때 잎이 포함된 가지에 전체적으로 감귤검은점무늬병징이 관찰되었으며, 접종원의 농도로 선정하였다.

2) 식물근권세균의 항균활성에 의한 선발

분리된 식물근권세균이 감귤검은점무늬병에 대한 항진균 효과를 알아보기 위하여 식물근권세균을 각각 tryptic soy agar(TSA)배지에 옮긴 후 28°C에서 48시간동안 배양하였다. 감귤검은점무늬병원균 *Diaporthe citri*은 PDA배지에 옮긴 후 25°C에서 7일 동안 배양하였다. 항진균 활성 효과 실험은 'Ⅲ. 연구내용; 2. 식물근권세균 처리에 의한 감귤역병 억제; (2) 재료 및 방법; 1) 식물근권세균의 감귤역병균에 대한 항균 활성; b. 항균활성에 의한 선발'에서 제시된 방법과 동일하게 수행하였다. 병원균이 치상된 PDA에 3일 경과 후 식물근권세균을 치상하였고 25°C에서 7일간 대치 배양하였다.

감귤검은점무늬병원균에 대한 항진균효과가 있는 식물근권세균은 식물근권세균과 대치 배양된 감귤검은점무늬병원균의 균사생장 저지원의 직경을 측정하여 선발하였고 본 실험은 각 4개씩 3반복 실험을 수행하였다.

3) 실내에서 식물근권세균 처리에 의한 감귤검은점무늬병 진전 억제 효과

감귤나무에서 신초가 발생하고 잎이 경화되기 직전, 25일 이상 경과된 신초에서 6장의 잎이 있도록 가지를 절취하였고 멸균수가 담긴 삼각플라스크에 꽂았다. 선발된 식물근권세균은 UV-Visible Spectrophotometer (Varian Aust, AU/CARY 50 Conc.)를 이용하여 균농도를 측정하여 식물근권세균의 현탁액은 2.0×10^6 cfu/ml의 농도로 준비하였다. 감귤검은점무늬병원균의 포자 현탁액은

hemacytometer를 이용하여 광학현미경에서 포자수를 확인 후 2.0×10^6 conidia/ml의 농도로 준비하였다. 병원균의 포자현탁액과 식물근권세균균의 현탁액의 혼합 처리는 'Ⅲ. 연구내용; 1. 식물근권세균 처리에 의한 감귤궤양병 억제; (2) 재료 및 방법; 3) 식물근권세균 처리에 의한 감귤궤양병원균 진전 억제; a. 실내에서의 식물근권세균 처리에 의한 감귤궤양병 진전 억제'에서 제시된 방법과 동일하게 수행하였다.

식물근권세균의 현탁액에 대신하여 음의 비교구로 살균수를 처리하였고, 감귤검은점무늬병균의 포자현탁액을 1.0×10^6 conidia/ml의 농도로 조정된 다음 동일한 방법으로 처리하였다. 양의 비교구로서 감귤검은점무늬병에 대한 식물근권세균의 억제효과를 비교하기 위해 한국작물보호협회에 등록되어 있는 살균제 Dithianon(유효성분량 75%, 정밀디치[®], 동부정밀)을 농약사용지침서에 따라 1.0 g/L의 농도(사용약량 20g/20L)로 조정하여 준비하였다. Dithianon[®]을 신초에 선처리하고 실험실의 음조건에서 2시간 동안 풍건하였으며, 총부피의 0.01%가 되도록 tween 20이 첨가된 감귤검은점무늬병균의 포자현탁액 1.0×10^6 conidia/ml의 농도를 단독으로 신초에 살포했다.

접종된 감귤의 잎을 28°C의 dew chamber에서 48시간 습실 처리 후 $28 \pm 1^\circ\text{C}$ 가 유지되는 식물배양실의 습실처리된 상자에 보관하여 병반의 진행을 14일 동안 관찰하였다. 실험은 3반복 시행하였으며, 14일이 경과 후 감귤검은점무늬병원균에 의해 감염된 병반수를 측정하였다. 시험결과는 분산분석과 처리평균 사이의 비교를 위하여 Duncan검정($P=0.001$)을 실시했으며, Statistical Analysis System(SAS Institute, version 8.02) program을 이용하였다. 병반수 = [전체 병반수/조사엽수] 로 측정하였다.

4) 식물근권세균에 의한 감귤검은점무늬병균 성장 억제의 광학현미경 관찰

a. 식물근권세균과 인접한 감귤검은점무늬병균의 광학현미경 관찰

PDA배지에서 성장한 *D. citri*와 감귤검은점무늬병에 대해 항진균 효과가 있는 식물근권세균을 TSA배지에 배양하여 준비하고 배양된 배지에서 각각 직경

5mm를 절취하여 PDA 배지에서 대치 배양하였다. 식물근권세균의 항진균 효과에 의한 저지원의 형성 시기를 고려하여 25℃에서 10~14일간 배양하였고, 저지원 부위의 *D. citri* 균사를 현미경으로 관찰하였다. 대치배양 된 식물근권세균에 의해 형성된 저지원 부위의 균사를 배지의 중심에서 위아래, 2개의 위치를 잡아 4곳 정도 채취하였으며, 3개씩 3반복하였다. 현미경으로 병원균의 균사 관찰시 용이하도록 콩코레드와 프록사인으로 염색을 하고 KOH로 세척하였다. 현미경의 100배율로 관찰하였다.

b. 식물근권세균과 혼합한 감귤 검은점무늬병균의 성장 억제

인공배지를 이용한 감귤 검은점무늬병균에 대한 항진균 효과 및 생물 검정을 통하여 감귤 검은점무늬병 억제 효과가 검증된 식물근권세균 현탁액을 감귤 검은점무늬병균 포자 현탁액과 혼합하여 병원균의 발아율 또는 발아관 성장 억제효과를 현미경을 이용하여 검증하였다.

1%의 glucose가 포함된 멸균수에 감귤검은점무늬병균의 포자현탁액을 1.0×10^6 conidia/ml의 농도로 준비하였다. 선발된 식물근권세균은 UV-Visible Spectrophotometer (Varian Aust, AU/CARY 50 Conc.)를 이용하여 균 농도를 측정하였으며, 감귤검은점무늬병원균의 포자 현탁액은 2.0×10^6 conidia/ml로, 식물근권세균의 현탁액은 2.0×10^6 cfu/ml의 농도로 준비하였다. 병원균의 포자현탁액과 식물근권세균의 현탁액을 1 : 1로 혼합하여 각각의 처리를 1.0×10^6 cfu/ml의 농도로 조절하고 28℃에서 24 및 48시간 배양한 후 감귤 검은점무늬병균 포자의 발아율, 발아관의 길이 등을 조사하였다. 실험은 3반복 시행하였으며, 처리구의 분산분석과 처리평균 사이의 비교를 위하여 Duncan검정(P=0.001)을 실시했으며, Statistical Analysis System(SAS Institute, version 8.02) program을 이용하였다. 식물근권세균의 감귤 검은점무늬병균에 대한 성장 억제 효과를 시판 중인 농약과 비교하기 위하여 디치 수화제를 농도별로 감귤 검은점무늬병균과 혼합하여 동일한 방법으로 배양 후 효과를 조사하였다.

(3) 결과 및 고찰

1) 감귤검은점무늬병원균의 분리 및 발병조건 규명

a. 감귤검은점무늬병원균의 포자형성조건

배지의 종류에 따라 감귤검은점무늬병원균의 균사 생장에 차이를 보였으며, PDA가 들어있는 직경 90 mm의 petri dish에서의 병원균의 균사생장은 15일이 소요되지만 GBA와 OTA에서는 감귤검은점무늬병원균의 균사는 7일이면 petri dish를 전체적으로 조밀하게, 균사 층이 두껍고 빠른 성장하는 것을 확인할 수 있었다. 균사의 생장은 OTA에 비해 GBA에서 빨랐으나, 포자형성에는 GBA와 OTA의 차이는 없었다. 배지의 종류에 대한 병원균의 균사 성장정도에 따라 PDA와 OTA를 포자형성배지로 정하였고, PDA와 OTA를 배양하여 형광과 공기조건을 처리한 결과 PDA에서 자란 병원균은 20일 이상의 형광조건에서 포자태를 형성되는 것을 확인했으며, 30일 이상의 형광조건 배양시 포자를 형성하는 것을 관찰할 수 있었다. OTA에서 7일 동안 배양된 병원균을 광과 공기가 첨가된 환경에서 노출되면 5일부터 포자태가 형성되면서 7일부터 petri dish의 가장자리에서부터 노란색의 포자 덩어리가 형성되기 시작하였고, 10일이 후에는 petri dish의 전체적으로 포자가 조밀하게 발생하였다 (Fig. 3-1). 14일 동안 PDA배지에서 배양된 병원균에 형광과 공기조건을 처리했을 때 OTA배지에서 자란 병원균과 유사한 결과를 나타냈으며, 포자형성이 되지만 OTA에 비해 포자수는 적었다 (Table 3-1). 또한 PDA에 7일 배양 후 형광과 공기조건에 노출이 되면 포자는 형성되지만 균사의 생장이 지연되는 것을 확인했다

감귤검은점무늬병원균의 포자형성에는 광과 공기조건이 필수적이라고 생각되며, 이것으로 포자 형성시 OTA에서 감귤검은점무늬병원균의 균사를 7일 동안 배양 후 광과 공기조건에서 10일 동안 처리하면 포자형성이 용이하였다.

b. 감귤검은점무늬병원균 발병조건 규명

감귤검은점무늬병원균 현탁액 농도 1.0×10^6 conidia/ml를 접종하고 7일째부

더 전형적인 감귤 검은점무늬병의 병징이 관찰되기 시작했으며, 접종 15일 후에는 6장의 잎과 가지에 전체적으로 병반이 관찰되었다 (Fig. 4-2B). 병원균의 포자현탁액 농도 1.0×10^7 conidia/ml로 접종한 결과 병반은 더욱 많이 관찰되었으며 병 진전 속도도 빠르게 진행되어 접종 15일 후에는 잎 전체에 병반이 조밀하게 밀집되었다 (Fig. 4-2C). 또한 6장의 잎이 있는 가지의 가장 어린잎부터 떨어지는 등의 낙엽현상이 나타났다.

한편, 감귤검은점무늬병균의 포자현탁액을 1.0×10^5 conidia/ml의 농도로 신초발생 25일이 경과된 잎에 접종했을 때 감귤 잎의 발생 순서와 경화 정도에 의해 병반의 발생정도에 큰 차이를 나타냈다. 포자현탁액의 농도 1.0×10^8 conidia/ml으로 접종하고 7일 후부터 어린잎이 떨어지기 시작하여 전체적으로 잎이 떨어지는 낙엽현상이 두드러지게 나타났으며, 병반이 잎 전체적으로 조밀하게 발생하면서 습실조건에 의한 2차 감염이 되는 경우가 많았다 (결과 미제시).

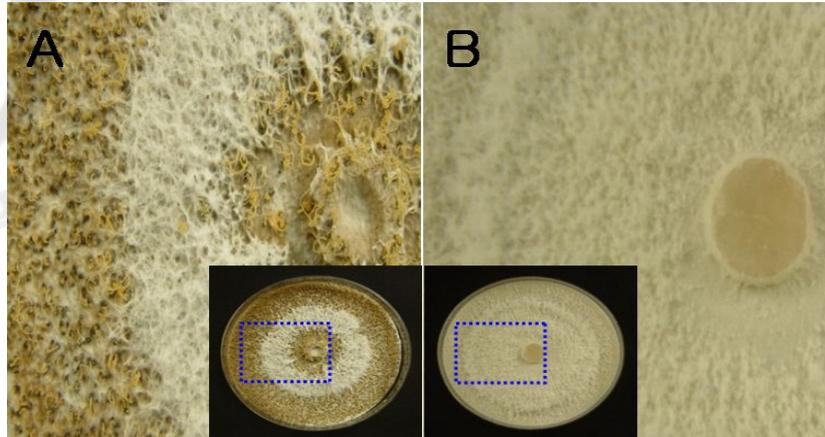


Fig. 3-1. Spore formation conditions of *Diaporthe citri*. A, Spore horns emerged from pycnidia on surface of OTA medium treated with light and air conditions; B, OTA medium blocked from light and air conditions.

Table 3-1. Spore productions of grown *Diaporthe citri* on OTA medium and PDA medium in conditions treated with light or air

Treatment	Spore formation conditions				Spore production ^a (conidia/ml)	
	non treated light and air	treated light	treated air	treated light and air		
Oatmeal Agar (OTA)	○				0.0	± 0.0 ^b
		○			0.0	± 0.0
			○		0.0	± 0.0
				○	1.1 × 10 ⁸	± 0.0
Potato Dextrose Agar (PDA)	○				0.0	± 0.0
		○			0.0	± 0.0
			○		0.0	± 0.0
				○	1.7 × 10 ⁷	± 0.0

^a Spore productions were measured from 25 days on OTA and PDA cultures.

^b Values represent means ± standard deviation of three separated experiments, each containing nine plates per treatment.

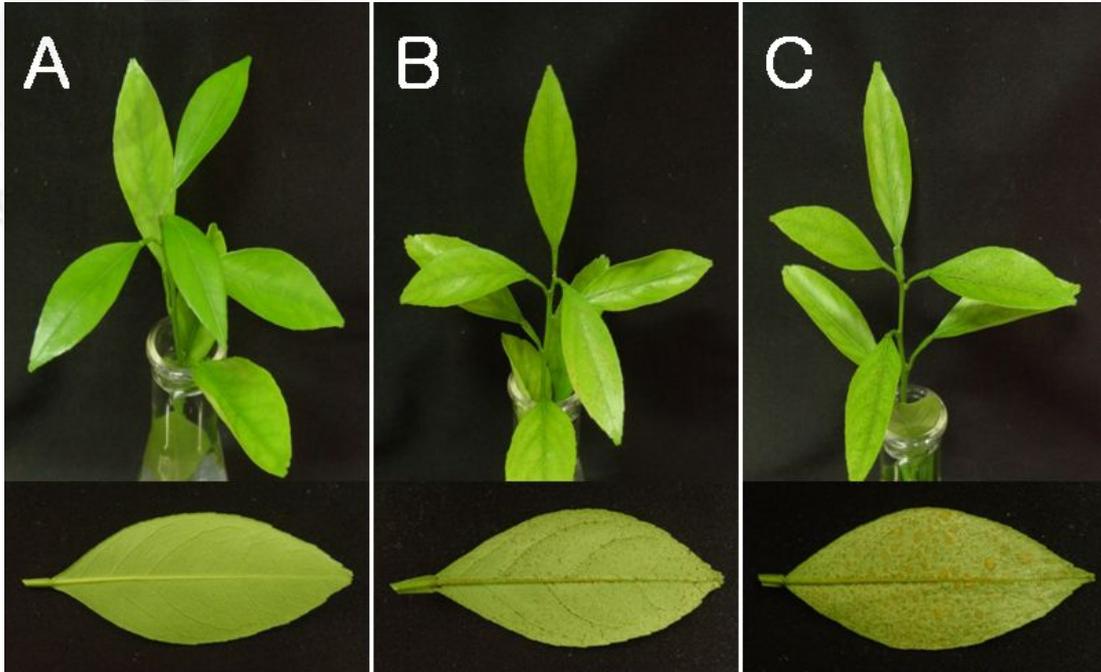


Fig. 3-2. Symptoms on citrus leaves at 15 days after inoculated with H₂O(A), different concentrations of *Diaporthe citri*(B and C). The concentration of spores suspension from *D. citri* were 1.0×10^6 conidia/ml(B) and 1.0×10^7 conidia/ml(C).

2) 식물근권세균의 항균활성에 의한 선발

자생식물의 뿌리에서 분리된 식물근권세균, 고추역병 및 오이탄저병 등의 식물체 실험에서 효과가 있었던 식물근권세균을 대상으로 감귤검은점무늬병에 항진균성을 조사하기 위해 감귤검은점무늬병과 대치 배양하였더니, 균사생장억제 효과를 나타내는 균주는 BRH433-2, TRL406-3, KRY502-1, KRY505-3, MRL412-4, THJ607-2, THJ609-2, THS601-2, TRH423-3, MRL408-3, TRH415-2 및 THJ609-3 등 총 12개였으며, 그 중 감귤케양병에 병 억제 효과가 확인된 4가지의 식물근권세균 TRH423-3, MRL408-3, TRH415-2 및 THJ609-3을 우선적으로 3반복 시행했다. 병원균을 PDA에 배양하고 2일 경과 후 4개의 식물근권세균을 각각 병원균과 대치 배양하였더니 배양 10일 후 병원균의 생장에 뚜렷한 차이가 나타났으며, 식물근권세균의 반대쪽에서 성장한 감귤검은점무늬병의 균사체의 길이가 평균 28.9~30.4 mm인데 반해 식물근권세균 쪽 방향으로 성장하는 균사체의 길이는 평균 13.5~19.5 mm로 균사 생장이 억제되었다. 대부분의 식물근권세균에 의해 균사생장억제율이 52%이상을 나타냈으나 TRH415-2는 35.9%로 가장 낮은 항진균활성을 나타냈다 (Fig. 3-2와 Table 3-2).

