



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

식물근권세균이 감귤더듬이병균 생장에
미치는 영향 및 품종 별 저항성 검정

Effect of Rhizobacteria to the Growth of *Elsinoe fawcettii*
and Testing of Disease Resistance

濟州大學校 大學院

農學科

朴宰伸

2016年 02月

식물근권세균이 감귤더덩이병균
생장에 미치는 영향 및 품종 별
저항성 검정

指導教授 田 溶 哲

朴 宰 伸

이 論文을 農學 碩士學位 論文으로 提出함

2015 年 12 月

朴宰伸의 農學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長

한해근



委

員

김동순



委

員

전용철



濟州大學校 大學院

2015 年 12 月



목 차

List of Figures	ii
ABSTRACT	1
I. 서 론	3
II. 재료 및 방법	7
1. 감귤식물체	
2. 접종원	
3. 식물근권세균	
4. 감귤식물체에 식물근권세균 전 처리	
5. 감귤식물체에 감귤 더덩이병균 접종	
6. 감염 식물의 주사전자현미경 관찰	
7. 감귤 더덩이병에 대한 감귤 품종 별 저항성 검정	
8. 통계분석	
III. 결과 및 고찰	14
1. 식물근권세균 전 처리에 의한 감귤 더덩이병 억제	
2. 감귤 더덩이병균 접종 후 전자 현미경관찰	
3. 감귤더덩이병에 대한 감귤 품종 별 저항성 검정	
IV. 적 요	29
V. 참 고 문 헌	31

List of Figures

- Fig. 1. Satsuma mandarin leaves untreated (A), pre-treated with rhizobacterial strains *Burkholderia gladioli* MRL408-3 (B), TRH423-3 (C), *Pseudomonas fluorescens* THJ609-3 (D), TRH415-2 (E) and commercial fungicide Imibenconazole (F) at 14 days after fungal inoculation with *Elsinoe fawcettii*. The concentration of the pathogen, the rhizobacteria and the fungicide were 4.0×10^6 conidia/ml, 2.0×10^7 cfu/ml and 0.5 g/L, respectively. 16
- Fig. 2. Number of lesions on Satsuma mandarin leaves untreated, pre-inoculated with the rhizobacterial strains *Burkholderia gladioli* MRL408-3, TRH423-3, *Pseudomonas fluorescens* THJ609-3, TRH415-2 and commercial fungicide Imibenconazole at 14 days after inoculation with *Elsinoe fawcettii*. The concentration of the pathogen, the rhizobacteria and the fungicide were 4.0×10^6 conidia/ml, 2.0×10^7 cfu/ml and 0.5 g/L, respectively. 17
- Fig. 3. Photographs of scanning electron microscopic images on Satsuma mandarin leaves untreated (A), pre-treated with the rhizobacterial strains *Burkholderia gladioli* MRL408-3 (B), TRH423-3 (C), *Pseudomonas fluorescens* THJ609-3 (D), TRH415-2 (E) and commercial fungicide Imibenconazole (F) at 3 days after inoculation with *Elsinoe fawcettii*. The concentration of the pathogen, the rhizobacteria and the fungicide were 4.0×10^6 conidia/ml, 2.0×10^7 cfu/ml and 0.5 g/L, respectively. Abb.: C, conidium; Bt, bacterial cell; Gt, germ tube (bars = 10

μm). 22

Fig. 4. Photographs of scanning electron microscopic images on Satsuma mandarin leaves untreated (A), pre-treated with the rhizobacterial strains *Burkholderia gladioli* MRL408-3 (B), TRH423-3 (C), *Pseudomonas fluorescens* THJ609-3 (D), TRH415-2 (E) and commercial fungicide Imibenconazole (F) at 3 days after inoculation with *Elsinoe fawcettii*. The concentration of the pathogen, the rhizobacteria and the fungicide were 4.0×10^6 conidia/ml, 2.0×10^7 cfu/ml and 0.5 g/L, respectively. Abb.: C, conidium; Bt, bacterial cell; Gt, germ tube (bars = 10 μm). 23

Fig. 5. Rate of germination of *Elsinoe fawcettii* on Satsuma mandarin leaves untreated, pre-inoculated with the rhizobacterial strains *Burkholderia gladioli* MRL408-3, TRH423-3, *Pseudomonas fluorescens* THJ609-3, TRH415-2 and commercial fungicide Imibenconazole at 3 (A) or 5 (B) days after inoculation with *Elsinoe fawcettii*. The concentration of the pathogen, the rhizobacteria and the fungicide were 4.0×10^6 conidia/ml, 2.0×10^7 cfu/ml and 0.5 g/L, respectively. 24

Fig. 6. Length of gum tube of *Elsinoe fawcettii* on Satsuma mandarin leaves untreated, pre-inoculated with the rhizobacterial strains *Burkholderia gladioli* MRL408-3, TRH423-3, *Pseudomonas fluorescens* THJ609-3, TRH415-2 and commercial fungicide Imibenconazole at 3 (A) or 5 (B) days after inoculation with *Elsinoe fawcettii*. The concentration of the pathogen, the rhizobacteria and the fungicide

were 4.0×10^6 conidia/ml, 2.0×10^7 cfu/ml and 0.5 g/L, respectively.

..... 25

Fig. 7. Varied cultivar leaves of citrus observing disease development at 20 days after fungal inoculation with *E.fawcettii*. (A) Satsuma mandarin, (B) Jigak, (C) Frost eureka, (D) Washington navel, (E) Jugyeon. The concentraion of the pathogen were 3.5×10^5 conidia/ml. 27

Fig. 8. Number of lesions on Varied cultivar leaves of citrus at 20 days after fungal inoculation with *E.fawcettii*. The concentraion of the pathogen were 3.5×10^5 conidia/ml. 28

ABSTRACT

Citrus scab disease caused by *Elsinoe fawcettii* is one of major disease in citrus cultivation, resulting in fruit blemishes that reduce quality and the economic value of fruits. Like other disease in citrus, citrus scab was mainly protected by chemical fungicides. Recently, interests of safe products were increased so that alternatives of chemical control were highly required. *Elsinoe fawcettii* was suppressed by rhizobacterial strains such as *Burkholderia gladioli* MRL408-3, TRH423-3 and *Pseudomonas fluorescens* THJ609-3, TRH415-2 having antifungal activity. In order to investigate inhibition-behaviors of citrus scab pathogen, the leaf surface of Satsuma mandarin, which was pre-treated with the rhizobacterial strains, was observed on the Satsuma mandarin leaves by a scanning electron microscope (SEM) after inoculation with *Elsinoe fawcettii*. The number of lesions was reduced on the leaves pre-treated with the rhizobacterial strains compared to those of untreated leaves. Especially, the lesions numbers was apparently reduced on the leaves pre-treated with *B. gladioli* MRL408-3. The observation by SEM revealed that not only the germination rate but also the length of germ tube of the pathogen were decreased on the rhizobacterial strains pre-treated leaves. These inhibition of the fungal growth was more strongly expressed on the leaves pre-

treated with commercial fungicide Imibenconazole, by which the lesions was rarely found on the leaves. Based on these results, it was suggested that rhizobacterial strains may inhibit the germination and growth of the *Elsinoe fawcettii* on the surface of citrus leaves, resulting in decrease of disease severity. Lastly, in order to test resistance of various kinds of citrus cultivar against *E. fawcettii*, some citrus cultivar Jigak, Frost eureka, Washington navel, Jugyeon and Satsuma mandarin (negative control) were inoculated with *E. fawcettii*. Consequently, The number of lesions was significantly reduced on all tested citrus cultivar leaves compared with Satsuma m mandarin. Particularly Jugyeon was the most resistant to citrus scab, but Frost eureka was the least.

I. 서 론

제주 감귤포장에서 주로 재배되는 온주밀감에 발병하는 감귤 더뎡이 병은 *Elsinoe fawcettii*에 의해 발생하는 병으로 주로 5-6월에 발생하기 시작하여 강우량이 많을 때 병 발생이 급증한다. *E. fawcettii*는 감귤나무의 잎, 가지, 과실을 감염시켜 시장에 판매되는 과실의 가치를 떨어뜨리고 농가의 수입을 감소시킬 수 있는 중요한 병해이다(Hyun 등, 2001; Timmer 등, 1996). 감귤 더뎡이병은 전년도에 발병된 가지나 잎의 병반에서 이듬해 새로운 병원균이 발생하기 때문에 감귤을 수확할 때나 전정하는 시기에 병이 발생된 조직을 최소화하도록 하며, 발병된 조직이 남아 있을 경우 발병 조건이 좋을 경우 병이 만연될 수 있다(Oh 등, 2005). 이러한 감귤 더뎡이병의 방제는 Imibenconazole 수화제와 트리프록시스토로빈 액상수화제 등과 같은 농약을 이용한 화학적 수단이 주로 이용하고 있다. 그러나 무분별한 농약 사용은 농약 잔류성, 환경오염, 병해충 저항성 및 인축의 독성 등의 문제를 야기할 수 있는 위험을 가지고 있다(Weller, 1988).

