항균활성 식물근권세균 전 처리에 의한 감귤 궤양병 억제

Suppression of Citrus Canker by Pretreatment with Rhizobacterial Strains Showing Antibacterial Activity

양지순¹ · 강소영¹ · 전용철^{1,2*}

¹제주대학교 생물산업학부, ²제주대학교 아열대농업생명과학연구소

Ji Seun Yang¹, So Young Kang¹ and Yong Chull Jeun^{1,2*}

¹Faculty of Bioscience and Industry, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

²The Research Institute for Subtropical Agriculture and Biotechnology, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

*Corresponding author

Tel : +82-64-754-3319

Fax: +82-64-725-2351

E-mail: ycjeun@jejunu.ac.kr

Citrus canker caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc) is one of the most important diseases on citrus. Although Satsuma mandarin cultivating mostly in Korea is moderately resistance to canker, occurrence of the disease were more frequently reported since last decade. Like other diseases in citrus, citrus canker was mainly protected by chemical fungicide in the field. Due to the side effect of the chemicals, alternative method of disease control is recently required. In this study four rhizobacterial strains TRH423-3, MRL408-3, THJ609-3 and TRH415-2 are selected by testing its antifungal activity against Xcc. Pre-inoculation with the selected rhizobacterial strains caused disease suppression on the citrus leaves after inoculation with the citrus canker pathogen. Similarly, in the field test symptoms of citrus canker were less developed in the citrus trees applied several times with the selected rhizobacterial strains compared with those of untreated trees. Therefore, it is suggested that the selected rhizobacterial strains may be valuable as an alternative method in the environment-friendly citrus farm.

Keywords : Antibiotics, Bacterial disease, Biological control, Jeju Island

Received April 30, 2014

Revised May 20, 2014

Accepted May 21, 2014

서 론

감귤 궤양병은 주로 잎과 열매에 발생하나 심할 때에는 가지에도 발생한다. 병징 초기에는 작은 반점으로 시작되어 2-10 mm의 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 있는 전염원이 된다. 바람에 의해 병이 조장되며, 6.5 m/s를 넘으면 잎과 과실에 상처가 많아져 발병이 높아진다(Timmer 등, 1991).

최근 감귤에 궤양병을 일으키는 병원균은 영양원 이용 양상과 DNA 상동성을 근거로 *Xanthomonas citri*, *X. fuscans*, *X. alfalfae*

로 구분되었다. *X. citri*는 *X. citri* subsp. *citri*와 *X. citri* subsp. *malvacearum*로, *X. fuscans*는 *X. fuscans* subsp. *fuscans*와 *X. fuscans* subsp. *aurantifolii*로, 그리고 *X. alfalfae*는 *X. alfalfa* subsp. *alfalfae*와 *X. alfalfa* subsp. *citrumelonis*로 각각 분류되었다(Schaad 등, 2006). 현재 제주도에서 발생하고 있는 감귤 궤양병은 일본에서 발생하고 있는 동일한 균주로 *X. citri* subsp. *citri*로 여겨진다(Shiotani 등, 2009).

제주에서 주로 재배되는 온주밀감은 감귤 궤양병에 대해 중도저항성으로서 검은점무늬병 또는 더랭이병과 비교해서 피해가 적다. 하지만 수출을 목적으로 감귤을 재배하는 농가에서는 감귤 궤양병의 완전 박멸이 요구되는데 이는 대부분의 감귤 수입국에서는 감귤 궤양병을 검역 대상 병해로 지정하여 감귤 궤양병균의 국내 유입을 금하고 있기 때문이다. 따라서 감귤 수출을 위해서는 다양한 감귤 궤양병 방제 시스템이 개발되어야 한다.