대치배양 10일 후 THJ609-3에서 식물근권세균과 마주하는 부위의 병원균의 균사가 검게 변화되기 시작하면서 배양 15일 후 TRH423-3, MRL408-3에서도 검게 변화된 것을 관찰하였다. 대치배양 20일 후 THJ609-3, TRH423-3은 균사가 자란 1/5점까지 검게 변했으며 MRL408-3은 대치배양된 병원균의 테두리를 전체적으로 검게 변했다. 이러한 항진균효과는 식물근권세균에서 분비되는 2차대사물질의 영향인 것으로 판단되어진다.

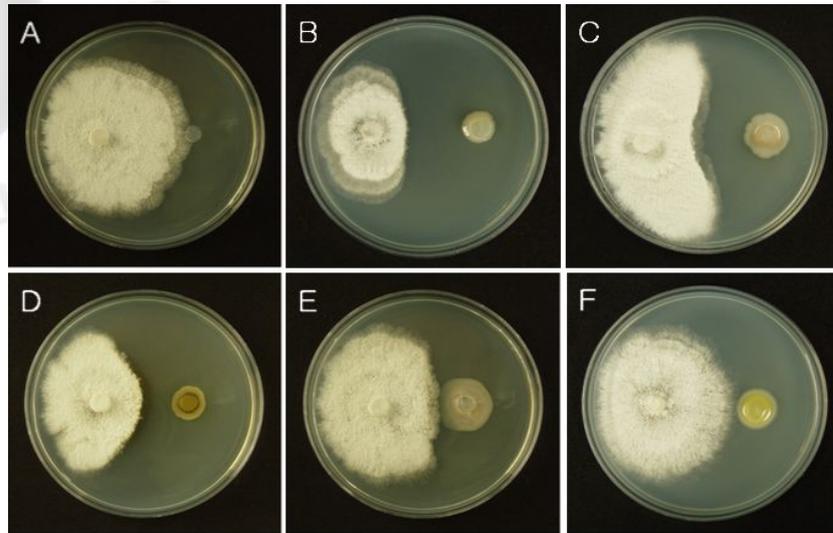


Fig. 3-3. Inhibition of mycelium growth of *Diaporthe citri* by the selected bacterial isolates on PDA medium. The presented PDA plates were untreated control(A), treated with TRH423-3(B), MRL408-3(C), THJ609-3(D), TRH415-2(E) and CRY521-1(no anti-fungal activity) (F). The present photographs were at 10 days after incubation.

Table 3-2. Mycelium of growth inhibition of plant pathogen *Diaporthe citri* by anti-fungal bacterial isolates from plant rhizosphere

Bacterial strains	Growth on PDA(mm)		Inhibition rate ^a of mycelium growth(%)
	Site of rhizobacteria	Opposing site of rhizobacteria	
CRY521-1 ^b	30.69 ± 1.72 ^c	29.45 ± 0.68	-4.2
THJ609-3	13.85 ± 0.51	29.11 ± 0.62	52.4
TRH415-2	19.45 ± 1.35	30.37 ± 1.20	35.9
MRL408-3	13.48 ± 1.35	29.36 ± 0.70	54.0
TRH423-3	13.62 ± 0.53	29.11 ± 0.29	53.2

^aInhibition rate(%)= [1 - (length of fungal colony near the strain / length of fungal colony opposite of the strain)] × 100.

^bNo anti-fungal activity.

^cValues represent means ± standard deviation of three separated experiments, each containing four plates per treatment.

3) 실내에서 식물근권세균 처리에 의한 감귤검은점무늬병 진전 억제 효과

감귤 검은점무늬병균을 단독으로 감귤 잎에 접종했더니 잎 전체적으로 병반이 형성된 것을 관찰할 수 있었고, 병반수를 측정한 결과 잎 1개당 1386개의 병반수를 확인할 수 있었다 (Fig. 3-4A와 Table 3-3). 감귤 검은점무늬병균과 식물근권세균 TRH415-2과 THJ609-3과의 혼합액을 감귤 잎에 접종했더니, 감귤 검은점무늬병균을 단독으로 접종한 비교구에 비해 병반수 716.7개와 476.0개로 유의성 있게 감소되었다 (Fig. 3-4B와 4C). 식물근권세균 MRL408-3과 TRH423-3은 감귤 검은점무늬병을 더욱 뚜렷하게 억제하였으며 (Fig. 3-4D, 4E) 각각의 식물근권세균에 의해 80%이상의 높은 방제가를 나타냈다 (Table 3-3).

양외 비교구로 시중에 판매되는 농약인 Dithianon이 함유된 약제를 처리한 감귤 잎에서는 병진전이 매우 억제되어 병반이 거의 나타나지 않았으며 병반수가 10.3으로 식물근권세균을 처리한 감귤보다 높은 방제효과를 나타냈다 (Fig. 3-4H와 Table 3-3).

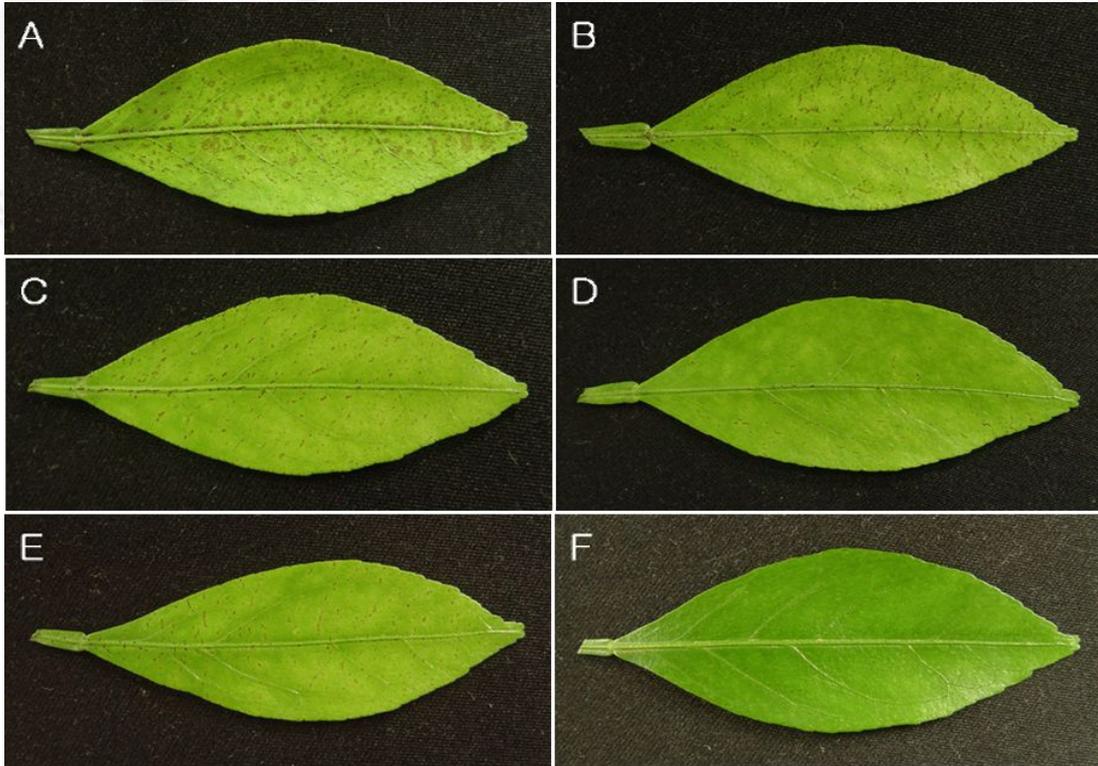


Fig. 3-4. Disease severity on citrus leaves at 14 days after inoculated with *Diaporthe citri*(A) and inoculated with mixture of citrus melanos and rizobacterial isolates TRH415-2(B), THJ609-3(C), MRL 408-3(D), TRH423-3(E) and pre-treated with commercial fungicide Dithianon[®](F). The concentration of *Diaporthe citri*, anti-bacterial isolates and Dithianon[®] were 1.0×10^6 conidia/ml, 1.0×10^6 cfu/ml and 1 g/L, respectively.

Table 3-3. Lesion numbers and control value on citrus leaves spray-inoculated with mixture of *Diaporthe citri* and rizobacterial isolates *in vivo* test

Treatment ^a	Lesion number	Duncan's test	Control value(%)
<i>Diaporthe citri</i>	1386.0 ± 163.3 ^c	a ^d	-
TRH415-2	716.7 ± 57.4	b	48.3
THJ609-3	476.0 ± 40.5	c	65.7
MRL408-3	256.0 ± 37.1	d	81.5
TRH423-3	221.3 ± 22.1	d	84.0
Dithianon ^{®b}	10.3 ± 0.8	e	99.3

^aThe inoculums were mixture of *Diaporthe citri* and the bacterial isolates. The concentration of anti-bacterial isolates and *D. citri* were 1.0×10^6 cfu/ml and 1.0×10^6 conidia/ml, respectively.

^bThe concentration of the fungicide was 1g/L.

^cValues represent means±standard error of three separated experiments, each containing three plants of six leaves per treatment.

^dThe different letters are significantly ($P=0.001$) different according to Duncan's multiple test.

4) 식물근권세균에 의한 감귤검은점무늬병균 성장 억제에 관한 현미경 관찰

a. 식물근권세균과 인접한 감귤검은점무늬병균의 광학현미경 관찰

*D. citri*에 대해 항진균효과가 있는 식물근권세균 MRL408-3을 PDA에 병원균과 대치하여 배양하면 배양 5일부터 병원균의 균사의 생장이 식물근권세균 방향으로 진전됨이 저조하였고, 배양 7일에는 저지원을 형성했으며, 10일째 뚜렷하게 관찰되어 병원균에 대한 저항성을 확인할 수 있었다. 배지의 바닥을 관찰하였더니 저지원 부위의 검은점무늬병균사가 검게 변한 것을 확인하였다. 병원균에 대해 저항성이 나타난 저지원 부위의 *D. citri* 균사를 채취하여 현미경으로 관찰한 결과 항진균 효과가 없는 균인 경우 균사의 생장이 길게 자란 것을 관찰할 수 있었으며(Fig. 3-5A), 병원균에 대해 항진균효과가 있어서 생긴 저지원의 균사의 형태는 짧아지고, 분지가 많이 형성된 것을 확인하였다 (Fig. 3-5B).

b. 식물근권세균과 혼합한 감귤 검은점무늬병균의 성장 억제

1% glucose를 첨가한 멸균수에 28℃에서 배양된 *D. citri*의 포자는 24시간 후 발아하기 시작했으며 34.1%가 발아하였고 발아관의 길이도 평균 40.5 μm 자랐다 (Table 3-4). 또한 48시간이 경과되면서 발아율은 75.1%에 이르고 균사가 확장되면서 발아관의 길이는 62.2 μm 정도 자랐다 (Fig. 3-6A와 Table 3-4).

식물근권세균 MRL408-3 또는 TRH423-3을 감귤 검은점무늬병균과 1 : 1로 혼합한 현탁액에서는 24 시간 경과 후에 병원균 포자가 전혀 발아하지 못했으며 48 시간이 경과하여도 포자의 발아는 발견되지 않았다 (Fig. 3-6B, 6C와 Table 3-4). 한편 이 두 가지 식물근권세균에 의해 감귤 검은점무늬병균 포자의 protoplast가 외부로 용출되는 현상이 관찰되었는데(Fig. 3-6C), 이는 이들 세균에 의한 항균 작용의 결과로 인한 것으로 생각된다.

식물근권세균 TRH415-2를 섞은 포자현탁액에서는 감귤 검은점무늬병균이 발아는 되었지만 발아율이 떨어졌을 뿐 아니라 균사 성장도 억제되었다 (Fig. 3-7D와 Table 3-4). 식물근권세균 THJ609-3에 의해서도 감귤 검은점무늬병균의 발아율과 균사 생장이 모두 억제되었다 (Fig. 3-6E와 Table 3-4). 식물근권세균 TRH415-2 및 THJ609-3에 의해서 포자 발아율과 평균 발아관 길이가 뚜렷하게

감소하여 발아율은 24시간 경과 후 각각 13.6% 및 9.1%였고 발아관의 길이도 각각 26.4 μm 및 11.6 μm 였다 (Table 3-4). 또한 48 시간이 경과하면서 포자 발아율은 각각 29.1%와 11.0%이고 발아관의 길이도 43.7 μm 와 27.9 μm 였다 (Table 3-4).

식물근권세균의 효과를 농약과 비교하기 위해 시판되는 디치수화제를 사용하였고, 관행농도인 1.0 g/L의 디치수화제와 혼합 처리된 병원균의 포자는 24시간과 48시간 이후에도 발아가 일어나지 않았다 (Fig. 3-6H와 Table 3-4). 또한 포자 내용물의 용출은 관찰되지 않았으며 이는 식물근권세균과 다른 작용에 의해 포자 발아를 억제하는 것으로 생각된다. 디치수화제를 희석하여 48시간 배양 후 조사한 결과 관행 농도의 1000배 희석액인 1 mg/L 농도에서는 포자 발아율 70.3%, 발아관 길이가 평균 60.0 μm 로 멸균수에 배양하였을 때와 차이가 없었다 (Fig. 3-6F). 100배 희석액인 10 mg/L에서 병원균의 포자발아율과 발아관 길이는 13.3%, 28.8 μm 였으며, THJ609-3을 처리한 현탁액과 유사한 효과를 나타냈다 (Fig. 3-6G). 10배 희석된 100 mg/L농도에서의 포자발아율은 7.1%, 발아관 길이는 8.3 μm 로 발아는 되지만 발아율과 균사 생장이 억제되었지만 발아된 병원균 포자가 조사됨으로써 식물근권세균 TRH423-3 또는 MRL408-3에서 보다 효과가 떨어지는 것으로 조사되었다 (결과 미제시).

식물병원균에 대한 식물근권세균의 길항작용기작은 protease, chitinase, β -1,3-glucanase 등과 같은 진균의 세포벽 분해능과 관련된 효소의 분비, maltophilin, xanthobactin과 같은 항진균성활성을 가진 항생물질의 생산, 그리고 근권에서의 정착성 등이 보고되었으며(Dunne 등, 1997; Zhang 등, 2000), 감귤검은점무늬병에 대한 생물학적 방제효과의 작용기작은 세포벽을 분해하는 분해능과 항생물질에 의한 항생작용인 것으로 생각된다.

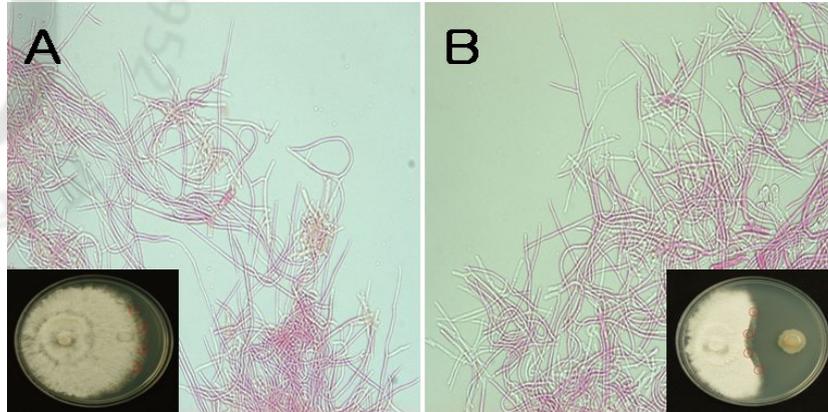


Fig. 3-5. Microscopical observation of mycelium growth inhibition site of plant pathogen *Diaporthe citri* by anti-fungal bacterial isolates from plant rhizosphere. Mycelium morphology were photographed non-inhibition site(A) and inhibition site(B) on PDA after 14 days.

