



저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 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

감귤검은점무늬병 억제효과가
있는 식물근권세균

Rhizobacteria Showing Suppress Effect
to Citrus Melanose

濟州大學校 大學院

農學科

高允呈

2013年 2月

감귤검은점무늬병 억제효과가 있는 식물근권세균

指導教授 田 溶 哲

高 允 呈

이 論文을 農學 碩士學位 論文으로 提出함

2013 年 2 月

高允呈의 農學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____ (印)

委 員 _____ (印)

委 員 _____ (印)

濟州大學校 大學院

2013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. 감귤식물체	
2. 감귤검은점무늬병균 분리 및 접종평가	
3. 식물근권세균의 분리 및 선발	
4. 식물근권세균 식물체 처리 및 살균제 처리 실험	
5. 노지 포장 조건에서 검은점무늬병 방제 효과 검정	
6. 식물근권세균 동정	
III. 결 과.....	11
1. 식물근권세균의 식물체 처리효과	
2. 실내 조건에서 검은점무늬병 방제 효과 검정	
3. 노지 포장에서의 식물근권세균의 감귤검은점무늬병 억제 효과	
4. 포장에서 식물근권세균과 농약의 교호 살포에 의한 감귤검은점무늬병 억제	
5. rDNA 염기서열 분석에 의한 식물근권세균 동정	
IV. 고 찰.....	22
V. 적 요.....	26
VI. 참 고 문 헌.....	27

List of Figures

Fig. 1 Photographs of citrus leaves at 7 days after inoculated with *Diaporthe citri*(A), pre-treated Dithianon[®](B), pre-treated TRH 423-3(C), pre-treated MRL 408-3(D), pre-treated THJ 609-3(E). The concentration of *D. citri*, the rhizobacteria and the fungicide were 3.0×10^5 conidia/ml, 1.0×10^6 cfu/ml and 1g/L, respectively.

Fig. 2 Photographs of citrus leaves at 7 days after inoculated with *Diaporthe citri*(A), pre-treated Dithianon[®](B), pre and post treated TRH423-3(C), pre and post treated MRL 408-3(D), pre and post-treated THJ 609-3(E). The concentration of *D. citri*, the rhizobacteria and the fungicide were 3.0×10^5 conidia/ml, 1.0×10^6 cfu/ml and 1g/L, respectively.

Fig. 3 Photograph of citrus fruit infected *Diaporthe citri* at the treated alone rhizobacterial and mixture Dithianon[®]. A : Control, B : Dithianon[®] C : TRH423-3, D : MRL408-3, E : THJ609-3. F. TRH423-3 mixture Dithianon[®], MRL408-3 mixture Dithianon[®], THJ609-3 mixture Dithianon[®]. The concentration of the rhizobacteria were 1.0×10^6 cfu/ml treated 10 times with 7 days and 6 time with 7days interval. And *D. citri*, the fungicide were 3.0×10^5 conidia/ml and 1g/L, respectively.

List of tables

Table 1. Number of lesions on citrus leaves inoculated with *Diaporthe citri* after pre and pre-post treatment with the selected rhizobacterial strains.

Table 2. Disease severity on the citrus trees of non treated control, inoculated with the selected rhizobacterial strains, bacterial strain and fungicide and treated with commercial fungicide (Dithianon[®]) in the orchard.

A B S T R A C T

Citrus melanose is known as an important disease in the citrus cultivation of Jeju island. Mostly, citrus melanose is controlled by spraying chemical fungicide. The frequency of using fungicide become increased which caused the fungicide resistance and environmental destruction. Recently, eco-friendly agricultural products is demanded in the citrus industry including biological control using microorganisms which can be an alternative method to pesticides. In this study three rhizobacterial strains TRH423-3, MRL408-3, THJ609-3 are selected by testing its antifungal activity against *Diaporthe citri* causing citrus melanose. To investigate the protect efficacy of the selected rhizobacterial strains to citrus melanose, the bacteria were pre-inoculated on citrus leaves following inoculation with melanose pathogen. Pre-inoculation with all selected rhizobacterial strains showed disease suppression in which the levels of protection rates were different by the rhizobacterial strains. Additional inoculation with the rhizobacterial strains after the pathogen inoculation was enhanced protection rates in all cases. In the orchards disease severity of citrus melanose was suppressed at 20% by the selected rhizobacteria strains, whereas at 94% by commercial fungicide Dithianon[®]. In the case of alternation treatment with the rhizobacteria and the fungicide the protection efficacy of the rhizobacteria could be apparent due to the fungicide. On the other hand, the strain MRL408-3 and TRH423-3 were identified as *Burkholderia gladioli*, THJ609-3 as *Pseudomonasputida* as a result of analyzing the internal transcript spaces(ITS) of the rhizobacterial strains rDNA. The selected rhizobacterial strains may be valuable in the environment-friendly citrus farm in which chemical application is limited.

I. 서 론

최근 감귤 재배면적은 수출시장개방 및 고품질 감귤수확을 위한 정책시행으로 인해 2009년 기준으로 20000여 ha로 다소 감소되었지만 현재 여전히 많은 과실이 생산되고 있다. 생과실 감귤을 이용한 감귤시장의 규모가 1.2조원이고, 최근에 생산된 과실 중 비상품과실을 포함한 나머지 17%로 만들어진 가공제품의 시장규모가 7400억원으로 점차 늘어나고 있는 추세지만, 여전히 감귤산업에서 생과실 감귤이 농가의 주 소득원이라고 할 수 있다(현 등, 2011). 때문에 상품성 과실을 생산하는 농가로서는 감귤에 나타나는 병해에 대해 신경을 쓸 수 밖에 없다.

감귤에 발생하는 병해로 미국에서는 100여종이 보고되었고, 일본에서는 46종의 보고되었으며, 제주도에서는 바이러스병을 포함한 35종의 병해가 발생되고 있는 것으로 알려져 있다(Whiteside 등, 1988; 유 등, 1993; 현 등, 2002년). 그 중 감귤검은점무늬병(*Diaporthe citri*) 우리나라 감귤에 가장 큰 피해를 주고 있다.

검은점무늬병균은 자낭균에 속하는 곰팡이로 자낭포자 세대는 *Diaporthe citri* F. A. Wolf이고(Bach and wolf, 1928; Fawcett, 1936; 福岡, 1937; 山本, 1991) 분생포자 세대는 *Phomopsis citri* Fawcett이다. 분생포자인 병포자를 형성하는 병자각은 주로 죽은 가지, 특히 최근에 죽은 가지에 주로 생기는 것으로 알려져 있다(Fawcett, 1911). 병포자는 나무위의 마른 가지나 과원에 방치하여 둔 죽은 가지에서 생겨난 병자각에서 생성되며 빗방울과 함께 비산된다(Fawcett 와 Lea, 1926). 과실의 경우 통상 낙화기 부터 낙화 후 5개월까지 병이 발생 할 수 있으며 병 발생 정도는 수상에 남아 있는 죽은 가지의 양, 과실의 크기(생육단계), 강우나 이슬에 의한 습윤기간에 따라 다양하다. 따라서 통상 농가에서는 6월 상중순부터 9월 중순까지 만코지 등의 약제를 4-6회 정도 살포하여 방제하고 있는 실정이다.

최근 농산물의 안전성에 대한 관심이 높아지고 있어 구리제와 같은 친환경 농자재 사용이 증가하고 있으나 살포 피해 발생 등의 문제가 있어 사용상에 큰 어려움이 있는 실정이다(현 등, 2005).

이에 농약의 사용은 최소한으로 줄임으로써 환경오염, 약제저항성 및 약해에 대해 보완하는 동시에 친환경 농업을 통한 농작물의 고품질, 고소득을 유지시킬 수 있는 방안으로 미생물을 이용한 방제가 주목받고 있다. 이러한 미생물 중에는 식물의 성장을 촉진하는 종류들이 있는데, 식물과 공생을 하는 것도 있고, 근권에서 독립생활을 하는 것도 있다. 그 중 식물 뿌리의 근권 2~3mm 내외에서 분포하고 있는 식물근권세균(plant rhizospher bacteria)이 큰 비중을 차지하고 있으며(이 와 송, 2010년), 근권 내에 존재하는 일부 세균들은 auxin, gibberellin, cytokinin 등의 호르몬을 분비하여 식물생장을 촉진시키는 것으로 알려져 있다(Kende 와 Zeevaart, 1997). 이러한 세균을 식물생육촉진근권세균(Plant Growth Promoting Rhizobacteria: PGPR)이라 하며 고활성이면서 근권정착력이 높아, 생물농약뿐만 아니라 토양 미생물제제로 많이 개발 되었다. 근권내 서식하는 식물생육 저해균(deleterious microorganism)의 생육을 억제할 뿐 만 아니라 흙에서 전염되는 병의 침입으로부터 식물을 안전하게 보호한다. 또한 PGPR은 식물의 전신적 유도 저항성(Induced Systemic Resistance: ISR)을 조장하여 지상부 병원균에 대하여 식물이 저항성을 가질 수 있도록 하는 것으로 알려져 있다. 대부분의 미생물 농약은 *Bacillus*속으로 열과 건조 등 환경스트레스에 견딜 수 있는 내생포자(endospore)를 형성하는 특징을 갖고 있어 대량으로 생산하여 농가에 보급될 경우 2~3년 정도의 장기간 보존에도 활력을 유지할 수 있어 미생물 농약으로 많이 이용하고 있다(박, 2011).

