



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](#)

碩士學位論文

식물근권세균에 의한 감귤 더듬이병
억제에 관한 연구

Studies on Suppression of Citrus Scab by Bacterial
Isolates from Plant Rhizosphere

濟州大學校 大學院

農學科

金昭娟

2011年2月

식물근권세균에 의한 감귤 더덩이병 억제에 관한 연구

指導教授 田 溶 哲

金 邵 娟

이 論文을 農學 碩士學位 論文으로 提出함

2011年 2月

金邵娟의 農學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____ ①

委 員 _____ ①

委 員 _____ ①

濟州大學校 大學院

2011 年 2月

목 차

List of Figures	ii
List of Tables	iii
A B S T R A C T	1
I. 서 론	2
II. 재료 및 방법	5
1. 감귤 더덩이병원균 분리	
2. 식물근권세균 분리	
3. 식물근권세균의 감귤 더덩이병원균에 대한 항진균 효과 실험	
4. 감귤 식물체에 감귤 더덩이병원균의 접종 및 관찰	
1) 선발한 식물근권세균 선 처리 후 감귤더덩이병원균 접종	
2) 선발한 식물근권세균과 감귤 더덩이병원균 혼합접종	
5. 감귤 식물체에서 감귤 더덩이병원균의 성장 억제를 형광현미경으로 관찰	
6. 선발한 식물근권세균의 total DNA 추출과 염기서열 분석	
III. 결 과	11
1. 감귤 더덩이병원균에 대한 분리한 식물근권세균의 항진균 효과	
2. 감귤 식물체에서 선발된 식물근권세균에 의한 감귤 더덩이병원균의 억제	
1) 선발한 식물근권세균을 선 처리 후 감귤 더덩이병원균 접종의 직접 효과	
2) 선발한 식물근권세균과 감귤 더덩이병원균 혼합 접종의 직접 효과	
3. 감귤 잎에서의 감귤 더덩이병원균의 성장 억제 효과 형광현미경 관찰	
1) 선발한 식물근권세균 선 처리 후 감귤 더덩이병원균의 성장 억제	
2) 선발한 식물근권세균과 감귤 더덩이병원균 혼합접종의 성장 억제	
4. 감귤더덩이병원균에 효과적인 식물근권세균의 동정	
IV. 고 찰	34
V. 적 요	37
VI. 참 고 문 헌	38

List of Figures

- Fig. 1. Rhizobacteria showing antifungal effect (D: THJ 609-3 , E: MRL 408-3, F: TRH 423-3) or not (B: KRY 505-3, C: CMC 903-2) against *Elsinoe fawcettii* on the PDA medium. The control (A) treated with agar block instead of bacterial isolation. **13**
- Fig. 2. Disease severity on citrus leaves untreated (A) or pre-treated with rhizobacterial suspension (B: THJ 609-3, C: MRL408-3, D: TRH 423-3) or with fungicide (E: Imibenconazol) at 14 days after pathogen inoculation with *E. fawcettii* (2.1×10^6 conidial/ml). **16**
- Fig. 3. Disease severity on citrus leaves at 14 days after inoculated with *E. fawcettii* (2.2×10^6 conidial/ml) (A) or treated with mixture of the *E. fawcettii* and rhizobacteria (4.2×10^6 conidial/ml and 4.2×10^6 cfu/ml, respectively) (B: THJ 609-3, C: MRL408-3, D: TRH 423-3) or with mixture of the *E. fawcettii* and fungicide (E: Imibenconazol). **20**
- Fig. 4. Fluorescence microscope observation of infection structures on the citrus leaves untreated (A), pre-treated with suspension of rhizobacterial strains (B: THJ609-3, C: MRL 408-3, D: TRH 423-3) or treated with fungicide (E: Imibenconazol) at 1 day, 5 days, 10 days after inoculation with *Elsinoe fawcettii*. Abb.: sp; fungal spore, gt; gum tube, ns; necrosis, ba; bacterium. **23**
- Fig. 5. Fluorescence microscope observation of infection structures on the citrus leaves at 1 day, 5 days, 10 days after inoculated with *E. fawcettii* (2.2×10^6 conidial/ml) (A) or treated with mixture of the *E. fawcettii* and rhizobacteria (4.2×10^6 conidial/ml and 4.2×10^6 cfu/ml, respectively) (B: THJ 609-3, C: MRL408-3, D: TRH 423-3) or with mixture of the *E. fawcettii* and fungicide (E: Imibenconazol). Abb.: sp; fungal spore, gt; gum tube, ns; necrosis, ba; bacterium. **29**
- Fig. 6. Gel electrophoresis of PCR amplified internal transcript spacer regions of DNA from rhizobacterial isolations THJ 609-3(lane 1), MRL 408-3(lane 2), TRH 423-3(lane 3) using universal primers 38r and 72f. M: 1kb ladder(iNtRON Bio.) **34**

List of Tables

Table 1. Size of inhibition zones formed by rhizobacteria against <i>Elsinoe fawcettii</i> on the PDA medium.	14
Table 2. Number of scab lesions on the citrus leaves untreated, pre-inoculated with rhizobacterial strains or treated with fungicide at 14 days after inoculation with <i>Elsinoe fawcettii</i>	17
Table 3. Number of scab lesions on the citrus leaves at 14 days after inoculation with suspension of <i>Elsinoe fawcettii</i> , mixture of the <i>E. fawcettii</i> and rhizobacteria or with mixture of the <i>E. fawcettii</i> and fungicide.	21
Table 4. Number of fungal spores on the citrus leaves untreated, pre-treated with suspension of rhizobacterial strains THJ 609-3, MRL 408-3 or TRH 423-3 or treated with fungicide Imibenconazol at different time after inoculation with <i>Elsinoe fawcettii</i>	25
Table 5. Rate of gem tube formation on the citrus leaves untreated, pre-treated with suspension of rhizobacterial strains THJ609-3, MRL 408-3 or TRH 423-3 or treated with fungicide Imibenconazol at different time after inoculation with <i>Elsinoe fawcettii</i>	26
Table 6. Frequency of necrosis on the citrus leaves untreated, pre-treated with suspension of rhizobacterial strains THJ 609-3, MRL 408-3 or TRH 423-3 or treated with fungicide Imibenconazol at different time after inoculation with <i>Elsinoe fawcettii</i>	27
Table 7. Number of fungal spores on the citrus leaves after inoculated with <i>E. fawcettii</i> or treated with mixture of the <i>E. fawcettii</i> and rhizobacteria THJ 609-3, MRL 408-3 or TRH 423-3 or with mixture of the <i>E. fawcettii</i> and fungicide at different time after inoculation with <i>Elsinoe fawcettii</i>	30
Table 8. Rate of gum tube formation on the citrus leaves after inoculated with <i>E. fawcettii</i> or treated with mixture of the <i>E. fawcettii</i> and rhizobacteria THJ 609-3, MRL 408-3 or TRH 423-3 or with mixture of the <i>E. fawcettii</i> and fungicide at different time after inoculation with <i>Elsinoe fawcettii</i>	31
Table 9. Frequency of necrosis on the citrus leaves after inoculated with <i>E. fawcettii</i> or treated with mixture of the <i>E. fawcettii</i> and rhizobacteria THJ 609-3, MRL 408-3 or TRH 423-3 or with mixture of the <i>E. fawcettii</i> and fungicide at different time after inoculation with <i>Elsinoe fawcettii</i>	32

A B S T R A C T

Elsinoe fawcettii is one of major pathogenic bacteria which cause citrus scab diseases, resulting in fruit blemishes that reduce the economic value of fruit. However, by increasing interest to safe products of crops the alternative methods of disease control is highly required. We irradiated whether the 100 bacterial strains isolated from Jeju Island have antifungal effect or suppression effect of pathogenic processing caused by *Elsinoe fawcetti* bacillus on citrus. Among them three bacterial strains THJ 609-3, MRL 408-3 and TRH 423-3 showing antifungal effect against *Elsinoe fawcetti* were selected. For application to the farm, pre-inoculation with the selected bacterial strains was carried out which could suppress the citrus crab on the citrus leaves. Also, inoculation with the mixture with the bacterial strains and the pathogen suppressed the disease severity as much as the case of the pre-inoculation. The observation with a fluorescence microscope revealed that the selected bacterial strains could decrease the number of fungal spores. The ratio of gum tube formation was also decreased by the selected bacterial strains at 1 and 5 days after the fungal inoculation. The THJ 609-3 was identified as *Pseudomonas pudia* as a result of analysing the internal transcript spaces (ITS) of the rhizobacterial rDNA. And the MRL 408-3 and TRH 423-3 were identified as *Burkholderia gladioli*. These results may be valuable when the selected rhizobacterial strains used as the environment-friendly microbe for biological control scab caused by *Elsinoe fawcettii* bacillus on citrus.

I. 서 론

제주에서 감귤재배는 1950년에는 면적이 100ha이었고, 1975년도 1만ha, 1996년에는 2만5천ha 이상으로 증가 되었으나, 과잉생산으로 인해 유통처리의 문제로 생산 가치가 떨어지게 되는 붕괴위기를 맞아 고품질의 안정적인 생산을 위해 간벌을 실시하여 2009년부터 2만ha를 유지시키고 있다(고, 2009). 현재의 전체 경지면적의 37%, 전체 농가의 87%를 차지하며 제주의 없어서는 안 될 하나의 산업이다(고, 2009).

감귤 생산에 문제시 되는 주요 감귤 병 중 하나인 감귤 더듬이병의 원인이 되는 병원균은 *Elsinoe fauvecetti* bitancourt & jenkins(citrus scab), *Elsinoe australis*(sweet orange scab), *Sphaceloma fauvecettii* var. s cabiosa(tryon's) 3 가지에 의해 발생되며(Timmer, 2000), 이 중 *Elsinoe fauvecettii*가 제주에서 주로 재배하는 온주 밀감에 병을 일으킨다 (현 등, 2002). *Elsinoe fauvecettii*의 병원형은 FBHR(Florida Broad Host Range)형과 FNHR(Florida Narrow Host Range)형 두 가지가 있으며 이들에 의해 감귤 잎과 열매에 병징이 발생된다 (Timmer 등, 1996).

감귤 더듬이병 발생시기는 주로 5~6월에 발생하기 시작하여 강우가 증가할 때 발생 정도가 심하다 (Hyun 등, 2001). 이러한 감귤 더듬이병은 제주내 감귤 재배에 있어 상업적인 가치를 감소시킨다 (Hyun 등, 2001). 제주에서의 감귤 더듬이병은 약제를 거의 사용하지 않는 친환경재배 과원이나 방제가 제대로 이루어지지 않은 곳을 제외하면 관행재배에서는 약제로 필수적으로 방제를 하기 때문에 많이 발생하지 않는다 (현, 2009). 하지만 병원균이 전년도에 병에 감염된 잎이나 가지에 남아 있는 농지의 경우 강우가 빈번하게 되면 병이 전파되어 큰 피해를 입을 수 있다 (현, 2009).

감귤 더듬이병 방제는 주로 화학적 방제로 이루어지고 있으며 3~4월 신초가 나기 전 디치아논(델란, 동부하이텍), 메티람(썬업, 한국삼공), 이미벤코나졸(확시란, 동방아그로), 디페코나졸(푸르젠, 경농), 베노밀(벤레이트, 신젠타), 등을 살포함으로써 방제를 한다 (현, 2009).

그러나 최근 화학적 방제제의 사용량의 증가로 농업생태계 뿐 아니라 자연 생태계의 파괴, 약제 저항성 병해충 출현 그리고 농약의 잔류에 의한 문제가 야기되었다 (Weller, 1988). 또한 지난 10년간 환경에 대한 중요성이 대두되면서 농산물을 구입하는 소비자는 안정성을 제일로 고려하고 다음 신선도를 찾아 식품에 대한 안정성이 요구되고 있다 (Hong과 Cho 2007). 따라서 농산물에 대해서 농약을 살포하지 않고 친환경적인 방법으로 식물병을 방제하는 수단의 강구가 절실히 요구되고 있다 (Hong과 Cho 2007). 따라서 최근 화학적 방제제 사용량을 줄일 수 있는 대치방안으로 식물근권세균을 이용하는 생물적 방제에 대한 관심이 더욱 고조되었다 (Thomahow과 Weller, 1996).