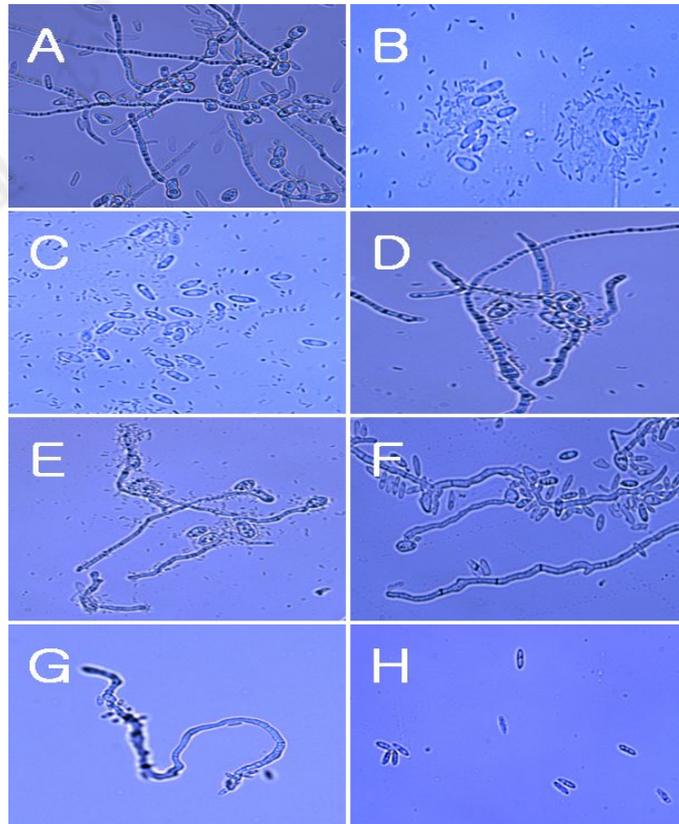


Fig. 3-6. Mycrosopical observation of α -conidia germinating at 48 hours after inoculated with *Diaporthe citri* in distilled water(A) and inoculated with mixture of citrus melanose and bacterial isolates MRL408-3(B), TRH423-3(C), TRH 415-2(D), THJ609-3(E) and commercial fungicide Dithianon[®], respectively. The concentration of *Diaporthe citri* and anti-bacterial isolates were 1.0×10^6 conidia/ml and 1.0×10^6 cfu/ml, respectively. The concentration of Dithianon[®] were 1 mg/L(F), 10 mg/L(G) and 1000 mg/L(H, traditional using). One % of glucose were added in all treatments.

Table 3-4. Germination rate and length of geum tubes of the melanose fungus on the inoculums at 24 hours and 48 hours after inoculation with mixture of *Diaporthe citri* and the anti-bacterial isolates, commercial fungicide Dithianon[®], respectively, *in vivo* test

Treatment ^a	Germination rate ^c		Length of geum tube(μm) ^d	
	24 hours	48 hours	24 hours	48 hours
<i>D. citri</i>	34.1 \pm 1.6 ^e a ^f	75.1 \pm 3.9 a	40.5 \pm 0.7 a	62.2 \pm 1.4 a
TRH415-2	13.6 \pm 0.4 b	29.1 \pm 2.9 b	26.4 \pm 3.3 b	43.7 \pm 2.1 b
THJ609-3	9.1 \pm 0.7 c	11.0 \pm 2.3 c	11.6 \pm 1.7 c	27.9 \pm 3.2 c
TRH423-3	0.0 \pm 0.0 d	0.0 \pm 0.0 d	0.0 \pm 0.0 d	0.0 \pm 0.0 d
MRL408-3	0.0 \pm 0.0 d	0.0 \pm 0.0 d	0.0 \pm 0.0 d	0.0 \pm 0.0 d
Dithianon ^{®b}	0.0 \pm 0.0 d	0.0 \pm 0.0 d	0.0 \pm 0.0 d	0.0 \pm 0.0 d

^aThe inoculums were 1 : 1 mixture of *Diaporthe citri* and the bacterial isolates. The concentration of *Diaporthe citri* and rizobacterial isolates were 2.0×10^6 conidia/ml and 2.0×10^6 cfu/ml, respectively. The untreated control, water was given instead of the bacterial isolates and was inoculated with an only *X. axonopodis* pv. *citri* (1.0×10^6 conidia/ml).

^bThe concentration of the fungicide was 1 g/L.

^cGermination rate of conidium(%) = (germinated conidia / total 100 numbers of conidia) \times 100.

^dLength of geum tubes were measured numbers of total 100 on microscopical observation.

^eValues represent means \pm standard error of three separated experiments, each containing 100 conidias per treatment.

^fThe different letters are significantly ($P=0.001$) different according to Duncan's multiple test.

4. 식물근권세균 처리에 의한 마늘흑색썩음균핵병 발병 억제 효과

(1) 연구배경

Sclerotium cepivorum Berk.에 의해 발병되는 마늘흑색썩음균핵병은 마늘, 양파, 파, 쪽파 등 *Allium*속 작물의 토양전염병해충에서 가장 피해가 큰 병으로 전 세계적으로 매년 피해가 증가되고 있다. 우리나라에서는 1988년 전남 고흥의 난지형마늘에서 처음 발생되었고, 연작재배에 의해 마늘 주산지인 충남, 전남, 경남 경북 및 제주도의 밭마늘 재배지에서 점차 증가되는 추세이며, 최근에는 달래의 주산지에서도 피해가 급속히 확산되고 있는 실정이다. 마늘품종별 병저항성에 있어서 난지형마늘에 비해 한지형 마늘이 마늘흑색썩음병원균에 의한 발병이 적었으며, 남도마늘과 서산종 마늘 등이 이병주율 50%이상으로 모두 감수성품종으로 판명되었다. 또한 토양 중 습도와 관계되어 는 마늘재배지보다는 밭마늘 재배지에서 피해가 더 큰 것으로 알려져 있다 (Kim 등, 2004; 허와 오, 1999).

우리나라에 발생하는 흑색썩음균핵병은 소형균핵(직경 340~570 μ m)을 형성하는 *Sclerotium cepivorum*와 대형균핵(직경 420~750 μ m)을 형성하는 *Sclerotium sp.*로 두 가지의 병원균에 의해 발생되며, 2001년 이전에는 *Sclerotium sp.*가 우점하는 것으로 나타났으나 최근에는 *Sclerotium cepivorum*에 의한 피해가 점차 증가되는 추세이다 (조 등, 2001). 흑색썩음균핵병은 균핵이라는 내구체를 형성하므로 일단 병이 발생한 포장 내에서는 발병이 계속해서 증가하게 된다. 병원균이 균핵 상태로 존재하기 때문에 파속식물을 재배하지 않더라도 병원균은 오랜 기간 생존이 가능하며 약제방제가 매우 힘들다. 생육적온은 15~20 $^{\circ}$ C이며, 1 $^{\circ}$ C에서도 균사생장이 가능하며, 균핵상태로 토양에 존재하다가 파종된 씨마늘을 감염시키고 겨울에 병진전이 정지했다가 봄에 기온이 상승하면 병징이 발현된다. 흑색썩음균핵병에 감염이 되면 지하부의 인경에 회백색의 균사가 나타나고, 조직이 물러지면서 병이 진전되면 뿌리가 흑색으로 변해 썩게 된다. 심하면 지하부의 인경에 흑색의 균핵이 형성되

고 지상부 줄기까지 물러 썩는다. 지상부의 하단 일부부터 황갈색으로 변하면서 위축되어 자라지 못하고 누렇게 갈색으로 변화되면서, 심하면 식물체 전체가 말라 죽는다. 주로 2~3월에 발병되기 시작하여 4~5월에 이르러 기온이 상승하면 발병이 급격히 감소되어 생육후기에 늦게 걸썩질만 병에 일부 감염된 마늘은 6월말 수확할 때에 건전마늘과 구별이 매우 어렵다 (Cho 등, 2002).

마늘, 양파 및 파 등은 제주농업의 주요 품목으로써 친환경 재배되는 마늘인 경우 마늘흑색썩음균핵병으로 수확량에 막대한 영향을 초래하여 생산량이 공급량에 못 미치고 있는 실정이다. 제주의 마늘은 대부분이 난지형 마늘로 한지형 마늘에 비해 발아시기가 빠르고, 제주의 겨울이 타 지역보다 따뜻하여 병원균이 월동이 가능하여 병원균 밀도의 점진적 증가로 인해 종구 및 유묘를 통해서 병이 발병될 가능성이 높다고 할 수 있겠다. 디카르복사마이드계통의 iprodione를 흑색썩음균핵병의 방제를 목적으로 사용하였으나, 계속된 동일약제사용으로 인해 방제효과가 저조하였다. tebuconazole과 토양훈증제인 메틸브로마이드의 사용으로 병원균의 밀도를 감소시켜 발병억제력을 높일 수 있으나 작물 및 토양 내에 잔류농약의 위험성이 보고(이 등, 2006)되면서 사회적인 문제가 되었다. 본 연구를 통해서 식물근권세균의 처리에 의해 재배되는 마늘식물체의 뿌리에서 토양 활착을 도와 작물의 토양의 적응력을 증대하여, 튼튼한 유묘관리로 인해 마늘 흑색썩음균핵병 예방 및 병원의 저항성을 증대됨으로써, 친환경 마늘 재배에 있어 생산량 증대에 보탬이 될 것으로 사려 되어 본 연구를 실시하였다.

(2) 재료 및 방법

1) 마늘흑색썩음균핵병균의 분리 및 발병조건 규명

a. 병원균 분리

제주지역의 김녕리와 하도리에 위치한 무농약 마늘 재배 포장에 마늘흑색썩음균핵병이 발병시기인 2007년과 2008년 3월에 조사하였다. 포장 내에서 뿌리

와 줄기가 위축되어 자라지 못하고 누렇게 변색된 마늘식물체 위주로 관찰하였고, 마늘흑색썩음균핵병에 감염된 마늘식물체를 뿌리까지 채집하였다. 채집된 식물체의 병징을 중심으로 2~3겹의 인경 껍질을 벗겨낸 다음 병원균 분리를 하였다. 병원균의 분리는 'Ⅲ. 연구내용; 3. 식물근권세균 처리에 의한 감귤검은점무늬병에 대한 방제 효과; (2) 재료 및 방법; 1) 감귤검은점무늬병원균의 분리 및 발병조건 규명; a. 병원균 분리'에서 수행한 방법과 동일하게 하였다.

소독된 식물체의 감염 조직을 water agar(WA)에 치상한 후 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 향온기에서 3일간 배양하였다. 잎 조직의 절편 주위에 자라는 균사를 채취하여 potato dextrose agar(PDA)에 이식 후 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 향온기에서 14일간 배양하였으며, 균총을 지속적으로 관찰하여 기타 균과 구분하였다. 또한, Korea Agricultural Culture Collection(KACC, 한국농업미생물자원센터)에서 *Sclerotium cepivorum* Berk.(KACC 41236; 흑색썩음균핵병균)을 분양 받아 PDA에 배양하였다. 분리 또는 분양받은 병원균이 배양된 PDA배지에 균핵 형성조건을 동일하게 준 후 현미경관찰을 통해 분리된 병원균이 흑색썩음균핵병임을 비교 관찰하였다.

분리 또는 분양된 흑색썩음균핵병균은 병원균이 치상된 PDA의 사면배지를 20°C 의 향온기에 넣어 7일간 배양한 다음 $4 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 저온에 보관하여 실험에 사용하였다.

b. 마늘흑색썩음균핵병의 발병조건 규명

*in vitro*에서 배지에 종류에 의한 흑색썩음균핵병의 균핵 형성을 확인하고자 'Ⅲ. 연구내용; 3. 식물근권세균 처리에 의한 감귤검은점무늬병에 대한 방제 효과; (2) 재료 및 방법; 1) 감귤검은점무늬병원균의 분리 및 발병조건 규명; b. 감귤검은점무늬병원균의 포자형성조건'에서 수행한 방법과 동일하게 하였다. PDA, GBA, V8배지, OTA 및 WA 등의 5종류의 배지에 병원균을 치상하고 20°C 에서 14일 동안 배양한 후 공기 환경에 노출시켜 균핵발생을 유도하였다.

흑색썩음균핵병의 접종원의 조건으로 마늘식물체가 자라는 화분에 균사체 접종 또는 균핵 접종, 상토 또는 모래에 직접 마늘흑색썩음균핵병을 접종하여 병원균을 배양하여 생육 중인 마늘식물체의 화분에 일정량을 넣는 방법 등을 선택

하였다. 병원균의 군사 접종은 PDA배지에 배양된 병원균사체를 10 mm의 cork borer로 절취하여 4개의 절편을 준비한 다음 마늘식물체가 생육중인 화분의 윗층 흙을 걷어내어 4방위에 각각 접종하고 흙으로 덮어줬다. 균핵접종은 병원균이 배양된 PDA배지를 균핵형성 조건에 노출시켜 균핵이 형성되면 군사접종과 동일한 방법으로 4개의 절편을 취하고 화분에 접종하였다. 병원균 배양토를 화분에 넣은 방법으로 병원균의 균핵을 발생시키기 위해 옥수수가루 : 모래 = 1 : 20의 비율로 섞은 후 멸균하고 모래배지 30g에 멸균수 5ml을 넣어 섞은 다음 PDA에 배양된 마늘흑색썩음균핵병균을 10 mm의 cork borer로 절취하여 2개의 병원균의 군사 절편을 모래배지에 넣어 섞어 준 후 20℃의 배양기에서 25일 동안 배양하였다. 또한 상토에도 모래와 같은 방법으로 시행하였으며, 상토배지에 배양된 병원균과 모래배지에 배양된 병원균을 마늘식물체가 생육 중인 화분에 5 g을 넣어 접종하였다.

병원균배양토를 대량배양을 하기 위해 공기가 순환할 수 있는 뚜껑이 있는 조직배양용기와 밀폐된 삼각플라스크를 사용하였다.

2) 식물근권세균의 항균활성 효과에 의한 선발

a. 식물근권세균의 분리

식물근권세균의 분리 및 보관은 'Ⅲ. 연구내용; 1. 식물근권세균처리에 의한 감귤케양병 억제 효과; (2) 재료 및 방법; 2) 식물근권세균의 항균활성 효과에 의한 선발; a. 식물근권세균의 분리 및 보관'에서의 방법과 동일하게 수행하였다.

b. 항균활성 효과에 의한 선발

분리된 식물근권세균을 마늘흑색썩음균핵병에 대한 항진균 효과를 알아보기 위하여 식물근권세균을 각각 tryptic soy agar(TSA)배지에 옮긴 후 28℃에서 48시간동안 배양하였다. *S. cepivorum*을 PDA배지에 옮긴 후 20℃에서 7일 동안 배양하였다.

항진균 활성효과 실험은 'Ⅲ. 연구내용; 2. 식물근권세균 처리에 의한 감귤

역병 억제; (2) 재료 및 방법; 1) 식물근권세균의 감귤역병균에 대한 항균 활성; b. 항균활성에 의한 선발'에서의 방법과 동일하게 수행하였다. 수행된 방법 중에 병원균에 따른 PDA의 치상 시간과 배양온도를 다르게 조정하였으며, 감귤역병의 병원균과 식물근권세균을 준비한 다음 동일시간에 PDA배지에 치상하였고, 20°C에서 10일간 대치 배양하였다. 항진균 효과가 있는 식물근권세균은 식물근권세균과 대치 배양된 *S. cepivorum*의 균사생장 저지원의 직경을 측정하여 선발하였고 각각 4개씩 3반복 실험을 수행하였다.

3) 식물근권세균 처리에 의한 마늘흑색썩음병 발병 억제효과

소형 화분을 이용한 실험은 4°C의 저온 처리된 마늘 종서를 1.0%의 NaOCl에서 30초간 씻고 멸균수로 3회 세척하여 무균상태의 습윤상자에서 보관 후 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 배양기에서 발아시킨 후 멸균된 10%의 펄라이트(Parat[®] Sam Son, Korea)가 함유된 상토(Choroc Nala[®] Bokyung Nongsang, Korea)를 플라스틱 pot(diameter 80 mm)에 채우고 파종하였고, 주간 20°C, 야간 18°C로 유지되는 식물배양실에서 재배하였다. 각각의 식물근권세균 BRH433-2, TRH423-3, TRH415-2 및 MRL408-3의 농도는 Park과 Kleopfer(2000)가 제시한 방법에 따라서 1.0×10^6 cfu/ml로 조정하였고 10일에 1회씩, 총 2회 관주하였다. 식물근권세균의 현탁액 처리 3일 후 화분의 윗부분의 흙을 걷어 낸 후 마늘흑색썩음균핵균을 배양한 상토 5 g을 넣고 멸균된 흙을 덮어주고 7일 동안 관찰하였다.

대형화분을 이용한 실험은 10%의 펄라이트(Parat[®] Sam Son, Korea)가 함유된 상토(Choroc Nala[®] Bokyung Nongsang, Korea)를 pot(310 × 200 × 510 mm)에 채우고 마늘 재배시 저면 관수할 수 있도록 styrofoam pot의 바닥에 심지 6개를 설치하여 수분 공급에 용이하도록 하였다. 4°C의 저온 처리된 마늘 종서를 무균상태의 습윤 처리된 상자에서 발아시킨 후 마늘 종구를 준비된 styrofoam pot에 20개씩 파종하였고, 주간 20°C와 야간 18°C로 유지되는 온실에서 재배하였다. 마늘의 소형 화분실험과 동일하게 각각의 식물근권세균 BRH433-2,

TRH423-3, TRH415-2 및 MRL408-3의 현탁액을 준비하여 30일 간격으로 1회씩 총 10회를 관주하였다. 마늘이 생육중인 화분의 윗부분의 흙을 걷어 낸 후 마늘흑색썩음균핵병균의 배양상토 1 kg을 넣어 화분의 흙과 섞어 준 다음 그 위를 멸균된 흙을 덮어주고 90일 동안 관찰하였다. 마늘종구는 그늘에서 7일 동안 말린 후 수확량을 측정하였다.