*Bacillus*속을 이용한 생물적 방제 연구는 많이 이루어져 있다. 차나무 겹등무늬병을 일으키는 *Pestalotiopsis longiseta*에 *Bacillus subtilis* BD0310을 처리한 결과 70%의 병 억제 효과를 보였으며(김 등, 2008), *Alternaria panax*에 의한 인삼 점무늬병은 미생물제제인 *Bacillus subtilis* QST713를 처리한 결과 7~80%의 병 억제 효과를 보였다(이 등, 2008). 또한 *Sphaerotheca fusca*에 의한 오이 흰가루병에 대하여 *B. subtilis* KB-401을 처리한 결과 약 80%의 병 억제효과를 나타냈고(남 등, 2010), 채소의 모잘록병을 일으키는 *Alternaria altrata*, *Collectotrichum gloeosporioides*, *Didymella bryoniae*, *Fusarium moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. oxysporum cucumerinum*, *F. oxysporum niveum*, *Gloeosporium* sp, *Glomerella* sp, *G. cingulata*, *Penicillium digitatum*, *P.*

italicum, *Phytophthora capsici*, *Pythium ultimum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Stemphylium solani* 에 대하여 *Bacillus ehimensis* YJ-37를 이용한 항진균성 실험을 한 결과 대부분 균사를 억제하는 것으로 나타났다(주 등, 2002). 토마토 풋마름병을 일으키는 *Ralstonia solanacearum*의 방제를 위해 양액재배하는 토마토에 *Bacillus amyloliquifaciens* EXTN-1을 관주처리한 결과 효과적으로 병발생을 억제하였다(남 등, 2001). 또한 동일한 *B. amyloliquifaciens* EXTN-1 처리에 의한 딸기의 생육 및 잿빛곰팡이병 방제에 대하여 조사한 결과 딸기의 결주 감소율, 엽록소 함량, 엽장, 분얼수에 대하여 증가하였으며, 잿빛 곰팡이병에 대해서도 방제효과가 있는 것으로 나타났다(박 등, 2012).

감귤에 나타나는 병에 대해서도 *Bacillus* 계통의 미생물을 통해 방제하는 연구가 진행되었다. 감귤 저장 후 발생하는 녹색곰팡이병을 일으키는 *Penicillium digitatum*을 방제하기 위하여 감귤 잎에서 분리된 *Bacillus* 균주 중 녹색곰팡이병에 항진균 활성을 보이는 *Bacillus velezensis* CB3 균주가 선발되었다. 이 균주를 처리한 감귤에 *Penicillium digitatum*을 고농도로 상처접종하였을 때도 방제효과가 높게 나타났다고 보고하였다(이 등, 2012). 또한 감귤 역병균인 *Phytophthora citrophora*에 항미생물 효과가 있는 식물근권세균 *Bacillus cereus*와 *B. circulans*를 감귤 열매에 처리하면 감귤역병 병반 크기가 감소됨을 통하여 감귤역병 억제가 가능함을 확인하였다(강 등, 2010).

감귤검은점무늬병의 생물적 방제에 대해서 국내에서 연구가 진행되고 있으나, *in vivo*단계에서 미생물의 효과가 입증 되었을 뿐 실제농가에서의 실험은 진행되지 않은 상태이다. 따라서 본 연구에서는 *D. citri*에 의해 발병되는 검은점무늬병에 대해 선행연구를 통하여 항진균효과를 나타낸 식물근권세균을 전처리와 전-후처리 실험을 진행하여 생물적방제의 가능성을 확인하고, 실제 포장에서 효과가 있는 식물근권세균을 처리하였을 때 친환경 감귤 재배 농가의 포장에 적용할 수 있는 방안을 제시하고자 본 연구를 수행 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 감귤 식물체

감귤검은점무늬병의 실험을 수행하기 위해서 궁천조생(*Citrus unshiu*) 2년생 감귤나무 묘목을 산흙과 상토(뚝심이, 농우바이오)의 비율을 1:3으로 섞은 흙과 함께 화분(8호)에 옮겨 심었다. 그 위에 소나무 바크를 2~3cm 정도 흙이 보이지 않을 정도로 깔아서 잡초발생 방지 및 수분증발 방지를 하였다. 유리온실에서 6개월간 묘목이 잘 자는지 관찰하기 위해 적응기간을 두어 키운 뒤 식물배양실로 옮겨서 온도 25~27℃, 습도 50~70%의 환경을 주간과 야간이 똑같도록 조성하여 감귤나무의 새순이 빨리 나오도록 유도하였다. 여기서 나오는 새순 중에 3~4주 정도 성장한 가지를 선정하여 실험에 쓰일 잎 4~5개 정도만 남긴 후 가지의 아랫부분을 물 흡수가 잘 되도록 전정가위를 사용하여 사선으로 절단하였다. 절단한 부위를 0.5% 차아염소산나트륨 수용액에 1~2초 정도 담궈 표면소독을 하고, 멸균수에 1~2초 정도 세척한 뒤 멸균수가 채워진 100ml 플라스크에 절단한 부위가 잠기게 줄기를 꽂아 사용하였다.

2. 감귤검은점무늬병균 분리 및 접종평가

감귤검은점무늬병은 제주시 회천동에 있는 농장에서 검은점무늬병에 걸린 잎을 5~10개를 채집하였다. 잎의 감염부위를 메스로 약 0.5×0.5cm의 크기로 절단한 후 1% 차아염소산나트륨 수용액에서 30초간 1회 소독, 멸균수에서 1분간 3회 세척하였다. 세척된 조직을 다시 70% 에탄올에서 30초간 1회 소독, 멸균수에서 1분간 3회 세척한 후 필터페이퍼에 조직의 물기를 제거하여 1% water agar배지에 치상한 후 25℃ incubator에서 2일간 배양하였다. 1% water agar배지에 치상한 식물조직에서 나온 균사가 자라고 있는 agar를 떼서 Potato Dextrose Agar(PDA)배지에 치상하고 25℃ incubator에서 14일간 계대배양 하였다. PDA 배양된 감귤검

은점무늬병 균사를 Oatmeal agar(OA) 배지에 치상하여 25℃ incubator에서 14일간 계대배양하고 여기서 자란 균에 빛과 공기를 노출시킨 상태에서 25℃ incubator에서 7일간 배양하였다.

배양된 감귤검은점무늬병균을 식물체에 접종하기 위해서 감귤검은점무늬병균 포자 형성을 유도하였다. PDA배지에서 배양된 검은점무늬병 균사를 Cork borer (직경0.9mm)로 잘라 oatmeal배지에 치상하여 25℃에서 14일정도 배양한 후 배지내에 공기가 통하게 하되 검은점무늬병이 배양된 배지자체가 빨리 건조되지 않도록 oatmeal 배지를 감싼 Sealing tape에 구멍을 뚫고 25℃ incubator에서 7일간 빛과 공기를 노출시켰다.

감귤검은점무늬병 포자가 자란 배지에 10ml 멸균수를 넣고 loop로 포자를 수확한 후 miracloth (CALBIOCHEM) 1겹으로 현탁액을 걸러준 후 Hemacytometer를 이용하여 접종농도를 3.0×10^5 conidia/ml로 조정하였다. 접종액에 Tween20을 Total volume에 0.01%로 맞추어 섞은 후 앞에서 준비한 감귤 가지에 달린 잎의 앞면과 뒷면에 스프레이로 잎의 표면에 현탁액 물방울이 골고루 맺힐 수 있도록 분무하여 접종하였다.

접종한 식물체는 온도 28℃, 습도가 약 90%이상의 환경으로 설정된 dew chamber에서 24시간 동안 둔 후 식물체를 식물배양실에 위치한 25℃ 습도가 70~80%정도 되는 습실구에 옮겨 7일간 관찰하였다. 7일 후 감귤검은점무늬병 병징을 보이는 잎을 채취하여 육안으로 잎의 절반 부분에 해당하는 병반을 측정할 수치에 두 배로 적용하여 기록하였다.

3. 식물근권세균의 분리 및 선발

본 실험에서 사용된 근권세균은 2002~2010년까지 제주도내에 자생하는 1년생 초본식물의 뿌리에서 분리된 균으로 -80℃에서 보관되어있는 것을 배양하여 사용하였다. 식물근권세균의 분리방법은 식물 뿌리를 채집하여 뿌리에 묻은 흙을 흐르는 물에 조심스럽게 씻어내고 뿌리에 남은 물기를 제거한 뒤 70% ethanol로 소독한 가위로 총 1g의 뿌리를 채취하였다. 채취한 뿌리는 10ml 멸균수와 함께 지

름 120mm정도의 막자사발에 갈아서 miracloth(CALBIOCHEM) 한 겹으로 여과한 후 나온 현탁액 1ml을 채취하여 희석법을 이용하여 10^{-8} 까지 희석하였다. 희석액 중 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} 의 희석액에서 $100\mu\text{l}$ 를 취하여 Tryptic Soy Agar(TSA)배지 위에서 도말한 후 28°C 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 배양된 세균들 중 육안으로 모양 및 색깔이 다른 균주들을 선발하여 새로운 TSA배지에 도말하고 28°C 에서 48시간 동안 배양 후 수확하여 Tryptic Soy Broth에 20% glycerin이 담긴 1.5ml micro tube에 넣어 -80°C 에 보관하였다.