최근 친환경 농산품에 대한 수요자들의 수요가 높아짐으로써 무농약 재배과원을 포함한 친환경재배 과원의 수가 증가하고 있다. 농약을 거의 사용하지 않는 친환경 감귤과원에서는 감귤 더뎡이병이 빈번하게 발생하는데, 특히 전년도에 발생 포장에는 감염된 가지나 잎에 감귤 더뎡이병균이 남아 있어 다음 해에 전염원으로서 역할을 할 수 있으며, 병 발생에 좋은 조건이 만족 될 시에는 대발생의 원인이 될 수도 있다(David, 1988; Hyun 등, 2001).

친환경적인 감귤생산을 위한 더댕이병 방제는 상대적으로 환경 친화적인 농자재인 석회 보르도액을 포함한 구리제를 주로 사용하고 있다(Timmer 와 Zitko, 1996; Michaud와 Grant, 2003). 그러나 구리제는 특정병해에 대해서는 전문 화학적 약제에 비해 비교적 약효가 떨어지며 특히 구리피해가 발생하는 문제점이 있어 사용에 제약이 따른다(Hyun 등, 2005).

친환경적 식물병 방제 수단으로 가장 이상적인 방법은 저항성 품종을 이용하는 것은 이미 알려져 있다. 그러나 감귤 더댕이병에 대한 저항성 품종은 아직 등록된 것은 없으며 최근 육종 분야에서 다양한 감귤 유전자원을 이용하여 감귤의 내병성 및 기능성 품종을 육성하기 위해 연구 중이다. 본 연구에서는 이들 품종의 저항성 정도를 알아봄으로써 친환경 농가에 저항성 품종 공급에 이바지하고자 한다. 그러나 저항성 품종에 대한 연구는 아직 미비한 상태에 있어서 다른 친환경적 방제 수단이 필요한 상태이다.

또 다른 감귤 병 방제수단으로 식물근권세균 중 *Burkholderia gladioli*와 *Pseudomonas fluorescens* 에 의해 감귤 검은점무늬병이 유의적으로 억제되는 것을 실내실험을 통해 확인 되었다(Ko 등, 2012). 또한 이들 식물근권세균이 포장에서 감귤 궤양병의 발생을 억제시키는 것으로 조사되어 농약사용이 제한된 친환경 농가에서는 식물근권세균을 통해 병 방제 수단으로 이용할 수 있는 가능성을 보여주고 있다(Yang 등, 2014).

그 외에도 식물근권세균의 항진균 활동에 의한 생물학적 방제에 대한 많은 연구들이 이루어져 있다. 예를 들면, *B. subtilis* KB-401은 오이 흰가루병에 대한 방제 효과가 보고되었다(Nam 등, 2010). 또한 참다래 꽃썩음병은 식물근권세균인 *Streptomyces* sp.의 항균작용이 73 %로 확인되어 뛰어난 생물적

방제효과가 보고 되었다(Cho 등, 2007). 최근 이러한 식물병 억제 효과가 검증된 식물근권세균은 농업용 상품으로 *Paenibacillus polymyxa* 등 2종을 이용하여 실용화시킨 큐팩트, 탑시드가 이미 시판되고 있다(Kloepper 등, 2004; Kim 등, 2012).

식물근권세균은 대개 식물의 성장도 촉진시키는데 이들은 식물근권에 서식하면서 indoleacetic acid(IAA), 지베렐린, 사이토키닌, 에틸렌과 같은 식물 호르몬을 합성한다(Okon 등 1998). 예를 들어 *B. amyloliquefaciens* FZB42의 배양여액을 기체 크로마토그래피와 고성능액체크로마토그래피로 분석했을 때, 식물생장을 촉진시키는 물질 중의 하나인 IAA가 검출되어 *B. amyloliquefaciens* FZB42가 IAA를 생성한다고 보고되었다(Idris 등, 2007). 또한 식물근권세균은 인이나 질소와 같은 다양한 영양분을 식물에 제공하며 *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*와 *Allorhizobium*속의 근권세균들은 콩과 식물에서 공생하면서 질소를 고정시켜 양분을 공급한다고 알려졌다(Bloemberg 과 Lugtenberg, 2001).

게다가 식물근권세균은 식물 병을 억제하기 위해 뿌리표면에서 빠르게 증식하여 병원체와 경쟁을 하거나 병원체에 기생함으로써 생물학적 방제요인으로 작용하기도 한다(Rangarajan 등, 2003). 이러한 작용의 예로써 *P. fluorescens* WCS365은 *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (*For1*)에서 분비되는 푸사리산에 의해 유도되어(de Weert 등, 2003) 병원체의 균사에 증식함으로써 *For1*의 병원성을 저하시켜 토마토 뿌리썩음병을 억제한다(Bolwerk 등, 2003). 또한 *For1*에 감염된 뿌리에서 *P. fluorescens* WCS365가 병원체의 균사주변에 부착하여 증식된 모습이 주사전자현미경으로 관찰되었다

(Kamilova 등, 2008). 결과적으로 *P. fluorescens* WCS365는 *Forl*의 활성화와 생존 그리고 발아를 억제시키고 균사에 증식하여 새로운 포자형성을 방지하여 병원체의 확산을 억제시킨다(Validov 등, 2009). 그 외에 식물근권세균의 항균 작용을 통한 식물병 억제에 대한 연구에는 뿌리혹병을 일으키는 *Agrobacterium tumefaciens*가 *A. radiobacter*에 의해 생산되는 agrocin 84에 의해 억제된다고 보고 되었다(Cooksey 와 Moore, 1982).

식물근권세균에 의한 식물병이 억제되는 현상을 보다 정확하게 해석하기 위해서는 생화학적 분석뿐 아니라 조직학적인 분석도 필요하다. 선행 연구에서는 식물근권세균을 전 처리한 후 감귤 더뎡이병균을 접종한 감귤 잎에서 감귤 더뎡이병균의 포자수와 발아율이 무처리한 잎보다 감소된다는 것을 형광현미경을 이용하여 확인하였다(Kim 등, 2011). 따라서 식물근권세균이 감귤 더뎡이병균의 생장에 어떠한 영향을 미치는지 보다 자세하게 알아보기 위해 주사전자현미경을 이용하여 관찰하였다. 이를 통해 식물근권세균을 전 처리한 감귤 잎에서 감귤 더뎡이병균의 발아율, 발아관 생장 억제 여부 및 식물근권세균과 감귤 더뎡이병균 사이의 상호작용 여부 등을 관찰하였다.

II. 재료 및 방법

1. 감귤 식물체

본 실험에서는 탱자에 접목한 2 년생 감귤 묘목(품종: 궁천)을 일반 토양과 상토(뚝심이)를 2:1 의 비율로 섞은 토양의 화분(직경 30 cm)에 옮겨 심은 후 주간 25 ± 1 °C, 야간 18 ± 1 °C가 유지되는 식물 배양실에서 배양하였다. 실험에는 최소한 4 개 이상의 신초를 포함하고 있는 가지를 살균된 가위로 자른 후 자른 부위를 0.5 %의 sodium hypochlorite solution 으로 5 초 동안 표면살균 한 후 멸균수로 세척하여 멸균수가 담긴 삼각플라스크에 꽂아 실험 대상 식물로 사용하였다.

2. 접종원

감귤 더뎡이병의 접종원으로 사용된 *Elisonoe fawcettii*는 제주특별자치도 서귀포시 남원동에 위치한 감귤시험장에서 육안으로 더뎡이병징이 보이는 온주밀감의 잎에서 분리하였다. *E. fawcettii*의 분리는 멸균된 면도날을 사용하여 병반 주위를 3.0×3.0 mm로 잘라 1 % Sodium hypochlorite solution에 30초간 표면살균 하였다. 그 후 멸균수로 10분씩 3회

세척하고 70 % ethanol에서 30초간 다시 표면살균 한 후 동일한 방법으로 세척하였다. 세척된 시료는 90 mm filter paper를 이용하여 물기를 제거하고 Potato Dextrose Agar(PDA)배지에 치상하여 27 °C incubator에서 5일간 배양하였다. 그 후 잎 조직 근처에 자라는 균사 중 *E. fawcettii*로 판단되는 균사를 분리하였다(Kim 등, 2011). 분리된 *E. fawcettii*를 PDA배지에 접종하여 배양기(DA-MIL-2500, DONG-A, Korea)에 옮겨 25 °C에서 20일간 배양한 후 균총을 배지에서부터 떼어 멸균된 spatula를 이용하여 잘게 분쇄하였다. *E. fawcettii*의 포자를 수거하기 위해서 Frise medium (ammoniumtartrate 5 g, ammonium nitrate 1 g, potassium phosphate dibasic 1 g, ammonium sulfate 0.5 g, calcium chloride 0.1 g, sodium chloride 0.1 g, sucrose 20 g in 멸균수1l) 30 ml 에 분쇄된 *E. fawcettii* 1 g을 넣은 후 shaking incubator(HB-201SL, HANBAEK scientific. Co., Korea)로 옮겨 70 rpm으로 27 °C에서 48시간 배양 하였다. 그 후 원심분리기 (mega17R, HANIL, Seoul, Korea)를 이용하여 4 °C에서 10000 rpm으로 90 초 동안 원심분리 하여 상층액인 Frise medium을 제거하고 멸균수를 30 ml 채워서 세차게 섞어준 후 앞선 방법과 동일하게 원심분리하여 상층액을 제거하고 멸균수로 3회 세척하였다. 포자를 새롭게 생성할 수 있는 *E. fawcettii*에 멸균수를 30 ml 넣어 shaking incubator에 옮겨 70 rpm으로 27 °C 에서 24 시간 동안 배양 하였다.