미생물을 이용한 친환경적 방제는 최근 전신적 유도 저항성 (induced systemic resistance; ISR)을 이용한 연구와 미생물의 항균 작용을 이용한 연구로 나뉘어 진행되고 있다. 전신적 유도저항성에 대한 연구의 예로 길항근권세균 *Pseudomonas putida* 와 *Micrococcus luteus*을 오이 식물체에 전 처리하여 탄저병을 일으키는 *Colletotrichum orbiculare*을 접종하였더니 병 발생하는 정도가 무처리에 비해 유의적으로 감소하였다 (Lee와 Jeun, 2005). 두 길항근권세균은 식물체로 하여금 병원균 침입 부위에 callose 형성을 유도하여 병원균의 침입을 감소시키는 것으로 생각된다 (Jeun 등, 2004; Lee과 Jeun, 2005). 뿐만 아니라 토마토에 길항근권세균을 처리하였더니 *Phytophthora infestans*에 의해 발생하는 토마토 역병이 세포에서 callose 형성의 활성이 유도되면서 길항근권세균에 의한 전신적 유도저항성 발현으로 병 발생이 억제됨을 확인하였다 (An, 2006). 그 외에도 *Bacillus sp.*와 *Pseudomonas sp.*은 땅콩나무 뿌리와 줄기 시들음병인 *Sclerotium rolfsii*의 병원력을 억제 시킨다 (Tonelli 등, 2010). 전신적 유도 저항성 기작으로는 길항근권세균의 처리에 의해 병원균을 접종 후 식물체에 페닐알라닌 암모니아-라아제와 과산화효소의 활동을 증가시키는 것으로 보이며(Tonelli 등, 2010), 식물체의 감염 유발 세포에 병원균에 대한 방어반응을 활성화시키는 것으로 저항성을 나타내는 것으로 보인다 (Tonelli 등, 2010). 또한 여러 연구로 인해 식물 잎의 염색된 조직의 형광현미경 관찰을 통하여 다양한 병원균에 대하여 ISR 기작에 대한 많은 연구가 되고 있다 (Jeun 등, 2004; Tonelli 등, 2010).

미생물의 항균 작용을 이용한 연구의 예로는 채소류 모잘록병이 길항세균에

의해 억제된 연구로 *Rhizoctonia solani*와 *Pythium ultimum*에 의해 무와 수박에 모잘록병이 발병되는 것을 *Bacillus ehimensis*로 이용하여 방제하였다 (김 등, 2002).

또한 참다래 꽃썩음병에 대해서도 길항세균에 의한 생물적 방제 효과로서 *Streptomyces* sp.가 생물적 방제 효과가 검증되어 병원균에 대한 길항 작용이 73% 정도로 우수한 것으로 나타나 미생물을 이용한 방제가 긍정적인이 검증되었다 (조 등, 2007). 그 외에도 토마토잎곰팡이병 *Fulvia fulva*을 생물적 방제로 길항세균 *Bacillus amyloliquefaciens*를 이용하여 농가에서 화학농약을 사용하는 방식으로 희석처리를 하여 72%의 방제효과를 보여 토마토 잎곰팡이병을 미생물방제용으로 사용할 수 있음을 보여주었다 (공 등, 2010). 감귤 역병 또한 *Phytophthora citrophthora*를 감귤 열매에 *in vivo* 실험에서 상처 접종을 통하여 선발한 길항근권세균 *Bacillus cereus*, *Burkholderia gladiol*, *B. circulans*로 인해 항진균 활성이 나타났다 (강과 진, 2010).

이러한 미생물을 이용한 생물적 방제는 일년생 작물이나 고추, 오이, 상추 등 엽채류에서는 많은 연구가 진행되어지고 있으나 다년생 목본류인 감귤을 대상으로한 연구는 미비한 실정이다 (조 등, 2007; 김, 2002). 또한 길항미생물에 의한 식물병 억제 기작에 대해서는 전신적 유도저항성에 의한 기작에 비해 연구가 많이 되어 있지 않다 (장 등, 2004; 정 등, 2006).

이에 본 연구는 제주에서 큰 문제가 되고 있는 감귤 더덩이병균을 식물근권에서 분리한 세균을 통하여 방제할 수 있는 방안을 마련하고자 실시하였다. 세부적으로 *in vitro* 조건에서 감귤 더덩이병균에 대해 항진균활성이 있는 식물근권세균의 검색, 생물 검정 시험을 통해 감귤 더덩이병 억제 능력이 있는 길항근권세균의 선발, 그리고 형광현미경을 이용한 선발된 길항근권세균의 병 억제 기작에 대한 연구를 수행하였다. 또한 이들 식물근권세균에서 rDNA를 추출하여 특정부위 염기서열의 분석을 통한 동정을 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 감귤 더듬이병원균의 분리

감귤 더듬이병원균을 분리하기 위해 제주특별자치도 서귀포시 남원동에 위치한 농촌진흥청 국립원예특작과학원 감귤시험장에서 육안으로 감귤 더듬이병원균 병반이 잎 전면에 고루 발생한 잎과 50%이상의 병반으로 판단되는 9~10장의 잎을 채집하였다. 채집한 잎은 살균된 면도날을 이용하여 병반 주변을 3.0×3.0mm의 크기로 잎마다 5개씩 잘라 1%의 Sodium hypochlorite solution이 담긴 멸균 dish에 잎 조직이 잠기도록 담가 30초간 표면살균 하였다. 살균한 10분씩 3번 씻어서 70% Ethanol에 30초간 다시 표면살균 하고 멸균수로 10분씩 3번 씻어서 멸균된 filter paper(직경 90mm)를 이용하여 조직의 물기를 제거하였다. 처리된 잎 조직은 Potato Dextrose Agar(PDA)에 얹어 27°C의 incubator에 5일간 배양하였다. 그 후 잎 조직 윗 부분에 자라는 균사 중 감귤 더듬이병원균이라 판단되는 것을 긁어 새로운 PDA배지에 배양하고 분리한 미생물이 더듬이병원균인 것을 확인하기 위해 제주도 서귀포시 감귤시험장에서 분리하여 PDA배지에서 배양한 더듬이병원균 sample을 분양받아서, 채집된 병반에서 관찰되는 균총과 동종임을 현미경 상에서 확인 한 후 더듬이병원균을 새로운 PDA배지에 옮겨 27°C에서 14일간 다시 배양 하였다.

배양한 감귤 더듬이병원균 균총을 살균한 spatula를 이용해 떼어내어 살균된 dish에서 잘게 으갠 후 40ml의 Frise medium¹⁾이 채워진 conical tube에 넣고 27°C incubator에서 48시간동안 배양 하였다. 그 후 배양하며 가라앉은 균총들이 섞이지 않게 Frise medium을 조심히 붓고 멸균수를 넣어 vortex 한 후 균총을 침지시켜 상등액을 버리고 다시 멸균수를 부어 세척하였다. 위의 방법을 3반복 한 후 새로운 멸균수를 40ml를 채워 넣어 27°C에서 24시간 동안 배양 한 현탁액을 감귤 더듬이병원균 접종원으로 사용하였다.

1) Frise medium 제조

· ammonium tartrate 5g + ammonium nitrate 1g + potassium phosphate dibasic 1g + ammonium sulfate 0.5g + calcium chloride(無水) 0.1g + sodium chloride 0.1g + sucrose 20g + D.W 1L를 섞어 멸균하여 사용한다. (Frise N. 1978)

2. 식물근권세균 분리

제주대학교 식물병리학실험실에서 2004년~2010년간 제주도 한라산 중심으로 산간지역, 중산간지역, 해안지역 또는 주변 섬의 해변에서 자생하는 1년생 식물체 전초를 채집하여 Lee와 Jeun(2006)등이 제시한 실험 방법으로 식물근권세균 215개를 분리하였다.

식물근권세균의 분리는 먼저 채집한 식물체에서 뿌리의 손상을 적게 하기 위해 흐르는 물에 흙을 제거하고 가는 뿌리 위주로 1g을 채취하였다. 10mm정도 자른 후 뿌리를 막자사발에 10ml의 멸균수와 함께 넣어 으갠 후 funnel에 filter paper(90mm)를 얹은 삼각플라스크를 이용하여 여과한 후 나온 액 1ml를 채집하여 멸균수가 9ml씩 들어간 test tube에 넣어 희석법을 통해 10^{-8} 까지 희석하였다. 희석액 중 10^{-7} 및 10^{-8} 의 희석액을 $100\mu\text{l}$ 씩 추출하여 Tryptic Soy Agar(TSA)에 도말한 후 28°C incubator에서 48시간 동안 배양하였다. 배양된 근권세균 중 육안으로 서로 다른 모양, 다른 색깔로 자란 colony를 새로운 TSA배지를 이용하여 단세포 분리를 하였다. 분리한 근권세균은 새 TSA배지에 도말하여 28°C 에서 48시간동안 배양 후 멸균된 loop를 이용하여 충분히 긁어 떼어낸 후 glycerin : Tryptic Soy Broth(TSB)= 1 : 1 비율로 담긴 1.5ml micro tube에 균일하게 섞어 -80°C 에서 보관하여 실험에 이용하였다.

3. 식물근권세균의 감귤 더듬이병원균에 대한 항진균 효과 실험

분리된 식물근권세균이 감귤 더듬이병원균에 대한 항진균 효과를 알아보기 위하여 감귤 더듬이병원균 현탁액(4.7×10^{-7} cfu/ml) $300\mu\text{l}$ 을 PDA배지에 도말한 후 27°C incubator에 24시간 배양하고 미리 배양한 식물근권세균 블록(직경 8mm)을 배지의 중앙에 얹어 놓고, control은 아무것도 배양되지 않은 TSA배지 블록을 얹어 놓은 후 27°C 에서 5일간 배양하였다. 항진균 효과가 있는 식물근권세균의 선발은 배지 중앙에 형성된 감귤 더듬이병원균의 저지원 길이를 측정함으로써 선발하였고 본 실험은 각 3개씩 3반복 실험을 수행하였다.

4. 감귤 식물체에 감귤 더듬이병원균의 접종 및 관찰

1) 선발한 식물근권세균 선 처리 후 감귤더듬이병원균 접종

감귤 잎에서 직접적 효과실험에 사용 할 감귤나무는 3년생 궁천 묘목을 화분(11호)에 상토(뚝심이)와 일반 토양을 1:2의 비율로 섞어 심었다. 주간 25±1℃, 야간 18±1℃로 항온을 유지하여 유리 온실에서 키웠으며 실험에 사용될 신초는 20~25일 자란 잎을 이용하여 실험에 사용하였다.

선발한 식물근권세균 THJ 609-3, MRL 408-3, TRH 423-3은 접종실험 시행 전 TSA배지에 28℃ incubator에서 48시간 동안 배양 된 것을 이용하였다. 선발한 식물근권세균을 배양한 배지에 멸균수를 10ml를 넣고 loop로 세균을 긁어 현탁액을 만든 후 UV-Visible Spectrophotometer(Varian Aust, AU/CARY 50 Conc.)를 이용하여 농도를 측정 한 후 멸균수를 이용해 2.1×10^{-6} cfu/ml의 농도가 되도록 하였고 tween 20을 총부피의 0.01%가 되도록 첨가하여 사용하였다. 감귤 더듬이병에 대한 식물근권세균의 억제효과를 비교하기 위한 positive control은 일반적으로 농가에 사용하는 감귤 더듬이병원 살균제인 Imibenconazol(확시란, 동방아그로)를 약제 사용지침서에 따라 관행농도로 사용하였고, untreated control인 control은 멸균수를 이용해 감귤나무 신초에 이슬이 맺히는 정도로 스프레이 접종하였다. 감귤 잎에 처리된 현탁액이 건조될 때 까지 상온(20℃)에서 1시간 30분의 자연 건조 후 감귤 더듬이병원 접종현탁액을 식물근권세균과 같은 2.1×10^{-6} conidia/ml의 농도로 조정하여 tween 20을 총 부피의 0.01%가 되도록 첨가 한 후 잎에 이슬이 맺힐 정도로 스프레이 접종하였다. 멸균수로 스프레이 처리한 비닐팩(30×45mm)을 접종한 감귤 잎에 닿지 않도록 덮어 90~99%의 습도를 유지 시켰으며, 온도 27±1℃에서 24시간동안 배양 한 후 비닐 팩을 벗겨 온도 27±1℃, 습도 70 ~90%를 유지하며 식물배양실에서 배양 및 관찰하였다.