이와 같이 분리하여 보유하고 있는 약 300여개 중 감귤검은점무늬병에 효과적인 균인지를 확인하기 위하여 항진균 실험을 하였다. 방법은 PDA에서 14일간 배양한 *Diaporthe citri*와 선발된 식물근권세균을 보관균주에서 $100\mu\text{l}$ 를 뽑아 TSA에서 도말하여 2일간 배양한 균을 Cork borer(직경0.9mm)로 찍어 새 PDA배지에 중앙 일직선상 동일한 간격으로 치상하여 10일간 대치배양하였다. 10일간 배양 후 병원균 생장을 억제시키는 TRH423-3, MRL408-3, THJ609-3을 선발하여 실험에 이용하였다(김, 2011; 강, 2012).

4. 식물근권세균 식물체 처리 및 살균제 처리 실험

선발된 TRH423-3, MRL408-3, THJ609-3, TRH415-3를 TSA배지에 도말하여 2일간 28°C 배양기에서 배양하였다. 각각의 식물근권세균이 배양된 배지에 살균수 10ml를 넣고 loop를 이용하여 고르게 섞어 현탁액으로 만들었다. 현탁액 농도는 $1 \times 10^6 \text{cfu/ml}$ 로 조정된 후 계면활성제 역할을 하는 0.01% Tween20를 첨가하였다.

감귤가지의 수는 근권세균 별로 따로 3개씩 3반복으로 실험을 진행하였으며, 배양실에서 키우고 있는 묘목에서 약 21일 경과된 가지를 전정가위로 자른 부위에 0.5% 차아염소산나트륨수용액에 1~2초 처리후 멸균수로 1~2초 처리하여 멸균수가 있는 플라스크에 줄기가 잠기도록 꽂아 사용하였다. 배양실에서 채취한 감귤가지 하나에 달린 4~5개의 잎에 각각 다른 처리를 한 후 잎에 병 접종을 했을 때 잎에 나타나는 병반의 정도를 비교하기 위해 감귤 잎에 식물근권세균 현탁액을 골고루 처리하였으며, 다른 처리를 한 잎에 현탁액이 묻지 않도록 HP필름으로

만든 가리개로 다른 처리구의 잎을 가린 뒤 원하는 잎에만 식물근권세균을 살포하였다.

대부분의 농가에서는 살균제를 통한 감귤검은점무늬병을 방제하기 때문에 식물근권세균구와 비교를 하기 위해 비교살균제로는 시중에 판매되고 있는 Dithianon[®](정밀디치, 동부정밀화학, Dithianon 75%)을 사용하였고, 사용농도는 관행농도인 1g/l로 검은점무늬병 접종 전에 가리개로 다른 처리구는 가리고, 살균제 처리할 감귤 잎에만 골고루 살포하였다. 또한 대조구로서는 식물근권세균 현탁액 대신 살균수를 감귤 잎에 처리하였다.

검은점무늬병균을 접종하기 전에 식물근권세균 전처리구와 식물근권세균 전-후처리구에 식물근권세균 현탁액을 처리한 잎, 살균제 Dithianon[®]을 처리한 잎, 그리고 살균수를 처리한 잎을 포함한 감귤 새순 가지를 22~23℃ 상온에서 물기가 마를 때까지 건조시킨 후 감귤검은점무늬병균을 3.0×10^5 conidia/ml의 현탁액으로 만든 뒤 0.01% tween20을 넣고 감귤 잎 전체에 골고루 접종하였다. 접종후 Dew chamber에서 24시간 처리하고 상온에서 다시 건조시킨 뒤 다른 처리구에는 가리개로 보호하고 식물근권세균 현탁액을 식물근권세균 전-후처리구 잎에만 1.0×10^6 cfu/ml로 다시 처리하였다. 처리를 마친 식물체는 배양실에 있는 25℃, 70~80%의 환경으로 맞춰진 습실구에 7일간 두어 관찰하였다. 식물체에 검은점무늬병균을 접종한지 7일 경과된 잎을 떼어내어 약제 및 근권세균을 처리한 잎에 DW로 적신 솜을 잎의 앞면과 뒷면을 살짝 닦아낸 뒤 육안으로 잎 하나의 면적 중 반쪽면에 해당하는 병반수만 측정 후 곱하기 2하여 병반수를 기록하였다.

감귤검은점무늬병에 감염된 각 처리구당 병반수에 따른 분산분석 및 평균간 비교를 위해 SAS 프로그램을 이용하여 Duncan's test를 실시하였다.

5. 노지 포장 조건에서 검은점무늬병 방제 효과 검정

선발된 식물근권세균을 실제 포장에 적용했을 때 감귤검은점무늬병의 발병정도를 알아보기 위해 아열대 농업 연구소에서 관리하고 있는 서귀포시 토평동 2240-5번지에 위치한 과수원에서 2012년 5월 10일~7월 12일까지 식물근권세균

및 살균제 처리실험을 진행하였으며, 조사는 7월 24~25일에 시행하였다. 또한 관찰은 10월 4일, 11월 19일 두 차례 진행하였다. 식물근권세균 단일처리구에 TRH423-3, MRLA08-3, THJ609-3을 각각 3그룹에 1.0×10^6 cfu/ml의 농도로 5ℓ씩 5월 10일부터 처리하여 7일 간격으로 10회 처리하였으며, 식물근권세균 및 살균제의 교호살포 처리구에도 식물근권세균을 각 처리당 3그룹씩 위와 같은 농도로 5ℓ씩 살균제를 치는 날을 제외한 총 6회 처리하였으며, Dithianon을 관용농도 20g/20ℓ로 감귤 나무 3그룹당 5ℓ씩 5월 31일부터 처리하여 14일 간격으로 4회 처리하였다.

감귤검은점무늬병을 발생시키기 위하여 인위적으로 감귤검은점무늬병균을 7월 5일에 접종하였다. 접종원은 앞에서 설명한 방법과 동일하게 포자 형성을 유도하여 1.0×10^5 conidia/ml의 포자 현탁액을 만들었다. 포자 현탁액에 0.01% Tween20을 접종처리 전에 첨가한 후 각처리구에 해당되는 감귤 나무에 살포하여 접종하였다.

감귤검은점무늬병 살포 2주 후 각 처리 감귤나무 당 열매 100개 중 감귤열매 표면에 나타난 감귤검은점무늬병에 감염된 정도가 30%미만인 것을 미감염과로 하고, 30%이상 감염된 것을 병든 열매로 기준을 정하여 측정하였다.

6. 식물근권세균 동정

식물근권세균을 동정하기 위해 DNA추출후 PCR(polymerase chain reaction)로 증폭시켜 각 세균이 가지고 있는 염기서열 분석하는 동정 방법을 선택하였다. 그러기 위해서 DNA kit(DNeasy[®] Blood & Tissue Kit, Qiagen)에서 안내하고 있는 Gram positive bacterial DNA 추출방법으로 DNA를 분리하였다. 분리된 DNA에서 염기서열을 통한 동정을 위해 ITS-72F Primer(CCC GGT TTC CCC ATT CGG)와 ITS-38R Primer(TGC GGC TGG ATC TCC TT)각각 $0.5 \mu\text{l}$, $10 \times$ buffer $2 \mu\text{l}$, dNTP $2 \mu\text{l}$, Taq polymerase $0.5 \mu\text{l}$ 에 나머지 volume을 3DW로 $19 \mu\text{l}$ 를 채운 용액에 $1 \mu\text{l}$ total DNA를 넣고 PCR Thermal cycler Dice TP600(TaKaRa, Japan)을 사용하여 96°C 2분 1회 처리, 94°C 에서 30초, 55.9°C 에서 30초, 72°C 에서 30초 처리를 30회 반복 후 72°C 에서 2분간 1회 cycle을 처리하여 PCR(polymerase chain reaction)하였다.

위와 같이 증폭된 DNA를 2% agarose gel에 50v에서 60분간 전기영동하여 나온 DNA 밴드를 Elution kit (NucleoSpin[®] Extract II, MN, Germany)를 이용하여 DNA를 정제하였다. 이렇게 정제 및 추출된 식물근권세균의 DNA를 제주대학교 공동실험실습관에 Sequence를 의뢰하였고, Sequence된 염기서열을 NCBI(National Center for Biotechnology Information)사이트에서 분석하여 동정하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 식물근권세균의 식물체 처리 효과

선발된 식물근권세균인 TRH423-3, MRL408-3, THJ609-3을 현탁액으로 만들어 실내에서 절단된 감귤가지의 잎에 처리하고 물기를 자연건조 시킨 후 감귤검은점무늬병을 접종하였을 때, 길항균을 무처리한 잎에서 보다 병 발생에 대한 억제에 효과는 있었다. 다만, 습도 및 온도 등이 감귤검은점무늬병에 감염되기 좋은 환경이고, 식물근권세균을 처리하더라도 감귤검은점무늬병 감염에 의해 잎에 갈변화 및 낙엽 등의 현상은 무처리와 비슷하게 나타났으며 살균제를 처리한 잎 보다 병반이 발생이 다소 높게 나타났다.