감귤 궤양병 방제 수단으로는 주로 합성농약을 이용한 화학

적 방제가 이루어지고 있다. 하지만 집중적인 화학적 방제는 병원균의 저항성 발현, 주변 환경의 오염 및 인축독성 등 많은 부작용의 원인이 될 수 있다. 작물의 다수확을 목적으로 과도한 농약사용의 증가로 인해 병원균의 약제 저항성이 발생되면서 농약은 약효를 잃고 그 사용에 제한이 따르게 되었으며, 감귤 궤양병에 대해서도 지역에 따라 약제내성을 나타냈다(Hynes와 Boyetchko, 2006; Timmer 등, 1991).

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 친환경 농산물에 대한 국내·외 소비자들의 요구가 점차 커지고 있다.

따라서 본 연구는 감귤 수출 농가에서 기존의 화학적 방제에만 의지하였던 감귤 궤양병 방제 수단에서 벗어나 친환경적 방제 방안을 제시하고자, 감귤 궤양병균의 생장을 억제하는 식물근권세균의 선발, 온실에서 식물근권세균을 이용한 감귤 궤양병 발생 억제 여부, 그리고 포장실험을 통한 선발된 식물근권세균의 감귤 궤양병에 대한 방제력을 조사하였다.

재료 및 방법

감귤 궤양병균 분리와 동정. 제주지역의 감귤원에서 온주 감귤(품종: 궁천조생)에서 궤양병균에 의해 용균반이 형성된 잎을 채집하여 감귤 궤양병균을 분리하였다. 채집된 이병 잎에서 병징을 중심으로 5×5 mm 크기의 정방형으로 자르고 1% sodium hypochlorite solution(NaOCl)에서 30초간 표면 소독하였다. 증류수에 1분씩 3회 세척하고 70% ethanol에 30초 담근 후 증류수에서 1분씩 3번 세척하였다. 식물시료를 살균된 흡습지로 물기를 제거하고 매스로 4등분하여 5%의 peptone액 1 ml에 넣고 2시간 동안 식물조직 속의 세균을 용출시켰다. 그 세균이 포함된 용액 100 µl를 tryptic soy agar(TSA; Becton, Dickson and Company, France) 배지에 넣고 골고루 도말한 후 28±1°C의 항온기에서 3일간 배양하였으며, 감귤 궤양병균으로 추정되는 노란색 colony를 분리 배양하였다.

분리된 노란색 colony가 감귤 궤양병원균인지를 확인하기 위하여 loop를 이용하여 분리된 균을 떼어서 tryptic soy broth(TSB) 배지에 옮긴 후 28°C에서 24시간 동안 100 rpm으로 진탕 배양하였다. 그 후 배양된 세균의 total DNA를 NucleoSpin® kits(Macherey-Nagel, Germany)를 이용하여 추출하였으며, 그 절차에 따라 분리하였다. 그 후 감귤 궤양병원균인 *X. citri* subsp. *citri*의 특이적 유전자만을 증폭하는 primer인 primer-2(5'-CACGGGTGCAAAAAATCT-3')와 primer-3(5'-TGGT-GTCGTCGCTGTAT-3') (Shiotani 등, 2009)를 이용하여 유전자 증폭을 하였다.

PCR 반응액은 2 µl의 분리된 DNA(5–10 ng/ml), 2.5mM의

dNTP 1 µl, 10pmol의 primer 각 1 µl, 10×Buffer 4 µl, 5 unit/µl의 Taq DNA polymerase(iNtRON Co., Korea)를 1 µl 첨가하고, 멸균수로 반응용액의 부피를 최종 40 µl가 되게 하였다. PCR 증폭 조건은 PCR Thermal Cycler Dice TP600(TaKaRa, Japan)을 사용하여 95°C에서 10분간 처리 후, 95°C에서 70초, 58°C에서 60초, 72.0°C에서 60초의 조건에서 30회 반복하였으며, 마지막으로 72.0°C 2분 동안 처리하였다. DNA 증폭산물의 8 µl를 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 감귤 궤양병원균을 동정하였다.

