

최 종  
연구보고서

감귤 수출증대와 오렌지류 수입제어를  
위한 궤양병 예찰방제체계 개발 및  
병원유전학적 특성 구명

Disease forecasting system  
for citrus canker and genetic diversity  
of *Xanthomonas smithii* pv. *citri* in Jeju Island

서울대학교  
난지농업연구소  
농업과학기술원  
(주)에피넷

농림수산식품부

# 제 출 문

농림수산물식품부 장관 귀하

본 보고서를 “감귤 수출증대와 오렌지류 수입제어를 위한 궤양병 예찰방제체계 개발 및 병원유전학적 특성 구명에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008년 4월 24일

주관연구기관명 : 서울대학교

총괄연구책임자 : 박 은 우

세부연구책임자 : 박 은 우

연 구 원 : 강 위 수

연 구 원 : 도 기 석

연 구 원 : 이 인 정

협동연구기관명 : 난지농업연구소

협동연구책임자 : 현 재 옥

협동연구기관명 : 농업과학기술원

협동연구책임자 : 이 용 훈

위탁연구기관명 : (주)에피넷

위탁연구책임자 : 한 용 규

# 요 약 문

## I. 제목

감귤 수출증대와 오렌지류 수입제어를 위한 궤양병 예찰방제체계 개발 및 병원유전학적 특성 구명에 관한 연구

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구개발의 목적은 감귤 및 오렌지류 수출입시 중요한 검역대상 병인 감귤궤양병의 발생생태와 병원균의 병원학적 특성을 규명하여 환경 친화적이며 효과적인 방제체계를 개발하고, 국내에서 발생하는 병원균과 오렌지 수출국에서 발생하는 병원균의 병원유전학적 특성을 구분함으로써 수출용 감귤 생산기반을 강화하고, 수입 오렌지류 검역에 필요한 과학적 근거를 확보하는 것이다.

이 연구개발의 필요성은 기술적 측면, 경제-산업적 측면, 사회-문화적 측면에서 살펴볼 수 있다. 기술적 측면으로서 궤양병 방제체계상의 문제점, 궤양병 방제약제의 문제점, 오렌지류 검역상의 문제점이 나타나고 있다. 2003년부터는 대미 수출관리요령이 매우 강화되어 궤양병으로 인한 검역상의 문제로 인한 경제-산업적 측면으로서의 어려움이 나타나고 있는 실정이다. 마지막으로 사회-문화적 측면을 살펴보면 최근 웰빙 바람이 급격히 확산되고 있으며 이로 인한 안전한 친환경 농산물에 대한 소비자의 요구가 급증하고 있다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 감귤 수출증대와 오렌지류 수입제어를 위한 궤양병 예찰방제체계 개발 및 병원유전학적 특성 구명을 위하여 각각 세부와 위탁, 협동과제로 나누어 진행되었다. 제 1 세부과제는 감귤궤양병 발생생태 규명 및 예찰모형 개발을 주목표로 하여 감귤 잎 표면에서의 병원균의 생존과 생장에 미치는 환경요인의 영향 규명, *Xanthomonas smithii* pv. *citri* 감염에 의한 감귤 감수성 품종과 저항성 종에 따른 초미세구조적 반응 연구, 감귤 궤양병 발생 예찰 모형 개발을 연차적으로 연구하였다. 제 1 세부과제에서 위탁과제가 수행한 연구개발 내용은 감귤궤양병 발생 예측 정보제공 시스템 구현에 초점을 두어 군락기상 관측 및 자료 수집체계 구축, 제주도 전역 준 실시간 그물망 농업기상추정 및 관리체계 구축, 감귤 궤양병 발생 예측 서비스 시스템 구축을 수행하

였다. 제 1협동과제에서는 감귤퀘양병균의 항생제 저항성 생태 규명 및 환경 친화적 방제체계 개발에 목표를 두고 항생제 저항성 균의 생태 연구, 병 발생 및 구리피해 발생 현황 조사, 친환경적 방제 체계 개발, 농가에서의 실증을 통한 방제 체계 검정을 수행하였다. 마지막으로 제 2협동과제에서는 국내 감귤류 퀘양병균의 병원유전학적 특성 규명을 위하여 국내 분포하고 있는 감귤류 퀘양병균의 병원유전학적 다양성 분석 및 저항성 품종개발을 위한 국내 대표균주 선발을 위한 실험을 진행 하였다.