2) 선발한 식물근권세균과 감귤 더듬이병원균 혼합접종

선발한 식물근권세균과 감귤 더듬이병원균 혼합접종의 준비 과정은 선발한 식물근권세균을 선 접종하여 감귤 더듬이병원균을 접종한 실험 방법과 동일하게 수행하였다. 식물근권세균 THJ 609-3, MRL 408-3과 TRH 423-3은 4.2×10^{-6} cfu/ml의

농도로 현탁액을 만들었다. Imibenconazol은 관행농도로, 준비된 감귤 더벵이병 접종 현탁액을 식물근권세균의 현탁액과 동일하게 멸균수를 이용하여 4.2×10^{-6} conidia/ml의 농도로 만들어 혼합하여 각각 처리 당 2.1×10^{-6} conidia/ml의 농도를 조정하고 tween 20을 총 부피에 0.01% 첨가하여 스프레이 접종 하였다. 병원균 혼합 접종 후 온도 및 습도 유지는 식물근권세균을 선 접종하여 감귤 더벵이병균을 접종한 방법과 동일하게 시행하였다.

식물근권세균에 선 처리 후 감귤 더벵이병균을 접종한 실험과 식물근권세균과 감귤 더벵이병균을 혼합접종 한 실험을 각 3반복 시행하였다. 접종 14일이 지난 후 감귤 더벵이병균에 의해 감염된 병반수를 측정 하였고 처리구의 분산분석과 처리평균 사이의 비교를 위하여 Duncan 검정을 실시하였으며 SAS Institute, version 8.02(Statistical Anaysis System)을 이용하였다.

5. 감귤 식물체에서 감귤 더벵이병균의 성장 억제를 형광현미경으로 관찰

감귤 더벵이병균의 성장억제 관찰은 선발된 식물근권세균을 선 처리하여 감귤 더벵이병균을 접종한 잎과 식물근권세균과 감귤 더벵이병균을 혼합접종 한 잎에서 1일째, 5일째, 10일째에 비슷한 크기의 잎을 채집하여 Jeun 등(2004)이 제시한 형광염색방법을 따라 시행하였다. 채집한 잎은 멸균된 면도날을 이용하여 잎맥을 피해 7.0×7.0 mm의 크기로 잘라 Phosphate Buffer solution 0.05M(pH 7.2 PBS²⁾)로 희석시킨 2%의 glutaraldehyde가 담긴 plate에 자른 잎 조직이 폭 잠기도록 담가 2 시간동안 조직을 고정하여 PBS로 10분씩 3번 세척하였다. 그 후 잎 조직을 aniline blue(sigma) 0.1%(w/v)에서 20분간 암실에서 염색하여 PBS로 10분씩 3번 세척 후 Uvitex 2B(Diethanol, polyscience) 0.05%(w/v)에서 20분간 염색하였고 PBS로 10분간 3번 세척하였다. aniline blue는 식물의 방어반응을 관찰하기 위함이고, Uvitex 2B는 병원균의 구조 관찰을 위하여 염색하였다. 잎 조직들은 염색 후 filter

2) Phosphate buffer solution 0.05M 제조

- solution A : $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2.07g + H_2O 300ml
 - solution B : $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 6.23g + H_2O 700ml
- solution A was added to solution B until pH reaches 7.2 (Gomori 1955)

paper(90mm)를 이용하여 물기를 제거한 후 slide glass 위에서 50%의 glycerin 100 μ l를 처리하여 형광현미경(Olympus) 필터 05(BP 400-440, FT 460, LP 470)으로 감광 더넵이병균의 포자수, 발아율 및 피저수를 관찰하고, control과 선발된 식물근권세균, Imibenconazol을 처리한 잎 등의 표면에서 수를 세어 집계하였다.

처리된 각 식물체에서 채집한 잎을 4개의 조각으로 나누어 3반복 실험을 하였다. 형광현미경 관찰은 접종 후 1일, 5일, 10일 이 경과할 마다 감광 더넵이병균의 포자수, 발아율, 피저형상 수의 변화를 관찰하였으며, control과 선발된 식물근권세균 처리구, Imibenconazol 처리구의 분산분석과 처리평균 사이의 비교를 위하여 Duncan 검정을 실시하였다.

6. 선발한 식물근권세균의 total DNA 추출과 염기서열 분석

Ausubel 등(1987)이 제시한 방법에 따라 선발한 식물근권세균의 DNA를 추출하였다. 감광 더넵이병균에 억제효과가 있는 THJ 609-3, MRL 408-3, TRH 423-3을 각 TSB배지에 같은 양으로 옮겨 28°C에서 48시간 진탕 배양 한 후 1ml를 채집하여 1.5ml micro tube에 넣고 10,000 rpm으로 1분간 원심분리하였다. 상등액은 제거하고 500 μ l TE-buffer(10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA)를 넣어 잘 섞은 후 -80°C에 10분간 냉동 후 상온에 녹여 다시 -80°C에서 얼리고 녹이는 작업을 3반복하였다. 해동된 세포는 10mg/ml의 lysozyme이 포함된 250mM tris buffer 50 μ l을 첨가하여 천천히 섞은 후 4°C incubator에 45분간 배양하였다. 다음 증류수 110 μ l, 10% SDS 13 μ l, 10N의 NaOH 3 μ l을 각각 넣어 제조한 용액 10 μ l를 첨가하고, 세포가 녹을 때까지 50°C water bath에 넣어 배양하였다. 세포가 투명하게 녹으면 최종농도가 1mg/ml가 되도록 proteinase K를 넣어 천천히 잘 섞어주고 tris saturated phenol을 시료의 총량과 1:1 비율로 섞어 10,000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 상등액은 제거하고 총량의 0.1 volume의 3M sodium acetate와 0.7 volume의 isopropanol을 넣고 천천히 섞어서 상온에 10분 동안 두었다. 이후 10,000 rpm으로 4°C에서 5분간 원심 분리하여 상등액을 제거하고 70%의 Ethanol 500 μ l을 넣고 -20°C incubator에서 10분간 배양하였다. 다시 10,000 rpm, 4°C에서 10분간 원

심분리하여 상등액을 완전히 제거한 후 37°C 건조기에 30분간 넣어 두었다. DNA를 TE-buffer 30 μ l로 녹여 채집하였고 -20°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다. 각각의 식물근권세균에서 유래된 total DNA에서 rDNA의 ITS(Internal Transcribe Spaces) 염기서열을 universal primer 38r: 5'-CCG GGT TTC CCC ATT CGG-3'와 72f: 5'-TGC GGC TGG ATC TCC TT-3'(Gurtler와 Stanisich, 2001)를 이용하여 동정하였다.

PCR 반응액은 2 μ l의 분리된 DNA (5ng/ml), 2.3mM의 dNTP 1 μ l, 10 pmol의 primer 각 1 μ l, 10 \times Buffer 4 μ l, 5 unit/ μ l의 Taq DNA polymerase(iNtRON Co.)를 1 μ l의 volume으로 넣고 멸균수로 반응액의 부피를 최종 40 μ l가 되게 하였다. PCR 증폭 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 반복하였다. 마지막 cycle에서는 72.0°C에서 2분 동안 처리하였다. DNA 증폭 유무를 1% agarose gel에 EtBr(Ethidium Bromide)를 넣어 염색한 후 UV에서 확인하고 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 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 홈페이지의 Basic Local Alignment Search Tool(Blast; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)를 이용하여 동정하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 감귤 더듬이병균에 대한 분리한 식물근권세균의 항진균 효과

식물근권세균의 항진균 효과를 알아보기 위하여 제주대학교 식물병리학 실험실에서 2004년~2010년 동안 제주도 일원에서 분리한 식물근권세균 중에서, 선행 연구(An, 2006, Lee, 2006) 및 다른 식물병균에 효과가 있었던 식물근권세균을 선발하여 감귤 더듬이병균을 도말한 배지 위 중앙에 치상하여 배양하였다.

PDA배지를 얹어놓은 control은 주황색 균총이 대치배양 1일째부터 감귤 더듬이병 현탁액이 도말한 부분에서 colony가 약하게 형성되면서 자랐으며 3일째부터는 균총이 조금 더 뚜렷하게 성장하는 모습이 확인되었다. 5일째부터 균총은 배지의 직경 86mm까지 꽉 채우며 자랐고, 저지원은 형성되지 않았다 (Fig. 1A와 Table 1).

그러나 식물근권세균 THJ 609-3, MRL 408-3과 TRH 423-3을 치상한 배지에서는 식물근권세균 주위에 저지원이 형성되었으며 이는 감귤 더듬이병균에 대한 항진균 작용이 있다는 것을 의미한다 (Fig. 1). 특히, 식물근권세균 THJ 609-3은 배양 1일째에 PDA배지 중앙에 위치한 블록 주변으로 노란색의 THJ 609-3의 세균이 자랐으며, 배양 3일째는 배지 가장자리에서 주황색인 감귤 더듬이병 균총이 자라는 것이 육안으로 확인되었다. THJ 609-3이 13.0mm 정도 자랐으며, 병원균에 대한 저지원은 평균 62.14 ± 0.65 mm로 형성되었다. 저지원이 형성된 경계부분과 저지원이 활성화 된 안쪽에서도 감귤 더듬이병 균총이 약하게 발생했으나 거의 저지되는 모습이 관찰되었다 (Fig. 1D와 Table 1).

또한 식물근권세균 MRL 408-3과 TRH 423-3은 서로 비슷한 형태로 나타났다. MRL 408-3은 배양 1일째에 중앙의 블록 주변으로 백색의 균총이 조금씩 자랐으며, 배양 3일째는 도말 된 부분에 감귤 더듬이병 균총이 배지 가장자리부터 자랐다. 배양 5일째 MRL 408-3은 블록을 포함하여 11.0mm 정도 자랐으며, 병원균에 대해 형성된 저지원은 평균 47.12 ± 0.40 mm로 나타났다.

MRL 408-3은 저지원 경계부분으로 배지 가장자리는 감귤 더듬이병 균총이 뚜렷이 자랐으며, 경계부분과 경계 안으로 감귤 더듬이병 균총이 형성되었으나 뚜렷이 자라지 못하고 저지되는 모습이 관찰되었다. TRH 423-3도 배양 1일째와 3일째는 MRL 408-3과 같은 증상을 보였으며, 배양 5일째 배지 중앙에 놓인 식물근권세균은 블록 포함하여 14.0mm 정도 근권세균이 자라면서 저지원이 형성되어 나타났다. 평균 48.27 ± 0.47 mm 저지원이 측정되어 저지원 경계부분과 경계 안으로 THJ 609-3, MRL 408-3과 같이 감귤 더듬이병 균총이 약하게 자라지만 저지되는 것을 확인하였다 (Fig. 1E, F와 Table 1).

그 외 저지원을 형성시키지 못하는 식물근권세균을 치상한 배지에서는 control과 유사한 결과를 나타냈다. 대표적으로 KRY 505-3과 CMC 903-2은 배양 1일째 배지 중앙에 엮어진 식물근권세균 블록에서 근권세균이 자라며, 배양 3일째에는 감귤 더듬이병 균총이 조금씩 자라면서 근권세균과 함께 자라는 것을 확인하였다. 배양 5일째는 균총이 배지 가득히 자라며, 식물근권세균도 감귤 더듬이병균에 아무런 영향을 주지 않고 함께 자라 감귤 더듬이병균을 억제하는 저지원이 형성되지 않는 것으로 보아 감귤 더듬이병균에 직접적인 항진균 효과가 없다는 것을 나타냈다 (Fig. 1B, C와 Table 1).