항균활성에 의한 식물근권세균 선발. 지난 10년간 제주대학교 식물병리학실험실에서 제주도 한라산에 자생하는 1년생 식물의 뿌리부분을 채취하여 Lee 등(2003)이 제시한 실험 방법으로 식물근권세균 총 200여 균주를 분리하였고 그 중 감자 역병(Kim과 Jeun, 2006; 2007), 감귤 검은점무늬병(Ko 등, 2012), 감귤 더덩이병(Kim 등, 2011), 토마토 역병(An 등, 2010) 등 작물병에 저항성을 유도하거나 직접적인 항균 효과가 입증된 세균 12개 균주를 선발하여 본 실험에 이용하였다.

식물근권세균의 감귤 궤양병균에 대한 직접적인 항균 효과를 알아보기 위해 *in vitro* 실험을 실시하였다. TSA 배지가 채워져 있는 페트리디쉬에 준비된 감귤 궤양병원균의 현탁액 1.0×10⁷ cfu/ml을 50 µl을 전체적으로 고르게 도말한 후 1시간 동안 실온의 무균실험대 안에 보관하였다. 식물근권세균은 TSB에서 2일간 배양 후 1분간 10000 rpm으로 원심분리하여 상층액을 준비하였고, 감귤 궤양병균이 도말된 배지의 중앙에 멸균된 paper disc(8 mm)을 올려놓은 후 미생물이 배양된 액을 70 µl을 처리하였다. 대조군으로 멸균수와 Streptomycin(유효성분 20%, 농용신®, 동부정밀) 10 g/l을 처리하였다. 처리한 배지를 28°C의 배양기에서 2일간 배양 후 감귤 궤양병원균의 생장억제정도(inhibition zone)를 확인 후 길항효과가 우수한 균주를 1차적으로 선발하였다.

실내에서의 식물근권세균 처리에 의한 감귤 궤양병 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, THJ609-3을 3.0×10⁷ cfu/ml의 농도가 되도록 조절하고 0.01% Tween 20을 첨가한 후 감귤 신초에 살포

했다. 식물근권세균의 효과를 비교하기 위하여 streptomycin을 1 g/l로 준비하여 살포하였다. 전 처리한 감귤 잎을 3시간 동안 상온에서 건조시킨 후 감귤 껍질병원균의 농도를 3.0×10^7 cfu/ml로 조절된 접종원을 살포하였다. 접종된 감귤의 잎을 28°C의 dew chamber에서 24시간 습식 처리 후 $28 \pm 1^\circ\text{C}$ 가 유지되는 식물배양실의 습식처리 된 상자에 보관하여 병반의 진행을 14일 동안 관찰하였다. 실험은 3반복 시행하였으며, 14일이 경과 후 감귤 껍질병원균에 의해 감염된 병반수를 측정하였다. 시험결과는 분산분석과 처리평균 사이의 비교를 위하여 Duncan 검정($P = 0.001$)을 실시했으며, Statistical Analysis System(SAS Institute, version 8.02) program을 이용하였다. 병반수는 [전체 병반수/조사엽수]로 계산하였다.

포장에서 식물근권세균 처리에 의한 감귤 껍질병 진전 억제. 감귤 껍질병 시험포장별로 무처리구, 대조약제로 streptomycin, 선발된 식물근권세균 TRH423-3, MRL408-3, THJ609-3 및 TRH415-2를 각각 10 m 이상 떨어진 3주를 선정하고, 3반복 완전임의 배치하였다. 감귤나무에서 새순이 발생 후 새순이 굳기 전에 15일 간격으로 식물근권세균의 현탁액을 1.0×10^6 cfu/ml의 농도로 처리하였다. 식물근권세균의 현탁액을 7회 처리하고 7일 뒤에 감귤 껍질병원균 현탁액을 1.0×10^6 cfu/ml의 농도로 준비하여 감귤나무에 분무 접종하였다. 접종 7일 뒤에 8회째의 식물근권세균을 처리하고 15일 뒤에 껍질병의 병반을 조사하였다. 조사는 봄순 잎을 대상으로 주당 200엽씩 4방향 조사하였다. 감귤 껍질병에 대한 이병엽율(%) = [(이병엽수/조사엽수) $\times$ 100]을 조사하였다.