2. 실내 조건에서 검은점무늬병 방제 효과 검정

대부분 미생물 제제가 예방을 목적으로 병 발생 전에 살포하기 때문에 이와 동일한 실험을 위하여 식물근권세균을 감귤검은점무늬병 접종 전처리와 전-후처리, 대조약제인 Dithianon[®], 살균수 처리 등 각 잎당 처리구를 하나씩 지정하여 처리한 잎에 감귤검은점무늬병균 (*D. citri*)을 접종하여 7일 후에 관찰하였다. 살균수가 처리된 잎의 경우 대부분 잎자루 부분이 갈변화 되어 잎 부분과 같이 떨어졌으며, 잎이 떨어지지 않은 경우라도 많이 시듦 증상이 나타났다. 잎의 앞면에는 갈색 혹은 검은점의 병반이 여러 개가 모여 불규칙한 선 또는 타원 비슷한 모양을 이루고 있으며 더 심한 경우 거의 갈변화가 진행된 상태에서 병반이 많이 형성되었다. 잎의 뒷면의 경우 기공 또는 그 주변조직에서 갈색점에 노란윤환 무늬가 희미하게 보였다. 병이 더 진전된 경우에는 2차감염으로 인해 병반주위에 갈변화가 진행되면서 병반이 보이지 않는 경우도 나타났다. 잎에 나타난 병반수를 육안으로 측정한 결과 평균 1521 ± 1397.2 개의 병반수가 측정되었다(Fig. 1A와

Table 1).

반면 대조약제인 Dithianon[®]을 처리한 잎은 시듦 증상이 없었으며 약제를 씻어내어 관찰하였을 때 잎의 앞면에는 병반 주위에 노란 윤환무늬가 없었고, 갈색점 병반이 나타났으나 다른 처리구에 비해 병반수가 적었다. 잎의 뒷면의 경우 잎의 앞면보다 많은 병반이 보였는데 대체적으로 갈색점의 병반이 보였고, 병이 완전히 진전된 경우 병반주위로 약간의 갈변화가 진행되어 있었는데 무처리보다는 적은 수로 발생되었다. 육안으로 병반수를 측정한 결과 평균 86.7±103.5개가 측정되었으며, 살균수 처리에 비해 94%의 병반수가 감소되었다(Fig. 1B와 Table 1).

TRH423-3을 전처리한 잎은 무처리된 잎보다는 시듦 증상이 적었으며, 잎의 앞면에는 갈색점무늬의 병반 주위에 노란 윤환무늬가 띠었다. 잎의 뒷면에는 잎의 앞면보다 많은 병반이 관찰되었는데 연한 갈색점무늬의 병반이 여러 개가 모여 나타났으며 병반의 크기는 다른 근권세균처리구보다 다소 크게 형성되었다. 간혹 좀 더 병이 진전된 경우 짙은 갈색점무늬의 병반이 보이거나 갈변화가 진행되었다. 잎에 나타난 병반의 수를 육안으로 측정한 결과 399.3±240.0개가 측정되었으며 무처리한 잎에서의 병반수와 비교하였을 때 약 73%의 병반수가 감소되었다(Fig. 1C와 Table 1). THJ609-3을 전처리한 잎의 경우 연한 갈색점무늬의 병반이 발생하였고 병반 크기가 다른 근권세균보다 작았다. 병반 주위에는 노란윤환무늬가 희미하게 나타났으며 갈변화된 증상도 있었으나 그 수는 드물었다. 또한 385.1±404.4개로 TRH423-3보다는 병반수가 약간 적었지만 비슷하게 병반수가 측정되었고, 무처리에 비해 약 74%정도 병반수가 감소되었다(Fig. 1E와 Table 1). MRL408-3을 전처리한 잎의 앞면에는 병반이 갈색점 병반이 많이 발생되었고, 병반주위에 갈변화 증상보다는 노란 윤환무늬를 띠는 증상이 많았다. 잎의 뒷면에는 다른 근권세균처리와는 달리 검은색병반이 많이 나타나고 병반 주위에 약간의 갈변화는 보였다(Fig. 1D). 육안으로 병반수를 측정한 결과 1056.0±658.3개로 TRH423-3, THJ609-3에 비해 가장 많은 병반수가 측정되었으나 무처리에 비해서는 약 30%정도 병반수가 감소되었다(Table 1).

식물근권세균 전처리와 마찬가지로 방법으로 전-후처리한 잎에도 전처리와 마찬가지로 식물근권세균 현탁액을 먼저 처리하고 *D. citri*를 접종한지 24시간 후

다시 동일한 농도로 다시 식물근권세균을 처리한 지 7일 후 관찰한 결과, 병반수는 전처리보다는 다소 줄어들었으며, 병반주위로 노란색의 윤환무늬가 나타나는 것은 전처리와 동일하게 나타났다. TRH423-3을 전-후처리한 잎의 경우 잎의 시듦정도는 전처리와 비슷하였고, 잎의 앞면의 경우 표면에 병반이 발생하지 않은 부위에서 하얀 물질이 기공과 주변조직에 대부분 덮여있었으며 뒷면에도 마찬가지로 하얀 물질이 존재하였다. 잎의 뒷면에는 앞면과 달리 병반이 다소 크고 주황빛을 띠었으며 병반이 있는 부분에서는 약간 옅은 갈색으로 갈변화 되었다.(Fig. 2C). MRL408-3을 전-후처리한 잎의 앞면에는 검은색의 병반이 다소 나타났다으며 노란윤환무늬도 눈에 띄게 줄어들었다, 잎의 뒷면도 마찬가지로 짙은 흑갈색의 병반이 나타났지만 그 수가 전처리보다는 적었으며 병반의 크기는 TRH423-3보다 크기가 작았다. (Fig. 2D). THJ609-3을 전-후처리한 잎의 경우 잎의 앞면의 경우 검은색의 점무늬 병반이 전처리보다는 다소 적게 발생하였다. 잎의 뒷면에는 병반수가 전처리한 잎의 병반수보다는 적게 발생하였고 병반의 크기는 전처리한 잎의 병반과 비슷하였다. 전처리보다는 병반이 약간 짙은 갈색을 나타냈으며 병반주위로 노란윤환무늬가 나타났다(Fig. 2E). TRH423-3, THJ609-3, MRL408-3을 전-후 처리한 잎에 나타난 병반수를 육안으로 측정한 결과 전처리에 비해 각각 282.9 ± 214.4 , 359.3 ± 248.9 , 280.7 ± 288.5 개의 병반이 나타났다. 또한 살균수 살포처리한 잎과 비교해 보았을 때 70~80%의 병반 감소를 나타냈으며, 전처리한 병반수와 비교했을 때에는 TRH423-3과 THJ609-3은 20%, 27%정도로 비슷하게 병반수가 감소된 반면, MRL408-3은 65%의 병반감소를 나타냈다. (Table 1)

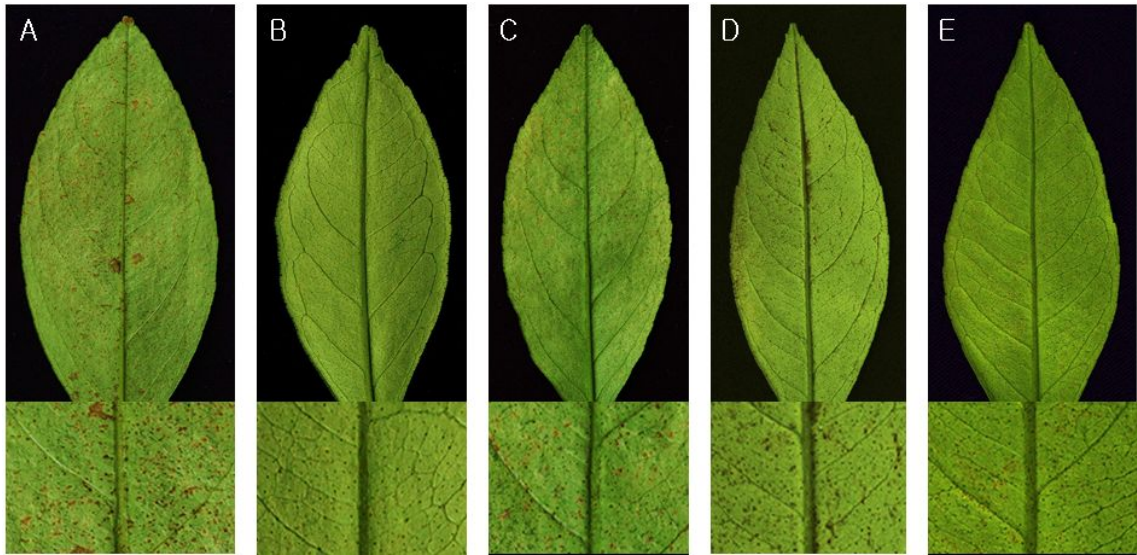


Fig. 1 Photographs of citrus leaves at 7 days after inoculated with *Diaporthe citri*(A), pre-treated Dithianon[®](B), pre-treated TRH 423-3(C), pre-treated MRL 408-3(D), pre-treated THJ 609-3(E). The concentration of *D. citri*, the rhizobacteria and the fungicide were 3.0×10^5 conidia/ml, 1.0×10^6 cfu/ml and 1g/L, respectively.