(3) 결과 및 고찰

1) 마늘흑색썩음균핵병의 분리 및 발병조건 규명

김녕리와 하도리의 마늘재배지포장에서 채집된 마늘에서 대형균핵과 소형균핵을 발생하는 2가지의 병원균을 분리하였다. 분리된 2가지 병원균을 균핵 형성조건에 처리했더니 공기 환경 노출에 의해 배지마다 많은 양의 균핵형성이 유도 되었지만, 배지에 의한 차이는 크지 않았다. 마늘 인편상에서의 실험에서 소형균핵을 형성하는 *Sclerotium cepivorum*이 대형균핵을 형성하는 *Sclerotium sp.*에 비해 균사생장속도가 빠르고, 균핵형성도 빠른 것으로 나타나 *Sclerotium cepivorum*이 *Sclerotium sp.*에 비해 병원력이 크다고 보고(Kim 등, 2004)되었기에 분리된 2가지 병원균 중에 소형균핵을 발생하는 *Sclerotium cepivorum*을 사용하였다.

*S. cepivorum*의 균사 또는 균핵이 포함된 배지 절편을 마늘식물체가 생육중인 화분에 접종하였으나, 7일, 14일, 21일이 경과하여도 병은 발생하지 않았다. 한편, *S. cepivorum*의 배양된 상토배지와 모래배지에서 접종 25일 경과시점에 균사를 관찰되었고, 모래배지보다 병원균의 균사발생이 월등했다 (Fig. 4-1). 마늘흑색썩음균핵병균을 상토에 접종하여 배양했지만, 상토에서 배양된 균이 흑색썩음균핵병인지 확인하기 위해 새로운 PDA배지에서 배양하였고, PDA배지에서 자라는 형태는 흑색썩음균핵병균과 유사했다. 균핵 형성조건인 공기가 순환되는 환경조건에 노출하고 30일 후 배지 내에 소형균핵이 발생했으며, 상토에 배양된

균이 흑색썩음균핵병균임을 확인하였다.

병원균배양토 접종에 의해 병이 발생하는 기간을 판단할 수 있었으며, 균사 또는 균핵의 접종은 발병기간에 못 미쳤던 것으로 생각되어졌다. 실험 결과와 흑색썩음균핵병원균의 생육특성을 비교하여 병원균의 접종에는 멸균된 상토에 병원균을 배양하고 마늘이 생육된 화분에 일정량을 넣는 방법이 흑색썩음균핵병 발생에 용이하였다

마늘흑색썩음균핵병이 배양된 상토 5 g를 마늘이 자라는 화분에 접종하였더니, 접종 3일부터 화분의 윗면에 하얀 균사가 발생하기 시작했으며 7일이 되면 하얀 균사로 전체적으로 덮혔다. 마늘식물체를 화분과 분리하였더니 마늘 뿌리는 건전했지만 마늘의 인경에 솜털모양의 흰색균사가 발생했으며, 물리져서 검게 썩는 것을 관찰하였으며, *Sclerotium cepivorum* Berk.의 병원성을 확인할 수 있었다 (Fig. 4-2).

한편, 병원균배양토를 대량배양을 하기 위해 공기가 순환할 수 있는 조직배양용기(병)와 밀폐된 삼각플라스크를 사용하였더니 조직배양병에서는 균사가 잘 자랐지만 삼각플라스크의 균사발생이 조직배양병보다 느렸다. 배양토에서의 균생장의 차이는 수분관계 및 마늘흑색썩음균핵병원균의 호기성에 인한 것으로 추측되어지며, 토양의 습도는 균핵의 발아와 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되었다 (Crowe, 1996, Lee 등, 1997; Gerbrandy, 1992).



Fig. 4-1. Mycellial growth of *Sclerotium cepivorum* Berk. in culture soil medium(left) or sand medium(right).

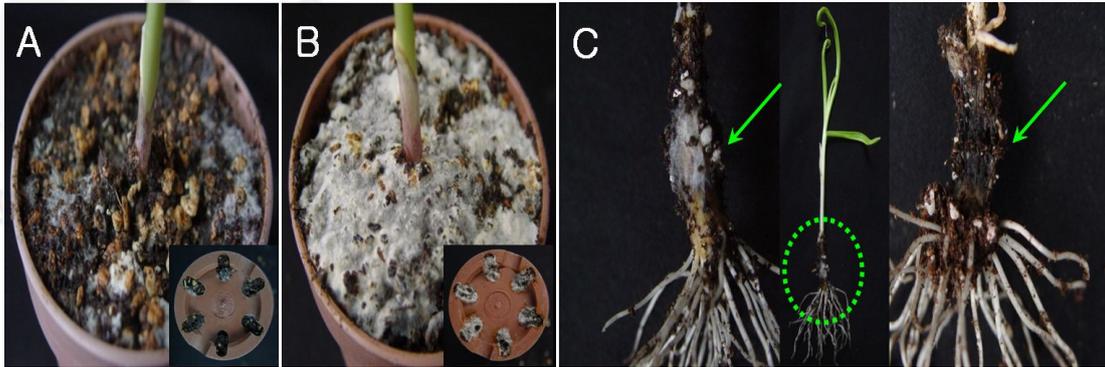


Fig. 4-2. Garlic plants infected white rot caused by *Sclerotium cepivorum* Berk. A and B, Occurrence of white rot in soils of garlic plants; C, infected garlic stem.

2) 식물근권세균의 항균활성 효과에 의한 선발

자생식물의 뿌리에서 분리된 100개 이상의 식물근권세균을 마늘흑색썩음균핵병균과 PDA에서 대치배양 한 결과, BRH433-2, KRY505-1, MRL408-3, MRL412, THS603-1, THS605-1, THJ609-3, TRH415-2, TRH423-3, TRK2-2 및 TRL406-3 등 총 11개의 균주가 마늘흑색썩음균핵병에 대해 항진균 효과를 나타냈다. 선행연구의 오이식물체에 발병된 흰가루병, 토마토와 고추식물체에서 발병된 역병에 대해 병 발생억제 효과가 확인된 4개의 식물근권세균 BRH433-2, TRH423-3, TRH415-2 및 MRL408-3을 우선적으로 3반복 시행했다. 4개의 식물근권세균을 병원균과 각각 대치배양 하였더니, 배양 10일 후 병원균의 생장에 뚜렷한 차이가 나타났다(Fig. 4-3와 Table 4-1).

마늘흑색썩음균핵병에 대해 항진균 효과가 없는 식물근권세균 THS602-1인 경우는 대치 배양된 배지에서 병원균의 균사가 식물근권세균 방향으로 자라면서 세균의 절취된 배지 위를 넘어 생장을 했으며 균사체 길이가 41.0 mm였다. 병원균에 대한 균사생장억제율이 -37.2%로 생장억제 효과가 없다고 할 수 있겠다 (Fig. 4-3A와 Table 4-1). PDA의 1/3지점에 치상된 마늘흑색썩음균핵병균의 균사체는 식물근권세균 BRH433-2과 TRH423-3의 방향으로 평균 15.3~17.8 mm로 균사 생장하였으나, 식물근권세균의 반대쪽에서 생장한 마늘흑색썩음균핵병균의 균사체의 길이는 평균 29.6~29.9 mm이었다. BRH433-2과 TRH423-3의 식물근권세균은 40%이상의 균사생장억제율을 보였으며, 항진균 효과에 의한 저지원이 뚜렷하게 형성되었다 (Fig. 4-3B, 3C와 Table 4-1). TRH415-2과 MRL408-3는 7.3%, -2.02%로 가장 낮은 항진균활성을 나타냈고, 식물근권세균의 근처에서 병원균의 균사 생장이 억제되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 4-3E, 3F와 Table 4-1).

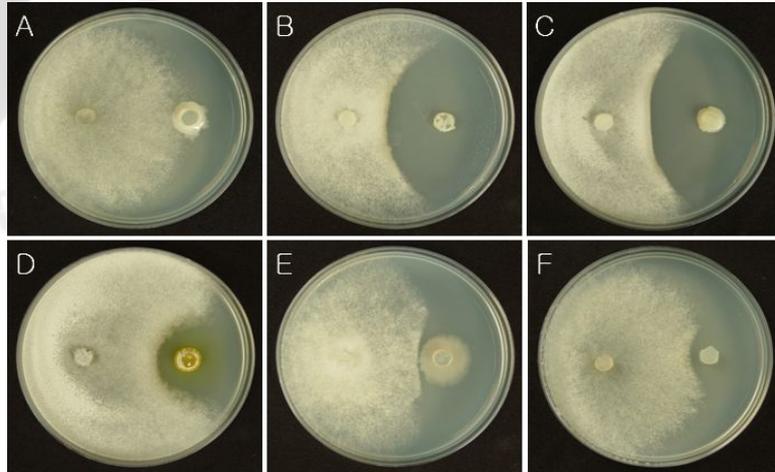


Fig. 4-3. Inhibition of mycelium growth of *Sclerotium cepivorum* Berk. by the selected bacterial isolates on PDA medium. A, THS602-1(no anti-fungal activity); B, BRH433-2; C, TRH423-3; D, TRL406-3; E, TRH415-2; F, MRL408-3.

Table 4-1. Mycelium of growth inhibition of plant pathogen *Sclerotium cepivorum* Berk. by anti-fungal bacterial isolates from plant rhizosphere

Bacterial strains	Growth on PDA(mm)		Inhibition rate ^a of mycelium growth(%)
	Site of rhizobacteria	Opposing site of rhizobacteria	
THS602-1 ^b	41.0 ± 1.38 ^c	29.89 ± 0.72	-37.2
MRL408-3	30.40 ± 1.18	29.82 ± 1.13	-2.02
TRH415-2	27.40 ± 0.86	29.57 ± 0.76	7.3
TRH423-3	17.82 ± 0.87	29.91 ± 0.74	40.4
BRH433-2	15.29 ± 0.89	29.71 ± 1.08	48.4

^aInhibition rate(%)= [1-(length of fungal colony near the strain / length of fungal colony opposite of the strain)] × 100.

^bNo anti-fungal activity.

^cValues represent means±standard deviation of three separated experiments, each containing four plates per treatment.

3) 마늘식물체에 식물근권세균의 선처리에 의한 마늘흑색썩음병 발병 억제 효과

소형 화분 실험에서 식물근권세균 MRL408-3, TRH415-2, TRH423-3 및 BRH433-2이 2회 처리된 마늘식물체에 마늘흑색썩음균핵병균의 배양토를 화분에 섞어 주고 7일 경과 후 무처리와 비교한 결과 마늘흑색썩음균핵병 발병이 억제 되는 것을 확인하였다.

무처리구에서 화분의 윗면에서 화분 바닥까지의 상태에 전체적으로 흰색균사를 관찰하였고 마늘식물체의 생장이 느려지고 줄기가 가늘어지고 잎의 끝이 말라가는 현상을 확인하였다. 접종 7일 후 마늘식물체와 화분을 분리했더니 인경부위가 물러지고 갈색으로 변화했으며 병반부위의 표면에 흰색균사의 형성을 확인했으며 부분적으로 검게 변한 것을 관찰했다 (Fig. 4-4A). 병반부위의 흰색균사 및 병에 감염된 부위에서 병원균을 분리하였으며 PDA에 배양하였더니 자라는 형태는 흑색썩음균핵병균과 유사했다. 배양된 병원균을 공기가 순환되는 환경 조건에서 보관하였고, 7일 후 배지 내에 소형 균핵이 발생하여 흑색썩음균핵병균임을 확인하였다.

식물근권세균을 처리한 각각의 화분의 상태는 윗면에서 바닥까지 무처리에 비해 적었지만 균사가 발생하였다. 인경부위가 갈색으로 부분적으로 변하기는 했으나 물러지지도 않았으며 흰색 균사를 확인할 수 없었다. 또한 마늘의 뿌리상태는 무처리에 비해 양호한 편이었다 (Fig. 4-4B, 4C와 4D).

대형 화분실험(Fig. 4-4E)에서 *B. circulans* BRH433-2은 토양병해인 마늘흑색썩음균핵병을 유발하는 *Sclerotium cepivorum*에 대해 항진균실험에서 *Bur. gladioli* TRH423-3과 저지원이 비슷하거나 *Bur. gladioli* MRL408-3와 *P. fluorescens* TRH415-2에 비해 넓게 형성되어 강력한 항진균 효과를 관찰했고, 병원균 접종 7일 뒤에 조사된 소형화분실험에서도 병억제 효과를 확인할 수 있었다. 반면, 10개월 동안 진행된 대형화분실험에서는 다른 식물근권세균의 처리에 비해 마늘흑색썩음균핵병에 의한 병 방제효과가 낮아 마늘수확량에 영향을 끼쳤다. 마늘식물체의 근권에 정착하지 못하였거나, 실험된 시기가 저온환경이었던 점으로 미뤄볼 때 미생물의 생육특성에 의한 활력이 떨어졌을 것이라 판단된

다. *P. fluorescens* TRH415-2는 항진균효과와 소형화분실험에서는 *B. circulans* BRH433-2에 비해 낮은 방제효과를 나타냈으나, 대형화분실험에서는 4개의 다른 균주에 비해 수확량이 증가하였다 (Fig. 4-4F와 Table 4-2). *P. fluorescens* TRH415-2인 경우 다른 균주에 비해 저온에서도 오랜 생장기간이 유지했으며, 토양 관주시 마늘식물체의 뿌리에 정착이 뛰어났다고 생각된다. *P. fluorescens*인 경우 토양적응력이 뛰어났다는 보고와 일치한다고 생각된다(Jang 등, 2010).

토양병의 생물적 방제에 있어서 외부에서 도입된 미생물이 안정적으로 근권토양과 식물뿌리에 정착하는 것은 생물적방제 성공여부의 관건이라 할 수 있다. 특히 토양의 물리·화학적 상태, 근권 미생물상, 작물의 종류에 따라 식물근권세균이 정착력은 큰 차이를 나타낸다고 보고되었다 (Zhang 등, 2000). *B. circulans* BRH433-2와 *P. fluorescens* TRH 415-2를 항진균효과와 병억제 효과를 비교해보면 식물근권세균에 의한 병원균의 군사생장억제력과 병 진전 억제력 사이에 항상 양의 상관관계가 성립하지는 않는 것으로 생각되어진다. 실험실의 제한된 조건에서 선발된 길항능력을 갖는 미생물들이 근권에서의 정착력이 떨어져 포장에서는 길항효과를 발휘하지 못하는 경우가 많다.

길항세균 *Pseudomonas aurantiaca* G28-6은 고추역병발생포장에서 건전한 고추뿌리와 근권토양에서 분리되었으며, 역병균의 군사생장을 억제할 뿐만 아니라 역병균의 유주자낭과 유주자의 형성, 그리고 피낭포자의 발아를 효과적으로 억제하였다. 역병균이 군사나 난포자상태로 토양에서 월동하여 다음 작기의 전염원이 된다. 난포자는 발아하여 유주자낭을 형성하고 유주자낭은 직접발아하거나 유주자를 형성하여 토양수분에 따라 능동적으로 이동하여 기주식물에 도달하여 식물체에 침입하는 1차 전염원이 된다. 고추역병이 접종된 pot시험에서 90%의 방제효과를 나타냈으며, 고추역병의 자연발생 비닐하우스에서도 고추생육기간 근권토양과 고추뿌리에 일정한 정착밀도를 유지하여 고추역병을 현저하게 억제하여 79.4%의 방제가를 보였다. 또한 DLF검정법에 의해 근권밀도를 환산하였으며, 선발된 균주들은 우수한 근권정착능력을 확인하였다 (Jang 등, 2010). 온실실험에서 땅콩이 심어진 plastic pot에 배지에 키운 병원균을 접종한 다음 흙을 덮어서 병을 발생시켰으며, 선발된 *Pseudomonas fluorescens*의 균주들은 땅콩의 줄기 썩음병에 대해 56.0 %이상의 병 억제를 하였다. *Pseudomonas fluorescens*에는

chitinase나 hydrogen cyanide(HCN)이 생성되어 병원균에 의한 병진전을 억제하는 것을 확인하였다(Manjula 등, 2004).

2007년 9월부터 2008년 6월까지 10개월 동안 진행된 실험으로 4개의 식물근권세균 중에 TRH 415-2는 다른 식물근권세균에 비해 저온에서 잘 성장하여 노지에서 월동중인 마늘에서의 흑색썩음균핵병에 대해 효과적으로 발병을 지연하여 마늘의 종구 생산량을 향상시켰다. *P. fluorescens* TRH 415-2은 흑색썩음균핵병의 전염원의 발아나 형성을 억제함으로써 병 방제 길항세균으로서의 잠재력을 가지고 있다고 판단되어진다. 제주의 마늘재배에 있어 9월 중순에 마늘 종구를 파종하고 월동을 거친 다음해 3월에 마늘흑색썩음균핵병이 발병하게 된다. 발병한 포장의 튼실하지 못한 마늘식물체는 4월에 녹병까지 발병하게 되며 연속으로 포장 내에 식물병이 발생하게 되어 종구생산이 전무하게 되고 병이 발병된 포장내의 수확량은 50%이상 감소하게 되는 경우가 있다. 또한 마늘 재배지가 제주의 동서 지역적으로 한정되어 있어 매해마다 병이 발생하는 악재가 발생되고 있지만 마땅한 대처방안이 없는 실정이다. 또한 흑색썩음균핵병의 병방제 목적으로 사용된 약제는 연용사용으로 인해 방제효과가 저조하게 되었는데, 그 원인은 토양의 미생물에 의한 분해로 밝혀졌다. 한편, 마늘흑색썩음균핵병은 농약에 의해 종자처리를 하여 발생빈도를 낮출 수 있어 종자소독을 중요시하고 있지만, 무농약 재배 이상에서는 농약을 사용할 수 없다. 친환경 마늘재배 농가에서 씨마늘의 종구소독의 수단 및 마늘흑색썩음균핵병의 생물적 방제제로 선발된 미생물을 활용한다면 병 억제 가능성이 있다고 판단되어지며, 양파, 파, 달래 등의 백합과 채소작물에 적용 가능하겠다.