시험결과는 분산분석과 처리평균 사이의 비교를 위하여 Duncan 검정($P = 0.001$)을 실시했으며, Statistical Analysis System(SAS Institute, version 8.02) program을 이용하였다.

결과 및 고찰

감귤 껍질병원균 분리. 제주에서 채취한 표면 살균된 이병

된 감귤 잎에서 분리한 세균이 TSA 배지에서 배양한 후 2일째 투명한 colony를 형성하였으며, 3일째 레몬빛의 연한 노란색 colony를 나타냈다. 분리한 세균의 DNA에서 감귤 껍질병원균 특정 primer-2와 primer-3에 의해 유전자를 증폭되었으며 250 bp 정도의 염기단편을 확인할 수 있었다(Fig. 1). NCBI의 Gene Bank에 등록된 균주들의 database에 대해 병원균의 DNA의 염기서열을 비교한 결과 100%로 *X. axonopodis* pv. *citri* str으로 동정되었다(Fig. 1). 이 세균은 *X. citri* subsp. *citri*와 동일한 감귤 껍질병원균으로 보고되었다(Gottwald 등, 2009).

또한 분리된 세균 현탁액을 서로 다른 농도로 감귤 잎에 접종하였더니 1.0×10^4 cfu/ml 농도의 현탁액으로 접종한 감귤 잎에서는 병징이 나타나지 않은 반면 1.0×10^6 cfu/ml 농도에서는 전형적인 감귤 껍질병 병징이 나타났다(결과 미제시).

항균활성에 의한 식물근권세균선발. 감귤 껍질병원균이 도말된 TSA 배지에서 중앙에 놓여진 식물근권세균의 현탁액이 처리된 페이퍼 디스크의 주변으로 저지원이 생겼다. 분리된 12개의 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. 2).

식물병원에 대한 방제 효과가 있는 식물근권세균의 선발은 주로 일차적으로 항균 활성 실험을 통해 이뤄졌다. 예를들면, 시들음병에 효과 있는 미생물을 선발하기 위해 실내 실험을 통해 *Fusarium oxysporum*에 대해 저지원이 형성된 미생물이 선발되었다. 이러한 항균 효과가 있는 미생물에서 2,4-diacetylphloroglucinol, pyoluteorin, pyrrolnitrin 등의 항생물질이 생성되어 식물병원균에 대해 직접적인 성장억제가 나타난다고 보고되었다(Raaijmakers 등, 1995).

감귤 껍질병원균에 대해 길항능력이 있는 식물근권세균 MRL408-3, TRH 423-3, TRH415-2 및 THJ609-3을 ITS 38F와 72R의 primer를 이용하여 rDNA의 특정유전자를 증폭하여 분

Fig. 1. Gel electrophoresis of PCR amplified 16S/23S internal transcript spacer regions (ITS) from *Xanthomonas citri* pv. *citri* (left) and ITS sequencing based on rDNA of *X. citri* pv. *citri* and blast results on the web-site (right). The presented gel electrophoresis of PCR product bands was using primer-2(5'-CACGGGTGCAAAAATCT-3') and primer-3(5'-TGGTGTCTGCTGCTGTAT-3') (lane 1 and 2). M: 1kb molecular size marker.

Fig. 2. Growth inhibition of *Xanthomonas citri* subsp. *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. 3. Disease severity on Satsuma mandarin leaves pre-treated with H₂O (A), rhizobacterial isolate MRL408-3 (B), TRH423-3 (C), and commercial fungicide Streptomycin® (D) at 14 days after inoculation with citrus canker pathogen *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. The concentration of the bacterial isolates and *X. citri* subsp. *citri* were 3.0×10^7 cfu/ml and the fungicide was 1 g/l, respectively.

석한 결과, MRL408-3와 TRH423-3는 *Burkholderia gladioli*로, TRH415-2는 *Pseudomonas fluorescens*로, 그리고 THJ609-3는 *Pseudomonas pudia*로 동정되었다(Ko 등, 2012).