배양된 *E. fawcettii*를 Hemocytometer (Hausser Scientific Inc., PA, USA)를 이용하여 농도를 4.0×10^6 conidia/ml이 되도록 조정하여 접종원으로 사용하였다.

3. 식물근권세균

2003년-2007년간 제주도 한라산 중심으로 산간지역, 중산간 지역, 해안지역에서 자생하는 1년생 식물체를 중심으로 식물 뿌리를 채집하여 흐르는 물에 뿌리에 묻은 흙을 조심스럽게 씻어낸 후 Filter paper를 이용하여 물기를 제거하였다. 씻어낸 뿌리는 70 % ethanol로 소독시킨 가위를 사용하여 약 1 g 정도 채취하여 지름 120 mm 정도의 막자 사발에 10ml 멸균수와 함께 갈아 준 후 한 겹의 miracloth(CALBIOCHEM)로 여과시켜 추출한 현탁액 1 ml를 10^{-8} 까지 희석시켰다. 희석액 중 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} 의 희석액을 100 μ l를 추출하여 Tryptic Soy Agar(TSA, Becton, Dickson and company, France)배지에 분무하여 도말 한 후 28 °C incubator에서 48시간 동안 배양하였다. 배양된 세균들 중 육안으로 색깔 및 모양이 다른 colony들을 선발하여 TSA배지에 도말한 후 28 °C에서 48시간 동안 배양 된 세균을 loop를 이용하여 충분히 수확하였다. 각각 수확된 균주들은 Tryptic Soy Broth (TSB)에 20 % glycerin이 담긴 1.5 ml micro tube에 섞어 vortex한 후 -80 °C에 보관하였다(Lee 등, 2003).

보관중인 200여 가지의 식물근권세균 중 감귤 더닝이병에 대한 전신 적 저항성을 유도하거나 항균 효과가 입증된 4개 균주 *Burkholderia gladioli* MRL408-3, TRH423-3과 *Pseudomonas fluorescens* THJ609-3, TRH415-2 (Kim 등, 2011)를 본 실험에 사용하였다. 식물근권세균들을 각각 TSA배지에 접종한 후 배양기에 옮겨 28 °C에서 48 시간 동안 배양하였다. 그 후 식물근권 세균이 배양된 배지에 멸균수 10 ml를 넣고 루프를 이용하여 현탁액을 만든 후

UV/visspectrophotometer(Optizen POP, Mecasys co., Korea)를 이용하여 2.0×10^7 cfu/ml의 농도로 조절하여 본 실험에 사용하였다.

4. 감귤식물체에 식물근권세균 전 처리

선발된 식물근권세균에 의한 감귤 더뎡이병 억제효과를 알아보기 위해 식물근권세균 현탁액에 0.01 % tween 20을 첨가한 후 삼각플라스크에 담겨 있는 감귤가지의 잎에 접종스프레이를 이용하여 감귤 잎 표면에 이슬이 맺힐 정도로 살포 하였다. 식물근권세균에 의한 감귤 더뎡이병 억제효과를 비교하기 위하여 시판 중인 살균제인 Imibenconazole 수화제(확시란, 동방아그로)을 관행농도인 0.5 g/l 로 살포하였다. 또한 무처리 비교구로 식물근권세균 현탁액 대신 멸균수를 처리한 감귤을 사용하였다. 예비 실험 결과 감귤 더뎡이병 발생 정도가 식물에 따라 매우 차이가 났으므로 한 식물에 무처리, 식물근권세균, 농약을 모두 처리함으로써 추후에 병원균을 접종하였을 때 발생하는 식물에 따른 병 발생 정도 차이가 나는 것을 피하였다. 전 처리한 감귤 잎은 6 시간 동안 상온에서 자연건조 시켰다.

5. 감귤식물체에 감귤 더뎡이병균 접종

감귤 더뎡이병균 현탁액에 0.01 % tween 20을 첨가하여 무처리,

4가지 식물근권세균 또는 Imibenconazole 수화제를 전 처리한 감귤 잎에 접종스프레이를 이용하여 이슬이 맺힐 정도로 살포하였다. 접종 한 감귤 잎은 상대습도 99 %로 유지되는 dew chamber (DA-DC, DONA-A, Korea)로 옮겨 28 °C에서 24 시간 동안 보관한 후, 낮에는 25±1 °C, 밤에는 18±1 °C이고 습도가 70-80 %가 유지되는 식물배양실에 옮겼다. 그 후 14일 동안 감귤 잎에 형성되는 병반의 진행 과정을 관찰하였다. 시간적으로 분리된 실험을 총 3회 시행하였으며, 각각 실험 마다 3개의 반복된 식물을 사용하였다. 병 발생 정도는 감귤 더덩이병균을 접종 14일 후에 감염된 병반수를 계수하여 [전체 병반수/조사엽수]로 측정하였다.

6. 감염 식물의 주사전자현미경 관찰

식물근권세균에 의한 감귤 더덩이병의 감염 억제 양상을 알아보기 위하여 식물근권세균을 전 처리한 후 감귤 더덩이병균을 접종한 잎을 접종1일, 3일, 5일 후에 채취하여 Hayat (1989)가 제시한 식물 전처리 방법에 따라 시행하였다.

채취한 잎을 면도날로 0.4×0.6 mm²의 크기로 잘라 2 % glutaraldehyde를 포함한 0.05 M phosphate buffer solution (pH 7.2; PBS)이 담긴 삼각플라스크에 침지하여 30초간 진공상태를 거쳤다. 그 후 0.05 M PBS가 담긴 2 ml 마이크로 튜브에 조심히 옮겨 실온에서 2 시간 동안 고정한 후 새로운 PBS로 10 분 동안 3회 세척 하였다. 세척된 샘플을 2 % osmium tetroxide

와 0.05 M PBS를 섞은 용액에 옮겨 4 °C에서 2 시간 동안 2차 고정된 후 멸균된 3차 증류수로 3회 세척 하였다. 세척된 시료들은 ethanol 시리즈 (각각 15 분 동안 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 % 2회, 100 % 3회)를 통해 탈수를 하였고 acetic acid로 (각각 10 분 동안 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 % 2회, 100 % 2회) 치환 하였다.

각 시료들은 critical point drier (CPD 030, BAL-Tec, Los Angeles, USA)를 사용하여 임계점에서 건조 시킨 후 스토브(Ø 25 cm) 위에 치상하여 Osmium Plasma Coater (OPC80T, FILGEN, Japan)로 시료 표면을 금으로 코팅(~100 Å)하였다. 코팅한 후 주사전자현미경(JSM-6700F, JEOL Ltd., Japan)을 통해 20kV에서 처리구 당 4개의 시료를 관찰하였고 주로 감귤 더듬이병균의 수, 발아 여부, 발아관의 길이 또한 식물근권세균의 수와 감귤 더듬이병균과의 접촉 여부 등을 관찰하였다.

7. 감귤 더듬이병에 대한 감귤 품종 별 저항성 검정

감귤 묘목 품종 별에 대한 감귤더듬이병 저항성 정도를 측정하기 위하여 제주특별자치도 농업기술원에서 개발된 4가지 감귤품종인 지각, 프로스트유레카, 워싱턴네블, 주건 품종과 대조구로서 온주밀감을 이용하였다. 감귤더듬이병균 접종과 병반수는 'II. 재료 및 방법 2. 접종원'과 동일한 방법으로 수행하였다.

8. 통계분석

무처리, 식물근권세균 및 Imibenconazole 수화제를 전 처리한 앞에서 감귤 더듬이병균 접종 후 관찰된 식물의 병반수, 감귤 더듬이병균의 발아된 포자 수, 발아관 길이 등의 분산분석과 처리평균 사이의 비교를 위하여 Duncan's 검정을 statistical analysis system (SAS Institute, version 8.02) 이용하여 분석하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 식물근권세균 전 처리에 의한 감귤 더뎡이병 억제

식물근권세균에 의해 감귤 더뎡이병이 억제되었으며 본 연구 결과는 감귤 더뎡이병에 대한 식물근권세균 억제 효과를 보고한 Kim 등(2011)에 의한 연구와 동일하였다. 감귤 식물체에 식물근권세균을 전 처리 했을 때의 직접적인 효과를 규명하기 위해 감귤 더뎡이병균에 대해 향균 효과가 있는 식물근권세균 *B. gladioli* MRL408-3 과 TRH423-3, *P. fluorescense* THJ609-3과 TRH415-2를 감귤 잎에 각각 전 처리 한 후 감귤 더뎡이병균 현탁액을 분무하였다.