\*2차년도 서울대학교 연구목표는 월동 후 감귤 잎의 발육단계와 환경변화에 따른 잎 표면의 병원균 집단 동태 연구였지만 실험을 수행한 결과 기후와 환경, 감귤나무 잎의 위치와 각도에 따라 잎의 발육상태가 틀리기 때문에 잎의 발육단계를 구분 짓기가 불확실하고 이 실험을 수행하기가 어렵다는 결론을 내렸다. 그래서 연구목표를 *Xanthomonas smithii* pv. *citri* 감염에 의한 감귤 감수성 품종과 저항성 종에 따른 초미세구조적 반응 연구로 전환하였다.

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

감귤 퀘양병을 일으키는 *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (syn. *X. citripv. citri*, *X. campestris* pv. *citri*, *X. smithii* subsp. *citri*)를 분리하기 위하여 제주 16지역의 감귤원에서 채집한 감귤 잎의 병징에서 36개의 세균을 분리하였다. 총 105개의 감귤 잎을 침지 접종하고, 6단계의 온도 처리를 하였으며, 감귤 잎에서의 생균수를 측정하기 위해 생균수 계수법을 사용하였다. 또한, 방제 수단을 투입할 적절한 시기의 결정에 이용하기 위해 병원균의 배수기와 온도를 바탕으로 한 회귀식인 감염 위험도 모형을 개발하였다. 일정한 온도, 영양분 및 습윤한 조건에서 이분법에 의해 개체군의 크기가 이상적으로 증가한다고 가정하는 지수성장모형(exponential growth model)을 이용하여 퀘양병균 개체군의 성장을 모사하였다. 온도가 가변적인 포장 상태에서 영양분 및 수분 등의 조건이 충분하게 주어진다고 가정하고, 퀘양병균 개체군의 크기를 모사하기 위하여, 모형을 이전 시간의 개체군 크기를 이용하여 현재 시간의 개체군의 크기를 계산할 수 있는 형태로 바꾸었다. 실제 포장에서는 수분 조건 또한 가변적이므로, 엽면습윤시간 을 이용한 형태의 모형으로 수정하였다. 지속적으로 건조한 조건이 유지되면 개체군이 사멸하거나 생리적인 활성이 매우 떨어지므로, 이 효과를 적용하기 위해 개체군의 초기 크기를 1로 설정하였다. 병원균이 감염된 후 잎에 병징이 나타나기까지의 잠복기간이 문헌에 나타난 연구결과에 따르면 20-30일 정도 걸린다. 따라서 모형에 의하여 추정된 개체군 크기값으로부터 일별로 30-20일 전 기간 동안의 개체군 크기값의 이동합(Moving sum of daily population size)을 구하여 이 이동합의 제곱근 값을 병원균의 일일 감염위험도(Daily Infection Risk)로 간

주하였다.

감귤 궤양병 예찰 모형의 평가를 위해 과수원 3곳에 무인기상관측기(CR10X, 캠벨사)를 설치하였고, 기존에 난지농업연구소에서 설치한 13지역의 군락기상자료 자동수집체계를 구현하였다. 제주도 감귤재배 전 지역의 예찰정보를 생성하기 위해서 기상청에서 관리하고 있는 무인기상기 22개를 이용하여 보간 방법에 의해 120m x 120m 격자 규모의 병 예찰에 필요한 기상자료를 추출하였다. 이렇게 추출된 기상자료를 바탕으로 감귤 궤양병 예찰 모형을 구동하고 지도기반의 서비스가 가능한 시스템을 구현하였다. 본 위탁과제에서는 감귤과원의 환경계측 시스템과 함께 기상청에서 제공하는 표준기상관측자료를 활용한 웹 기반의 감귤 궤양병 예찰 정보 시스템을 구현하였다. 실제 영농현장에서 활용하기 위해서는 서비스를 지속적으로 운영, 유지할 수 있는 기관으로의 이전이 필요하다.