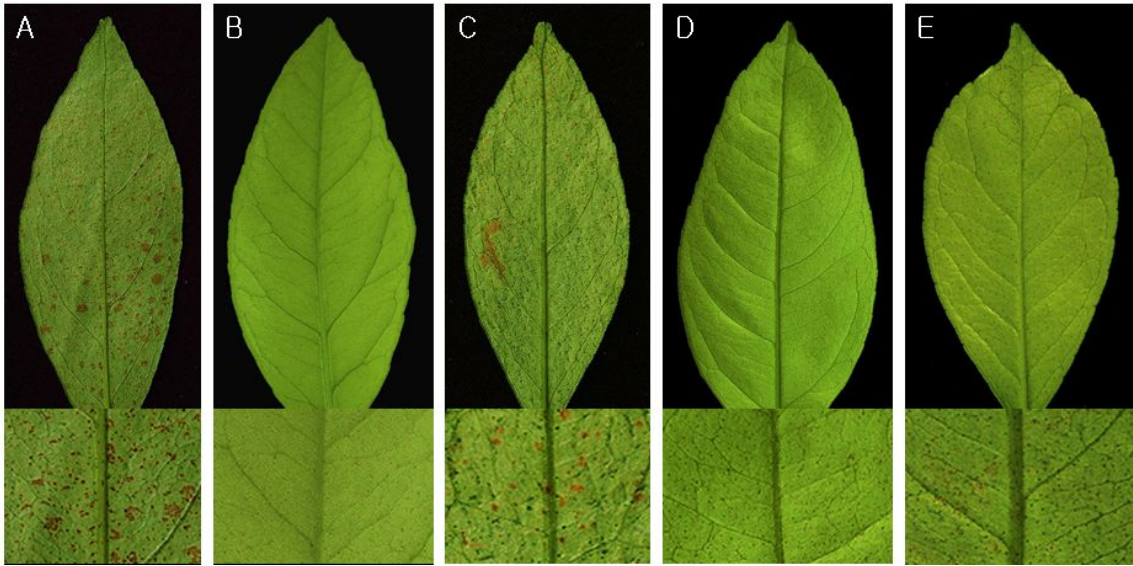


Fig. 2. Photographs of citrus leaves at 7 days after inoculated with *Diaporthe citri*(A), pre-treated Dithianon[®](B), pre and post treated TRH423-3(C), pre and post treated MRL 408-3(D), pre and post-treated THJ 609-3(E). The concentration of *D. citri*, the rhizobacteria and the fungicide were 3.0×10^5 conidia/ml, 1.0×10^6 cfu/ml and 1g/L, respectively.

Table 1. Number of lesions on citrus leaves inoculated with *Diaporthe citri* after pre and pre-post treatment with the selected rhizobacterial strains.

Treatment ^a	Number of lesions ^b	Duncan's test ^c
Control	1521.8 ± 1397.2	a
TRH423-3 pre	399.3 ± 240.0	bc
MRL408-3 pre	1056.0 ± 658.3	ba
THJ609-3 pre	385.1 ± 404.4	bc
TRH423-3 pre-post	282.9 ± 214.4	b
MRL408-3 pre-post	359.3 ± 248.9	b
THJ609-3 pre-post	280.7 ± 288.5	b
Dithianon [®]	86.7 ± 103.5	c

^a The concentration of *Diaporthe citri*, the rhizpbacteria and the fungicide were 3.0×10^5 conidia/ml, 1.0×10^6 cfu/ml and 1g/L, respectively.

^b Values represent mean ± standard deviation of three separated experiments.

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

3. 노지 포장에서의 식물근권세균의 감귤검은점무늬병 억제 효과

무처리, 식물근권세균 처리, 살균제 처리 또는 식물근권세균과 살균제를 번갈아 처리한 감귤나무에 1.0×10^5 conidia/ml의 *Diaporthe. citri*를 접종하여 발생한 검은점무늬병의 이병과를 조사하여 비교하였다. 접종한지 14일 경과된 초기 녹색 과실인 경우 대체적으로 갈색내지 검은색의 점무늬의 병반이 표피에 나타났으나 가까이서 보지 않는 한 감염정도가 명확하지 않았다. 과실이 노랗게 익어갈 때 검은점 병반의 감염정도가 제대로 보이게 되는데, 표피에 경우 흑점형으로 골고루 분포되어 발생하였으며 병반의 경우 검은색 및 붉은 갈색을 나타내며, 감염정도가 심할 경우 열매표피에 흑점이 과다하게 발생되었다. 과실이 숙성됨에 따라 흑점병반에 돌기가 생기거나 병반이 떨어진 직후 생긴 회색의 돌기부분만 골표피에 남아있기도 한다(Fig. 3).

감귤나무에서 감귤검은점무늬병에 감염된 과실의 경우 다소 붉은 빛을 띤 검은점의 병반이 많이 밀집되어 분포되었으며 좀 더 진전이 되면 검은점 병반에 돌기가 많이 생겼으며 다른 처리구보다 많이 형성되었다(Fig. 3A). 간혹 병반이 함몰되어 골껍질의 안쪽조직이 드러나기도 하였다. 육안으로 감귤검은점무늬병에 감염된 정도가 30%이상인 열매를 나무당 100개씩 조사한 결과 전체 조사된 열매 중 $94.4 \pm 4.9\%$ 가 검은점무늬병에 감염되었다(Table 3).

식물근권세균을 1×10^6 cfu/ml의 농도로 처리한 나무에서의 열매에 나타난 감귤검은점무늬병의 병반은 육안으로 관찰했을 때 병반형태는 마찬가지로 흑점형이었으며 TRH423-3을 처리한 열매의 경우 검붉은 병반이 다소 많았으며, MRL408-3과 THJ609-3에서는 검은점무늬병에 걸린 열매의 병반 더 검은 병반을 나타냈다. 과피에는 돌기가 많이 형성되는데, MRL408-3에서는 병반이 떨어져 나간 자리에 회색의 돌기가 많았고(Fig. 3D), TRH423-3과 THJ609-3에는 돌기에 병반이 붙어 있는 것이 많았다(Fig. 3C,E). 감귤검은점무늬병에 감염된 나무와 TRH423-3, MRL408-3, THJ609-3을 처리한 나무에서 감귤검은점무늬병에 감염된 열매에 대한 감염율을 비교했을 때 각각 $77.2\% \pm 9.3$, $71.8\% \pm 5.8$, $72.2\% \pm 11.8$ 으로 나타났으며, 방제가 또한 18.2%, 23.9%, 23.5%으로 나타났다(Table 3).

대조약제인 Dithianon[®]을 처리한 나무에서의 열매에서는 감귤검은점무늬병에

걸리지 않은 것들이 대부분이고 간혹 걸리더라도 10%미만으로 걸린 열매들이 많았다. 열매에서의 병반 형태는 흑점형이며, 검은색을 띠고 있고 무처리나 식물근권세균에서 많이 볼수 있는 돌기가 많이 발생하지 않았다(Fig. 3B). 병반수는 무처리나 식물근권세균을 처리한 열매보다 적었다. Dithianon[®]을 처리한 나무에서 30%이상 감귤검은점무늬병에 감염된 열매수를 나무당 100개씩 조사한 결과 검은점무늬병 감염율은 5.5%±4.1정도이며 무처리군과 비교했을 때 94.2%의 방제가를 나타냈다(Table 3).