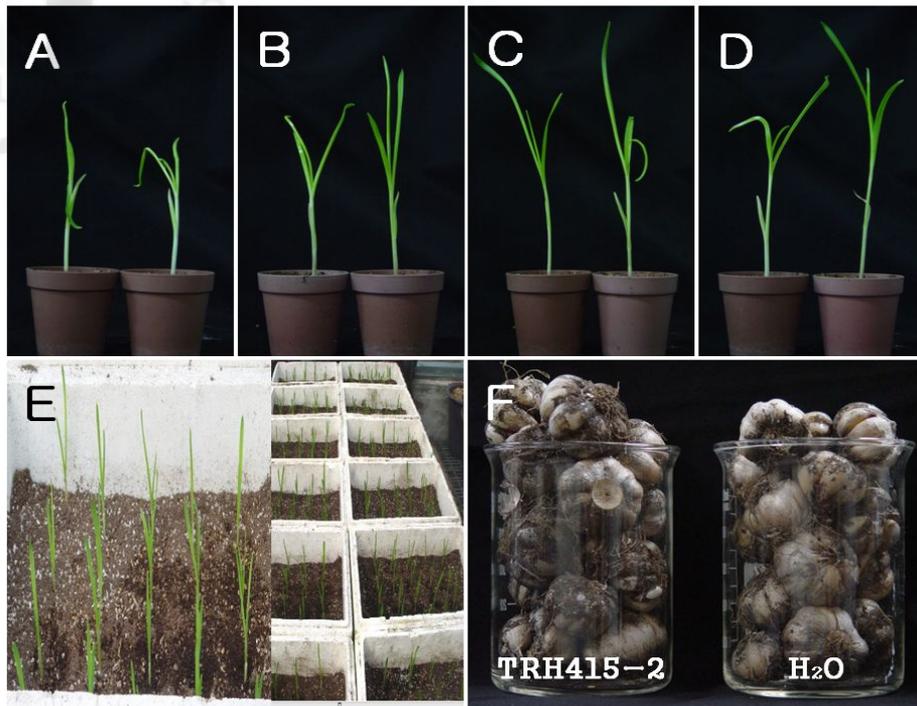


Fig. 4-4. Suppression of disease severity on the garlic plants pre-treated with suspension of antifungal bacterial isolates. The presented plants were untreated control(A), pre-treated with the selected bacterial suspension of TRH415-2(B), TRH423-3(C) and BRH433-2(D), respectively. The bacterial isolates suspension(1.0×10^6 cfu/ml) were treated twice. As a untreated control, H₂O was given instead of the bacterial suspension. Disease severity on the garlic plants were observed at 7 days after inoculation with *Sclerotium cepivorum* Berk. in the plastic pot experiment. In the styrofoam pot experiment(E) and yields of the garlic bulbs(F) on the garlic plant pre-treated with bacterial isolates. The bacterial isolates suspension(1.0×10^6 cfu/ml) were treated 10 times. The garlic bulbs were harvested at 90 days after inoculation with *Sclerotium cepivorum* Berk.

Table 4-2. Yields of the garlic bulbs on the garlic plants pre-treated with all four bacterial isolates, respectively

Treatment ^a	Yields of the garlic bulbs	Duncan's test
<i>S. cepivorum</i> Berk ^b	342.18 ± 21.83 ^c	a ^d
BRH433-2	346.38 ± 47.82	ab
TRH415-2	460.60 ± 29.85	b
MRL408-3	367.50 ± 22.50	b
TRH423-3	414.37 ± 16.49	b

^aThe total weight of garlic bulbs harvested per pot was measured using a balance.

^bThe untreated control, water was given instead of the bacterial isolates.

^cValues represent means ± standard error of three separated experiments, each containing three pots of twenty plants per treatment.

^dThe different letters are significantly ($P=0.001$) different according to Duncan's multiple test.

5. *Burkholderia gladioli* TRK2-2 및 DL-3-Amino Butyric Acid에 의한 감자조직 배양묘에서 감자역병 억제 효과

(1) 연구배경

*Phytophthora infestans*에 의해 유발되는 감자역병은 주로 재배포장 주변의 기후조건에 크게 의존하여 온도 15~18°C이고 잦은 비로 습도가 높아 병진전의 호조건이 계속되면 전염속도가 빠르다. 감자 괴경 비대기에 감자 줄기와 잎에 이 병되면 2주내에 지상부가 완전히 고사되고, 괴경 부패를 일으키는 등 포장전체를 순식간에 괴멸하여 감자생산에 직접적인 영향을 주며, 매우 심각한 경제적 손실을 주고 있는 병이다 (Ryu 등, 2005).

식물조직배양기술은 1960년대에 원예식물인 난 배양으로 시작되었고 최근에는 멸종위기의 야생식물 종 증식에도 이용되고 있다. 영양번식을 하는 감자는 무병종서를 생산하기 위해 조직배양기술을 활용하고 있으며 씨감자 생산을 위해 양액재배를 통한 대량의 생산이 이루어지고 있다 (Farrar and Mingo-Castel, 2006, Wang and Hu, 1982). 특히, 씨감자의 양액재배는 노지에서 감자를 생산하는 경우와는 달리 농약 사용이 금지되어 있으므로 역병과 같은 감자 주요 병에 대한 방제가 매우 어려운 실정이다. 따라서 인체에 무해한 미생물을 이용하여 병을 방제하는 수단의 개발이 요구되고 있다.

농약의 대체 수단을 찾기 위한 연구 결과로 108개의 세균 균주를 감자역병균 현탁액과 혼합하여 감자 괴경에 상처 접종하였더니 18개 세균 균주가 25~60%의 병 감소효과를 나타냈으며 그 중 *Pseudomonas fluorescens*의 한 균주가 가장 안정적인 병 억제 효과를 나타냈다고 보고하였다 (Slininger 등, 2007). 또한 Hultberg 등(2010)은 세균인 *Pseudomonas koreensis*를 감자역병균을 접종하기 하루 전에 감자식물체의 잎에 살포하였더니 무처리에 비해 역병 발생이 억제되었다. 그 균주에서 분비한 biosurfactant를 농도별로 처리하였더니 낮은 농도에서

부터 단계적으로 병 발생 억제가 증가되었다고 발표하였다. 병 저항성을 나타내는 물질로 여러 식물에서 유도저항성 인자로 잘 알려진 β -aminobutyric acid (BABA)는 감자에 처리 후 감자 역병균을 접종하였더니 페놀함량과 phytoalexin 함량이 증가되었고 병은 감소하였다 (Cohen, 2002; Olivieri 등, 2009). 온실 실험에서 BABA를 시판 중인 살균제와 혼합 처리하였더니 BABA 또는 살균제를 각각 처리한 감자에 비해 역병 억제 효과가 더욱 뛰어났으며 포장시험에서도 병 발생이 억제 될 뿐 아니라 병 진전 속도가 감소되었다 (Liljeroth 등, 2010).

지금까지 선행연구 결과를 통해서 감자 역병에 저항성을 유도하는 식물근권세균으로 *Pseudomonas putida* TRL2-3, *Micrococcus luteus* TRK2-2 및 *Flexibacteraceae bacterium* MRL412를 선발하였고 BABA의 유도 활력도 입증하였다 (Kim and Jeun, 2006). 또한 이들 식물근권세균을 선접종한 감자 잎에서 저항성 반응의 하나인 과민성반응이 감자 역병균 접종 후 무처리 감자 잎에 비해 현저하게 증가함을 관찰 하였다 (Kim and jeun, 2007). 본 연구는 이들 중 저항성 적용범위가 비교적 넓은 *Micrococcus luteus* TRK2-2가 감자 조직배양묘에서도 저항성 유도 활력이 있는지 알아보고 이를 씨감자 생산에 병 방제 수단으로 활용할 수 있는지 알아보고자 BABA와 비교하여 수행하였다.

(2) 재료 및 방법

1) 감자식물체, 식물근권세균 및 병원균

a. 조직 배양된 감자식물체

감자조직배양묘(품종: 대지마)를 1cm간격으로 자른 후 3%의 sucrose, 0.0001%(0.1ppm)의 gibberellic acid (GA) 와 0.0005%(0.5ppm)의 kinetin이 포함된 Murashige & Skoog (MS) 배지가 들어있는 삼각플라스크에 넣고 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 16시간 동안 2,000 Lux 형광조건 그리고 8시간 동안 암조건의 배양실에서 80rpm으로 10일간 진탕 배양한 후 5cm 정도 자란 배양묘를 실험에 사용하였다.

b. 식물근권세균 TRK2-2의 현탁액 작성

제주의 한라산에서 분리한 식물근권세균 TRK2-2를 tryptic soy agar(TSA)배지에서 28℃에서 48시간 동안 배양하였다. TRK2-2가 배양된 배지에 살균수 10 ml를 넣어 loope를 이용하여 골고루 섞어 세균 세포를 수확한 후 UV-Visible Spectrophotometer (Varian Aust, AU/CARY 50 Conc.)를 이용하여 세균 농도를 1.0×10^6 cfu/ml로 조정하여 현탁액을 작성하였다.

c. 병원균 접종원 작성

감자역병균 *Phytophthora infestans*를 Korea Agricultural Culture Collection(KACC)에서 분양 받아 oat meal agar(OTA)배지에 접종하여 15℃에서 10일 동안 배양하였다. 유주자낭이 형성된 감자역병균에서 유주자를 유출시키기 위해 10ml 살균수를 넣고 4℃에 2시간 동안 배양하였다. 유주자 현탁액을 miracloth 3겹에 통과시켜 절단된 균사 등 이물질을 제거하고 유주자 농도를 Haemocytometer를 이용하여 1.0×10^4 zoospores/ml로 조정하였다. 유주자 현탁액을 심하게 흔들어 유주자가 시스트를 형성하도록 유도한 후 접종원으로 사용하였다.

2) 감자조직 배양묘에서의 식물근권세균 TRK2-2 또는 BABA에 의한 감자역병 억제효과

a. TRK2-2 또는 BABA 전처리

MS배지에서 배양된 감자조직배양묘를 멸균 상태에서 꺼내어 뿌리를 멸균수로 2회 씻어내어 뿌리에 남아 있는 여분의 MS배지를 제거한 후 20ml의 TRK2-2 현탁액 또는 1mM β -aminobutyric acid(BABA)를 함유하고 있는 플라스크에 넣어 감자조직배양묘의 뿌리부분에 TRK2-2 및 BABA를 처리한 후 20℃에서 24시간 동안 80rpm으로 진탕 배양하였다. 그 후 감자조직배양묘 뿌리를 멸균수로 2회 씻어내고 20ml 살균된 MS배지를 포함한 삼각플라스크에 옮겨 병원균 접종할 때까지 20℃에서 48시간 동안 배양하였다.

b. 병원균 접종

TRK2-2 또는 BABA를 선처리한 감자조직배양묘를 1일 및 3일 후 각각 꺼내어 준비된 감자역병균의 시스트 현탁액을 기저부에서 정단부까지 현탁액이 흘러내리지 않을 정도로 골고루 살포하였다. 살포 시 표면에 역병균 시스트가 고루 퍼지게 하기 위해 0.01% tween 20을 첨가하였다. 접종된 감자조직배양묘를 다시 조심하여 MS 배지를 포함한 삼각플라스크에 넣고 18°C에서 24시간 동안 100% 상대습도 조건을 유지하였다. 비교구인 무처리와 TRK2-2 및 BABA 후처리를 위한 감자조직배양묘도 위의 방법과 마찬가지로 접종하였다.

c. TRK2-2 또는 BABA 후처리

감자역병을 접종한 감자조직배양묘를 멸균 상태에서 꺼내서 상온에서 2hr 놓아두어 식물 뿌리 표면에 있는 습기를 제거한 후 미리 준비한 TRK2-2 현탁액 (1.0×10^6 cfu/ml) 또는 1mM BABA를 포함한 삼각플라스크에 각각 다시 넣었다. TRK2-2 및 BABA를 처리한 감자조직배양묘를 20°C에서 24시간 동안 암상태를 유지하면서 80rpm로 진탕 배양하였다. 대조구로는 멸균수를 사용하였다.

d. TRK2-2 및 BABA처리에 의한 병 억제 조사

TRK2-2 및 BABA를 선처리 및 후처리한 감자조직배양묘는 병원균 접종 후 1일부터 6일까지 모든 처리구의 이병율을 매일 조사하였다. 이병율은 0%, 무발생; 5%, 1 또는 2개의 잎이 갈변됨; 10%, 갈변된 잎이 다른 잎으로 전반됨; 30%, 1 또는 2개의 잎에 역병균 균사가 나타남; 50%, 역병균 균사가 다른 잎으로 전반됨; 70%, 배양묘의 2/3 이상이 갈변되고 균사로 덮임; 90%, 전체적으로 갈변되나 녹색이 남아 있음; 100%, 완전 고사로 측정하였다. 조사된 이병율을 토대로 병에 대한 저항성을 비교하기 위해 병진전정도(Area Under the Disease Progress Curve, AUDPC)를 분석하였다. $AUDPC = \sum(X_i + X_{i+1}) / 2 \times (T_{i+1} - T_i)$ 에서 X_i 는 첫 번째 병반면적율, X_{i+1} 은 첫 번째 이후의 증가한 병반면적율, $T_{i+1} - T_i$ 은 두 조사시점의 경과일수를 말한다.

3) 식물근권세균 TRK 2-2의 동정 유전자염기서열분석을 통한 동정

감자역병균에 대해 항진균 효과 및 감자식물체에서 역병균의 발병억제효과가 있는 식물근권세균 TRK 2-2를 ITS를 이용한 분자생물학적 분석방법에 의해 재동정 되었으며, 분석방법은 'Ⅲ. 연구 내 용; 1. 식물근권세균 처리에 의한 감귤 궤양병 억제; (2) 재료 및 방법; 2) 식물근권세균의 항균활성에 의한 선발; c. 선발된 식물근권세균의 유전자염기서열분석을 통한 동정'과 동일하게 수행하였다

(3) 결과 및 고찰

1) TRK2-2 또는 BABA 전처리에 의한 감자역병 억제

무처리한 감자조직배양묘의 줄기가 감자 역병균에 의해 감염되면 접종 3일부터 감염된 부위에서 갈색으로 변하기 시작하여 점차적으로 감자줄기마다 병이 진행되다가 접종 6일째에 줄기 및 잎을 포함한 조직배양묘 전체적으로 백색의 균사가 도포되면서 역병의 표징을 관찰할 수 있었고 36.7%의 이병률을 보였다 (Fig. 5-1A와 Fig. 5-2). 이는 온실 실험과 비교하여 병 진전속도가 매우 빠르게 진행되었는데 조직배양을 통한 생장한 식물체 자체가 약하여 병에도 매우 감수성이기 때문인 것으로 생각된다.

하지만 TRK 2-2을 1일전에 선처리한 감자조직배양묘에서는 무처리보다 늦은 접종 후 5일째부터 줄기가 부분적으로 갈변되기 시작했으며, 접종 6일째는 17.5%의 이병율을 나타냈으며 무처리의 조직배양묘에 비해 병진전이 매우 더디게 진행되는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 5-2). 또한 TRK 2-2를 3일전에 선처리한 조직배양묘에서도 TRK 2-2을 1일전에 선처리한 조직배양묘와 유사하게 병진전이 초기부터 억제되었다가 접종 후 6일째 이병율이 18.3%를 보임으로써 TRK2-2에 의해 병진전이 억제됨을 확인하였다 (Fig. 5-1B와 Fig. 5-2). 일반적으로 저항성이 유도되기 위해서는 일정한 시간(induction interval)이 필요하다고

알려져 있다. 감자-감자역병 관계에 있어서는 이러한 시간이 최소 3일 정도 소요되는데(Kim and Jeun 2006), 본 연구에서는 1일전에 선접종한 조직배양묘에서 병진전이 3일전 선접종한 식물체에 비해 보다 더 지연되었다 (Fig. 5-2). 이는 조직 배양 환경이 무균 상태이고 다른 외부 요인에 의한 직·간접적인 영향을 적게 받은 것으로 생각되며, 1일 전에 선 접종한 식물근권세균의 직접적인 항균 작용에 의해 역병균의 감염을 억제했기 때문인 것으로 생각된다. 항진균효과를 알아보기 위한 *in vitro* 실험에서 감자 역병균인 *Phytophthora infestans*와 TRK2-2를 PDA에 대치배양 하였더니 TRK2-2의 주변으로 저지원이 형성되어 직접적인 항균작용을 확인하였다 (결과 미제시).