감귤 궤양병 진전에 있어서 초미세구조적 측면을 투과전자현미경을 통하여 감수성종인 Mexican lime (*Citrus aurantifoli*) 과 저항성종인 Yuzu (*Citrus junos*)를 비교하였다. 멕시코 라임에서 세균의 침입은 일반적으로 기주 세포벽 변형과 세포 파괴를 동반하였으며 세포벽 분해로 인하여 나타나는 fibrillar materials 는 세포간극에서 흔히 발견되었다. 괴저된 세포질로 이루어진 손상된 기주 세포들은 침입하는 세균에 인접한 세포벽으로부터 원형질막의 균집된 분리를 보여주었다. 궤양은 과도한 세포 분열로 인한 기주 세포 수의 증가로 인하여 잎의 뒷면에서 진전되는 것을 보여주었고 세균 증식과 electron-transparent capsule-like structures로 둘러싸인 세균들을 일반적으로 볼 수 있었다. Mexican lime 의 기주 세포벽 바깥쪽에서는, 다른 전자밀도를 가진 추가된 층이 세균 세포들 근처에서 뚜렷이 보였으며, Mexican lime 과 Yuzu 둘 다를 침입하는 세균 세포들 안쪽에 봉입체들이 발견되었다. 유자 잎의 경우에는, 세포벽 돌기들이 침입하는 세균과 인접한 기주 세포벽 바깥쪽에 종종 형성이 되었고 인접한 두 기주 세포들로부터 비롯된 두 개 또는 그 이상의 개별 세포벽 돌기의 융합으로 인하여 세포간극 맞물림이(교합) 형성되었다. Papilla-like materials 는 세균에 근접하여 기주 세포 안쪽에 국부적으로 축적되었다. 몇 세균들은 xylem fiber cell에서 퇴화되어가는 것을 발견하였고, 쪼그라들고 비활동적인 세균들은 세포간극에서 electron-transparent fibrillar materials 에 의해 둘러싸여져 있었는데 이것은 세균의 고정화를 의미한다. 이와는 대조적으로, 감수성인 Mexican lime의 병든 조직의 세포간극은 온전하거나 증식된 세균들을 포함하고 있었다. 이 초미세구조적 실험 결과를 가지고 모델링에 적용을 할 수는 없었지만 이 실험을 토대로 감수성과 저항성 품종 간의 defense mechanism에 대한 이해를 넓혔으면 한다.

2005년부터 2007년까지 3년간 제주도 감귤 재배지의 64개 조사 포장에서의 감귤 궤양병 발병을 조사하여 본 결과 전체적으로 잎의 경우 0.6~2.9% 발병하였으며 열매의 경우 0.2~1.0%정도 감염된 것으로 조사되었다.

2007년도 궤양병에 매우 감수성이 높은 하귤과 자몽 잎에서의 병진전 상황을 조사해 본 결과 6월 중순경에 첫 병징이 나타나기 시작하여 7월 중순경까지 급격히 병이 진전되었다. 열매의 경우 7월 24일 이전에 병이 발생하기 시작하여 9월 초순경에 급격히 증가하였다.

제주도내 17개 과원에서 총 319개 궤양병균을 분리하여 스트렙토마이신과 황산구리에 대한 저항성여부를 배지내에서 조사해 본 결과 스트렙토마이신 저항성 균주는 71.2%인 227개 균주이었으며 구리 저항성 균주는 총 120개 균주 중에서 38.3%인 46개 균주이었다 (Table. 2).