4. 포장에서 식물근권세균과 농약의 교호 살포에 의한 감귤검은점무늬병 억제

식물근권세균과 Dithianon[®]의 교호살포처리는 식물근권세균을 5월 10일부터 처리를 시작으로 6회, Dithianon[®]은 5월 31일 처리를 시작으로 14일마다 4회씩 각각 번갈아 처리한 나무에서 감염된 과실의 경우 대부분 Dithianon[®]을 처리한 나무처럼 병반이 많이 생기지 않았으며, 거의 검은색 병반에 흑점형으로 발생하며 회색돌기가 있는 병반이 식물근권세균 단독처리보다는 적게 발생하였다. TRH423-3 및 THJ609-3과 Dithianon을 번갈아 살포한 열매에서는 돌기를 가진 검은 병반이 많은 반면, MRL408-3과 Dithianon을 번갈아 살포한 열매에서는 병반이 떨어져 나간 회색 돌기가 많이 보였다(Fig. 3F, G, H). 식물근권세균과 Dithianon을 처리한 나무에서의 열매와 감귤검은점무늬병에 감염된 나무에서의 열매에서 감귤검은점무늬병에 30%이상 감염된 열매수를 측정한 결과 감염된 과실이 눈에 띄게 감소하였다. TRH423-3, MRL408-3, THJ609-3을 각각 Dithianon과 번갈아 처리한 열매에서 감귤검은점무늬병의 감염도는 9.7±10.2, 5.7±3.6, 3.4±3.0으로 나타났다. 방제가는 각각 89.7%, 94%, 96.4%로 식물근권세균을 단독으로 처리했을 때 보다도 방제가가 높게 나타났으며(Table 3), Dithianon[®]과 비교하였을 때에는 감염된 열매수가 거의 비슷비슷한 수준으로 나타났다.



Fig. 3 Photograph of citrus fruit infected *Diaporthe citri* at the treated alone rhizobacterial and mixture Dithianon[®]. Control(A), Dithianon[®](B), TRH423-3(C), MRL408-3(D), THJ609-3(E), TRH423-3 mixture Dithianon[®](F), MRL408-3 mixture Dithianon[®](G), THJ609-3 mixture Dithianon[®](H). The concentration of the rhizobacteria were 1.0×10^6 cfu/ml treated 10 times with 7 days and 6 time with 7days interval. And *D. citri*, the fungicide were 3.0×10^5 conidia/ml and 1g/L, respectively.

Table 2. Disease severity on the citrus trees of non treated control, inoculated with the selected rhizobacterial strains, bacterial strain and fungicide and treated with commercial fungicide (Dithianon[®]) in the orchard.

Treatment	Disease severity(%) ^a	Control value(%) ^b	Duncan' s test ^c
Control	94.4 ± 4.9	-	a
MRL408-3	71.8 ± 5.8	23.9	b
TRH423-3	77.2 ± 9.3	18.2	b
THJ609-3	72.2 ± 11.8	23.5	b
MRL408-3+Dithianon	5.7 ± 3.6	94.0	c
TRH423-3+Dithianon	9.7 ± 10.2	89.7	c
THJ609-3+Dithianon	3.4 ± 3.0	96.4	c
Dithianon [®]	5.5 ± 4.1	94.2	c

^a Disease severity (%) = (Number of infection fruit/Total fruit)×100

^b Control value (%) = [1-(disease severity of treatment/disease severity of non-treatment)]×100

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

6. rDNA 염기서열 분석에 의한 식물근권세균 동정

감귤검은점무늬병 억제에 효과가 있는 TRH423-3, MRL408-3, THJ609-3에서 추출한 Total DNA를 16s-23s ITS 38R, 72F primer로 PCR하여 전기영동을 한 결과 TRH423-3과 MRL408-3은 700bp에서 밴드가 나타났으며, THJ609-3은 350bp에서 밴드가 나타났다. 그리고 PCR한 DNA를 sequence과정 거쳐 sequence scanner v1.0 프로그램을 통해 분석된 DNA염기서열을 NCBI gene bank의 등록된 균주들과 비교하기 위해 blast 프로그램을 통하여 동정한 결과, TRH423-3(NCBI NO. EF522070.1)과 MRL408-3(NCBI NO. EF552064.1)은 *Burkholderia gladioli*로 동정되었으며, THJ609-3(NCBI NO. CP000949.1)은 *Pseudomonas putida*로 동정되었다.

IV. 고 찰

최근 친환경 농산품에 대한 관심이 높아지면서 농약 사용을 최소한으로 줄이면서 식물병을 방제할 수 있는 수단에 대한 필요성이 대두되고 있다. 그 중 한 가지 수단으로 식물근권세균을 이용한 식물병 방제에 관한 연구가 최근 수십 년 동안 진행되고 있으며(Kim 등, 2004; David, 1988), 대부분 식물병 방제 효과가 있는 식물근권세균 중 일부가 농업용 상품으로 시판하고 있다.(Kloepper 등, 2004). 감귤산업에서도 친환경 농업의 도입으로 감귤병에 대해서도 생물적 방제에 대한 인식이 중요해졌으며, 이에 대하여 생물적 방제로 미생물을 이용한 연구가 조금씩 보고되고 있다. 감귤병 중 저장병균인 *penicillium digitatum*을 길항내생균을 이용한 방제를 하였으며(이 등, 2012), *Diaporthe citri*에 대해서도 *Bacillus* 계통의 토양미생물을 이용한 방제에 대해서도 보고된 바 있다(남 등, 2009).

본 연구인 *Diaporthe citri*에 의해 발생하는 감귤검은점무늬병의 발생억제 실험에 이용된 TRH423-3, MRL408-3, THJ609-3은 이미 *Elsinoe fawcettii*인 감귤더랭이병균과 *Xanthomonas axonopodis*인 감귤퀘양병균에 대한 *in vitro* 실험에서 항진균 효과가 보고된 균주들로 알려져 있다(김, 2011; 강, 2012). 이들 균주들을 이용한 실내실험으로 수행한 식물체 내에 여러 처리구의 병 발생 비교를 위해 가지에 달린 잎 하나당 처리구를 달리하여 근권세균의 전처리 및 전-후처리를 한 뒤 감귤검은점무늬병을 접종하여 병반 발생 억제효과를 비교한 결과 근권세균 전처리 및 전-후처리한 잎에서 병반 발생을 억제하는데 효과적인 것으로 나타났다. 근권세균 전처리의 경우 무처리한 감귤 잎에 비해 TRH423-3를 처리한 감귤 잎에서는 약 73%, THJ609-3을 처리한 감귤 잎에는 74%로 비슷하게 병반감소를 보인 반면 MRL408-3을 처리한 잎에서는 30%의 낮은 병반감소를 나타냈다(Table 1). 반면 근권세균을 전-후처리한 잎에서는 전처리한 잎에서 보다 병반 발생억제 효과를 더 높게 나타냈으며(Table 2), 아마도 근권세균을 전-후처리로 추가 처리하였을 때 잎에 처리한 검은점무늬병균보다 근권세균개체의 점유율이 높아져서 병을 억제하는 것으로 보여진다. TRH423-3과 THJ609-3을 전-후처

리한 감귤 앞에서 병반 발생을 억제하였으며 전처리와 비교하였을 때는 각각 20%, 27%의 병반 감소를 보인 반면 MRL408-3을 전-후처리한 감귤 앞에서는 전처리에 비해 65%정도의 병반 감소를 보여 다른 근권세균에 비해 크게 병반 발생을 억제하는 것으로 나타났다. 시중에 시판중인 대조약제로 쓰인 Dithianon[®]은 94%의 병반감소를 하는 것으로 나타났다(Table 2). 따라서 선발된 식물근권세균을 1회 이상 처리하였을 때 병 억제 효과는 균주에 따라 차이가 있었지만 감귤 앞에 검은점무늬병이 억제되었으며, 살균제 처리를 통한 병 억제효과보다는 떨어지지만 어느정도 억제효과를 나타냈다. 실제로 다른 기주-병원균 상호 작용에서도 식물근권세균에 의한 병 방제 효과는 화학적 농약에 비해 일반적으로 떨어지는 것으로 보여진다. 감귤 역병에 효과있는 근권세균으로 선발된 *Burkholderia gladioli* (TRH423-3), *Bacillus circulans* (BRH433-2), *Bacillus cereus* (KRY505-3)균주를 살균제를 각각 처리한 후 *Phytophthora citrophthora*를 접종하였을 때 살균제를 처리한 열매에서 병반의 크기가 근권세균을 처리한 열매의 병반보다 더 많이 억제되었다고 하였으며(강 과 전, 2010), 감자 역병의 경우에도 효과있는 근권세균으로 선발된 *Pseudomonas putida*(TRL2-3), *Micrococcus luteus*(TRK2-2), *Flexibacteraceae bacterium*(MRL412)균주와 살균제를 각각 처리한 후 *P. infestans*를 접종하였을 때 근권세균처리에 비해 살균제처리한 감자 식물체에서 병방제 효과가 높았다고 하였다(김 과 전, 2006). 또한 감귤 더듬이병에서는 효과있는 근권세균으로 선발된 *Burkholderia gladioli* (TRH423-3, MRL408-3), *Pseudomonas putida* (THJ609-3)균주와 살균제를 선처리한 후 *Elsinoe fawcettii*를 접종한 실험과 근권세균과 살균제에 *Elsinoe fawcettii*를 혼합처리한 실험에서 근권세균과 살균제 간의 방제효과는 비슷하게 나왔지만 살균제의 방제효과가 좀 더 높았다고 하였으며(김 등, 2011), 오이 흰가루병을 일으키는 *Sphaerotheca fusca*에 *B. subtilis* KB-401균주를 미생물제로 제형화시켜 처리한 결과 살균제를 처리한 오이 앞에서 나타난 방제가가 미생물을 처리한 것보다 좀 더 높았다고 보고되었다(남 등, 2010).