실내에서의 식물근권세균 처리에 의한 감귤 궤양병 진전 억제. *X. citri* subsp. *citri* 현탁액 처리 후 7일부터 가장 어린 잎 뒷면에 병반이 형성되기 시작하였다. 접종 20일 후에는 대부분의 접종된 감귤 잎에서 병징이 나타났으며 잎 전체적으로 병반을 확산되었다(Fig. 3).

근권세균을 전 처리한 감귤 궤양병균 접종구에서는 무처리한 감귤 잎보다 병 발생이 억제되었다(Fig. 3). 병 억제 정도는 전 접종한 식물근권세균 균주에 따라 차이가 있는데 TRH423-3을 전 접종한 식물에서 방제가가 79.0%로 가장 높게 나타났으며 THJ609-3에 의해서는 병이 억제가 다른 근권세균에 비해 다소 떨어졌다(Table 1). 그리고 MRL408-3과 TRH415-2를 전 접종한 감귤 잎에서는 50% 이상의 방제 효과를 나타내었다(Table 1).

식물근권세균 MRL408-3, TRH423-3과 THJ609-3은 감귤 궤양 병원균의 생장을 억제했으며, 형성된 저지원을 형성하여 항진균 효과가 있음을 확인하였다(Fig. 2). THJ609-3은 병원균에 대한 저지원 형성이 다른 식물근권세균보다 넓게 형성되어 병원균에 대해 직접적으로 강한 생장 억제효과를 나타낸다고 판단된다. 그러나, 병 진전 억제 실험의 THJ609-3은 병원균의 단독

Table 1. Lesion numbers on Satsuma mandarin leaves pre-treated with H₂O, the selected rhizobacterial strains and commercial fungicide Streptomycin® after inoculation with *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Treatment ^a	Lesion number	Duncan's-test
Control	643.5 ± 294.0 ^c	a ^d
MRL408-3	291.3 ± 149.1	bc
TRH423-3	135.0 ± 55.7	bc
TRH415-2	262.3 ± 170.0	bc
THJ609-3	320.7 ± 186.4	b
Streptomycin ^{®b}	0.0 ± 0.0	c

^aThe concentration of the bacterial isolates suspension and citrus canker pathogen *X. citri* subsp. *citri* were 3.0×10^7 cfu/ml. The control was pre-treated with sterilized distilled water instead of the bacterial isolates.

^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.

처리보다 식물병에 대한 억제력은 유의성 있게 나타났지만 다른 식물근권세균에 비해 효과가 다소 낮았다(Table 1).

식물근권세균에 의한 병원균의 군사생장억제력과 병 진전 억제력 사이에 항상 양의 상관관계가 성립하지는 않았다. 그 예로 *B. cereus*로 동정된 TRL2-3인 경우 감귤 역병에 대해 항

Fig. 4. Disease severity on citrus leaves at 7 days after inoculated with *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (1.0×10^8 cfu/ml) in the field experiment. Bacterial suspension of the isolates was pre-inoculated on citrus leaves 7 times before inoculation with *X. citri* subsp. *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.

진균효과에 의해 선발되어 감귤 열매에 접종된 역병균의 진전을 억제하는 효과는 있었다. 반면, 감자 역병에 대해서는 항진균 효과가 없었으나, 감자 식물체에 처리하였더니 감자 역병에 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) 또는 항생물질(Joo 등, 2002) 등에 의해 병원균에 작용하여 포자수 및 발아관의 형성이 저하되는 것으로 보고되어 있어 식물체와 처리된 식물근권세균과의 상호작용으로 인한 것으로 생각되어진다.