감귤 잎에 멸균수를 전 처리한 무처리구에서 병반 형성은 접종 후 3일째부터 육안으로 감귤 잎의 윗면에 전체적으로 흑갈색의 작은 반점이 생기며 잎 뒷면에는 황갈색반점을 형성하며 반점 부분이 파여있는 것을 확인 하였다. 접종 5일째부터는 잎 앞면이 황갈색의 병반으로 변하며 약간 돌출되어 반점의 크기가 커졌으며, 접종 7일째부터 잎 앞면 병반의 돌출이 두드러지기 시작 했다. 접종 10일째부터는 병반부가 진해졌으며 돌기는 좀 더 돌출되고 단단하게 형성되었다. 병반수는 잎 당 평균 209.8개로 확인되었다(Fig. 1A, Fig. 2).

이에 반해 식물근권세균 *B. gladioli*와 *P. fluoresces*을 전 처리한 감귤 잎에서의 병 진전은 무처리에 비해 하루 늦은 접종 4일째부터 흑갈색의

작은 반점이 감귤 잎 윗면에 발생했으며, 접종 후 7일째부터는 황갈색의 병반이 형성되며 약간 돌출된 것을 확인 하였다. 접종 후 14일째에는 돌기가 더 돌출되고 병반이 진하게 형성 되었다(Fig. 1B-E).

병반수 조사결과 *B. gladioli* MRL408-3은 56.8개로 무처리구에 비해 73 %정도 적게 나타났고 TRH423-3은 114.3개로 약 46 % 감소했다. 또한 *P. fluoresces*를 전 처리한 감귤 잎에서도 감귤 더듬이병의 병반수가 감소되었다. THJ609-3의 병반수는 122.5개로 무처리구에 비해 40 % 정도 적게 나타났으며 TRH415-2의 병반수는 92.0개로 56 % 정도 감소된 것을 확인 하였으며 특히 *B. gladioli* MRL408-3 균주를 전 처리한 식물에서 병반 형성이 뚜렷하게 억제되었다(Fig. 2). 시판농약과 식물근권세균의 감귤 더듬이병 억제효과를 비교하기 위하여 Imibenconazole 수화제를 감귤 잎에 동일한 방법으로 처리하였을 때 접종 6일째에 흑갈색의 작은 반점이 감귤 잎 윗면에 발생하였으며, 접종 후 8일째에부터 황갈색의 병반이 돌출 된 것을 확인 할 수 있었다. 접종 14일째에는 병반 부분의 돌출이 딱딱해지고 진한 병반을 나타냈으며 병반수는 20.0개로 무처리구에 비해 88 % 적게 나타나 병 진전이 뚜렷하게 억제된 것을 확인 하였다(Fig.1F, Fig. 2). 본 실험에서 뿐 아니라 *B. gladioli*는 *Colletotrichum orbiculare*에 의해 발생하는 오이탄저병과 모에 발생하는 *Pythium ultimum*에 의한 모잘록병에도 방제효과가 있었다고 보고되었다(Bae 등, 2007; Raupach와 Kloepper, 1998). 또한 *P. fluorescens*에 의해 땅콩 줄기썩음병과 마늘 흑색썩음병이 억제되었다고 보고되었다(Kang과 Jeun, 2012; Manjula 등, 2004).

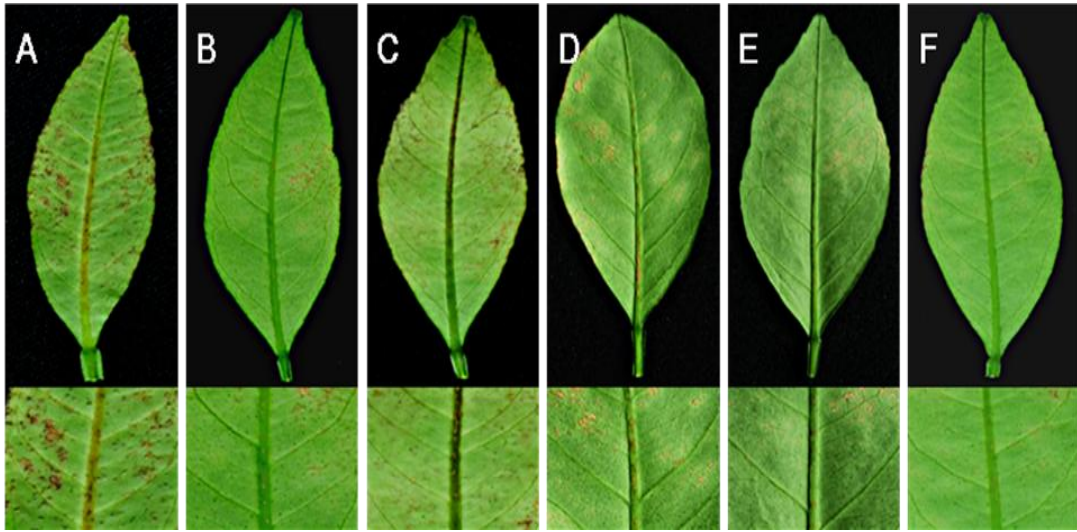


Fig. 1. Satsuma mandarin leaves untreated (A), pre-treated with rhizobacterial strains *B. gladioli* MRL408-3 (B), TRH423-3 (C), *P. fluorescens* THJ609-3 (D), TRH415-2 (E) and commercial fungicide Imibenconazole (F) at 14 days after fungal inoculation with *Elsinoe fawcettii*. The concentration of the pathogen, the rhizobacteria and the fungicide were 4.0×10^6 conidia/ml, 2.0×10^7 cfu/ml and 0.5 g/L, respectively.

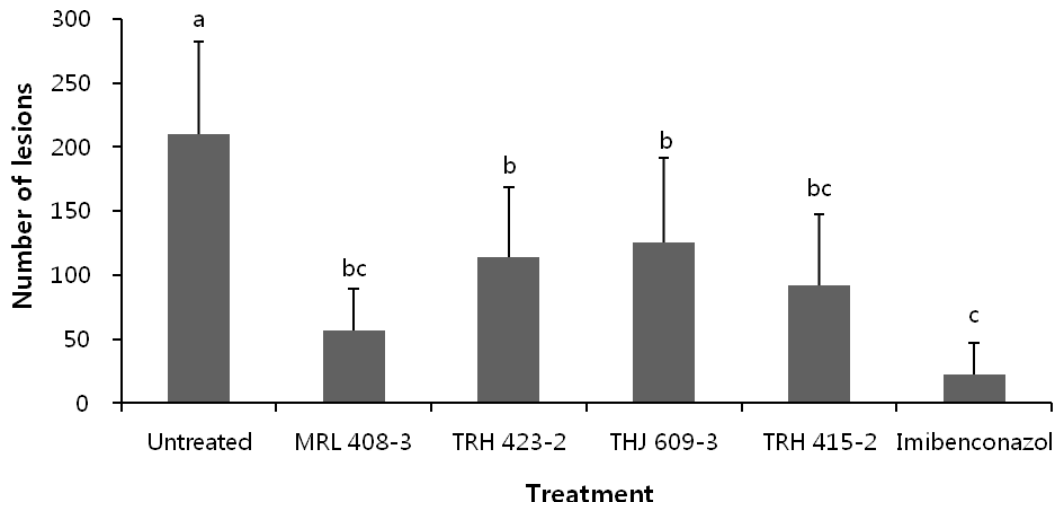


Fig. 2. Number of lesions on Satsuma mandarin leaves untreated, pre-inoculated with the rhizobacterial strains *B. gladioli* MRL408-3, TRH423-3, *P. fluorescens* THJ609-3, TRH415-2 and commercial fungicide Imibenconazole at 14 days after inoculation with *Elsinoe fawcettii*. The concentration of the pathogen, the rhizobacteria and the fungicide were 4.0×10^6 conidia/ml, 2.0×10^7 cfu/ml and 0.5 g/L, respectively.

2. 감귤 더듬이병균 접종 후 전자 현미경관찰.

선행연구(Kim 등, 2011)에서 식물근권세균을 전 처리하고 감귤 더듬이병균을 접종한 감귤 잎을 형광현미경으로 관찰을 하였을 때 무처리구에 비해 식물근권세균을 전 처리한 감귤 잎에서 감귤 더듬이병균의 포자수가 약 60 %정도 감소하였으며, 발아율은 약 50 %정도 감소하였다. 뿐만 아니라 식물의 괴사율은 현저히 억제되는 것을 확인 할 수 있었다. 본 실험에서도 식물근권세균 *B. gladioli*와 *P. fluorescens*가 감귤 더듬이병균의 성장을 억제하는 것을 주사전자현미경을 통해 관찰할 수 있었다.

멸균수를 전 처리한 무처리구에서 접종 후 1일째 감귤 잎의 표면을 주사전자현미경으로 관찰하였을 때 감귤 더듬이병균의 포자가 발아하기 시작하였으며, 식물근권세균을 전 처리한 감귤 잎에서는 무처리구와 감귤 더듬이병균 발아관 형성의 차이는 나타나지 않았다(결과 미제시).