제주도내에 있는 대부분의 스트렙토마이신 저항성 감귤궤양병균들은 플라즈미드 상의 str 유전자와 염색체 DNA상의 rpsL 유전자의 41번째 아미노산 염기서열이 AAG(lys)에서 AGG(arg)으로 돌연변이 되어 스트렙토마이신 저항성을 표현하는 것으로 추정된다. 또한 실내 실험에서 스트렙토마이신 감수성인 남균 87-27균주는 스트렙토마이신 저항성균주인 남균82-54균주와 혼합 배양을 통하여 3.3:1의 비율로 스트렙토마이신 저항성 균주로 전환되었음을 알 수 있었다. 감귤 궤양병을 방제하기 위한 자재로는 구리제가 가장 효과가 있었으나 구리제 살포 피해가 있어서 큰 문제가 되었다. 구리제 살포 피해는 고온기에 가장 심하였으며 기계유유제나 식물성 파라핀유를 혼합하여 살포하여 주면 그 피해를 경감시킬 수 있었다. 본 연구에서 개발된 감귤 궤양병 발생 예찰 프로그램을 통하여 방제시기를 결정하여 레몬 재배 농가에 방제를 실시한 결과 방제 횟수를 6회에서 5회로 경감시킬 수 있었지만 온주밀감에 적용시키기 위해서는 2회 내지 3회의 방제 프로그램 작성이 필요할 것으로 여겨진다.

감귤류에 궤양병을 일으키는 병원균을 수집 분리한 후 외국에서 도입한 대조균주와 병원형을 비교분석 하였다. 국내에서 분리한 감귤궤양병균은 자몽, 레몬, 스위트오렌지 및 온주밀감에 전형적인 궤양을 형성하며 병을 일으켜 *X. axonopodis* pv. *citri* A 형으로 판단되었다. ERIC과 BOX 및 REP PCR후 이들의 결과를 동시에 중첩분석한 결과 *X. a. pv. citrumelo*만을 포함하는 한 그룹과 *X. a. pv. citri*와 *X. a. pv. aurantifolii*를 포함하는 또 다른 그룹으로 구분이 가능하였는데, 두 번째 그룹에서는 *X. a. pv. citri* Asiatic type과 *X. a. pv. aurantifolii* B, C type간에 확연히 구분이 가능하였다. 16S rDNA의 시퀀스를 통하여 중첩분석을 실시한 결과 *X. a. pv. aurantifolii* B와 C type 및 *X. a. pv. citrumelo*는 99%의 유사도를 보이며 동일한 그룹을 형성하였다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 국내에 발생하는 궤양

병원균은 모두 *X. a. pv. citri* A type인 것으로 생각된다. 탄소원 이용정도 및 지방산 조성에 따라서도 궤양병원균의 병원형간 구분이 가능하였는데, 이들 중 몇 가지는 병원형을 구분하는데 중요한 요소로 이용될 수 있었으며, 95개의 탄소원 이용정도에 따라 증첩분석을 한 결과 *X. a. pv. citri* A, A\* 및 A<sup>w</sup> 형은 다른 병원형과 분명히 구분되었다. 병원균의 신속한 분류 동정은 검역에 있어 매우 중요한데, 병징의 확인 후 병원균의 동정까지 걸리는 시간을 절약하고, 신속 정확하게 병원형을 구분할 수 있는 방법을 개발하기 위해 다중 PCR법을 개발하였는데, 궤양병원균의 병원형 검출을 위한 적정 신장온도는 60°C였다. 또한 기존에 보고된 바가 없는 *X. a. pv. citri* A\*과 A<sup>w</sup> type 및 *X. a. pv. aurantifolii* B와 C type을 PCR을 통해 특이적으로 검출하기 위한 프라이머를 개발하였는데, 이는 향후 관련 병원형 검출에 긴요하게 사용될 수 있을 것이다.

# SUMMARY

## I . Title

Disease forecasting system for citrus canker and genetic diversity of *Xanthomonas smithii* pv. *citri* in Jeju Island