BABA를 1일 전 선처리한 감자조직배양묘에서도 병진전이 접종 후 초기 며칠 동안 병진전이 뚜렷하게 억제되었으며 접종 6일째 26.7%의 이병율로 무처리구에 비해 병 발생이 감소되었다 (Fig. 5-1C와 Fig. 5-2). 또한 BABA를 3일 전에 처리한 조직배양묘에서도 6일째 이병율이 21.7%로 감자역병의 진전을 억제하였다 (Fig. 5-1C와 Fig. 5-2). BABA의 경우는 식물근권세균의 경우와는 다르게 BABA 1일전과 3일전 선처리한 조직묘 사이의 병진전 억제 정도는 유사하게 나타났다. 이는 BABA는 감자 역병균에 대한 직접적인 항균효과가 없기 때문에 두 처리 모두 저항성 유도에 의해서만 병이 억제된 것으로 보인다.

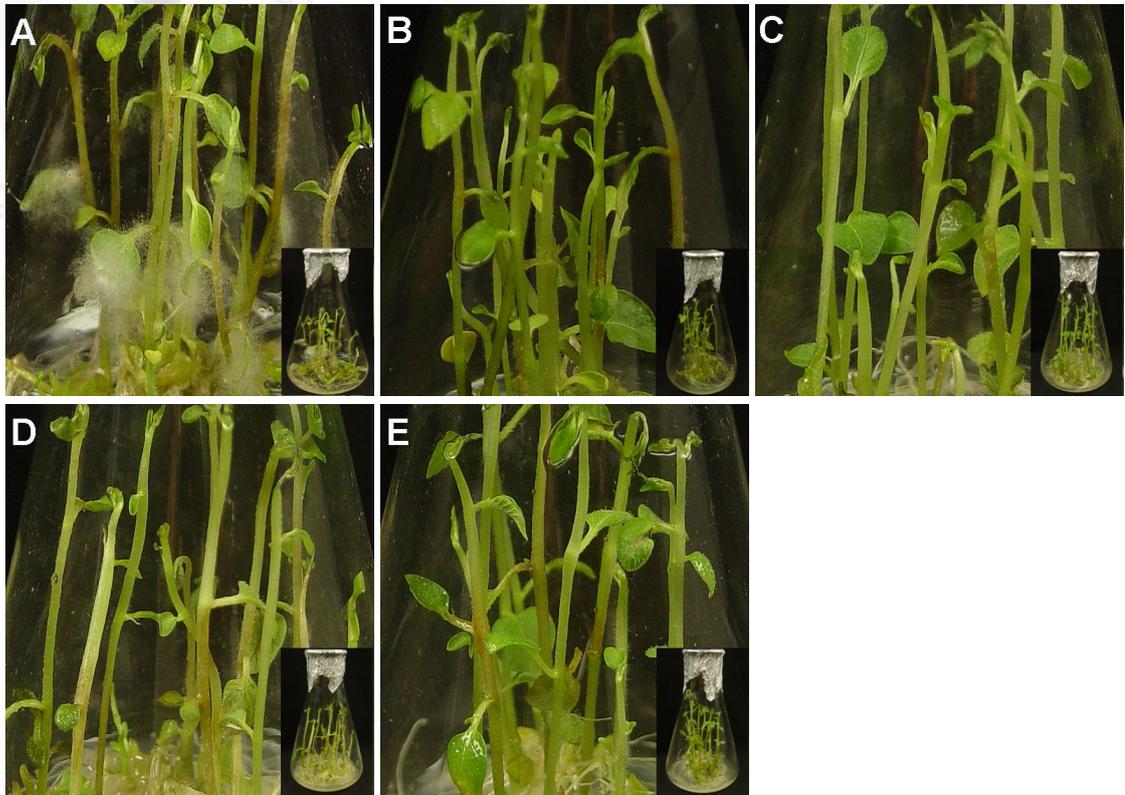


Fig. 5-1. Disease severity of potato seedling untreated control(A), pre-inoculated with bacterial isolate TRK2-2 at 1 day(B) and at 3 days(C) and pre-treated with BABA at 1 day(D) and at 3 days(E) before the fungal inoculation, respectively. The infected potato seedling were presented at 7 days after inoculation with *Phytophthora infestans* at concentration with 1.0×10^4 zoospores/ml.

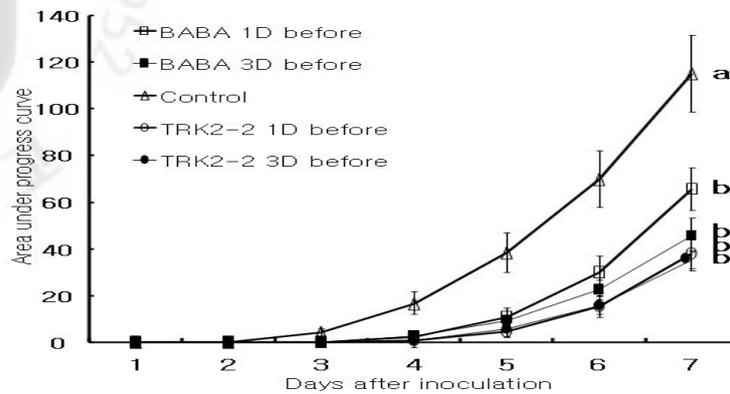


Fig. 5-2. Under diseases progress curves(AUDPC) of the infected potato seeding in tissue culture. All treatments were potato seeding untreated control, pre-treated with bacterial isolate TRK2-2 at 1 day and at 3 days, BABA at 1 day and at 3 days before the fungal inoculation, respectively. The infected potato seeding were presented at 7 days after inoculation with *Phytophthora infestans* at concentration with 1.0×10^4 zoospores/ml.

2) TRK2-2 또는 BABA 후처리에 의한 감자역병 억제

감자 조직묘에 선처리함으로써 감자역병을 억제하는 효과가 있는 식물근권세균 TRK2-2 및 BABA의 감자역병에 대해 치료 효과를 알아보기 위해서 조직 배양된 감자식물체의 줄기에 감자역병균을 접종하고 2시간 경과 후 TRK 2-2 및 BABA를 처리하였더니, 처리한 조직 배양묘에서 병 진전이 어느 정도 억제되었으나 BABA에 의한 병 억제는 통계적 유의성은 없었고 식물근권세균인 TRK2-2에 의해서는 효과가 뚜렷하게 나타났다 (Fig. 5-3).

병원균 접종 후 4일까지 무처리구와 TRK2-2 후처리구에서 감자역병의 병진전에는 차이가 없었으나 5일째부터 병 억제가 나타나 접종 후 6일째에 무처리구에서는 30.0%의 이병율을 나타낸 반면 TRK 2-2 후처리구에서는 14.4%의 이병율을 나타냈다 (Fig. 5-3B와 Fig. 5-4). 접종후기에 무처리에 비해 TRK 2-2 후처리에서 이병율이 낮게 나타난 효과는 병원균에 의한 발병이 지연된 것으로 생각되며, TRK 2-2를 처리하고 일정시간이 경과되면서 유도된 저항성과 역병균에 대한 직접적인 항균 작용에 의한 것으로 생각된다.

BABA 후처리구에서도 마찬가지로 초기에는 병진전을 억제하지 않았으나 접종 후 6일째에 22.2%의 이병율을 보여 무처리구에 비해 병이 억제 되었다 (Fig. 5-3C와 Fig. 5-4). 하지만 TRK2-2 및 BABA의 후처리는 선처리보다는 병 억제 정도가 낮았다. 이를 통해서 BABA는 선접종에 의한 저항성 유도 활력은 있으나 치료 효과는 떨어진다고 생각된다. 이러한 결과는 벼(Miyagawa and Takaya, 2000)와 완두(Heungens, 1999)에 발생하는 식물병에 대해 길항세균의 선처리에 의해 식물병이 억제되는 효과는 있었으나 후처리에 의해 식물병이 억제되지 않았다는 보고와 일치했다.

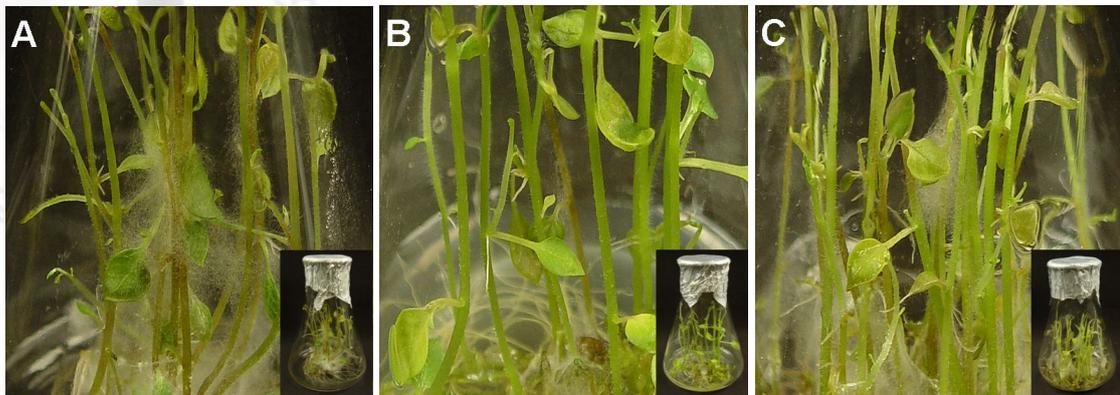


Fig. 5-3. Disease severity of potato seedling untreated control(A), post-inoculated with bacterial isolate TRK2-2(B) and post-treated with BABA(C) at 2 hours after the fungal inoculation, respectively. The infected potato seedling were presented at 7 days after inoculation with *Phytophthora infestans* at concentration with 1.0×10^4 zoospores/ml.

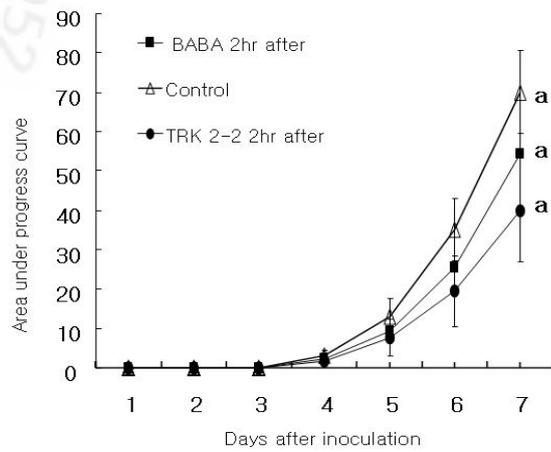


Fig. 5-4. Under diseases progress curves(AUDPC) of the infected potato seeding in tissue culture. All treatments were potato seeding untreated control, post-inoculated with bacterial isolate TRK2-2 and BABA at 2 hours after the fungal inoculation, respectively. The infected potato seeding were presented at 7 days after inoculation with *Phytophthora infestans* at concentration with 1.0×10^4 zoospores/ml.

3) 식물근권세균 TRK 2-2의 동정 유전자염기서열분석을 통한 동정

TRK 2-2에서 추출된 rDNA에서 ITS의 영역의 유전자를 특이적으로 증폭하도록 디자인 된 38R, 72F의 primer를 이용하여 얻어진 PCR의 산물의 크기는 약 650bp 및 200bp였다 (Fig. 5-5). 두 크기의 PCR산물의 염기서열을 각각 분석한 결과를 NCBI의 Gene Bank에 등록된 database에서 ITS 영역에 대한 염기서열의 상동성을 비교하였더니, *Burkholderia gladioli*와 100%의 가장 높은 상동성을 보였으므로 TRK2-2는 *Burkholderia gladioli*로 동정 되었다.

Burkholderia gladioli 로 동정된 TRK2-2는 *in vitro* 에서 직접적인 항진균 효과에 의해 선발됐으며(Lee 등, 2003), 식물근권세균 TRK2-2가 전처리 된 오이 식물체에서 탄저병균인 *Colletotrichum orbiculare*를 접종하였을때 병 발생이 감소하였다 (Jeun 등, 2004). 또한 온실에서 감자역병 연구에 적용하여 ISR을 유도하는 미생물로써의 효력을 확인했었다 (Kim and Jeun, 2007). *Burkholderia* 속 세균은 병원성진균에 대한 항진균활성을 가지고 상용농약에 대한 높은 저항성과 생존능력을 지니며 유기물분해활성이 뛰어나 토양정화에 효과적으로 이용될 수 있다 (Hong and Cho., 2007). 환경친화형 미생물농약으로 이용가능하다고 보고(Bae 등, 2007)되었으며, oomycete 병원체에 의해 발생하는 식물병(Clark and Parke, 1996; Heungens, 1999)을 억제했다. 그 중 *Burkholderia gladioli*를 식물에 처리하였더니, 다양한 대사 작용을 통해 가지과식물의 *Ralstonia solanacearum*(Do 등, 2001), 오이의 *Pythium ultimum*(Bae 등, 2007) 등에 식물 병원균의 성장을 저해하고 식물생장 촉진 등의 효과가 있었다.

본 시험의 결과를 토대로 *Burkholderia gladioli*로 동정된 TRK 2-2가 친환경 감자재배 농가에서 감자역병의 화학적 방제에 대한 대안으로 생물적 방제원으로 이용될 수 있는 가능성을 보여주고 있으며 또한 씨감자 생산에 이용되는 조직배양에도 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

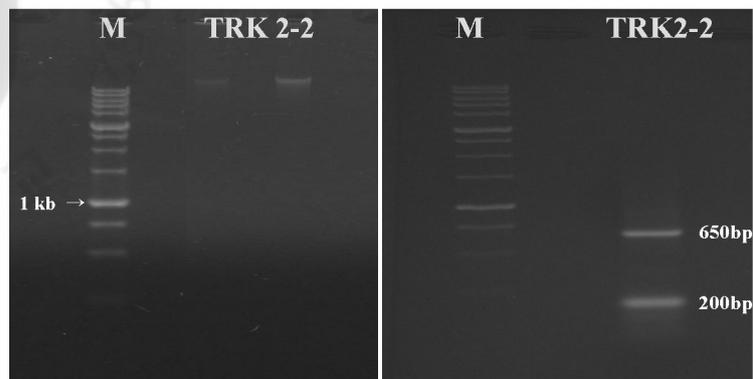


Fig. 5-5. Gel electrophoresis of total DNA(left) and PCR amplified 16S/23S intergenic spacer regions(right) from bacterial isolate TRK2-2 using universal primers 38r and 72f. M: 1kb molecular size marker.

IV. 종합고찰

생물적 방제에 대한 연구는 1980년대 이후에 중요성이 알려졌고, 식물병 방제를 위한 방법으로 길항세균의 사용이 제시되면서, 국내외적으로 많은 연구가 진행되었고, 외국에서부터 미생물을 이용한 식물병의 생물적 방제 가능성이 부각되면서 길항진균과 세균을 이용한 미생물농약에 대한 개발이 이뤄지고 있으며, 실용화 되었다(Clark와 Parke, 1996; Da La Fuente 등, 2004; Hynes와 Boyetchko, 2005). 본 연구도 미생물을 이용한 식물병의 방제 가능성을 탐색하고자 수행하였으며, 제주에서 자생하는 식물의 근권에서 유래된 식물근권세균에서 감귤에 발생하는 궤양병·역병·검은점무늬병, 마늘의 주요 토양전염병해인 마늘 흑색썩음균핵병, 감자 재배시 수확량의 감소를 초래하는 역병 등의 식물병에 대해 발병억제 효과를 확인하였다. 100개 이상 분리된 식물근권세균에서 여러 가지 식물병에 대해 항미생물활성에 의해 1차적으로 선별하고, 식물체에 처리하여 생물적 방제 효과 및 저항성 유도 등의 실험에 총 12개의 식물근권세균이 선발되었다. 감귤궤양병인 경우 2년 동안의 포장 실험 단계를 거쳐 발병억제효과가 있는 식물근권세균을 선별하였고, 농가의 적용할 수 있는 기반을 마련하였다. 식물병에 대해 발병억제 효과가 있는 미생물의 동정에는 미생물의 DNA를 추출하여 특정유전자(ITS)를 증폭하여 16S rDNA의 염기서열을 확인하고 Gene Bank에 등록된 균주들과 유사도를 비교하여 상동성이 높은 것으로 동정할 수 있는 분자생물학적인 방법(Joo 등, 2002)을 사용하였다. 이를 통해 식물근권에서 분리된 5개의 균주가 *Bacillus*속으로 동정되었으며 3개 균주는 *Burkholderia gladioli*에 속했고, 2개 균주는 *Pseudomonas*속, 기타 2종은 *Acinetobacter*속, *Miamiensis*속으로 동정되었다.