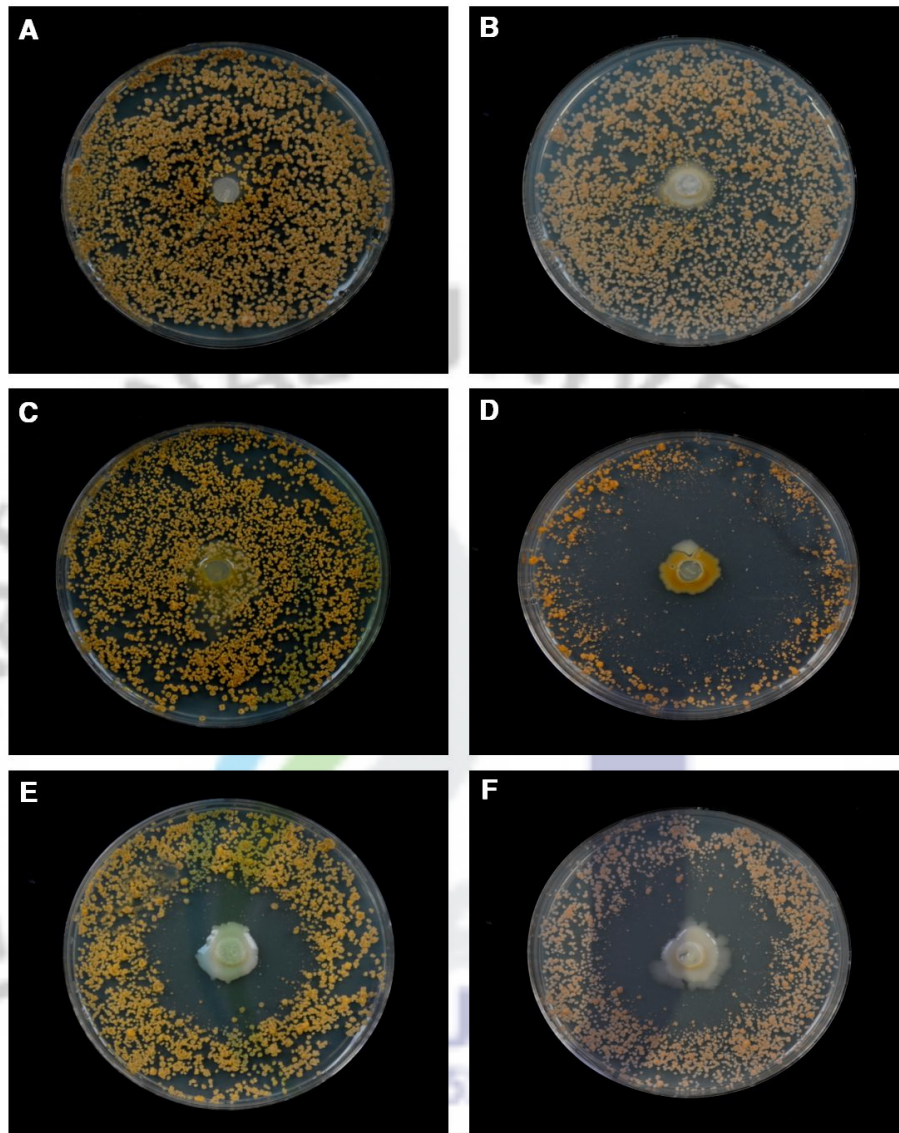


Fig. 1. Rhizobacteria showing antifungal effect (D: THJ 609-3 , E: MRL 408-3, F: TRH 423-3) or not (B: KRY 505-3, C: CMC 903-2) against *Elsinoe fawcettii* on the PDA medium. The control (A) treated with agar block instead of bacterial isolation.

Table 1. Size of inhibition zones formed by rhizobacteria against *Elsinoe fawcettii* on the PDA medium.

Bacterial strain	Inhibition zone (mm) ^X	Duncan test ^Y
control	-	a
KRY 505-3	0.00 ± 0.00	a
CMC 903-2	0.00 ± 0.00	a
THJ 609-3	62.14 ± 0.65	b
MRL 408-3	47.12 ± 0.40	c
TRH 423-3	48.27 ± 0.47	d

^XValues represent means±standard deviation of three separated experiments.

^YThe different letters are significantly(P<0.001) different according to Duncan's multiple test.



2. 감귤 식물체에서 선발된 식물근권세균에 의한 감귤 더듬이병균의 억제

1) 선발한 식물근권세균을 선 처리 후 감귤 더듬이병균 접종에 직접 효과

농가의 약제 살포 방법을 고려하여 식물근권세균을 식물에 분무했을 때의 직접적인 효과를 알아보기 위해 감귤 더듬이병균에 대해 항진균 효과가 있는 식물근권세균 THJ 609-3, MRL 408-3과 TRH 423-3을 각각 감귤 잎에 선 처리 후 감귤 더듬이병균 현탁액을 접종하였다.

감귤 잎에 무처리한 control에서의 병 진전은 접종 1일째에는 아무런 병징이 나타나지 않았고 접종 5일째부터 육안으로 감귤 잎 윗면에 전체적으로 흑갈색의 작은 반점이 생기며 약하게 돌출되어 나타나는 것을 확인하였다. 접종 7일째부터는 작은 반점이 커지면서 황갈색의 딱지로 변하며 5일째 보다 돌출된 부분이 좀 더 두드러졌으며, 접종 14일째부터 병징이 진행됨에 따라 병반부위에 돌기는 단단하게 조금 더 돌출되고 딱지는 진하게 형성되었다. 병반수는 평균 31.23 ± 3.07 개로 측정되었다 (Fig. 2A와 Table 2).

반면 감귤더듬이병균에 직접적인 항진균 효과가 입증된 식물근권세균 THJ 609-3 처리구의 병 진전은 접종 후 1일째 control과 같이 병징이 나타나지 않았고, 접종 6일째 감귤 잎에 흑갈색의 작은 반점이 발생했으며, 전체적으로 작은 반점이 형성되었던 control에 비해 50%정도 적게 나타났다. 접종 8일째부터는 반점이 황갈색의 딱지로 되었고 돌기도 6일째에 비해 조금 더 도드라졌으며, 접종 14일째에는 형성된 돌기와 딱지가 진하게 변하여 병반수 측정결과는 평균 16.46 ± 1.92 개로 나타났다 (Fig. 2B와 Table 2). 이와 유사하게 MRL 408-3과 TRH 423-3도 더듬이병의 병반 수가 억제되었다. 접종 1일째는 모든 처리구와 마찬가지로 병징이 나타나지 않았으며 접종 6일째는 돌기가 형성되지 않았다. 하지만 접종 7일째에 감귤 더듬이병이 흑갈색의 작은 반점과 돌기가 약하게 형성되며 control에 비해 30%정도로 적게 나타났다. 접종 11일째부터 돌기 위에 작은 반점이 황갈색의 딱지로 형성되었으며 접종 14일째 돌기와 딱지가 진하게 형성되었다. 14일째에 MRL 408-3은 TRH 423-3을 처리한 잎에 발생된 감귤 더듬이병의 병반수를 측정하였더니 각각 2.19 ± 0.40 와 1.81 ± 0.48 개였다 (Fig. 2 C, D와 Table. 2).

식물근권세균의 병 억제 효과를 시판 농약과 비교하기 위하여

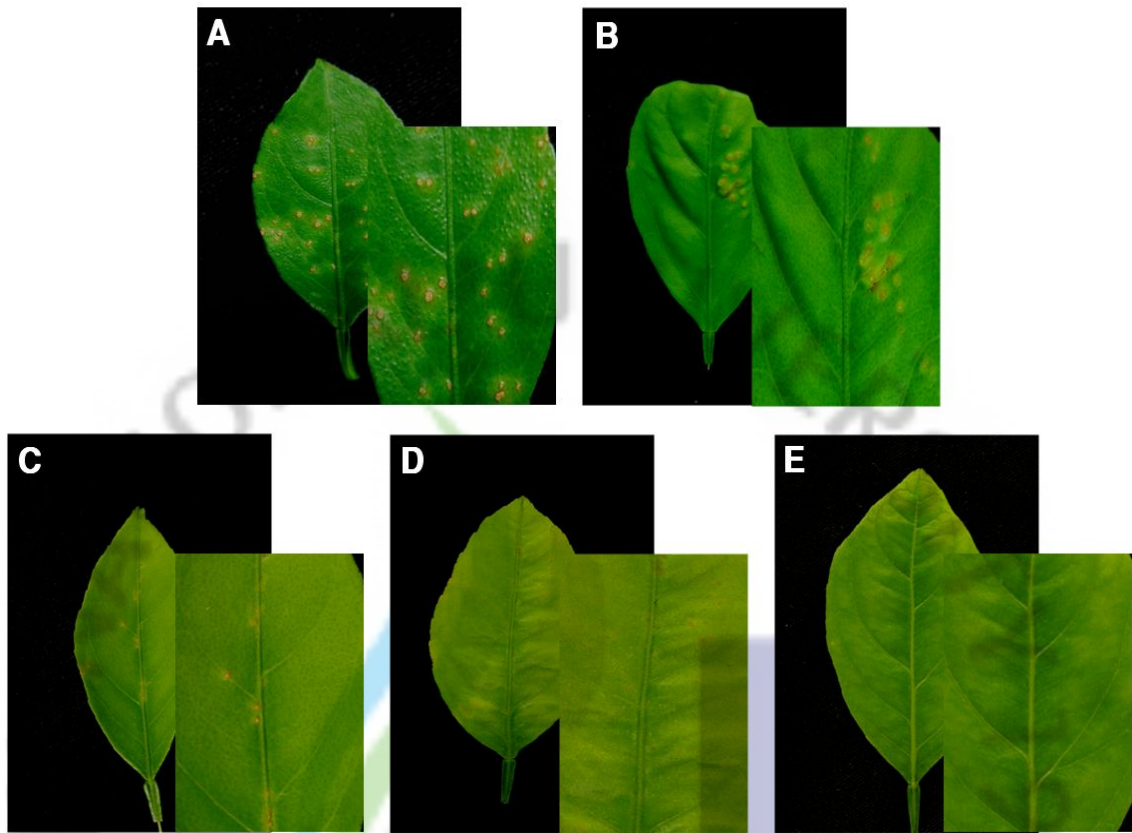


Fig. 2. Disease severity on citrus leaves untreated (A) or pre-treated with rhizobacterial suspension (B: THJ 609-3, C: MRL408-3, D: TRH 423-3) or with fungicide (E: Imibenconazol) at 14 days after pathogen inoculation with *E. fawcettii* (2.1×10^6 conidial/ml).

Table 2. Number of scab lesions on the citrus leaves untreated, pre-inoculated with rhizobacterial strains or treated with fungicide at 14 days after inoculation with *Elsinoe fauceitii*.

Treatment	Scab count ^Y	Duncan test ^Z
control	31.23 ± 3.07	a
THJ 609-3 ^W	16.46 ± 1.92	b
MRL 408-3	2.19 ± 0.40	c
TRH 423-3	1.81 ± 0.48	c
Imibenconazol ^X	1.46 ± 0.45	c

^WThe pre-inoculated concentration of the bacterial suspension was 2.1×10^6 cfu/ml and concentration of fungal suspension was 2.1×10^6 conidial/ml.

^XThe concentration of the fungicide was 0.5g/1L.

^YValues represent means±standard deviation of three separated experiments.

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

Imibenconazol을 같은 방법으로 처리하였더니 control과 유사하게 접종 1일째는 병징이 나타나지 않았고 접종 7일째에 감굴 나무의 10개 신초 중 2~3개의 앞에서 감굴 더듬이병균의 돌기와 그 위에 흑갈색의 작은 반점이 1~2개정도 형성되어 control에 비해 병진전이 억제됨을 확인하였다. 접종 10일째 돌기 위에 발생한 흑갈색의 작은 반점이 황갈색의 딱지로 나타났다. 접종 14일째 병반이 형성된 곳에서는 돌기와 딱지가 진하게 형성되어 나타났으며 평균 병반 수는 1.48 ± 0.45 개로 측정되었다 (Fig. 2E와 Table 2). Imibenconazol과 식물근권세균인 MRL 408-3, TRH 423-3는 감굴 더듬이병 발생에 대해 억제 경향이 유사함을 보였으며, control에 비해 병반 수가 현저히 적게 나타났다.

2) 선발한 식물근권세균과 감굴 더듬이병균 혼합 접종 of 직접 효과

농가에서 약제를 치는 방법과 자연에서 식물병이 발생할 수 있는 상황을 가정하여 감굴 더듬이병균에 대해 항진균 효과가 있는 식물근권세균 THJ 609-3, MRL 408-3과 TRH 423-3의 현탁액을 각각 병원균 현탁액과 혼합하여 접종하여 병진전 상황을 관찰하였다.

별균수와 감굴 더듬이병균을 혼합 접종한 control은 접종 1일째에는 병징이 나타나지 않았고, 접종 5일째부터 감굴 잎에 작은 흑갈색의 반점과 그 주위로 약하게 돌기가 형성됨을 육안으로 확인하였다. 접종 7일째부터는 작은 반점이 황갈색의 딱지로 형성되기 시작하였고 접종 14일째 돌기는 단단하게 조금 더 돌출되어 나타났고 딱지는 진하게 형성되어 나타나며 병반수는 평균 31.42 ± 2.85 개로 측정되었다 (Fig. 3A와 Table 3).

그러나 THJ 609-3을 혼합한 식물에서는 접종 후 1일째는 병징이 나타나지 않았고 접종 6일째 흑갈색의 작은 반점의 수가 control에 비해 35% 정도로 나타났다. 접종 10일째부터는 작은 반점이 황갈색의 딱지로 돌기 위에 형성되었고 접종 14일째부터 형성된 돌기와 딱지가 진하게 나타났으며, 측정된 병반수는 평균 4.50 ± 2.92 개였다 (Fig 3B와 Table 3).