그러나 접종 3일 후 모든 식물근권세균을 전 처리한 감귤 잎 표면에 감귤 더듬이병균의 발아율이 무처리구와 비교하여 감소하는 경향이 나타났다(Fig. 3, 5). 발아율 억제 정도에 있어서 접종 후 시간이 경과됨에 따라 또한 전 처리한 식물근권세균의 균주에 따라 약간의 차이가 나타났다(Fig. 4, 5). 한편 Kim 등(2011)의 형광현미경을 통한 관찰 결과에서도 감귤 더듬이병균의 발아율이 무처리에 비해 약 2배정도 억제 되어 유의성 있는 결과를 나타냈으며 이는 주사전자현미경으로 관찰한 본 연구 결과와 유사하였다. 예상한 바와 같이 Imibenconazole 수화제를 전 처리한 잎에서 감귤 더듬이병균의 발아율이 가장 억제되었으며 이는 형성된 감귤 더듬이병 병반수가 가장 감소한 것과 동일한 경

향을 나타냈다(Fig. 2, 3, 5).

이와 비슷한 연구결과로는 *P. fluorescens* THJ609-3을 전 처리한 감귤 잎에서 감귤 검은점무늬병균의 발아율이 상당히 감소 하였고 감귤 잎에서의 병반수 역시 억제 되었다고 보고되었다(Ko 등, 2013). 또한 친환경농가에서 사용할 수 있는 생물농약인 Serenade®(*Bacillus subtilis* QST713)는 유채에서 *Plasmodiophora brassicae*의 휴면포자의 생존력과 발아를 감소시켜 유채의 뿌리혹병을 억제할 수 있다고 보고하였다(Lahlali 등, 2011).

감귤 더듬이병균의 발아관 생장은 접종 후 3일째 *B. gladioli* TRH423-3을 전 처리한 감귤 잎의 경우를 제외한 모든 처리구에서 무처리구와 비해 유의성 있게 억제되었다(Fig. 3, 6). 또한 접종 후 5일째에는 모든 식물근권세균을 전 처리한 감귤 잎에서 발아관의 생장이 뚜렷하게 억제되었다(Fig. 3, 6). 이와 같은 결과는 식물근권세균을 전 처리한 감귤 잎에서 감귤 더듬이병의 병반수가 멸균수를 전 처리한 감귤 잎에서의 병 반수 보다 적게 나타난 것과 동일한 경향으로 조사되었다(Fig. 2, 3, 6). 이들 결과를 통하여 식물근권세균에 의해 감귤 더듬이병균의 발아관의 생장이 억제됨으로써 병반수 감소가 이루어진 것으로 추측할 수 있다. 실제로 Imibenconazole 수화제를 전 처리한 잎에서 감귤 더듬이병균의 발아관 길이가 가장 억제되었으며 감귤 잎에서의 감귤 더듬이병균에 의한 병반수도 가장 적게 형성되었다(Fig. 2, 4, 6).

병원균의 발아관 생장을 억제함으로써 병 발생을 억제시킨다는 연구는 많이 보고되었다. 예를 들면, 복숭아의 흑곰팡이병을 일으키는 *Rhizopus stolonifer*에 효과가 있는 효모현탁액에 CaCl_2 를 첨가 했을 때 포자발아와 발아관 생장을 억제시켜 과실에서의 병 진전을 억제 한다는 결과가 보고되었으며,

Ca가 포자발아와 발아관 성장을 억제 시킴으로써 진균의 침입을 감소 시킬 것이라고 보고 되었다(Tian 등, 2002; Wisiniewski 등, 1995). 또한 *Trichoderma harzianum*의 단백질분해효소는 *Bortrytis cinerea*의 생물학적 방제 역할을 하는 것으로 알려져 있다. *T. harzianum*과 단백질분해효소가 포함된 배지에서 *B. cinerea*의 발아와 발아관의 길이가 감소된 것을 확인 하였으며 *T. harzianum*가 합성한 단백질분해효소를 포함하는 배양액을 *B. cinerea*가 감염된 콩잎에 처리 하였을 때 단백질분해효소의 합성이 증가했을 뿐만 아니라 발병도도 유의적으로 감소 했다고 보고 되었다(Elad와 Kapat, 1999).

감귤 식물체에서 식물근권세균이 정확하게 어떠한 방법에 의해 병원균의 성장을 억제시키는지는 알려져 있지 않다. 다만 식물근권세균이 직접적인 항생물질을 분비하든가 siderophore를 형성함으로써 금속이온의 영양적 경합을 통하여 병원균의 성장을 억제한다고 보고되어 있다(Anelise 등, 2012). 실제로 직접적인 항균효과를 가진 미생물에서 분비되는 물질로는 *Pseudomonas*속에서 분비하는 2-4 diacetylphloroglucinol, pyoluteorin, pyrrolnitrin 등이 있다(Raaijmakers 등, 1997). 이 외에도 인삼에 뿌리썩음병을 일으키는 *Fusarium cf. incarnatum*는 *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*에 의해 PDA배지상에서 상당히 저지 되었는데(Song 등, 2014) 이는 *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*의 대사산물에서 나타난 독성화합물이 *F. cf. incarnatum*의 성장을 억제하는 요인이며 그것은 즉각적인 병 억제효과를 보이는 중요한 역할을 한다고 보고되었다(Kim 등, 2009). 또한 근권세균인 *Burkholderia cepacia*의 경우 근근내 밀도와 식물병의 발생 억제와 상관관계가 있다고 보고되었으나 일반적으로 길항미생물의 농도는 높을 수록 식물병 억제 정도가 높다가 보다는 어

떠한 특정한 농도에서 병 진전이 최소가 된다고 알려져 있다(Park, 2000).

따라서 본 실험에서 사용한 식물근권세균을 감귤 잎에 전 처리 하였을 때 감귤 더뎡이병이 억제 되는 것은 식물근권세균이 감귤 더뎡이병균의 발아율과 발아관 생장을 억제시켰기 때문이라고 사료된다. 그러나 어떠한 작용에 의해 발아율과 발아관 생장을 억제시키는지는 아직까지 밝혀지지 않아서 앞으로 이 분야에 대한 더 많은 연구가 요구된다.

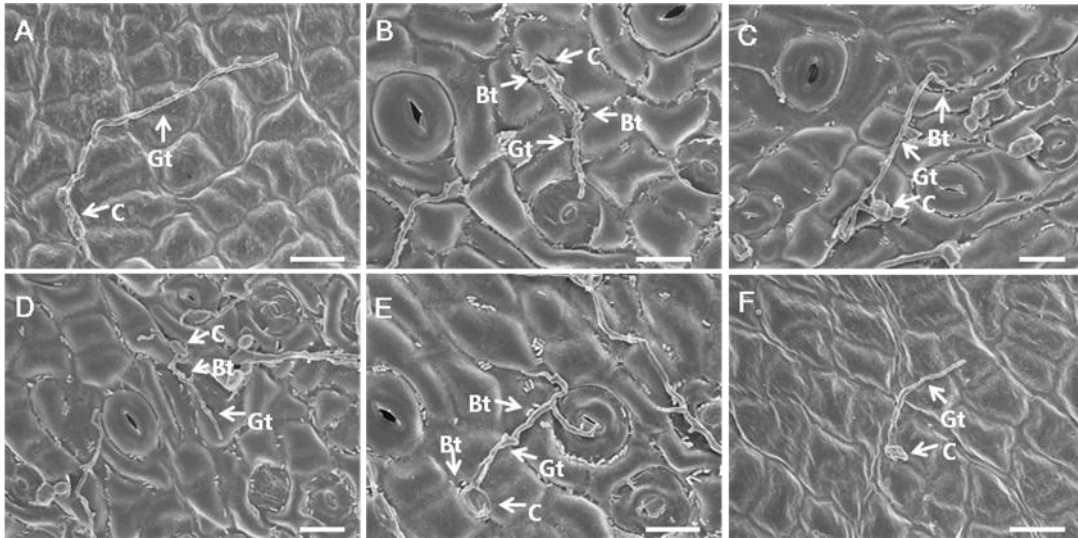


Fig. 3. Photographs of scanning electron microscopic images on Satsuma mandarin leaves untreated (A), pre-treated with the rhizobacterial strains *B. gladioli* MRL408-3 (B), TRH423-3 (C), *P. fluorescens* THJ609-3 (D), TRH415-2 (E) and commercial fungicide Imibenconazole (F) at 3 days after inoculation with *Elsinoe fawcettii*. The concentration of the pathogen, the rhizobacteria and the fungicide were 4.0×10^6 conidia/ml, 2.0×10^7 cfu/ml and 0.5 g/L, respectively. Abb.: C, conidium; Bt, bacterial cell; Gt, germ tube (bars = 10 μ m).