식물근권세균 *Bur. gladioli* MRL408-3, *Bur. gladioli* TRH423-3, *P. fluorescens* TRH415-2과 *P. putida* THJ609-3의 4개 균주는 감귤의 신초에 접종된 *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*에 의해 발병되는 감귤궤양병과 *Diaporthe citri*에 의해 발병되는 감귤검은점무늬병에 효과적으로 병을 억제하였다. *Phytophthora citrophthora*에 의해 발병되는 감귤역병에는 총 7개의 식물근권세

균이 선발되었으며, 그 중에 4개는 *Bacillus*속이었다. *Bur. gladioli* MRL408-3, *Bur. gladioli* TRH423-3과 *P. putida* THJ609-3은 감귤케양병과 감귤검은점무늬병에 효과를 나타내는 균주로서 감귤역병에 대해서도 효과적으로 병 진전을 억제하였다. 마늘흑색썩음균핵병을 일으키는 *Sclerotium cepivorum*에 대해 항진균 효과가 확인된 식물근권세균을 마늘식물체가 생육중인 화분의 토양 처리하였더니, 그 중에서도 *Pseudomonas fluorescens* TRH415-2가 효과적으로 병을 억제하여 마늘의 수확량을 증대시켰다. *Phytophthora infestans*에 의한 감자역병에 대해 항진균 효과된 *Burkholderia gladioli* TRK2-2를 조직배양된 감자식물체에서 선처리와 후처리를 하여 감자역병의 병진전면적을 확인하였으며, *Burkholderia gladioli* TRK2-2를 후처리 보다는 선처리하였을 때가 효과적으로 병이 억제되는 것을 확인하였다.

생물적 방제에 이용되는 중요한 미생물 그룹인, 내열성포자형성세균으로 알려진 *Bacillus*속은 내열성과 내건성의 특성으로 인해 안정적인 생물적 제제의 제형화에 있어서 많은 장점을 가지고 있다 (Handelsman과 Stabb, 1996). 그 외의 *Burkholderia*속, *Pseudomonas*속, *Serratia*속 및 *Trichoderma*속 등의 다양한 종류의 미생물에 대한 연구도 탐색되어지고 있으며, 탐색된 미생물에 대한 생물학적 방제력을 높이는 연구가 동시에 진행되고 있다 (Joo 등., 2002; Moon 등, 1988; Shen 등., 2005; 김 등., 2002; 김 등., 2003). 탐색된 미생물들은 토양 중의 잔류된 농약을 분해(Yang 등, 2007)하거나 다양한 항생물질의 생산으로 생물적 방제제(Bae 등, 2004; Jung 등, 2007; Weller, 1988)로 활용되고 있으며, 미생물 단독으로 사용할 수 있을 뿐만 아니라 다른 살균제와 혼합 또는 교차 방제하여도 효과가 증진되었다 (Li 등, 2008). 이와 관련된 몇몇 균주들은 선발되어 고추 (Shen 등, 2005), 오이(Lee 등, 2005), 토마토(Park 등, 2007)등 다양한 작물의 농업생산에 이용되고 있다.

감귤에 발생하는 케양병, 검은점무늬병, 더덩이병과 역병을 방제하기 위한 방법으로 농약을 사용하는 화학적 방제가 주로 행해지며, 미생물을 활용한 생물학적 방제는 미흡한 상태이다. 본 연구를 토대로 환경친화적 병·해충 및 잡초 방제 기술이 요구되는 친환경 농업의 기반으로 농약 사용이 제한되는 친환경 감귤 농가에 농약을 대체한 안전한 방제제로 유용하게 이용할 수 있을 것으로 기

대된다. 또한 관행농가에서 화학적 방제의 대체수단으로 사용되어 농약의 남용도 줄이고, 환경도 개선할 수 있다. *Allium*속 작물 중 마늘에 발생하는 흑색썩음균핵병, 오이탄저병, 감자·토마토·고추 식물체 등에 발생하는 역병에 대해 각각의 식물체에 처리된 식물근권세균에 의해 병 억제 효과를 확인할 수 있었다. 병 억제효과는 시판농약에 비해 떨어지지만 길항능력이 있는 식물근권세균의 현탁액을 생물 농약으로 제품화하여 친환경농가에 적용할 수 있다고 생각된다. 시판되는 친환경자재는 보관기간이 길어지면 효과가 떨어지는 등 농가에서 사용을 회피하는 경우도 있지만 제주의 단거리 이동 용이성 등의 지역적 특성을 이용하여 친환경재배 농가에서 작물에 따라, 필요한 만큼의 식물근권세균을 실험실 내에서 직접 제조하여 공급할 수 있다면 작물생장 촉진 및 발병억제 효과를 증진시킬 수 있을 것이라 판단된다. 또한 식물근권세균의 처리에 의해 식물병의 생장을 억제하는 작용 기작이 시판 중인 농약과 다른 것으로 밝혀짐으로써 기존 농약과 혼용하여 살포하였을 때 시너지 효과를 기대할 수 있는 새로운 병 방제 수단을 개발이 가능할 것으로 생각되며, 본 연구는 식물근권세균을 이용한 친환경재배의 병 방제 적용기술의 기초 자료로 활용할 수 있다고 보여진다.

V. 적 요

지금까지 병을 방제하기 위한 대체적인 방법으로 화학적 농약을 사용하였다. 최근, 환경 친화적인 생물적 방제가 조명 되었고, 제주에서 합성유기농약을 사용하지 않는 친환경작물재배의 수가 점차적으로 증가했다. 따라서 다양한 식물 병원균의 보호를 위한 대체 방안이 유기재배농장에서 강력히 요구되었다.

본 연구에서는 식물근권세균을 제주에서 서식하는 일년생 식물의 근권에서 분리하였다. 100개 이상 분리된 식물근권세균에서 여러 가지 식물병에 대해 저항성 유도 및 생물적 방제 효과 실험에 의해 총 12개의 식물근권세균이 선발되었다. 그리고 식물근권세균에 의한 병 방제 효과를 감귤, 마늘 그리고 감자에서 실험되었다. 이러한 식물근권세균은 ribosomal DNA 염기서열 분석에 의해 동정되었다. 병 억제 효과가 있는 식물근권세균 중에 42%는 *Bacillus*속에 속하였다. *Bacillus*속에서 3개의 균주는 *B. cereus*로, 또 다른 2개의 균주는 *B. weihenstephanensis*와 *B. circulans*로 동정되었다. 3개의 균주는 *Burkholderia gladioli*로 동정되었다. 그리고 또 다른 4개의 균주는 *Acinetobacter Quenomosp*, *Miamiensis avidus*, *Pseudomonas fluorescens*와 *Pseudomonas putida*로 동정되었다.

첫 번째 연구에서 식물의 근권에서 분리된 식물근권세균들이 감귤 앞에서 감귤궂양병 억제할 수 있는지 여부를 실험했다. 총 16개 균주 중 *Burkholderia gladioli* MRL408-3, *Burkholderia gladioli* TRH423-3, *Pseudomonas fluorescens* TRH415-2 및 *Pseudomonas putida* THJ609-3의 4개 균주는 *in vitro* 실험에서의 감귤궂양병원균에 대한 항균효과 및 *in vivo* 실험과 포장실험에서 감귤궂양병원균의 현탁액 단독점종 처리와 비교하여 앞에서 병 발생이 억제되었다.

두 번째 연구에서 *Phytophthora citrophthora*에 의해 발병되는 역병에 대해 식물근권에서 분리된 12균주를 감귤열매에서 조사되었다. 그 중에 *Pseudomonas putida* THJ609-3, *Burkholderia gladioli* TRH423-3, *Bacillus circulans*

BRH433-2, *Bacillus cereus* TRL2-3과 *Bacillus cereus* KRY505-3은 *in vivo*에서 병원균의 균사를 상처 접종하였더니 병 발병정도가 억제되었다.

세 번째 연구에서 감귤의 검은점무늬병에 대해 생물적 방제를 위한 효과적인 미생물로 알려져 있는 *Pseudomonas putida* THJ609-3, *Pseudomonas fluorescens* TRH415-2, *Burkholderia gladioli* MRL408-3과 *Burkholderia gladioli* TRH423-3의 4개 식물근권세균이 *in vitro* 뿐만 아니라 *in vivo*에서 조사되었다. *Diaporthe citri*에 의해 야기되는 검은점무늬병의 병발병도는 *Diaporthe citri*와 식물근권세균의 혼합액을 감귤 잎에 분무 접종하여 발병된 균주의 병반수를 측정하였다. 각각 식물근권세균 현탁액과 *Diaporthe citri*의 혼합액으로 접종된 잎에서만 소량의 병반을 확인하였다.

네 번째 연구에서 *Bacillus circulans* BRH433-2, *Burkholderia gladioli* TRH423-3, *Pseudomonas fluorescens* TRH415-2과 *Burkholderia gladioli* MRL408-3의 4개 균주는 *Sclerotium cepivorum* Berk.에 의해 발생하는 마늘혹색썩음균병에 대한 항진균활성에 의해 효과 및 다양한 식물병에 대한 저항성유도 효능 시험에 의해 우선적으로 선발되었다. 높은 항진균 활성은 *Bacillus circulans* BRH433-2와 *Burkholderia gladioli* TRH423-3 등의 인접된 부위에서 식물병원균의 균사생장의 저해로 확인되었다. *in vivo*의 실험에서 먼저 처리된 각각의 4개 균주가 마늘식물체에서의 병 저해와 마늘구근의 수확량은 미생물이 처리되지 않은 무처리 보다 높았다.

다섯 번째 연구에서 조직배양 감자식물체에서 감자역병에 대해 선접종과 후접종 된 식물근권세균 TRK2-2의 항진균 효과에 대해 조사하였다. 세균 현탁액을 1일전 또는 3일전에 선처리 된 감귤식물체에서 감자역병의 발병이 제어됐지만, 병원균 접종 후 2시간 후처리는 제어되지 못했다. 저항성유도인자로 잘 알려진 DL-3-amino butyric acid (BABA)를 선 또는 후처리에서도 TRK2-2에 의한 것과 유사한 결과를 보였다.

이들 결과를 통하여 효과적인 식물근권세균들은 농약 사용이 제한적인 친환경 농장에서 다양한 작물의 주요 병을 억제할 수 있을 것이라 판단되어 매우 유용하게 이용될 수 있다고 제시되었다.

VI. 참고 문헌

- Agrios, G. N. 2005. Systemic Acquired Resistance. P.237-242, and Antibiotics. P343-347. in: *Plant Pathology 5th ed. Elsevier Academic press. San Diego, California, USA.*
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. G. and Struhl, K. 1987. Current protocols in molecular biology. In: Preparation of genomic DNA from bacteria. ed. by K. Wilson. unit. 2.4.1~2.4.2. John Wiley, New York, USA.
- Bae, Y. S., Park, K. S. and Choi, O. H. 2007. Laboratory culture media-dependent biocontrol ability of *Burkholderia gladioli* strain B543. *Plant Pathol. J.* 23: 161-165.
- Boland, G. J and Hall, R. 1994. Index of plant hosts of *Sclerotinia Sclerotium*. *Can. J. Plant Pathol.* 16:93-108
- Chalutz, E., Droby, S., and Wilson, C. L.1989. Biological control of postharvest diseases Israel Agresearch 3: 107-118.
- Cho, W. D., Kim, W. G., Hong, S. K and Kim, W. S. 2002. *Sclerotium sp.* associated with occurrence of a new disease, globular Sclerotium rot of garlic. *The Plant Pathol. J.* 18(6): 372.
- Cho, J. I., Cho, J. Y., Park, Y. S., Son, D. M., Heo, B. G. and Kim, C. S. 2007. Screening and isolation of antagonistic Actinomyces#120 against the Kiwi fruit rot for the environment-friendly culture of Kiwi fruit. *J. Bio-Environment Control.* 16(3):252~257
- Cho, S. J., Lee, S. K., Cha, B. J., Kim, Y. H. and Shin, K. S. 2003. Detection and characterization of the *Gloeosporium gloeosporioides* growth inhibitory compound iturin A from *Bacillus subtilis* strain KS03. *FEMS Microbiol. Lett.* 223:47-51.

- Clark, A. D. and Parke J. L. 1996. Biological control of *Pythium* damping off of supersweet corn by seed-applied *Burkholderia cepacia* AMMDR1. *Phytopathology*. 86: 54.
- Clarkon, J. P., Payne, T., Mead, A. and Whipps, J. M. 2002. Selection of fungal biological control agents for control of white rot by sclerotial degradation in a UK soil. *Plant Pathol.* 51:735-745
- Copping. L. G. 2004. The manual of biocontrol agents. third edition, BCPC. UK. p702
- Crowe, F., Parks, R. and Bafus, R. 2002. Fungicidal control of white rot on garlic and onion in Oregon. Proc. of the 7th international workshop on *Allium* white rot, June 4-8, 2002. Harris Ranch, California.
- Da La Fuente, L., Thomaschow, L. S., Weller D. M., Bajsa, N., Quagliotto, L., Chernin, L. and Arias, A. 2004. *Pseudomonas fluorescens* UP61 isolated from birdsfoot trefoil rhizosphere produces multiple antibiotics exerts a broad spectrum of biocontrol activity. *Eur. J. Plant Pathol.* 110: 671-681.
- Elad, Y., Yunis, H. and Katan, T. 1991. Multiple resistance to benzimidazoles, dicarboximides and diethofencarb in field isolates of *Botrytis cinerea* in Israel. *Plant. Pathol.* 41:41-46.
- Esler, G. and Coley-Smith, J. R. 1983. Flavor and odor characteristics of species of *Allium* in relation to their capacity to stimulate germination of sclerotia of *Sclerotium cepivorum*. *Plant pathology* 32:13-22
- Gerbrandy, S. J. 1992. Effect of different temperature treatment on dormancy of sclerotia of ten isolates of *Sclerotium cepivorum*. *Neth. J. Pl. Path.* 98:269-276.
- Glick, B. R., 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microiol.* 41:109-117
- Gottwald. T., J. Graham, C. Bock, G. Bonn, E. Civerolo, M. Irey, R. Leite, G. McCollum, P. Parker, J. Ramallo, T. Riley, T. Schubert, B. Stein. and E.

- Taylor, 2009. The epidemiological significance of post-packinghouse survival of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* for dissemination of Asiatic citrus canker via infected fruit. *Crop Protection*. 28:508-524
- Graham, J. H. and, Menge, J. A. 2000. *Phytophthora*-induced diseases. In: Comendium of Citrus Diseases, 2nd edn. by L.W. Timmer, S.M. Garnsey, and J.H. Graham. pp. 12-15. APS Press, St. Paul. MN, USA.
- Gurtler. V., and Stanisich. V. A. 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*. 142: 3-16.
- Handelsman, J., Nesmith, W. C. and Raffel, S. J. 1991. Microassay for biological and chemical control of infection of tobacco by *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *Curr. Microbiol.* 22: 317-319.
- Handelsman, J., Raffel, S., Mester, E. H., Wunderlich, L. and Grau, .C. R. 1990. Biological control of damping-off of alfalfa seedlings by *Bacillus cereus* UW85. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 713-718.
- Handelsman, J. and Stabb, E. V. 1996. Biocontrol of soilborne plant pathogens. *Plant Cell*. 8:1855~1186.
- Heungens, K. and Parke, J. L. 2000. Zoospore homing and infection events: Effects of the biocontrol bacterium *Burkholderia cepacia* AMMDR1 on two oomycete pathogens of pea (*Pisumsativum* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 5192-5200.
- Hong. S. H. and Cho. K. S. 2007. Effect of plants, rhizobacteria and physicochemical factors on the Phytoremediation of contaminated soil. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 35: 261~271.
- Hynes, R. K. and Boyetchko, S. M. 2005. Research initiatives in the art and science of biopesticide formulations. *Soil Biology & Biochemistry* xx:1-57
- Hyun, J. W., Lee, S. C., Kim, K. S. and Jee, H. J. 2001. *Phytophthora*-induced diseases on citrus in Jeju Island. *Plant Pathol. J.* 17: 184-188.
- Hyun, J. W., Kim, D. H., Kim, K. S., Lee, S. C., Ko, S. W. and Lim, H. C.