포장에서 식물근권세균 처리에 의한 감귤 궤양병 진전 억제. 실험실에서 항균효과 및 감귤의 신초에 접종하여 발병억제 효과에 의해 선발된 4개의 식물근권세균 MRL408-3, TRH423-3, THJ609-3과 TRH415-2(Ko 등, 2012)등의 현탁액을 감귤나무(품종: 궁천조생)의 출아된 신초에 각각 총 8회 분무했으며, 감귤 궤양병의 이병엽율(%)과 병반수를 측정하였더니 무처리에 비해 식물근권세균을 전처리한 것이 감귤 궤양병의 병반 발생이 현저히 감소하였다. 무처리는 68.7%로 다른 처리에 비해 신초의 이병엽율(%)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(결과 미제시).

식물근권세균이 처리된 나무에서의 이병엽율이 무처리에 비해 뚜렷히 감소하였다(Table 2). 한편 식물근권세균에 따라 이병엽율의 차이가 나타났는데 식물근권세균 THJ609-3과 TRH415-2는 이병엽율이 5-6%로 현저하게 떨어진 반면에서는

Table 2. Suppression of infected leaves on citrus trees by treatment with the selected bacterial isolates in the citrus orchard

Treatment ^a	Rate of infected leaves (%)	Duncan's multiple test
Untreated	68.7 ± 4.3 ^c	a ^d
MRL408-3	17.7 ± 9.7	bc
TRH423-3	29.7 ± 12.3	b
TRH415-2	6.3 ± 2.8	c
THJ609-3	5.0 ± 2.7	c
Streptomycin ^{®b}	1.3 ± 0.3	c

^aThe bacterial isolates were pre-inoculated 7 times before pathogen inoculation with *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (1.0×10^8 cfu/ml). The untreated control was sprays-inoculated with an only *X. citri* subsp. *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.

차이가 없었지만, MRL408-3과 TRH423-3을 처리한 감귤에서는 17-30%의 이병엽율을 나타냈다(Table 2). 이병된 잎에서의 병반도 무처리에 비해 적게 조사되었는데 대부분이 병반이 1개였고, 평균적으로 잎 1개 당 0.03-0.38의 병반수가 확인되었다(결과 미제시).

*B. gladioli*는 오이에 발생하는 *Colletotrichum orbiculare*에 의한 오이탄저병과 *Pythium ultimum*에 의한 모잘록병 방제에 이용되고 있다(Bae 등, 2007; Raupach와 Kloepper, 1998). 또한 토마토와 콩에서 발생하는 잣빛곰팡이병이 *P. putida*의 균주 WCS358에 의해 억제되었다고 보고되었다(Meziane 등, 2005). 따라서 *B. gladioli*으로 동정된 MRL408-3, TRH 423-3과 *Pseudo-*

mons 속으로 동정된 TRH415-2, THJ609-3은 *in vivo* 실험뿐만 아니라 포장실험에서도 감귤 궤양병에 대해 발병억제효과를 확인할 수 있었으며, 감귤원에서의 포장적용가능성을 시사해 주고 있다.

요 약

감귤 궤양병은 *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc)에 의해 발생하는 감귤에서 매우 중요한 병 중에 하나이다. 비록 한국에서 대부분 재배되는 감귤인 온주밀감은 감귤 궤양병에 대해 중도 저항성이긴 하지만 지난 10년전 이래로 자주 발생되었다. 감귤에서 다른 병과 마찬가지로 감귤 궤양병도 포장에서 주로 화학농약에 의해 방제되고 있다. 농약의 부작용으로 인해 최근 다른 방제 수단이 요구되고 있다. 본 연구에서는 Xcc에 직접적인 항균 활성이 있는 식물근권세균 TRH423-3, MRL408-3, THJ609-3, TRH415-2을 선발하였다. 선발된 식물근권세균을 감귤 잎에 전처리하였더니 감귤 궤양병균을 접종한 후 병 발생이 억제되었다. 유사하게, 포장 실험에서도 선발된 식물근권세균을 여러 차례 살포한 감귤나무에서 무처리한 나무에 비해 병이 적게 진전되었다. 따라서 선발된 식물근권세균이 친환경 감귤농가에서 대체 수단으로 가치가 있다고 생각된다.