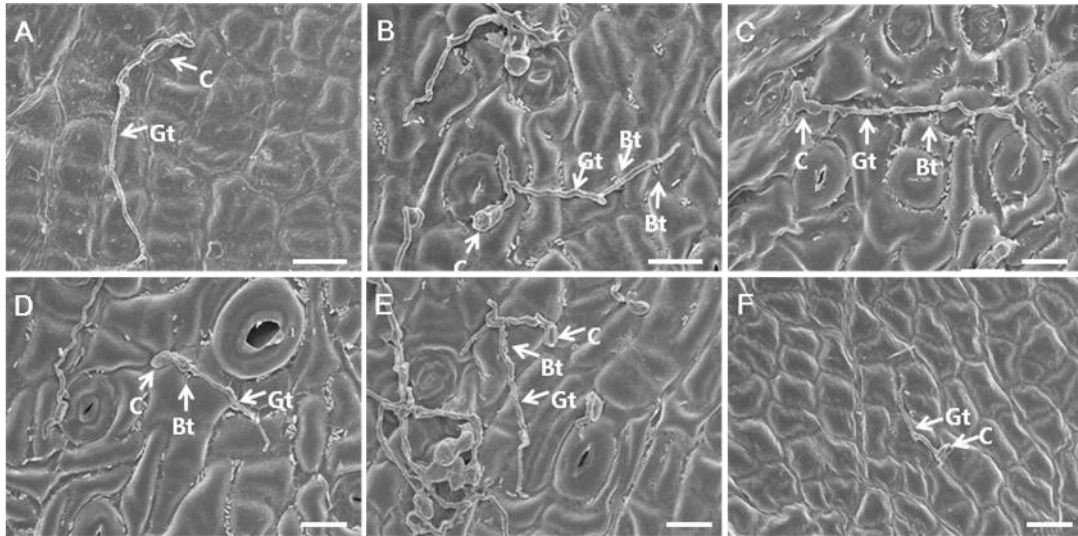


Fig. 4. Photographs of scanning electron microscopic images on Satsuma mandarin leaves untreated (A), pre-treated with the rhizobacterial strains *B. gladioli* MRL408-3 (B), TRH423-3 (C), *P. fluorescens* THJ609-3 (D), TRH415-2 (E) and commercial fungicide Imibenconazole (F) at 5 days after inoculation with *Elsinoe fawcettii*. The concentration of the pathogen, the rhizobacteria and the fungicide were 4.0×10^6 conidia/ml, 2.0×10^7 cfu/ml and 0.5 g/L, respectively. Abb.: C, conidium; Bt, bacterial cell; Gt, germ tube (bars = 10 μ m).

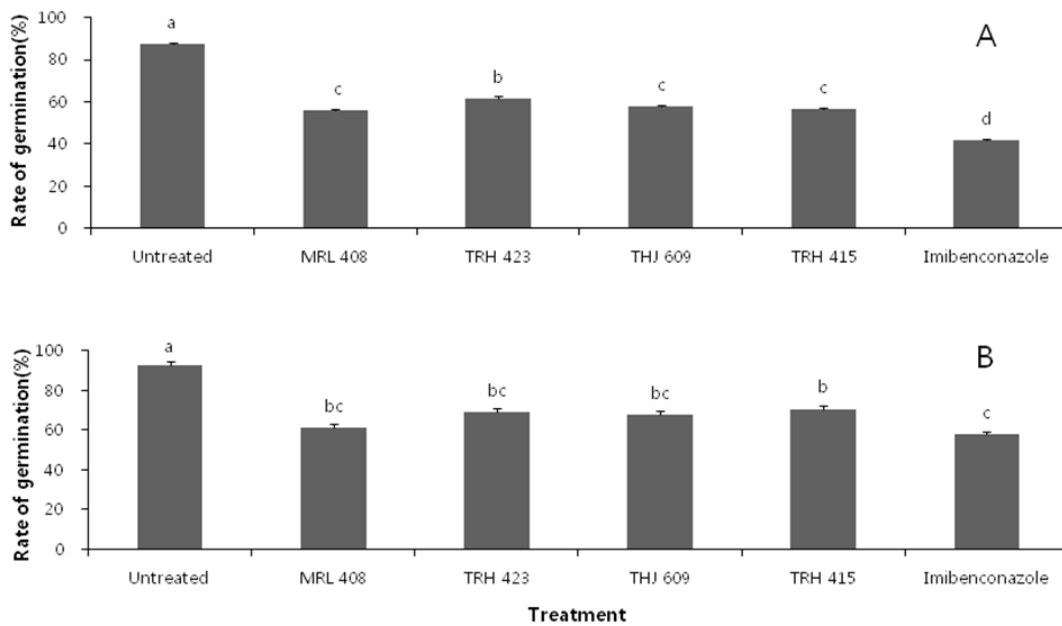


Fig. 5. Rate of germination of *E. fawcettii* on Satsuma mandarin leaves untreated, pre-inoculated with the rhizobacterial strains *B. gladioli* MRL408-3, TRH423-3, *P. fluorescens* THJ609-3, TRH415-2 and commercial fungicide Imibenconazole at 3 (A) or 5 (B) days after inoculation with *Elsinoe fawcettii*. The concentration of the pathogen, the rhizobacteria and the fungicide were 4.0×10^6 conidia/ml, 2.0×10^7 cfu/ml and 0.5 g/L, respectively.

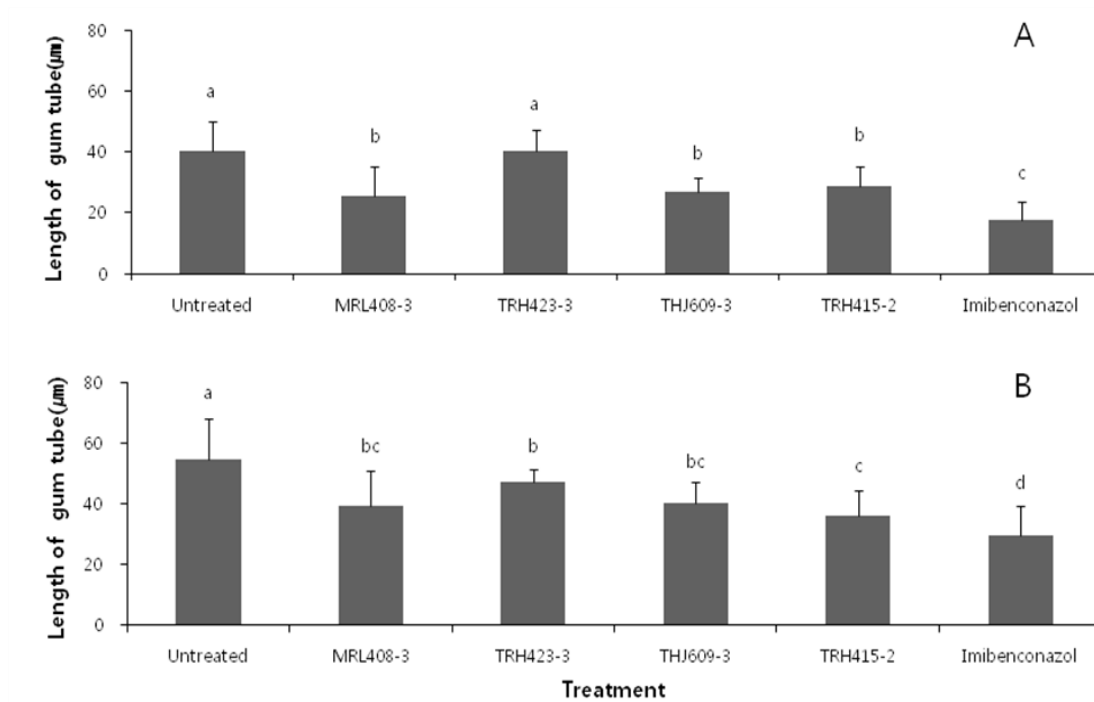


Fig. 6. Length of gum tube of *E. fawcettii* on Satsuma mandarin leaves untreated, pre-inoculated with the rhizobacterial strains *B. gladioli* MRL408-3, TRH423-3, *P. fluorescens* THJ609-3, TRH415-2 and commercial fungicide Imibenconazole at 3 (A) or 5 (B) days after inoculation with *Elsinoe fawcettii*. The concentration of the pathogen, the rhizobacteria and the fungicide were 4.0×10^6 conidia/ml, 2.0×10^7 cfu/ml and 0.5 g/L, respectively.

3. 감귤더듬이병에 대한 감귤 품종 별 저항성 검정

감귤 품종 별 감귤더듬이병에 대한 저항성을 검정하기 위하여 제주특별자치도 농업기술원에서 육종된 4가지 감귤 품종과 대조구로서 사용된 온주밀감에 감귤 더듬이병균을 접종하였다. 병반은 접종 후 대조구를 포함한 5개의 품종 모두 5-7일 사이에 발병하기 시작 하였으며 병 증상으로는 감귤 잎 뒷면이 조금씩 패이고 갈변하였다. 20일 동안 관찰해본 결과 감수성품종인 온주밀감의 잎은 병 진전이 많이 되었으며, 나머지 4개의 품종에서는 대조구에 비해 병이 덜 진전 된 것을 확인하였다.