실내실험에서 감귤검은점무늬병 억제에 효과가 있는 TRH423-3, MRL408-3, THJ609-3 균주를 가지고 실제포장에서 근권세균 단독 처리, 근권세균과 살균제의 교호살포 처리, 살균제 단독처리구, 무처리구로 나눠 처리하였다. 그 후 인위

적으로 감귤검은점무늬병을 집중하여 처리구간의 열매의 방제가를 비교하였다. 그 결과 식물근권세균을 단독처리한 경우 무처리에 비해 약 20%내외의 낮은 방제가를 나타남에 따라 효과는 있지만 무처리와 크게 차이가 나지 않는 것으로 나타났다(Table 3). 식물근권세균을 단독처리한 방제가가 실내실험을 통해 얻어진 방제가와 같은 효과를 내지 못한 이유에 대해서는 정확하게 알 수가 없지만 검은점무늬병을 집중 전 시기가 장마기였기 때문에 비가 많이 내려 습한 환경에서 검은점무늬병을 집중하였기 때문에 병의 발생이 더 심화되어 식물근권세균의 효과가 저하되었을 것으로 생각된다. 식물근권세균과 살균제의 교호살포 처리 및 살균제 단독 처리한 열매의 방제가를 비교한 결과 무처리에 비해 각각 약 90%, 94%의 높은 방제가를 나타냈지만 두 처리구간의 방제가는 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 따라서 식물근권세균을 단독 처리한 것보다 살균제와 교호살포하거나 살균제를 단독 처리를 했을 때 방제효과가 높게 나타났으며, 식물근권세균과 살균제를 교호살포 시 살균제의 방제 효과가 높았기 때문에 식물근권세균에 의한 효과 나타나지 않았거나 적었던 것으로 생각된다. 물론 식물근권세균 단독처리에 의한 방제가가 살균제 처리에 의한 방제가가 보다는 크게 미치지 못하지만 검은점무늬병을 억제하는 효과는 균주별로 비슷하게 나타났다(Table 3). 미생물과 살균제 교호살포 처리를 비교한 다른 연구에서의 경우, *Alternaria panax*에 의한 인삼검은점무늬병에 효과좋은 BS QS713미생물제제와 살균제를 대전과 무주 두 군데서 14일 간격으로 교호살포한 결과 환경에 따라 방제가는 달리 나왔지만 미생물제제를 단독으로 처리했을 때 보다 방제가가 높았으며 살균제와도 비슷한 방제가를 나타냈음을 보고하였다(이 등, 2008). 또한 *Pythium spp.* 균에 의해 발생하는 잔디 피시움마름병에 효과있는 *B. subtilis* GB-0365균주를 화학농약과 교호살포하였을 때 미생물처리보다 방제효과가 높게 나타났음을 보고하였다(정 등 2006).

미생물 동정방법으로는 미생물에서 분리된 DNA의 염기서열을 분석하여 동정한 분자생물학적 방법 (Ausubel 등, 1987)을 이용하였으며, 최근에 개발되어 널리 이용되고 있는 DNA kit를 이용하여 식물근권세균에서 DNA를 분리한 뒤 ITS primer로 특정유전자를 증폭시켜 16S rDNA의 염기서열이 분석된 data를 가지고 Gene Bank에서 등록된 균주의 염기서열과 유사도를 비교하여 동정하는

방법이 사용하였다.(Joo 등, 2002) 그 결과 TRH423-3, MRL408-3은 700bp에서 증폭되었으며 동정 결과 *Burkholderia gladioli* 로 동정되었다. *Burkholderia* 계통은 생물적방제와 생물적환경정화 및 식물성장촉진 목적으로 이용되어져 왔으며(Coenye, 2003년), 생강 부패병인 *Trichoderma spp* 에 대하여 억제력을 하는 것으로도 알려져 있다(Shanmugam 등 2012). 특히 *Burkholderia gladioli*는 후추, 토마토, 멜론 등의 모잘록병인 *Pythium ultimum*을 억제하는 것으로 나타났다(Bae 등, 2003), 또한 THJ609-3은 320bp에서 증폭되었으며 *Pseudomonas putida* 로 동정되었다. *Pseudomonas sp*의 경우 콩 탄저병 및 고추탄저병 억제에 효과적이었다(오 등, 2003; 전 등, 2010), *Pseudomonas spp*는 토마토케양병방제에 효과적이라고 알려져 있다(이 등, 2012), *Pseudomonas capacia*는 딸기 눈마름병에(신 등, 1994), *Pseudomonas burkholderia*는 딸기 시들음병에 효과적으로 알려져 있다(문 등, 1990). THJ609-3에서 동정된 *Pseudomonas putida*는 오이의 오이 시들음병인 *Fusarium wilt*. 및 토마토 풋마름병, 포도갯빛곰팡이병에 대해 억제효과가 증명되었다(박 등, 1988; 서 등, 2006; 서 등, 2008).

본 연구의 결과를 종합해 볼 때 선발된 식물근권세균을 이용한 *in vivo*실험에서 감귤 잎에서의 검은점무늬병의 억제효과는 좋았으나 실제 포장에 적용하였을 때는 병 방제에는 크게 못 미쳤다. 대신 식물근권세균을 살균제와 교호살포했을 때 검은점무늬병의 억제효과가 살균제 단독 처리했을 때와 비슷하게 나타났다. 따라서 관행농가에서도 근권세균과 살균제의 교호살포를 적용하기 위해 식물근권처리와 살균제 처리 횟수에 대한 추가 실험을 한다면 검은점무늬병의 방제시 살균제의 살포횟수를 줄이는 방안이 될 것으로 보인다. 친환경 농가에서도 병해충 방제로 친환경자재로 많이 이용되고 있는 구리제와 기계유유제를 혼합하여 사용하고 있는데, 여기에 식물근권세균과 같이 교호살포를 적용하여 살포한다면 효과적으로 검은점무늬병 방제를 할 수 있을 것으로 생각된다.

V. 적 요

감귤검은점무늬병은 제주도의 감귤 재배에 있어서 감귤 과실에 피해를 주는 중요한 병으로 알려져 있다. 감귤검은점무늬병은 대부분 화학농약 살포에 의해 방제되며, 농약사용 횟수의 증가로 인해 약제저항성 및 환경파괴의 원인이 되고 있다. 최근 감귤산업에서 농약을 대신할 수 있는 미생물을 이용한 생물적 방제를 포함하는 친환경 농업을 요구하고 있다. 본 연구에서는 감귤검은점무늬병을 일으키는 *Diaporthe citri* 에 대하여 항진균 효과를 가지는 TRH423-3, MRL408-3, THJ609-3 등 3개의 근권세균을 선발하였다. 선발된 근권세균의 감귤검은점무늬병에 대한 방제 효과를 알아보기 위하여 근권세균을 감귤 잎에 전처리한 다음 검은점무늬병균을 접종하였다. 그 결과 선발된 근권세균의 모든 전처리에서 방제 수준에서 병 억제효과를 나타냈으며 근권세균 균주 마다 다르게 나타났다. 또한 병원균을 접종한 후에 근권세균을 추가적으로 처리한 모든 균주에서 병 방제 비율이 높아졌다. 실제 감귤 과원에서 감귤검은점무늬병의 발병 정도는 선발된 근권세균들에 경우 20%정도 병 억제가 되었으며, 그에 비해 대조 농약인 Dithianon[®]에 의해 94%정도 병 억제가 되었다. 식물근권세균과 살균제를 교호 처리 한 경우 근권세균의 방제 효과보다는 살균제에 의한 것으로 보여진다. 한편, 식물근권세균에서 추출된 rDNA의 Internal Transcript Space(ITS)를 분석하여 동정한 결과 TRH423-3과 MRL408-3은 *Burkholderia gladioli*로 동정되었으며, THJ609-3은 *Pseudomonas putida*로 동정되었다. 이와같이 선발된 근권세균 들은 농약 적용이 제한된 친환경 감귤 농가에서 유용하게 쓰일 것으로 보여진다.