Acknowledgement

This research was supported by 2013 "Grant for Export of Fresh Agricultural Products" of Animal, Plant and Fisheries Quarantine and Inspection Agency/Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea.

References

- An, Y. J., Kang, S. Y., Kim, K. D., Hwang, B. K. and Jeun, Y. C. 2010. Enhanced defense responses of tomato plants against late blight pathogen *Phytophthora infestans* by pre-inoculation with rhizobacteria. *Crop Prot.* 29: 1406–1412.
- Bae, Y. S., Park, K. S. and Choi, O. H. 2007. Laboratory culture media-dependent biocontrol ability of *Burkholderia gladioli* strain B543. *Plant Pathology J.* 23: 161–165.
- Gottwald, T., Graham, J., Bock, C., Bonn, G., Civerolo, E., Irey, M., Leite, R., McCollum, G., Parker, P., Ramallo, J., Riley, T., Schubert, T., Stein, B. and Taylor, E. 2009. The epidemiological significance of post-packinghouse survival of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* for dissemination of Asiatic citrus canker via infected fruit. *Crop Prot.* 28: 508–524.
- Hynes, R. K. and Boyetchko, S. M. 2006. Research initiatives in the art and science of biopesticide formulations. *Soil Biol. Biochem.* 38: 845–849.
- Jeun, Y. C., Park, K. S., Kim, C. H., Fowler, W. D. and Kloepper, J. W. 2004. Cytological observations of cucumber plants during induced resistance elicited by rhizobacteria. *Biol. Control* 29: 34–42.
- Joo, G. J., Kim, J.-H. and Kang, S. J. 2002. Isolation of antagonistic *Bacillus ehimensis* YJ-37 and its antifungal activity against vegetables damping-off fungi. *Korean J. Life Sci.* 12: 200–207.
- 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. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 50: 23–28.
- Kim, H. J. and Jeun, Y. C. 2006. Resistance induction and enhanced tuber production by pre-inoculation with bacterial strains in potato plants against *Phytophthora infestans*. *Mycobiology* 34: 67–72.
- Kim, H. J. and Jeun, Y. C. 2007. Infection structures on the infected leaves of potato pre-inoculated with bacterial strains and DL-3-amino butyric acid after challenge inoculation with *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology J.* 23: 203–209.
- Kim, S. Y., Hyun, J. W. and Jeun, Y. C. 2011. Suppression effect and mechanism of citrus scap in the citrus pre-inoculated with rhizobacterial strains. *Res. Plant Dis.* 17: 302–310. (In Korean)
- Ko, Y. J., Kang, S. Y. and Jeun, Y. C. 2012. Suppression of citrus melonose on the leaves treated with rhizobacteria strains after inoculation with *Diaporthe citri*. *Res. Plant Dis.* 18: 331–337. (In Korean)
- 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. *Mycobiology* 31: 251–254.
- Meziane, H., van der Sluis, I., van Loon, L. C., Hoefte, M. and Bakker, P. A. H. M. 2005. Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. *Mol. Plant Pathol.* 6: 177–185.
- Raaijmakers, J. M., Leeman, M., van Osrschot, M. M. P., van der Sluis, I., Schippers, B. and Bakker, P. A. H. M. 1995. Dose-response relationships in biological control of Fusarium wilt of radish by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* 85: 1075–1081.
- 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.
- Schaad, N. W., Postnikova, E., Lacy, G., Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, P. E., Stromberg, V. K. and Vidaver, A. K. 2006. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. *Syst. Appl. Microbiol.* 29: 690–695.
- Shiotani, H., Uematsu, H., Tsukamoto, T., Shimizu, Y., Ueda, K., Mizuno, A. and Sato, S. 2009. Survival and dispersal of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* from infected Satsuma mandarin fruit. *Crop Prot.* 28: 19–23.
- Timmer, L. W., Gottwald, T. R. and Zikto, S. E. 1991. Bacterial exudation from lesions of Asiatic citrus canker and citrus bacterial spot. *Plant Dis.* 75: 192–195.