2004. Diseases and the symptoms recently occurred on 'Shiranuhi' citrus cultivar in Jeju Island. *Res. Plant Dis.* 10: 94-99.
- Jee, H. J. 1999. The genus *Phytophthora* in Korea. Proceeding of Fall Meeting. *Kor. Soc. Plant Pathol.* 13: 6-7.
- Jeong, M. J., Jang, S. S. and Kim, H. K. 1997. Interactions between biocontrol agents and indigenous microorganisms in rhizosphere of cucumber. *Kor. J. Plant Pathol.* 13(6):421~426.
- Jeun, Y. C., Park, K. S. and Kim, C. H. 2001. Different mechanisms of induced systemic resistance (ISR) and systemic acquired resistance (SAR) against *Colletotrichum orbiculare* on the leaves of cucumber plants. *Mycobiology.* 29:19-26.
- Jeun, Y. C. 2002. Signal pathway and resistance expression of systemic induced resistance. *J. Subtropic Agri. Biotech., Cheju Nat'l Univ.* 18(2):43-51.
- Jeun, Y. C., K. S. Park, C. H. Kim, W. D. Fowler, and J. W. Kloepper. 2004. Cytological observations of cucumber plants during induced resistance elicited by rhizobacteria. *Biological Control* 29: 34-42.
- Jung, W. C., Shin, T. S, Do, K. S., Kim, W. K., Lee, J. H. and Choi, K. H. 2006. Development of antagonistic microorganism for biological control of Pythium blight of turfgrass. *Res. Plant Dis.* 12: 260-266.
- Jung, H. K., Kim, J. R., Woo, S. M. and Kim, S. D. 2007. Selection of the auxin, siderophore, and cellulase-producing PGPR, *Bacillus licheniformis* K11 and its plant growth promoting mechanisms. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* 50: 23-28.
- Joo, G. J., J-H. Kim, and S. J. Kang. 2002. Isolation of antagonistic *Bacillus ehimensis* YJ-37 and its antifungal activity against vegetables damping-off fungi. *Kor. J. of Life Sci.* 12:200-207.
- Kang, I, B. 2002. Studies of Citrus Canker caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in the Citrus Cultivating Areas for Export to USA.

제주대학교 박사학위논문.

- Kerr, A. 1980. Biological control of crown gall through production of agrocin 84. *Plant Dis.* 64: 25~30.
- Kim, Y.-K., Kwon, M.-K., Shim, H.-S., Yeh, W.-H., Kim, T.-S., Cho, W.-D. and Kim, C.-H. 2004. A new method for sclerotial isolation of two species of *Sclerotium* from infested soils. *Plant Pathol. J.* 20:240-243.
- Kim, Y.-K., Kwon, M.-K., Cho, W.-D., Kim, T.-S., Shim, H.-S., Lee, Y.-H., and Lee, S.-C. 2004. Pathogenicity of Two Species of *Sclerotium* to Nine Cultivars of Garlic Cultivated Widely in Korea *Res. Plant Dis.* 10(2):105-111.
- Kloepper, J. W., J. Leong, M. Teintze, and M. N. Schroth. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria, *Nature* 286: 885-886.
- Kloepper, J. W., Ryu, C.-M. and Zhang, S. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94:1259-1266
- Lee, C. S., Kim, K. D., Hyun, J. W. and Jeun, Y. C. 2003. Isolation of Rhizobacteria in Jeju Island showing anti-fungal effect against various plant pathogens. *Microbiology.* 31: 251-254.
- Latorre, B. A., Agosin, E., San, Martin, R. and Vasquez, G. S. 1997. Effectiveness of conidia of *Trichoderma harzianum* produced by liquid fermentation against Botrytis bunch rot of table grape in Chile. *Crop Protect.* 16:209-214.
- Lee, Y. S., Jun, H. J., Lee, C. H. and Song, C. H.. 1997. Isolation of antibiotic-producing microorganisms antagonistic to soilborne pathogenic fungi of bentgrass and their antifungal activity. *Kor. J. Org. Agric.* 6: 133-149
- Lee, S.-Y., Ryu, J.-D. and Kim, H.-G., 2005. Environmental Factors Affecting Parasitism to Cucumber Powdery Mildew Fungus, *Sphaerotheca fusca* by

- Ampelomyces quisqualis* 94013 and Its Host Range. *Res. Plant Dis.* 11(2):167-172.
- Lee, S.-Y., Lee, S.-B., Kim, Y.-K. and Hwang, S.-J. 2006. Biological control of garlic white rot accused *Sclerotium cepivorum* by *Sclerotium* sp. using *Bacillus subtilis* 122 and 23. *Res. Plant Dis.*12(2):81-84.
- Li, X., Han, J. S., Jin, X., Yin, D. and Choi, J. E. 2008. Control of Alternaria leaf blight of ginseng by microbial agent and fungicides. *Res. Plant Dis.* 14: 102-106.
- Manjula, K., Krishna Kishore, G., Girish, A. G. and Singh, S. D. 2004. Combined application of *Pseudomons fluorescens* and *Trichoderma viride* has an improved biocontrol activity against stem rot in grandnut. *Plant Pathol. J.* 20(1):75~80.
- Mari, M., Guizzardi, M. and Pratella, G. C. 1996. Biological control of gray mold in pears by antagonistic bacteria. *Biol. Control.* 7:30-37
- Mena violante, H. G. and Olalde Portugal, V. 2007. Alteration of tomato fruit quality by root inoculation with plant growth promoting rhizobacteria(PGPR): *Bacillus subtilis* BEB-13bs. *Scientia Horticulturae* 113: 103-106.
- McLean, K. L. and Stewart, A. 2000. Application strategies for control of onion white rot by fungal antagonists. *N. Z. J. Crop Hort. Sci.* 28:115-122.
- Michael Davis, R. 2002. Use of a natural product to stimulate sclerotial germination of *Sclerotium cepivorum* for the control white rot of onions and garlic. *Pest Management Grants Final Report* : 1-9.
- Min, J. Y., Park, K. S. and Kim, C. H. 2000. Antifungal activity of crude extracellular polysaccharides(EPS) extracted from *Burkholderia cepacia* strain 923-87 on anthracnose of pepper fruit and cucumber plants. *The Plant Pathology Journal.* Vol. 16, 348.
- Moon, B. J., Chung, H. S. and Cho, C. T. 1988. Studies on Antagonism of *Trichoderma* Species to *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* I. Isolation,

Identification and Antagonistic Properties of Trichoderma Species. *Kor. J. Plant Pathol.* 4(2):111-123

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

Nam, M. H., Shin, J. H., Choi, J. P., Hong, S. I., Kim, Y. G. and Kim, H. T. 2009. Identification of Rhizo-bacterium Inhibiting Diaporthe citri Causing Citrus Melanose. *Kor. J. Pesticide Sci.* 13(4):332~335.

Nielsen, M., Sorenson, J., Fels, J. and Pedersen, H. C. 1998. Secondary metabolite-and endochitinase-dependent antagonism toward plant-pathogenic microfungi of *Pseudomonas fluorescens* isolates from sugar beet rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3562-3569.

Park, K. S., and J. W. Kloepper. 2000. Activation of PR-la promoter by rhizobacteria that induce systemic resistance in tobacco against *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *Biological Control* 18: 2-9.

Raupach, G. S., and Kloepper, J. W. 1998. Mixtures of plant growth promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathology.* 88: 1158-1164.

Park, K. S., Paul, D., Kim, Y. K., Nam, K. W., Lee, Y. K., Choi, H. W. and Lee, S. Y. 2007. Induced systemic resistance by *Bacillus vallismortis* EXTN-1 suppressed bacterial wilt in tomato caused by *Ralstonia solanacearum*. *Plant Pathol. J.* 23(1):22~25.

Schisler, D. A., Slininger, P. J., Behle, R. W. and Jackson, M. A. 2004. Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant diseases. *Phytopathology* 94:1267-1271

Shiotani, H., H. Uematsu, T. Tsukamoto, Y. Shimizu, K. Ueda, A. Mizuno. and S. Sato, 2009. Survival and dispersal of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* from infected Satsuma mandarin fruit. *Crop Protection.* 28:19-23.

- Siddiqui, I. A. and Shaukat, S. S. 2003. Combination of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pochonia chlamydosporia* for control of root infecting fungi in tomato. *J. Phytopathology* 151: 215-222.
- Sim, J. B., Chung, I. M., Ku, H. M., Choi, H. W., Lee, J. M. and Chun, S. C. 2008. Enhancing the biological control of rice seedling disease by adding specific carbon sources into the *Bacillus cereus* D324 formulation in water-seeded rice. *Plant Pathol. J.* 24: 58-62.
- Smith, K. P., Havey, M. J., and Handelsman, J. 1993. Suppression of cottony leak of cucumber with *Bacillus cereus* strain UW85. *Plant Dis.* 77: 139-142.
- Song, J. H., Kwon, H. M., Moon, D. Y., Kang, H. K. and Koh, Y. J. 1997. Isolation and identification of *Phytophthora citrophthora* from imported orange fruits. *Korean. J. Plant Pathol.* 13: 129-131.
- Spadaro, D. and Gullino, M. L. 2005. Improving the efficacy of biocontrol agents against soilborne pathogens. *Crop Protection* 24: 601-613.
- Thomidis, T. 2002. Variation in aggressiveness of Greek isolates of *P. citrophthora* as indicated by their relative abilities to cause crown rot on peach trees, *Phytoparasitica* 30: 191 - 193.
- Timmer, L. W., Zitko, S. E. and Albrigo, L. G. 1998. Split applications of copper fungicides improve control of melanose on grapefruit in Florida. *Plant Dis.* 82:983~986.
- Weller, D. M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26: 379-407.
- Winding, A., Binnerup, S. J. and Pritchard, H. 2004. Non-target effects of bacterial biological control agents suppressing root pathogenic fungi. *FEMS Microbiol. Ecol.* 47: 129-141.
- Wisniewski, M. E., and Wilson, C. L. 1992. Biological control of postharvest disease fruits and vegetables: Recent advances. *Hortscience* 27: 94-98.
- Wilson, C. L., and Wisniewski, M. E. 1989. Biological control of postharvest

disease fruits and vegetables: an emerging technology. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2: 425-441.

Vandenbergh, P. A. and Gonzalez. 1984. Method for protecting the growth of plants employing mutant siderophore producing strains of *Pseudomonas putida*. U.S. Patent #4,479,936.

Van Loon, L. C., P. A. H. M. Bakker, and C. M. J. Pieterse. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36: 453-483.

Yakoby, N., R. Zhou, I. Kobier, Diior and D. Prusky, 2001. "Development of *Collectotrichum gloeosporioides* restriction enzyme-mediated integration mutants as biocontrol agents against anthracnose disease in avocado fruits", *Phytopathology*, 91:143-148.

Yang. C., Dong, M., Yuan, Y., Huang, Y., Guo, X. and Qiao, C. 2007. Reductive transformation of parathion and methyl parathion by *Bacillus* sp. *Biotechnol Lett.* 29: 487-493.

Zhang, B. X., Zhang, P. and Chen, X. B. 2000. Factors affecting colonization of introduced microorganisms on plant roots. *Chinese Journal of Applied Ecology.* 11: 951-953.

Zhang, L.-J., Shi, H.-Z., Wang, J.-J., Chang, S.-X. and Shen, S.-S. 2010. Selection of Biocontrol Agents against Phytophthora Blight of Pepper and Its Root Colonization Ability. *Res. Plant Dis.* 16(2):158-162.

고복수. 2009. 감귤원예. (주)천제출판인쇄. 통권197호(177). pp. 2~7. 제주.

국립식물검역소.1999. 한국산 감귤생과실의 대미수출 검역요건 식물검역규정집 pp.300~314

권혁모. 1996. 감귤검은점무늬병의 병원, 발생생태 및 약제 방제에 관한 연구. 제주대학교 박사학위 논문. 1-79.

권혁모, 남기웅, 김광식, 김동환, 이성찬, 현재욱 (2003) 감귤나무 가지에서 분리한 검은점무늬병균 *Diaporthe citri*의 균학적 특징. 식물병연구 8:153~158.

김경필. 2006. 감귤원예. (주)천제출판인쇄. 통권181호(161). pp. 12~19. 제주.

- 김규동, 이정윤, 남궁석. 2008. 서울지역 주부들의 친환경농산물 구매행동. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 37(12): 1667~1673.
- 김진호, 최용화, 강상재, 이인구, 주길재. 2002. *Bacillus ehimensis* YJ-37에 의한 채소류 모잘록병의 생물학적 방제. *Kor. J. Life Sci.* 12(4):416-422.
- 농업경제연구원. 2010. 국내·외 친환경농산물의 생산실태 및 시장전망.
- 박경석, 2011. 미생물농약의 개발현황과 바실러스 미생물의 중요성. 한국공업화학회. 14(4):1~11.
- 임양빈, 김경선, 경기선, 김남숙, 하현영, 이희동, 오경석, 김정원, 류갑희. 2003. 국내과수류의 농약사용 실태조사. *Kor. J. Pesticide Sci.* 7(4):258~263.
- 이성찬, 송장훈, 김대현, 권혁모. 1997. 감귤케양병의 발생 생태 및 조기진단 연구. 1996년도 농진청원예연구소 제주감귤연구소 시험연구보고서 pp.1250~1254.
- 우상민, 김상달. 2007. 생물방제능과 식물성장촉진능을 동시에 가지는 *Bacillus licheniformis* K11의 non-siderophore 항진균물질 및 cellulase의 생산조건 확인. *Kor. J. Life Sci.* 17(7):983~989.
- 제주특별자치도 제주·서귀포시청 친환경감귤농정과. 2007. 제 11호 태풍 나리 내습에 따른 긴급 병해충 방제. 제주특별자치도.
- 최용철, “병해의 생물적 방제와 생물농약”, 농업과학기술원
- 허길현, 박서기. 2005. 전남 지역 유자과원의 검은점무늬병균 포자형성과 비산. 식물병연구 11:16~20.
- 허노열, 오한중. 1999. 마늘흑색썩음균핵병 발생소장과 방제에 관한 연구. 농약연구소 시험보고서: 129-141.
- 현재욱. 2008. 감귤원예. (주)천제출판인쇄. 통권192호(172). pp. 60~61. 제주.
- 현재욱, 고상욱, 김동환, 한승갑, 김광식, 권혁모, 임한철. 2005. 친환경적 감귤 병 방제를 위한 구리제의 효율적 사용. 식물병연구 11:115~121.
- 현재욱, 김동환, 김광식, 이성찬, 고상욱, 임한철. 2004. 최근 부지화감귤 품종에 발생하는 식물병의 종류 및 그 증상. 식물병연구 10:94~99.

감사의 글

아주 오랜만에 글을 씁니다. 글의 시작을 어찌할까 고민 중인데, 글의 끝은 이미 눈앞에서 아른거리며, 글의 시작을 괴롭힙니다. <시작과 끝>은 참 좋은 짝입니다. 시작의 설레임과 끝의 충만감은 안 먹어도 배부르게 합니다. 저의 공부도 마늘로 시작된 2년 동안의 농업인기술개발과제와 3년간의 감귤병해로 1차적인 마무리를 짓습니다. 욕심은 많고, 실력은 부족한 저를 채우고자 시작한 공부였으며, 아직도 많이 부족합니다만, ‘끝이 좋아야 모든 것이 좋다’는 명언처럼 끝이 있어 기분은 좋습니다. 스승님, 친구, 선후배, 가족 등 많은 분들의 도움으로 농사의 재미, 자연의 지혜, 결실에 대한 겸손과 나눔 등을 배웠으며, 그것을 바탕으로 한편의 논문이 완성되었습니다. 그 고마움을 개인마다 표현하고 싶지만 제한된 공간에 담기에는 터무니없이 부족합니다.

먼저, 피와 살이 될 가르침으로 5년 동안 저를 지도해주시느라 마음고생 많으셨던 전용철 교수님께 마음 깊이 감사드립니다. 고맙습니다.

2002년에 <자연예찬농원>을 시작으로 <농업>과 손잡은 저에게 관심과 격려로 힘이 되어주신 송창길 교수님, 바쁘신 와중에도 부족한 저의 논문을 세심히 검토해주신 감귤시험장의 현재욱 박사님과 식물검역원의 강익범 과장님, 스쳐가는 말 한마디에도 따뜻함이 있으신 김동순 교수님, 제가 나태와 손잡으려 할 때마다 시종일관, 부지런한 모습을 보여주신 강영길 교수님께 많은 것을 배웠습니다. 저의 엉뚱한 질문에 대답을 충실히 해주시며 새로운 강의법으로 지도해주신 현해남 교수님과 저의 연구에 관심 열어주신 김주성 교수님께 감사드립니다. 식물병리학 실험실, 농학과 대학원 및 식물자원환경전공의 선후배님들께도 감사의 마음을 글로 대신합니다. 늘 부족하지만 2011년의 상자를 채웠습니다. 또 다른 상자를 2012년에는 무엇으로 채울까 고민 중입니다. 하늘에 계시지만 저의 등대이신 할아버지의 말씀대로 올해도 ‘밥 값하는 사람’이 되고자 노력하겠습니다. 끝으로, 하늘 덕에 배울 수 있는 기회를 받았고, 공부하는 동안 많은 조언과 관심을 주신 제가 사랑하는 분들께 시 한편으로 감사의 마음을 전합니다. 고맙습니다.

……라음의 첫눈

텅 빈 공원에 첫 눈이 내린다.

놀이기구의 뼈격 임도 낮은 벤치의 그림자도
‘라’ 음을 낸다.

자장자장 거리는 밤
시린 겨울의 고요 속, 샅포시 내리는 목화솜의 따뜻한 음표들

사랑하는 사람들이 ‘라’음에 투영된다.
보 고 싶 다

조심스레
싱그러운 ‘라’ 음의 첫 발자국을 남긴다.

- 2011년 12월 식물병리학실험실에서 강소영 올림 -