VI. 참 고 문 헌

- 헌재욱, 박재호, 김광식, 박경진, 윤수현. 대학나무, 감귤이야기 - 감귤 산업의 르네상스를 꿈꾸며. 2011. 제42호 p.1~20.
- 유화영, 이영희, 조원대, 김완규, 명인식, 진경식. 1993. 과수병해 원색도감. 농촌진흥청 농업기술연구소. 286pp.
- 헌재욱, 이성찬, 김광식. 2002. 감귤병해의 진단과 방제. p.14-92, 감귤병해충의 진단과 방제, 농촌진흥청 제주농업시험장, 제주감귤농업협동조합.
- 헌재욱, 김동환, 김광식, 이성찬, 고상욱, 임한철. 2004. 최근 부지화 감귤품종에 발생하는 식물병의 종류 및 그 증상. 식물병연구. 10(2) : 94-99.
- 허길현, 박서기. 2005. 전남지역 유자과원의 검은점무늬병균 포자 형성과 비산. 식물병연구. 11(1) : 16-20.
- 고영진, 서정규, 이태선, 송장훈, 권혁모, 문덕영, 문두길, 한해룡. 1998. RAPD 및 억제저항성을 이용한 감귤 검은점무늬병균의 유전적 다양성 분석. 한국식물병리학회 14(2) : 171-176.
- 헌재욱, 고상욱, 김동환, 한승갑, 김광식, 권혁모, 임한철. 2005. 친환경적 감귤 병 방제를 위한 구리제의 효율적 사용. 식물병연구 11(2) : 115-121.
- 이상열, 송홍규. 2010. 근권세균 분리균주의 식물생장촉진능. Journal of the Environment vol. 7. No. 1 : 33-37.
- 박경석. 2011. 미생물농약의 개발현황과 바실러스 미생물의 중요성. KIC News, Vol.14(4) : 1-11.
- 김경희, 임명택, 허재선, 염규진, 고영진. 2008. 미생물제제를 이용한 차나무 겹등근무늬병의 방제. 식물병연구 14(1) : 37-42
- 李翔國, 한진수, 金玄吉, 尹大鵬, 최재을. 2008. 미생물제제와 살균제에 의한 인삼점무늬병 방제. 식물병연구 14(2) : 102-106
- 남명훈, 최재필, 김형조, 이재준, 임근환, 김영권, 김홍태, 전용철. 2010. 오이 흰가루병에 대한 *Bacillus subtilis* KB-401의 방제 효과. 농약과학회지 vol. 14. No. 1pp. 49-53.

- 주길재, 김진호, 강상재. 2002. 채소류 모잘록병균에 길항하는 *Bacillus ehimensis* YJ-37의 선발과 항진균성. Korean Journal of Life Science Vol. 12. No. 2. 200-207.
- 남기웅, 박경석, 김충희, 2001. 양액재배에 있어 식물근권세균 *Bacillus amyloliquifaciens* EXTN-1에 의한 토마토폏마름병의 생물학적 방제. 원예과 학기술지 vol. 19. No. 1. 84-84.
- 박진우, 고민정, 김택수, 이세원, 이상엽, 박경석. 2012. 미생물제제 처리에 의한 딸기 생육촉진 및 병 방제효과. 한국농약과학회지 P. 164
- 이지현, 서문원, 김흥기. 2012. 감귤저장병 병원균 *Penicillium digitatum* 방제를 위한 길항내생세균 *Bacillus velezensis* CB3의 분리 및 특성규명. 한국균학회지. 40(2) : 118-123.
- 강소영, 전용철. 2010. 식물근권에서 분리한 세균을 처리한 감귤열매에서 감귤 역병 억제 효과. 식물병연구. 16(1) : 35-40.
- 김소연. 2011. 식물근권세균에 의한 감귤 더덩이병 억제에 관한 연구. 제주대학교 대학원 석사학위논문. 1-43.
- 강소영. 2012. 제주에서 근권세균을 이용한 주요 식물병의 방제. 제주대학교 대학원 박사학위논문. 1-124.
- 김효정. 2006. 길항근권세균에 의한 감자역병에 대한 저항성 유도 및 감자수량 증가. 제주대학교 대학원 석사학위논문. 1-39.
- 정우철, 신태수, 도기석, 김원극, 이재호, 최기현. 2006. 잔디 피시움마름병 (*Pythium blight*)의 생물학적 방제를 위한 길항 미생물의 선발과 효력 검증. 식물병연구. 12(3) : 260-266.
- 오정행, 김규홍. 2003. *Pseudomonas sp.*를 이용한 콩 탄저병의 생물학적 방제. 식물병연구 9(3) : 174-178.
- 이은형, 홍성기, 명인식, 심홍식, 이상엽, 이영기. 2012. 토마토 궤양병의 생물적 방제용 유용세균 선발. 한국농약학회. 151-151.
- 신동범, 小林紀彦, 이준택. 1994. 길항미생물에 의한 시설재배 딸기 눈마름병의 생물학적 방제. 한국식물병리학회지 10(2) : 112-118.
- 文炳周, 盧聖煥, 曹鍾濃. 1990.拮抗細菌 *Pseudomonas gladioli*를 이용한 딸기 시

- 들음病的 生物的 防除. 한국식물병리학회지 6(4) : 461-466.
- 서상태, 박종한, 한경숙, 정승룡. 2006. 포도 잿빛곰팡이병의 생물적 방제를 위한 길항세균 선발. 식물병연구. 12(3) : 267-271.
- 서상태, 박종한, 김경희, 이상현, 오은성, 신상철. 2008. *Pseudomonas putida* P84 균주를 이용한 토마토 풋마름병의 억제. 식물병연구. 14(1) : 32-36.
- Whiteside, J. O., Garnsey, S. M. and Timmer, L. W. 1988. Compendium of Citrus Disease. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA. 80pp.
- Bach, W. J. and Wolf, F. A. 1928. The isolation of the fungus that causes citrus melanose and the pathological anatomy of the host. Jour. Agr. Res. 37 : 243-253.
- Fawcett, H. S. 1936. *Diaporthe citri* (Faw) Wolf the perfect stage of a *Phomopsis citri* and *Phomopsis californica*(Abstr.). Phytopathology 22 : 928.
- Fawcett, H. S. 1911. Stem-end rot citrus fruits (*Phomopsis sp.*) Florida Agr. Exp. Sta. Bull. 107 : 1-23.
- Fawcett, H. S. and Lea, H. A. 1926. Citrus Disease and Their Control. 1st ed. London, 583pp.
- kende, H. and Zeevaart, J. 1997. The five "Classical" plant hormones. Plant Cell 9, 1197 - 1210.
- 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.
- David, M. W. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. 26 : 379-407.
- 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
- 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: Prea-ration of genomic DNA from bacteria. ed. by K. Wilson. until. 2.4.1~

2.4.2. John Wiley, New York, USA.

- Joo, G. J., J-H. Kim, and S. J. Kang. 2002. Isolation of antagonistic *Bacillus ehimensis* YJ-37 and its antifungal activiti against vegetables damping-off fungi. Kor. J. of Life Sci. 12 : 200-207.
- Tom Coenye and Peter Vandamme. 2005. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. Environmental Microbiology. 5(9), 719-729.
- Veerubommu Shanmugam, Samriti Gupta, N.P. Dohroo. 2012. Selection of a compatible biocontrol strain mixture based on co-cultivation to control rhizome rot of ginger. Crop protection 43 : 119-127.
- Yeoung-Seuk Bae, Kyungseok Park and Choong-Hoe Kim. 2003. *Burkholderia Gladioli* Strain B543 as a Potential Biocontrol Agent against Dumping-off Caused by *Pythium Ultimum*. Proceedings of IUPAC-KSPS Int'l Workshop on Pesticides. 298-298.
- Sang-Yoon Jeon, Yong Gyun Kim, Sang Mong Lee, Hong Joo Son, Hyeon Cheal Park, Sun-Tae Kim¹, Ki Do Park, Ui Gum Kang and Keun Ki Kim. 2010. Structural Identification of Antibiotics from *Pseudomonas* sp. RRj 228, a Antifungal Activity of *Collectotrichum acutatum* Causing Anthracnose on Pepper. Journal of Life Science. Vol. 20. No. 8. 1254~1260.
- Chang Seuk Park, Timothy Paulitz and Ralph Backer. 1988. Attributes Associated with increased Biocontrol Activity of Fluorescent *Pseudomonas*. Korean J. Plant Pathol. 4(3) : 218-225.
- 福岡正信. 1937. 柑橘樹脂病特にその完全時代について。日植病報. 7(1) : 32-33.
- 山本省二. 1991. カンキツ黒點病およびそばかすの生態と防除に関する 研究. 和歌山縣 果樹園試験場 特別研究報告. 1-95pp.

감사의 글

아쉬움을 뒤로한 채 부족하지만 논문 탈고를 마치며 감사하면서도 죄송한 분들이 기억에 스칩니다. 연구가 어설프고 부족함에도 불구하고 논문을 쓰도록 허락해주시고 논문 잘쓰도록 지도와 격려를 아낌없이 해주신 전용철 교수님께 먼저 감사를 드리우고, 심사받을 자질이 아직 부족함에도 불구하고 성의있게 심사를 해주신 김동순 교수님과 감귤시험장의 현재욱 박사님께는 죄송하고 한편으로는 진심으로 감사함을 느꼈습니다. 또한 저의 연구가 잘 되어가도록 격려를 해주신 강영길 교수님, 김주성 교수님께도 감사합니다.

이 논문의 연구에서 실외실험을 많이 도와준 고평렬 선생님, 김경남에게 제대로 고맙다는 한마디 제대로 못 건넸지만 이 글을 통해서 진심으로 감사하고 고맙습니다는 말을 글이라도나마 남겨봅니다. 그리고 실험실에 있는 나머지 학부생 연구원들한테도 고맙다는 말을 글로써 남깁니다.

마지막으로 늘 학교서 늦게까지 있다 집에 돌아오면 따뜻하게 맞이하고 논문을 탈고를 할 수 있도록 불편을 감수해준 어머니와 동생에게도 미안하고 감사하다는 말을 전해봅니다.