각 품종의 잎의 병반을 계수해본 결과 대조구인 온주밀감에서 병반수가 평균 174개로 가장 많이 발생하였으며, 주건 품종에서 평균 4개의 병반을 형성함으로써 감귤 더듬이병에 가장 저항성을 나타내었다. 또한 프로스트 유레카, 지각, 워싱턴네블 순으로 감귤더듬이병에 저항성을 나타내었다.

그러나 이러한 저항성 품종에 대한 포장 실험은 아직 실시하지 않았기 때문에 농가에 적용하기 위해서는 앞으로의 많은 연구가 보충되어야 한다. 국내에서 토마토의 경우에는 *Ralstonia solanacearum*에 의한 풋마름병 방제를 위해 저항성 품종의 사용이 해결책으로 제시되어 많은 품종들이 개발되어 있으며, 품종 초기에는 저항성을 보이는 품종이 개발된 후 품종에 맞게 병원균이 돌연변이를 일으켜 다시 병원성을 획득하게 되는 이유로 품종 별 저항성 검정이 이루어 지고 있다(Han 등, 2009). 이와 마찬가지로 감귤에서도 더 많은 저항성 품종 개발과 품종 별 저항성 검정이 지속적으로 이루어져야 한다고 사료된다.

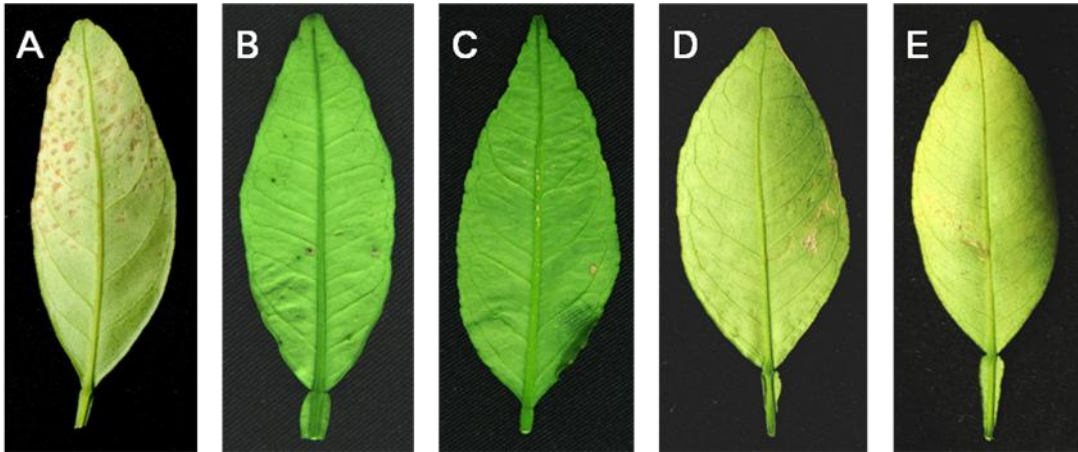


Fig. 7. Varied cultivar leaves of citrus observing disease development at 20 days after fungal inoculation with *E.fawcettii*. (A) Satsuma mandarin, (B) Jigak, (C) Frost eureka, (D) Washington navel, (E) Jugyeon. The concentraion of the pathogen were 3.5×10^5 conidia/ml.

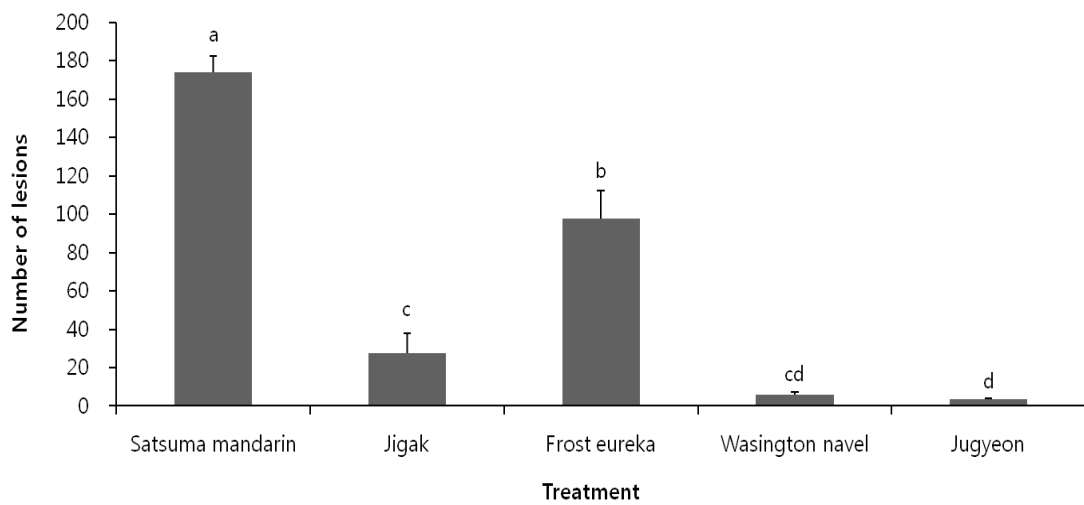


Fig. 8. Number of lesions on Varied cultivar leaves of citrus at 20 days after fungal inoculation with *E. fawcettii*. The concentration of the pathogen were 3.5×10^5 conidia/ml.

IV. 적 요

*Elsinoe fawcettii*는 감귤에 더뎡이병을 일으킴으로써 감귤산업에 매우 중요한 병중 하나이다. 이 병은 감귤 과실의 표면에 딱딱한 돌기를 형성하여 과실의 품질과 경제적인 가치를 떨어뜨린다. 이러한 감귤 더뎡이병은 다른 감귤병과 같이 화학적 살균제에 의해 주로 방제 되어왔다. 최근 안전한 생산물에 대한 관심이 늘어남 따라 화학적 방제의 대안이 요구되고 있다. 이러한 대안으로 항진균효과가 있는 식물근권세균을 이용한 생물학적 방제와, 저항성 품종을 선택하는 경종적 방제 방법이 있다. 본 실험에서는 항진균효과가 입증된 식물근권세균 *Burkholderia gladioli* MRL408-3, TRH423-3, *Pseudomonas fluorescens* THJ609-3, TRH415-2는 온주밀감의 잎 표면에서 감귤 더뎡이병을 억제 시켰다. *Elsinoe fawcettii*의 억제기작을 확인하기 위하여 4가지 식물근권세균을 전 처리한 Satsuma mandarin 감귤 잎을 감귤 더뎡이병균을 접종한 후 주사 전자 현미경을 이용하여 관찰하였다. 식물근권세균을 전 처리한 잎에서 무처리한 잎에 비해 감귤 더뎡이병의 병반수가 감소되었다. 특히 *B. gladioli* MRL408-3 균주를 전 처리한 식물에서 감귤 더뎡이병의 병반수가 뚜렷하게 억제되었다. 주사전자현미경을 통해 관찰 결과 식물근권세균을 전 처리한 감귤 잎 표면에서 병원균의 발아율과 발아관의 길이가 감소되는 것을 확인 하였다. 시판 농약인 Imibenconazole 수화제를 전 처리한 잎에서 감귤 더뎡이병균의 성장이 가장 뚜렷하게 억제되었는데 이는 병반수가 가장 적게 형성된 것과 상통한다. 이들 결과를 통하여 식물근권세균에

의해 감귤 잎 표면에서 감귤 더듬이병균의 발아와 생장이 억제되고 그 결과 감귤 더듬이병의 발생이 감소되는 것으로 판단된다. 또한 감귤더듬이병에 대해 감귤 품종 별 저항성 검정을 위해 지각, 프로스트 유레카, 워싱턴네블, 주건의 품종과 대조구인 온주밀감에 *E. fawcettii*를 접종한 결과 온주밀감과 비교하여 4가지 모든 품종에서 유의적으로 병 발생이 억제 되었다. 특히 주건 품종에서 저항성을 크게 나타낸 반면에 프로스트 유레카 품종에서는 저항성 효과 가장 적게 나타난 것으로 확인되었다.