유사하게도 MRL 408-3과 TRH 423-3을 혼합한 경우 각각 접종 1일째 모든 처리구와 마찬가지로 병징이 나타나지 않았으며, 접종 7일째 감굴 더듬이병균으로 인해 잎 표면에 작은 흑갈색의 반점과 함께 돌기가 약하게 나타났다. control에

비해 MRL 408-3을 혼합한 식물과 TRH 423-3을 혼합한 식물이 25%정도 병반이 형성되었고 접종 11일째부터 돌기 위에 반점이 황갈색의 딱지로 형성되어 접종 14일째 진한 황갈색의 딱지와 더 돌출되어진 돌기로 형성되었다. MRL 408-3을 혼합한 식물에서의 평균 병반수는 1.92 ± 0.22 개, TRH 423-3을 혼합 경우의 평균 병반수는 1.73 ± 0.15 개로 측정되었다 (Fig 3. C, D와 Table 3).

Imibenconazol을 혼합한 접종액을 접종한 잎에서는 1일째 병징이 나타나지 않았고 접종 7일째는 병 진전이 억제되어 병반이 1~2개 정도 감귤 더덩이병균의 흑갈색인 작은 반점과 돌기가 형성되며, 접종 10일째, 작은 반점이 황갈색의 딱지로 변하였다. 접종 14일째는 병반이 형성된 곳에서는 진한 돌기와 딱지가 진하게 나타나며, 병반수 측정결과 평균 0.81 ± 0.15 개였다 (Fig 3. E와 Table 3).

별균수와 감귤 더덩이병균을 혼합 접종한 control에서는 선 처리에서와 유사한 경향을 나타냈으나, THJ 609-3을 혼합한 접종액을 접종한 잎에서는 선 처리 후 병원균을 접종한 감귤 잎에 비해 병반 수가 15%정도 적게 나타나 혼합접종이 감귤 더덩이병균의 발생에 효과적으로 감소시키는 것으로 나타났다. 그러나 MRL 408-3, TRH 423-3과 Imibenconazol은 선 처리와 혼합접종의 결과가 비슷하게 나타나 처리 방법에 따른 발생하는 병반 수에 차이가 없었다.

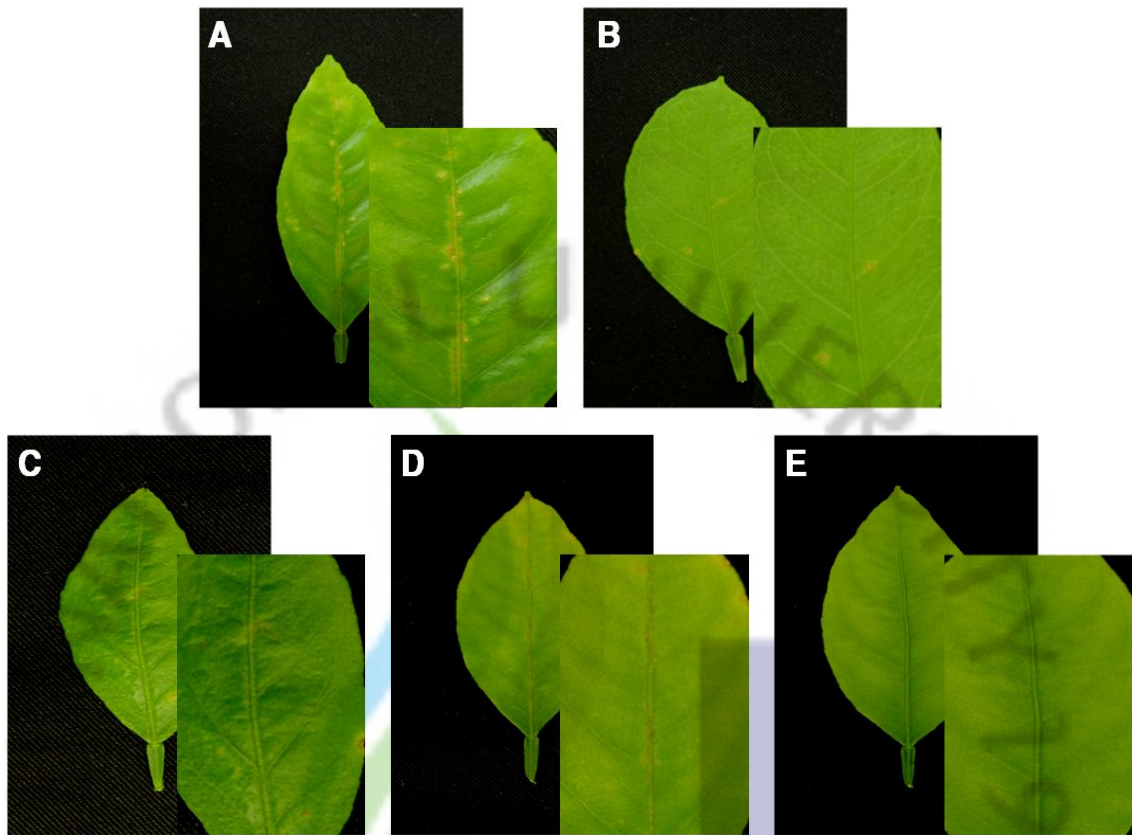


Fig. 3. Disease severity on citrus leaves at 14 days after inoculated with *E. fawcettii* (2.2×10^6 conidial/ml) (A) or treated with mixture of the *E. fawcettii* and rhizobacteria (4.2×10^6 conidial/ml and 4.2×10^6 cfu/ml, respectively) (B: THJ 609-3, C: MRL408-3, D: TRH 423-3) or with mixture of the *E. fawcettii* and fungicide (E: Imibenconazol).

Table 3. Number of scab lesions on the citrus leaves at 14 days after inoculation with suspension of *Elsinoe fawcettii*, mixture of the *E. fawcettii* and rhizobacteria or with mixture of the *E. fawcettii* and fungicide.

Treatment	Scab count ^Y	Duncan test ^Z
control	31.42 ± 2.85	a
THJ 609-3 ^W	4.50 ± 2.92	b
MRL 408-3	1.92 ± 0.22	b
TRH 423-3	1.73 ± 0.15	b
Imibenconazol ^X	0.81 ± 0.15	b

^WThe concentration of the bacterial and fungal suspension was 2.1×10^6 conidial/ml + 2.1×10^6 cfu/ml.

^XThe concentration of the fungicide was 0.5g/1L.

^YValues represent means ± standard deviation of three separated experiments.

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

3. 감귤 잎에서의 감귤 더듬이병균의 성장 억제 효과 형광현미경 관찰

1) 선발한 식물근권세균 선 처리 후 감귤 더듬이병균의 성장 억제

감귤 더듬이병균에 대해 항진균 효과가 있는 식물근권세균 THJ 609-3, MRL 408-3,과 TRH 423-3을 병원균의 활성화되는 것이 억제되는 직접 효과가 있는지 감귤 잎에 접종 후 병원균의 현탁액을 접종하여 각 처리마다 1일, 5일, 10일째 형광현미경으로 포자, 발아율, 괴저 수 등 차이가 있는지 비교하였다.

무처리한 control에서의 접종 1일째 감귤 잎의 표면을 염색 후 감귤 더듬이병균의 포자가 대략 10개 이상으로 뭉쳐져 있었으며 포자에 2~3개 정도 발아관이 조금씩 형성 되었으며 접종 5일째에서는 포자에서 발아관이 길게 형성되어 나타났고, 그 주변으로 괴저현상이 나타나기 시작했다. 접종 10일째에서는 괴저현상이 뚜렷이 보여 감귤 잎을 육안으로 봤을 때 병반으로 보였던 부분을 현미경으로 관찰시 대부분이 괴저현상으로 나타났다. 대부분이 형광 현미경 관찰시 괴저현상으로 나타났다 (Fig. 4A).

식물근권세균 처리구인 THJ 609-3을 처리한 잎의 접종 1일째 현미경 관찰은 control과 큰 차이 없이 포자가 아무런 변화가 없거나 발아관이 형성되어 가는 모습을 확인하였으며, 접종 5일째는 발아관이 뚜렷하고 길게 형성되며 약하게 괴저 현상이 생기는 것을 확인하였다. 접종 10일째는 괴저현상이 나타났지만 control 보다는 약하게 형성되었다. MRL 408-3을 처리한 잎에서도 접종 1일째 control과 별다른 차이가 없는 반면 근권세균이 포자 주변에 있는 것이 확인하였다. 접종 5일째는 발아관이 조금 형성되고 주변에 근권세균이 계속 접촉 되어있는 것을 확인하였으며 접종 10일째는 괴저가 형성되었고 control에 비해 진하게 나타나지 않았으며 그 수는 현저히 적게 나타났다 (Fig. 4C). TRH 423-3을 처리한 잎도 MRL 408-3의 경우와 동일하게 접종 1일째는 포자 주변에 근권세균이 있는 것이 확인되었으며, 접종 5일째는 발아관이 조금 형성된 발아관 주변에 처리된 근권세균이 포자 주변으로 접촉해 있는 것을 확인하였다. 접종 10일째는 괴저형성이 control에 비해 약하게 나타났으며 그 수도 적게 나타났다 (Fig. 4D). Imibenconazol을 처리한 잎에서는 접종 1일째는 전반적으로 모든 처리구와 동일하게 포자가 감귤 잎 표면에 부착되어 있었고 접종 5일째는 약하게 포자에서 발아관이 형성되었다. 접종 10일째는

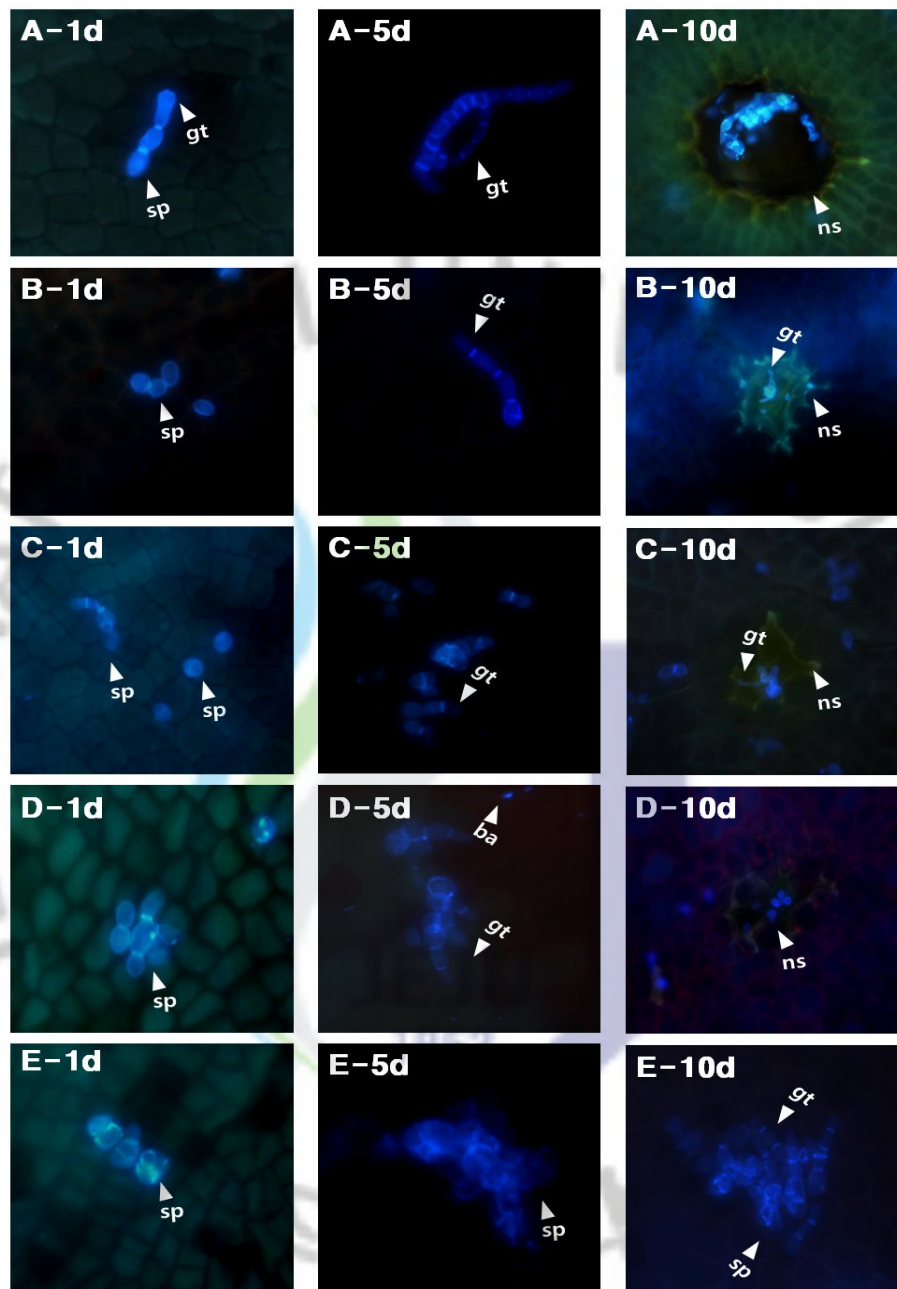


Fig. 4. Fluorescence microscope observation of infection structures on the citrus leaves untreated (A), pre-treated with suspension of rhizobacterial strains (B: THJ609-3, C: MRL 408-3, D: TRH 423-3) or treated with fungicide (E: Imibenconazol) at 1 day, 5 days, 10 days after inoculation with *Elsinoe fawcettii*. Abb.: sp; fungal spore, gt; gum tube, ns; necrosis, ba; bacterium.

발아관이 좀 더 길게 형성되거나 약하게 괴저형성이 나타났다 (Fig. 4E).

무처리한 control 앞에서 조사된 포자수는 접종 1일째, 5일째, 10일째 약 1,000~1,200개로 측정된 반면 THJ 609-3을 처리한 앞에서는 약 630~670개로 측정되어 control에 비해 약 60%가량 확인되었으며, MRL 408-3, TRH 423-3과 Imibenconazol은 포자수가 큰 차이가 없이 약 150~360개의 포자수가 측정되어 control의 비해 포자수가 현저히 낮게 측정된 것을 확인 할 수 있었다 (Table 4).

또한 발아율은 control 1일째부터 10일째까지 증가하였고 다른 처리구에서도 계속 증가하였다. 10일째의 발아율은 비슷하게 나타난 것으로 확인되지만 각 처리구마다 포자수에 비례하기 control은 약 1,000개에서 약 18%의 발아율이 나타난 것이며, 10일째 21%의 발아율이 측정된 Imibenconazol은 약 150개에서 측정된 것이다 (Table 4와 Table 5). 괴저 현상은 모든 처리구에서 1일째 괴저가 나타나지 않았고, control은 5일째부터 16.5개에서 10일째 21.17개로 증가하였다. THJ 609-3은 10일째의 괴저수가 5일째에 비해 2배가 증가하였고 control에 비해서 1/2정도 적게 측정되었다. MRL 408-3, TRH 423-3과 Imibenconazol은 큰 차이를 나타내지 않았고 각각 5일째보다 10일째는 약 1~2개 증가하여 control에 비해 괴저가 거의 낮게 측정되었다 (Table 6).

2) 선발한 식물근권세균과 감귤 더듬이병균 혼합접종의 성장 억제

감귤 더듬이병균에 대해 항진균 효과가 있는 식물근권세균 THJ 609-3, MRL 408-3, TRH 423-3을 선 처리 한 실험과 혼합접종 실험의 각 처리구마다 형광현미경으로 포자, 발아관 형성 등 어떠한 차이가 있는지 조사하였다.

별균수와 감귤 더듬이병균을 혼합 접종한 control은 선 처리에서와 차이가 나타나지 않았으며, 식물근권세균인 THJ 609-3을 혼합하여 접종 한 것과 THJ 609-3을 선 처리를 비교한 결과 포자수에서는 혼합접종이 약 50개 정도 감소하였고 (Table 4와 7), 발아율도 THJ 609-3을 선 처리한 입에 비해 약 2% 감소하였다 (Table 5와 8). MRL 408-3을 혼합 접종 처리구와 TRH 423-3을 혼합하여 접종한 처리구는 MRL 408-3 선 처리와 TRH 423-3 선 처리한 입과 비교하여 포자수, 발아율, 괴저수가 혼합 접종과 유사하게 나타났다 (Table 4-9).

Table 4. Number of fungal spores on the citrus leaves untreated, pre-treated with suspension of rhizobacterial strains THJ 609-3, MRL 408-3 or TRH 423-3 or treated with fungicide Imibenconazol at different time after inoculation with *Elsinoe fawcettii*.

Treatment	Number of spores ^x		
	1day	5days	10days
control	1074.33 ± 31.72 _{a^r}	1120.83 ± 46.87 a	1167.75 ± 66.24 a
THJ 609-3	648.75 ± 44.32 _b	662.17 ± 46.63 b	637.33 ± 53.08 b
MRL 408-3	358.92 ± 39.41 _c	357.92 ± 35.32 c	279.08 ± 27.93 c
TRH 423-3	340.25 ± 40.02 _c	344.08 ± 36.07 c	267.83 ± 20.27 c
Imibenconazol	161.17 ± 14.69 _d	149.83 ± 15.44 d	163.83 ± 22.89 c

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

^yThe different letters are significantly(P<0.001) different according to Duncan's multiple test.

Table 5. Rate of gem tube formation on the citrus leaves untreated, pre-treated with suspension of rhizobacterial strains THJ609-3, MRL 408-3 or TRH 423-3 or treated with fungicide Imibenconazol at different time after inoculation with *Elsinoe fawcettii*.

Treatment	Rate gum tube formation(%) ^x		
	1day	5days	10days
control	5.75 ± 0.37 ^{a^y}	15.40 ± 1.97 ^a	17.25 ± 2.63 ^a
THJ 609-3	2.49 ± 0.12 ^b	8.81 ± 0.89 ^b	12.87 ± 1.40 ^a
MRL 408-3	1.00 ± 0.14 ^c	6.13 ± 0.76 ^b	20.50 ± 2.80 ^a
TRH 423-3	1.00 ± 0.16 ^c	5.90 ± 0.36 ^b	19.93 ± 3.35 ^a
Imibenconazol	1.06 ± 0.16 ^d	7.46 ± 0.95 ^b	21.76 ± 3.78 ^a

^xValues represent means±standard deviation of three separated experiments, each containing four leaves per treatment. Gum tube rate(%)=(gum tube÷spore)×100

^y The different letters are significantly(P<0.001) different according to Duncan's multiple test.

Table 6. Frequency of necrosis on the citrus leaves untreated, pre-treated with suspension of rhizobacterial strains THJ 609-3, MRL 408-3 or TRH 423-3 or treated with fungicide Imibenconazol at different time after inoculation with *Elsinoe fawcettii*.

Treatment	Frequency of necrosis ^x		
	1day	5days	10days
control	0.00 ± 0.00 ^{a_r}	16.50 ± 0.97 a	21.17 ± 1.85 a
THJ 609-3	0.00 ± 0.00 ^a	7.42 ± 0.45 b	13.92 ± 1.12 b
MRL 408-3	0.00 ± 0.00 ^a	1.17 ± 0.27 c	4.58 ± 0.63 c
TRH 423-3	0.00 ± 0.00 ^a	0.92 ± 0.26 c	3.83 ± 0.63 c
Imibenconazol	0.00 ± 0.00 ^a	0.33 ± 0.14 c	1.83 ± 0.44 c

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

^y The different letters are significantly(P<0.001) different according to Duncan's multiple test.

또한 Imibenconazol을 혼합하여 접종한 식물 역시 Imibenconazol을 선 처리 한 것과 혼합접종의 결과가 비슷하게 나타났다 (Fig. 5와 Table 7-9).



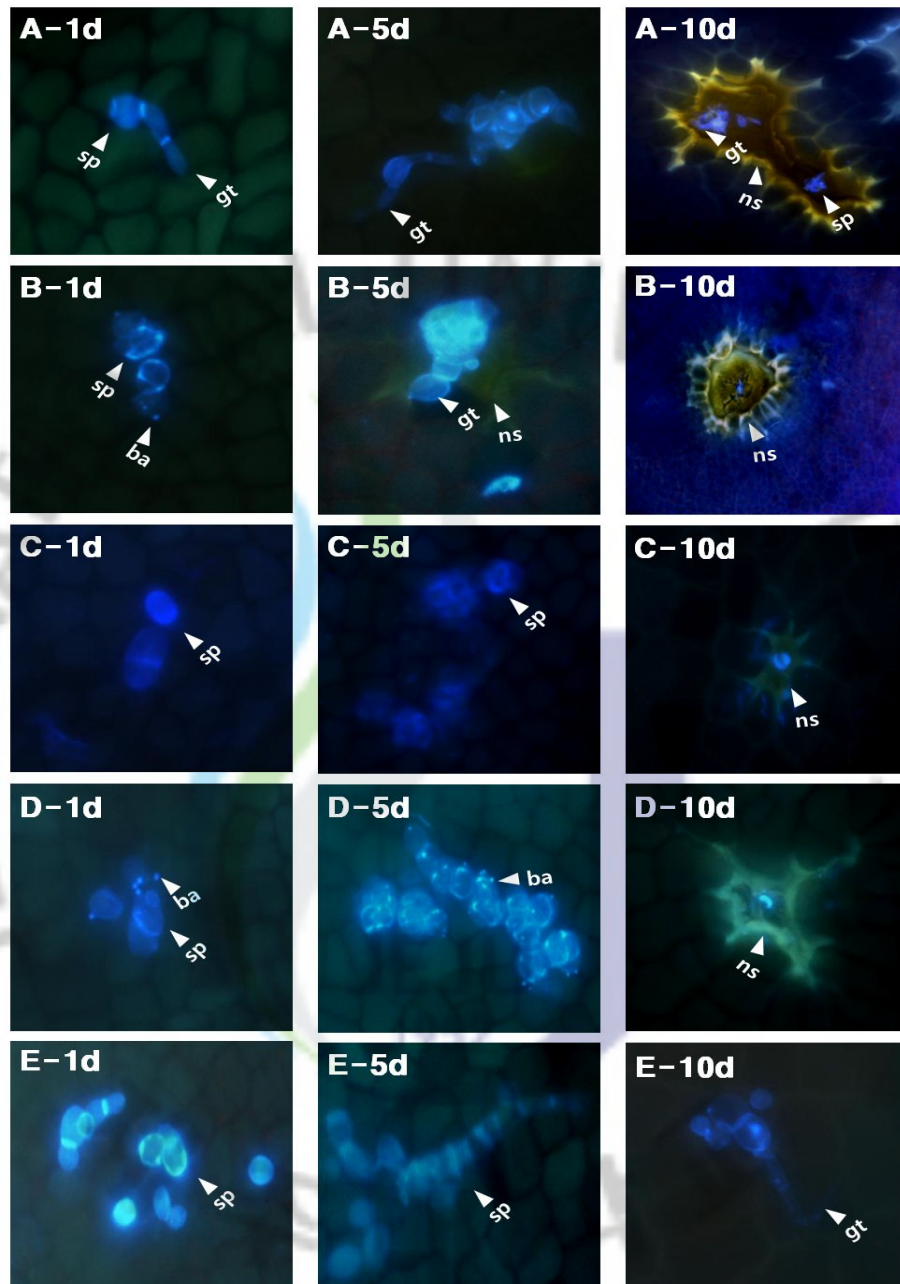


Fig. 5. Fluorescence microscope observation of infection structures on the citrus leaves at 1 day, 5 days, 10 days after inoculated with *E. fawcettii* (2.2×10^6 conidial/ml) (A) or treated with mixture of the *E. fawcettii* and rhizobacteria (4.2×10^6 conidial/ml and 4.2×10^6 cfu/ml, respectively) (B: THJ 609-3, C: MRL408-3, D: TRH 423-3) or with mixture of the *E. fawcettii* and fungicide (E: Imibenconazol). Abb.: sp; fungal spore, gt; gum tube, ns; necrosis, ba; bacterium.

Table 7. Number of fungal spores on the citrus leaves after inoculated with *E. fauvecettii* or treated with mixture of the *E. fauvecettii* and rhizobacteria THJ 609-3, MRL 408-3 or TRH 423-3 or with mixture of the *E. fauvecettii* and fungicide at different time after inoculation with *Elsinoe fauvecettii*.

Treatment	Number of pores ^x		
	1day	5days	10days
control	1218.92 ± 86.00 _a ^r	1105.25 ± 51.74 a	1071.92 ± 31.73 a
THJ 609-3	635.33 ± 25.54 _b	574.08 ± 36.76 b	544.17 ± 31.66 b
MRL 408-3	285.42 ± 21.89 _c	293.67 ± 21.69 c	251.67 ± 20.81 c
TRH 423-3	297.17 ± 25.51 _c	262.50 ± 22.02 c	242.58 ± 15.84 c
Imibenconazol	147.83 ± 10.58 _d	111.17 ± 6.64 d	122.08 ± 11.32 d

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

^y The different letters are significantly (P<0.001) different according to Duncan's multiple test.