V. 참고 문헌

- Anelise, B., Adriana, A. and Luciane, M.P. P. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology*. 35: 1044-1051.
- 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: 161-165.
- Bloemberg, G. V. and Lugtenberg, B. J. J. 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 343-350.
- Bolwerk, A., Lagopodi, A. L., Wijfjes, A. H. M., Lamers, G. E. M., Chin.A-Woeng, T. F. C., Lugtenberg, B. J. J. and Bloemberg, G. V. 2003. Interactions in the tomato rhizosphere of two *Pseudomonas* biocontrol strains with the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 11: 983-993.
- Cho, J. I., Cho, J. Y., Park, Y. S., Yang, S. Y. and Heo, B. G. 2007. Selection and identification of actinomyces, and its biological control effect against the bacterial blossom blight infected in kiwifruits. *Kor J Hort Sci Technol.* 25: 235-240.
- Cooksey, D. A. and Moore, L. W. 1982. Biological control of crown gall with

- an agrocin mutant of *Agrobacterium radiobacter*. *Phytopathology*. 72: 919–921.
- David, M. W. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu Rev. Phytopathol.* 26: 379–407.
- de Weert, S., Kuiper, I., Lagendijk, E. L., Lamers, G. E. M. and Lugtenberg, B. J. J. 2003. Role of chemotaxis toward fusaric acid in colonization of hyphae of *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* by *Pseudomonas fluorescens* WCS365. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16: 1185–91.
- Elad, Y. and Kapat, A. 1999. The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol.* 105: 177–189.
- Han, Y. K., Min, J. S., Park, J. H., Han, K. S., Kim, D. H., Lee, J. S. and Kim, H. H. 2009. Screening of tomato cultivars resistant to bacterial wilts. *Res. Plant Dis.* 15: 198–201.
- Hayat, M. A. 1989. Chemical fixation, pp. 1–78. Principles and techniques of electron microscopy. Biological applications, 3rd ed. The Macmillan Press LTD.
- Hyun, J. W., Ko, S. W., Kim, D. H., Han, S. G., Kim, K. S., Kwon, H. M., Lim, H. C. 2005. Effective Usage of Copper Fungicides for Environment-friendly Control of Citrus Diseases. *Res. Plant Dis.* 11: 115–121.
- Hyun, J. W., Timmer, L. W., Lee, S. C., Yun, S. H., Ko, S. W. and Kim, K. S. 2001. Pathological characterization and molecular analysis of *Elsinoe*

- isolates causing scab diseases of citrus in Jeju isolates in Korea. *Plant Dis.* 85: 1013–1017.
- Idris, E. S. E., Iglesias, D. J., Talon, M. and Borriss, R. 2007. Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by bacillus *amyloliquefaciens* FZB42. *Mol Plant Microbe Interact.* 20: 619–626.
- Kamilova, F., Lamers, G. and Lugtenberg, B. 2008. Biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS365 inhibits germination of *Fusarium oxysporum* spores in tomato root exudate as well as subsequent formation of new spores. *Environ. Microbiol.* 10: 2455–61.
- Kang, S. Y. and Jeun, Y. C. 2012. Suppression effect of white rot by bacterial isolates from plant rhizosphere in garlic plants. *Korean J Organic Agri.* 28(1): 25–32. (in Korean).
- Kim, S. G., Zakaullah, K., Jeon, Y. H. and Kim, Y. H. 2009. Inhibitory effect of *Paenibacillus polymyxa* GBR-462 on *Phytophthora capsici* causing *phytophthora* blight in chili pepper. *J. Phytopathol.* 157: 329–337.
- Kim, S. Y., Hyun, J. W. and Jeun, Y. C. 2011. Suppression effect and mechanism of citrus scab in the citrus pre-inoculated with rhizobacterial strains. *Res. Plant Dis.* 17: 302–310. (in Korean)
- Kim, Y. K., Hong, S. J., Shim, C. K., Kim, M. J., Choi, E. J., Lee, M. H., Park, J. H., Han, E. J., An, N. H. and Jee, H. J. 2012. Functional analysis of *Bacillus subtilis* isolates and biological control of red pepper powdery mildew using *Bacillus subtilis* R2-1. *Res. Plant Dis.* 18: 201–209. (in

Korean)

- 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.
- Ko, Y. J., Kang, S. Y. and Jeun, Y. C. 2012. Suppression of citrus melanose on the leaves treated with rhizobacterial strains after inoculation with *Diaporthe citri*. *Res. Plant Dis.* 18: 331–337.
- Lahlali, R., Peng, G., McGregor, L., Gossen, B. D., Hwang, S. F. and McDonald, M. 2011. Mechanisms of the biofungicide Serenade (*Bacillus subtilis* QST713) in suppressing clubroot. *Biocontrol Sci. Technol.* 21: 1351–1362.
- 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 fungal plant pathogens. *Micobiology.* 31: 251–254.
- Manjula, K., Krishna Kishore, G., Girish, A. G. and Singh, S. D. 2004. Combined application of *Pseudomonas fluorescens* and *Trichoderma viride* has an improved biocontrol activity against stem rot in groundnut. *Plant Pathol. J.* 20: 75–80.
- Michaud, J. P. and Grant A. K. 2003. Sub-lethal effects of a copper sulfate fungicide on development and reproduction in three coccinellid. *Journal of Insect Science.* 3: 1–6
- Nam, M. H., Choi, J. P., Kim, H. J., Lee, J. J., Lim, K. H., Kim, Y. G., Kim, H.

- T. and Jeun, Y. C. 2010. Controlling activity of *Bacillus subtilis* KB-401 against cucumber powdery mildew caused by *Sphaerotheca fusca*. *Korean J Pestic Sci.* 14(1): 49–53. (in Korean)
- Park, K. S. 2000. Biological Control of vegetable diseases by Rhizobacteria. *Korean J Organic Agri.* 6: 93–105 (in Korean)
- Oh, H. J., Seo, I. S., Jin, S. C. 2005. Effects of agricultural chemicals on *Elsinoe fawcettii* of Citrus fruits. In Reports of IPM Technology Development, pp. 53–58 (in Korean)
- Okon, Y., Bloemberg G.V., Lugtenberg, B.J.J. 1998. Biotechnology of biofertilization and phytostimulation. In Agricultural Biotechnology, ed. by A. Altman, pp. 327–349. Marcel Dekker, New York, USA.
- Raaijmakers, 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.
- Rangarajan, S., Saleena, L. M., Vasudevan, P. and Nair, S. 2003. Biological suppression of rice disease by *Pseudomonas* spp. under saline soil conditions. *Plant Soil.* 251: 73–82.
- 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.
- Song, M., Yun, H. Y. and Kim, Y. H. 2014. Antagonistic Bacillus species as a biological control of ginseng root rot caused by *Fusarium* cf.

- incarnatum*. *J. Ginseng Res.* 38: 136–145.
- Tian, S. P., Fan, Q., Xu, Y. and Jiang, A. L. 2002. Effects of calcium on biocontrol activity of yeast antagonists against the postharvest fungal pathogen *Rhizopus stolonifer*. *Plant pathology*. 51: 352–358.
- 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. and Zitko, S. E. 1996. Evaluation of copper fungicides and rates of metallic copper for control melanose on grapefruit in Florida. *Plant Dis.* 80: 166–169.
- Validov, S. Z., Kamilova, F. and Lugtenberg, B. J. J. 2009. *Pseudomonas putida* strain PCL1760 controls tomato foot and root rot in stonewool under industrial conditions in a certified greenhouse. *Biological Control*. 48: 6–11.
- Weller, D. M. 1988. Biological control of soilborn plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu. Rev. Pathol.* 13: 129–131.
- Wisniewski M, Droby S, Chalutz E, Eilam Y, 1995. Effects of Ca²⁺ and Mg²⁺ on *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* in vitro and on the biocontrol activity of *Candida oleophila*. *Plant Pathol.* 44: 1016–24.
- Yang, J. S., Kang, S. Y. and Jeun Y. J. 2014. Suppression of citrus canker by pretreatment with rhizobacterial strains showing antifungal activity. *Res. Plant Dis.* 20: 1–6. (in Korean)

감사의 글

짧다면 짧고 길다면 길 수 있었던 실험실 생활은 많은 사람들을 만나고 여러 경험을 통해 조금 더 성숙할 수 있는 뜻 깊은 시간이었습니다. 그 시간은 앞으로 어디에서도 경험하지 못할 특별한 추억으로 남을 것 같습니다. 실험실 생활을 하면서 어려운 점도 있었지만 많은 분들의 아낌없는 격려와 응원으로 이 논문을 완성할 수 있었습니다. 이 논문이 나오기까지 많은 도움을 주신 분들께 짧게나마 감사의 인사를 전하고자 합니다.

한없이 부족한 저를 위해 충고와 조언을 아끼지 않으시고 끊임없는 관심과 믿음으로 보듬어 주시며 이 자리까지 이끌어 주신 전용철 교수님께 고개 숙여 깊이 감사 드립니다. 바쁘신 가운데도 논문 심사를 맡아주신 현해남 교수님, 김동순 교수님께 진심으로 감사 드립니다. 또한 학부생 시절부터 항상 관심을 가져 주시고 격려하여 주신 강영길 교수님, 송창길 교수님, 김주성 교수님께도 진심으로 감사의 마음을 전합니다.

학부과정과 대학원 석사과정을 거치는 동안 실험실의 어머니 역할을 해주시며 많은 조언으로 도움을 주셨던 고평열 박사님께 정말 감사 드립니다. 그리고 오랜 실험실 생활 동안 또 다른 가족이 되어 힘을 주고 많은 도움을 주었던 우리 실험실 식구들 순열 선생님, 운주 선생님, 윤정이 누나, 경남이형, 지순이, 승학이, 용호, 은주, 실험실 동기이자 좋은 친구가 되어준 민아에게 미안한 마음과 고마운 마음을 함께 전합니다.

마지막으로 항상 걱정만 끼쳐 드렸지만 격려와 응원을 아끼지 않았던 사랑하는 아버지, 어머니, 누나를 비롯한 모든 식구들과 못난 손자 사랑으로 보듬어 주신 할아버지, 할머니께 감사와 사랑을 전하며 이 논문을 바칩니다.