Table 8. Rate of gum tube formation on the citrus leaves after inoculated with *E. fauveltii* or treated with mixture of the *E. fauveltii* and rhizobacteria THJ 609-3, MRL 408-3 or TRH 423-3 or with mixture of the *E. fauveltii* and fungicide at different time after inoculation with *Elsinoe fauveltii*.

Treatment	Rate of gum tube formation(%) ^x		
	1day	5day	10day
control	5.19 ± 0.33 _{a^y}	14.75 ± 1.75 _a	21.62 ± 4.08 _a
THJ 609-3	2.11 ± 0.11 _b	6.20 ± 0.44 _b	10.65 ± 0.96 _b
MRL 408-3	1.16 ± 0.24 _c	4.80 ± 0.35 _b	16.92 ± 2.11 _{ab}
TRH 423-3	0.94 ± 0.19 _c	4.62 ± 0.19 _b	16.61 ± 2.28 _{ab}
Imibenconazol	1.25 ± 0.37 _c	6.05 ± 0.70 _b	24.77 ± 3.85 _a

^xValues represent means±standard deviation of three separated experiments, each containing four leaves per treatment. Gum tube rate(%)=(gum tube÷spore)×100

^y The different letters are significantly(P<0.001) different according to Duncan's multiple test.

Table 9. Frequency of necrosis on the citrus leaves after inoculated with *E. fawcettii* or treated with mixture of the *E. fawcettii* and rhizobacteria THJ 609-3, MRL 408-3 or TRH 423-3 or with mixture of the *E. fawcettii* and fungicide at different time after inoculation with *Elsinoe fawcettii*.

Treatment	Frequency of necrosis ^x		
	1day	5day	10day
control	0.00 ± 0.00 ^{a^y}	23.42 ± 1.79 ^a	28.00 ± 2.69 ^a
THJ 609-3	0.00 ± 0.00 ^a	5.00 ± 0.41 ^b	6.83 ± 0.46 ^b
MRL 408-3	0.00 ± 0.00 ^a	1.67 ± 0.22 ^c	2.67 ± 0.41 ^c
TRH 423-3	0.00 ± 0.00 ^a	1.25 ± 0.25 ^c	2.33 ± 0.54 ^c
Imibenconazol	0.00 ± 0.00 ^a	0.67 ± 0.19 ^c	1.08 ± 0.29 ^c

^x Values represent means±standard deviation of three separated experiments, each containing four leaves per treatment.

^y The different letters are significantly(P<0.001) different according to Duncan's multiple test.

4. 감귤더듬이병균에 효과적인 식물근권세균의 동정

감귤 더듬이병균에 대해 억제력이 있는 식물근권세균 THJ 609-3, MRL 408-3과 TRH 423-3을 ITS 38F와 72R의 primer를 이용하여 rDNA의 특정유전자를 증폭하여 동정하였다. 증폭된 유전자의 염기서열 분석을 AB program에 의해 진행하여 THJ 609-3, MRL 408-3과 TRH 423-3은 각각 320 bp, 660 bp,과 538 bp의 sequence를 확인하였다 (Fig. 6).

NCBI의 Gen Bank에 등록된 균주들의 database에 대해 분석된 균주들의 DNA의염기서열을 각각 비교한 결과 THJ 609-3(NCBI NO. CP000949.1)은 *Pseudomonas pudia*로 동정되었고, MRL 408-3(NCBI NO. EF552064.1)과 TRH 423-3(NCBI NO. EF522070.1)은 *Burkholderia gladioli*로 동정되었다 (Fig. 6).



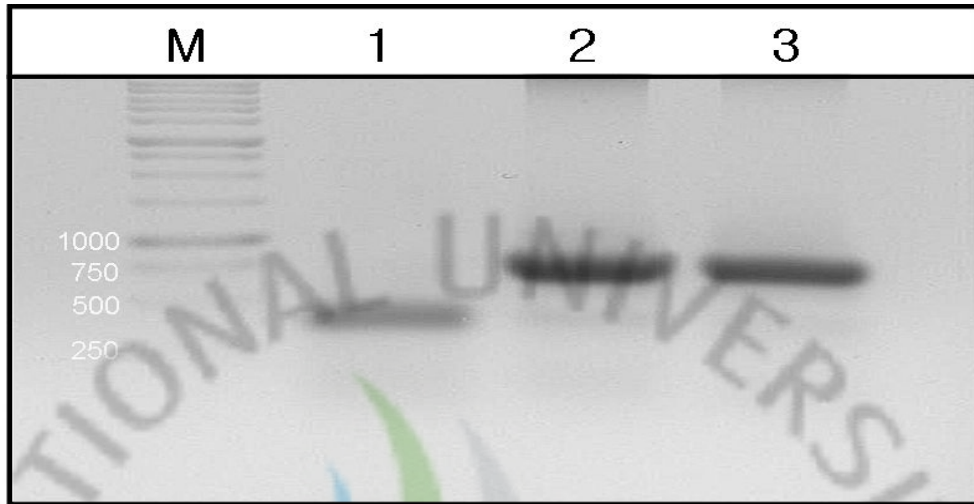


Fig. 6. Gel electrophoresis of PCR amplified internal transcript spacer regions of DNA from rhizobacterial isolations THJ 609-3(lane 1), MRL 408-3(lane 2), TRH 423-3(lane 3) using universal primers 38r and 72f. M: 1kb ladder(iNtRON Bio.)

V. 고찰

최근에는 생물학적 방제로 미생물을 이용한 연구가 많이 보고 되고 있으며 (김 등, 2002), 연구 성과에 의한 다양한 미생물제제의 개발은 화학적 방제수단인 농약으로 인한 잔류성, 환경오염, 병해충의 저항성 문제를 감소시킬 수 있어 친환경 농업의 기반이 되고 있다 (David, 1988). 최초로 미생물제제로써 상품화된 *Agrobacterium tumefaciens*는 과수 근두암종병원균 방제에 대해 지금까지도 널리 사용되고 있고(Kerr, 1980), 세계적으로 많이 사용되고 있는 미생물 농약인 *Bacillus subtilis* QST 713은 에코제트로 시판되면서 노균병균, 흰가루병균, 탄저병 등 넓은 범위로 사용하고 있으며, 미국과 20개의 다른 국가에 사용되고 있다 (Miille, 2006). 국내에서도 오이 흰가루병에 대해 방제 효과가 있다고 보고 된 *Bacillus subtilis* KB-401가 슈팅스타라는 상품명으로 등록되어 시판되고 있다 (남 등, 2010). 식물 병에 대해 효과를 나타낸 미생물들은 대부분 *Bacillus*속이었으며(김 등 2002; 김 등 2008; 공 등 2010), 최근에는 많은 종류의 미생물에 대한 연구가 증가하고 있다 (Clark와 Parke, 1996; Da La Fuente 등, 2004).

한편, 본 연구에서 식물근권세균 중 *Bacillus*로 동정된 KRY 505-3은 감귤 더듬이병원균에 대한 *in vitro* 실험에서 항진균 효과가 없었으나, THJ 609-3, MRL 408-3과 TRH 423-3은 병원균에 저지원을 형성하여 항진균 효과가 있음을 확인하였다. THJ 609-3은 병원균에 대한 저지원 형성이 MRL 408-3과 TRH 423-3 보다 넓게 형성되어 병원균에 대해 직접적으로 강한 균사 억제효과를 나타낸다고 생각되어진다 (Fig. 1). 이러한 연구는 시들음병균을 일으키는 *Fusarium oxysporum*에 대해 항균효과 실험에서 저지원이 형성된 미생물을 선발했으며(오와 김, 2003; 강 등, 2005), 길항미생물에서 식물병원균에 대한 2,4-diacetylphloroglucinol, pyoluteorin, pyrrolnitrin 등의 항생물질이 생성되어 항균효과에 이바지한다고 보고 되었다 (Raaijmakers 등, 2000).

THJ 609-3, MRL 408-3과 TRH 423-3이 자연에서도 감귤 더듬이병에 대해 억제 효과가 나타날 것이라 판단하여 일반 농가가 사용하는 농약 살포 방법을

고려하고 감귤 잎에 식물근권세균을 선 처리 후 감귤 더덩이병원균을 접종하여 병원균의 병진전 억제효과 실험을 실시하였다 (강과 진, 2010). *in vitro*에서 저지원 형성이 넓게 나온 THJ 609-3의 병진전 억제효과는 control에 비해 약 50%의 억제효과를 보인 반면 MRL 408-3과 TRH 423-3은 약 70%의 억제효과를 나타냈으며, Imibenconazol은 약 80%의 억제효과를 나타냈다 (Table 2). 또한 농가에서 식물병 방제 후 기상으로 인한 병의 감염이 즉시 일어날 수 있는 상황을 가정하여 식물근권세균과 병원균을 혼합 접종하여 억제효과가 일어날 수 있는지 실험하였으며, 그 결과 THJ 609-3은 control보다 약 65%의 억제율을 보여 선 처리보다 약 15%의 병원균에 대한 억제율이 높게 나타났으며, MRL 408-3과 TRH 423-3는 선 처리와 유사한 결과를 나타내어 병원균의 생장 억제에 대해 효과적이었고, Imibenconazol 역시 선 처리와 비슷한 결과가 나왔지만 효과가 보다 향상되었다 (Table 3). 식물근권세균을 선처리하여 감귤 더덩이병원균을 접종 실험과 식물근권세균과 감귤더덩이병원균을 혼합 처리한 실험의 차이는 실험적인 것으로, 선 처리에서 각각의 처리가 고루했다 해도 혼합접종을 한 처리구보다는 서로 접촉되는 부분이 많아서 효과가 다르게 나타났다고 생각된다.

감귤 잎에 접종된 감귤더덩이병원균의 침입기작을 형광 현미경으로 관찰하였더니 병원균의 포자와 발아관의 형성, 괴저현상이 control보다 식물근권세균 처리구가 포자수, 발아관의 형성, 괴저수가 약 50~70%가 낮게 나타났으며, 특히적으로 근권세균이 병원균의 포자와 발아관 주변에 접촉되어있는 것을 확인하였다 (Fig. 4과 Fig. 5, Table 3) 이러한 결과는 근권세균의 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 생각되어진다. 또한 접종 1일째, 5일째, 10일째까지 근권세균이 병원균에 포자 및 발아관 주변에 분포되어 생존하고 있음을 확인할 수 있었으며(Fig. 4와 Fig. 5), 접종 1일째는 관찰되지 않았으나 접종 5일째부터 병원균의 형태가 분해되어 실타래 같은 잔재물이 병원균 근처에 잔존된 것이 형광물질에 염색된 것을 관찰할 수 있었다. 이것은 진균의 세포벽을 분해하는 cellulase, chitosanase 등이 식물근권세균에 의해 형성(Jung

등, 2007; Kurosshima 등, 1996)되어 병원균의 포자를 직접적으로 분해하여 포자수가 점차적으로 감소하였고, 이로 인해 발아율의 저하 및 병반으로 확인되는 괴사현상도 간접적인 영향으로 감소되어 병 발생이 저하된 것으로 생각되어진다.

미생물의 동정에는 미생물의 형태학적, 배양학적, 생리·생화학적 특성을 조사하는 일반적인 Bergey's manual의 방법(Sneath 등, 1986), 미생물 세포벽의 지방산 조성을 확인하는 방법(Joo 등, 2002)과 미생물의 DNA를 분리하여 염기서열을 확인하는 분자생물학적 방법(Ausubel 등, 1987)등을 이용할 수 있으며, 분석된 결과는 상동성을 비교하여 동정할 수 있다. 최근에는 3가지 방법 중 분리된 미생물의 DNA에서 특정유전자를 증폭하여 16S rDNA의 염기서열을 확인하고 Gene Bank에 등록된 균주들과 유사도를 비교하여 상동성이 높은 것으로 동정할 수 있어 기존의 방법보다 쉽고, 간편하며 높은 정확도에 의해 분자생물학적인 방법이 주로 사용되고 있다(Joo 등, 2002). 감귤 더듬이병균에 억제 효과를 보인 식물근권세균 THJ 609-3의 rDNA의 특정유전자를 ITS primer를 이용(Ausubel 등, 1987)하여 증폭하여 확인하였으며, *Pseudomonas pudia*로 동정되었다. 최근 *Pseudomonas* 속 균주를 이용한 생물적 방제는 많이 보고되고 있으며(Da La Fuente 등, 2004), *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). 또한 MRL 408-3과 TRH 423-3은 *Burkholderia gladioli*로 동정되었으며, *Burkholderia*속에 대한 연구로는 사탕수수의 모잘록병균에 방제 효과가 있으며(Clark와 Parke, 1996), 난균류에 의해 발생된 콩과식물의 노균병균에 효과가 있다 (Heungens와 Parke, 2000). 오이에 발생하는 *Pythium ultimum*에 의한 모잘록병에 대한 효과가 연구가 보고 되었다 (Bae 등, 2007).

이러한 많은 연구에서 감귤 더듬이병균에 대한 농약 등의 화학적 방제 이외 생물학적 방제로 거의 연구된 바가 없어 본 연구를 토대로 관행농가에서 사용되는 농약의 남용도 줄이고, 환경도 개선할 수 있으며, 친환경 농가에 농약을 대체한 안전한 방제제로 유용하게 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

V. 적 요

*Elsinoe fawcettii*는 현재 감귤 산업의 경제 가치를 떨어트리며, 감귤 더뎡이 병을 일으키는 원인중 하나로 일반적으로 살균제를 이용하여 방제가 이루어지고 있다. 하지만 안전한 농산물에 대한 관심이 증대되면서 생물학적인 방제에 대한 연구가 많이 요구되고 있다. 이에 미생물 방제에 대한 연구로서 제주에서 분리한 식물근권세균 100개 중 *Elsinoe fawcettii*에 의해 발병되는 감귤 더뎡이병균의 항진균 효과와 병원균 발병 억제효과가 나타나는지 조사하였다. 그 중 감귤 더뎡이병균의 항진균 효과로 THJ 609-3, MRL 408-3, TRH 423-3가 더뎡이병균에 저지원이 형성되어 선발하였다. 농가 적용을 위한 방법으로 식물근권세균을 선 처리하여 병원균을 접종하는 방법과 근권세균과 병원균을 혼합하여 접종하는 방법을 수행하였으며 처리한 결과 두 방법 모두 더뎡이병 억제효과가 있었다. 형광현미경 관측은 선발된 식물근권세균이 병원균의 포자수를 감소시킬 수 있는지 밝혔다. 발아율 또한 접종 뒤에 1일과 5일에 근권세균에 의해 감소되었다. 식물근권세균 rDNA의 Internal Transcript Spaces(ITS)을 분석을 통해 동정한 결과 THJ 609-3은 *Pseudomonas pudia*로 동정되었으며, MRL 408-3과 TRH 423-3은 *Burkholderia gladioli*로 동정되었다. 본 연구는 생물적 방제로 감귤 더뎡이병균을 방제할 수 있는 친환경적 미생물제제로 유용하게 이용할 수 있는 가치가 있다고 생각된다.

VI. 참고 문헌

- Agrios, G. N. 2005. Systemic Acquired Resistance. P. 237-242, and Antibiotics. P.343-347. in : *Plant Pathology 5th ed. Elsevier Academic press*. San Diego, California, USA.
- An, Yong jun. 2007. Systemic resistance induction by bacterial strains isolated from jeju island against late blight caused by phytophthora infestans in tomato. 濟州大學校 碩士論文.
- 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. until. 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. in Korea. *Plant Pathol.J.* 23(3):161-165.
- 조정일, 조자용, 박용서, 양승렬, 허복구. 2007. 참다래 꽃썩음병에 대한 방선균 #110의 분리, 동정 및 생물적 방제효과. *Kor. J. Sci. Technol.* 25(3): 235-240.
- 조정택, 손석련, 문병주. 1992. 길항세균 *Pseudomonas gladioli*와 유기물 첨가에 의한 오이덩굴썩음병의 억제효과. *한국병리학회지* 8(1): 8-13.
- Clark, A. D. and Parke, J. L. 1996. Biological control of Pythium damping off of supersweet corn by seed-applied *Burkholderia cepacia* AMMDRI. *Phytopathology* 86:54.
- 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.
- David, M. W. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu. Rev. Phytopathil.* 26, 379-407.

- Heungens, K. and Parke, J. L. 2000. Zoospore homing and infection event: 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 plant, rhizobacteria and physicochemical factors on the Phytoremediation of contaminated soil. *Kor. J. Microbiol.* 35: 261-271.
- Hyun, J. W., Timmer, L. W., Lee, S. C., Yun, S. H., Ko, S. W., Kim, K. S. 2001. Pathological Characterization and Molecular Analysis of *Elsinoe* Isolates Causing Scab Diseases of Citrus in Jeju Isolates in Korea. *Plant Disease.* 85(9): 1013-1017.
- 현재욱. 2002. 감귤병해충의 진단과 방제. 농촌진흥청 제주농업시험장, 제주감귤 농업협동조합 발행. p.26~32.
- 현재욱. 2009. 감귤원에. 제주감귤농업현동조합 발행. 통권 194호(174) p.56-58. 제주.
- 장혜원, 최용락, 주우홍, 최윤희, 도형기, 황철원. 2004. 포항 부추에 대한 biosurfactan를 생산하는 *Bacillus* sp. LP03, TBM40-3의 항진균성과 생육에 미치는 영향. *Journal of Life Science* 14(5): 859-862.
- 정우철, 신태수, 도기석, 김원극, 이재호, 최기현. 2006. 잔디 피시움마름병(Pythium light)의 생물학적 방제를 위한 길항 미생물의 선발과 효력 검증. *식물병연구.* 12(3) 260-266.
- 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., Lee, Y. J., Bae, Y. S. 2004. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance in cucumber plants against anthracnose disease caused by *Colletotrichum orbiculare*. *Kor. J. Plant. Pathol.* 20: 172-176.
- Jung, H. K., J. R. Kim, S. M. Woo and S. D. Kim 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.
- 강상재, 김진호, 주길재. 2005. 시들음병균에 길항하는 미생물의 분리 및 미생물 제제를 첨가한 부산물비료의 이화학적 특성. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 23(3): 342-350.
- 강소영, 전용철. 2010. 식물근권에서 분리한 세균을 처리한 감귤열매에서 감귤 역병억제 효과. *식물병연구.* 16(1): 35-40.
- Kerr, A. 1980. Biological control of crown gall through production of agrocin 84. *Plant Dis.* 64: 25~30.
- 김근기, 김용철, 최영환, 신태순, 박기도, 강위금, 최용락, 박현철. 2008. *Bacillus* sp. AB 02를 이용한 식물 병원균에 대한 생물검정. *Journal of Life Science.* Vol. 18. No. 6. 858~864.
- 김진호, 최용화, 강상재, 이인구, 주길재. 2002. *Bacillus ehimensis* YJ-37에 의한 채소류 모잘록병의 생물학적 방제. *Korean Journal of Life Science.* 12(4): 416-422.
- Kim, H. Y., and Jeun Y. C. 2006. Resistance Induction and Enhanced Tuber Production by Pre-inoculation with Bacterial Strain Potato Plants against *Phytophthora infestans*. *The Korean Society of Mycology.* 34(2): 67-72.
- 고복수. 2009. 감귤원에. 제주감귤농업현동조합 발행. 통권197호(177) p.2-7. 제주.
- 공현기, 전옥주, 최기혁, 이광렬, 백정우, 김현주, 셴틸쿠마 무루가이안, 문병주, 이선주. 2010.
- 길항미생물 *Bacillus amyloliquefaciens* A-2를 이용한 토마토 잎곰팡이병 방제용 미생물 제제. *식물병연구.* 16(1): 27-34.
- Kuroshima, K., T, Sakane, R. Takata and A. Yokota. 1996. *Bacillus ehimensis* sp. nov. and *Bacillus chitinolyticus* sp. nov., new chitinolytic members of the genus *Bacillus*. *Intl. J. System. Bacteriol.* 46,7 6-80.
- Lee, K. H., Jeun, Y. C., 2005. Observations of Infection Structures after Inoculation with *Colletotrichum orbiculare* on the Leaves of Cucumber Plants Pre-inoculated with Two Bacterial Strains *Pseudomonas putida* or *Micrococcus luteus*. *The Korean Society of Mycology.* 33(3): 131-136.
- 남영훈, 최재필, 김형조, 이재준, 임근환, 김영권, 김홍태, 전용철. 2010. 오이 흰가루병에 대한 *Bacillus subtilis* KB-401의 방제효과. *농약과학회지* 제 14권, 제 1호, 49~53.

- Miille, M. J. 2006. AgraQuest biofungicide gets a European Ok. *Industrial Bioprocessing* Volume 28, Issue 10. October 2006. Page 3.
- 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*. 16. 348.
- 오정행, 김규홍. 2003. *Pseudomonas* sp.를 이용한 콘 탄저병의 생물학적 방제. *식물병 연구* 9(3): 174-178.
- 박종환, 서상태, 김경희, 이상현, 오은성, 신상철. 2008. *Pseudomonas putida* P84 균주를 이용한 토마토 풋마름병의 억제. *식물병연구*. 14(1): 32-36.
- Raaijmaker, J. M., Weller, D. M. and Thomashow, L.S. 1997. Frequency of antibiotic producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 881-887.
- Sneath, P. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe and J. G. Holt. 1986. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. vol. 2., The Williams & Wilkins, Baltimore.
- Thomashow, L. S. and Weller, D. M. 1996. Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: mechanisms and antifungal metabolites. pp.187-235. In: *Plant-microbe interactions*, vol. 1. G. Stacey and N.T. Keen(ed.), Campman and Hall, New York, N. Y.
- Timmer, L. W., Priest, M., Broadbent, P., and Tan, M. K. 1996. Morphological and pathological characterization of species of *Elsinoe* causing scab diseases of citrus. *Phytopathology* 86: 1032-1038.
- Timmer, L. W. 2000. Scab diseases. Pages 31-32. in: *Compendium of Citrus Diseases*. 2nded. L. W. Timmer, S. M. Garnsey, and J. H. Graham, eds. American Phytopathological Society Press. St. Paul. M N.
- Tonelli M. L., Ana Furlan, Tania Taurian, Stella Castro, Adriana Fabra. 2010. Peanut priming induced by biocontrol agents. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 11: 1-6.
- Weller, D. M. 1988. Biological control of soilborn plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu. Rev. Pathol.* 13: 129-131.

감사의 글

지난 연구실 생활을 돌이켜 한 편의 논문으로 대신하기엔 아쉬움이 많이 남지만, 대학원 생활을 잘 마무리 할 수 있게 되어서 무엇보다 뜻 깊게 생각하고, 석사학위 논문을 완성하면서 2년이라는 시간이 ‘결코 길지만은 않다.’ 라는 깨달음과 동시에 새로운 것에 대한 도전, 결실을 이루었다는 성취감과 더 많이 노력하지 못함에 후회 등 많은 것을 느끼고 얻게 되었던 시간이었습니다. 이 논문이 완성되기까지 저를 도와주시고 지도해 주신 분들께 적은 지면을 빌려 감사의 마음을 전하고자 합니다.

논문이 완성되기까지 많은 면으로 부족한 제자를 위해 포용과 격려 뿐만 아니라 쓴소리도 마다하지 않고 아낌없이 지도해주시며 모난돌을 갈고 닦아주신 전용철 지도교수님께 머리 숙여 감사드립니다. 바쁘신데도 불구하고 논문 심사를 맡아 주신 송창길 교수님, 현해남 교수님께 진심으로 감사드립니다. 또한 학부생부터 농학에 대한 배움의 길을 열정적으로 쏟아 부어주신 강영길 교수님, 김동순 교수님, 김찬우 박사님께도 진심으로 감사의 마음을 전합니다.

그리고 학부과정과 대학원 석사과정을 하면서 많은 조언으로 도움을 주셨던 박성준 선생님, 이충선 선생님, 송진영 선생님, 유일하게 졸업동기이자 대학원 동기인 영삼오빠를 비롯한 대학원 선,후배님께도 감사드립니다. 무엇보다 오랫동안 연구실에서 같이 웃고, 고생하면서 이번 논문에 처음부터 끝까지 아낌없이 도와주신 강소영선생님, 고평렬선생님 정말 감사드리며, 유경언니, 윤정이, 찬학오빠, 지혜에게도 감사를 전하고 항상 언니랍시고 방해만해서 미안한 경아, 원빈이에게도 감사한 마음을 전합니다. 학부생부터 저에게 정신적 지주가 되어주었던 경후오빠, 효정언니, 효정이, 소영이, 항상 옆에서 묵묵히 도와주는 건희에게 감사의 마음을 전합니다.

마지막으로 외손녀의 응석에도 한없이 받아주시고 믿어주신 할아버님과 할머니님, 조카의 어려운 부탁에도 최고의 조언을 해주신 형일 삼촌, 같은 시기에 석사과정을 졸업하게 된 준영오빠와 제가 학업을 무사히 마칠 수 있게 묵묵히 뒤에서 받쳐주시고 밀어주신 저의 어머님께 감사와 사랑을 전하면서 이 논문을 바칩니다.