## II . Background and Objectives

Tangerines are important as an income source for citrus growers in Jeju Island of Korea. In order to increase income from tangerines, Korea has been making a great deal of efforts to export tangerine to USA, Canada, and other countries in the world. Two major aspects that need to be emphasized in Korea are the environmentally friendly production systems with a minimum use of chemicals to protect citrus plants from diseases and insect pests, and appropriate quarantine technologies for identifying pathogens that may be introduced from or exported to foreign countries along with citrus fruit trades. Currently, citrus canker caused by *Xanthomonas smithii* pv. *citri* is one of the major diseases that causes serious losses in fruit production in quantity and quality. It is also an important disease that draw attentions in the quarantine systems of many countries in the world. The objectives of this study are (i) to develop a disease forecasting system to determine infection risks based on weather data. The forecasting system is expected to be used as a decision making-support system for determining when to spray chemicals to control the bacterial disease; (ii) to establish a disease management system for citrus orchards that can manage citrus canker in environmentally friendly manners without using antibiotics; and (iii) to identify genetic background of *X. smithii* pv. *citri* found in Jeju Island, and distinguish the Korean isolates from strains originated from foreign countries. The genetic data can be used in the quarantine systems to safeguard the citrus production in Korea from risks of foreign strains that may be introduced along with oranges and other citrus fruits produced in foreign countries.

## III. Contents and Scope

This research was conducted for three years by three teams. The contents and scopes of research by each team were as followings:



1. The project led by Eun Woo Park in Seoul National University:

- ①Influence of environmental factor to pathogen survival and growth on the surface of citrus leaf
- ②Development of disease forecast model for citrus canker based on weather data
- ③Ultrastructural study on responses of susceptible and resistant species of *Citrus* to infection by *Xanthomonas smithii* pv. *citri*

2. The project led by Yong Kyu Han in Epinet Co.

- ①Development of weather data acquisition system using automated weather stations
- ②Development of agricultural weather data management system generating near real-time data at high spatial resolution
- ③Development of disease forecasting system for citrus canker at farm-based scale

3. Project led by Jae Wook Hyun in National Institute of Subtropical Agriculture

- ①Understand of mechanisms of streptomycin resistance of citrus canker pathogen (*Xanthomonas smithii* subsp. *citri*) in Jeju Island
- ②Diminishment method of copper spray injury and the mechanism
- ③Development environmentally-friendly control system of citrus canker disease

4. Project led by Yong Hoon Lee in National Institute of Agricultural Science and Technology

- ①Diversity of *Xanthomonas smithii* pv. *citri* by host range and physiochemical characteristics
- ②Genetic diversity of *Xanthomonas smithii* pv. *citri* strains
- ③Analysis of diversity in *pthA* gene and virulence of *Xanthomonas smithii* pv. *citri*
- ④Development of multiplex PCR methods for differentiation of pathotypes
- ⑤Design of specific primers for pathotype detection

## IV. Results and Applications

Asiatic citrus canker (ACC), which is caused by *Xanthomonas smithii* pv. *citri* (syn. *X. campestris* pv. *citri*, and *X. axonopodis* pv. *citri*), is one of the most damaging diseases of several citrus species. Although effective chemicals such as antibiotics and copper compounds are available to control the disease, their effectiveness varies depending on when to spray. Consequently, determination of daily infection risks

would be of importance to achieve successful management of the disease in citrus orchards. The objectives of this study were (1) to investigate growth response of *X. smithii* pv. *citri* on citrus leaves to temperature, and (2) to develop a disease forecasting model to predict risk levels of infections based on weather conditions. A rifampicin-resistant mutant, rx31, was obtained by screening for spontaneous mutants from a wild type isolate, xj31, collected from Jeju Island in 2005. By using bacterial identification methods including physiological tests, the BIOLOG and FAME analyses, and the 16S rDNA sequence analysis, both rx31 and xj31 were determined to have typical characteristics of *Xanthomonas smithii* pv. *citri*. Both isolates also showed similar growth rates on the LB medium, suggesting that both isolates may have similar growth behavior. Growth response of epiphytic population of rx31 on detached leaves to temperature was measured in terms of doubling time, and could

$$g = 130.42 - 9.34 \text{temp} + 0.17 \text{temp}^2$$

be described as  $(R^2=0.90)$ , where  $g$  and  $t_{emp}$  are doubling time and temperature, respectively. Using the doubling time model, an exponential growth model was derived as  $N_t = N_0 \frac{2^t}{g}$ , where  $N_0$  and  $N_t$  are the population size at time 0 and t, respectively. From this equation,  $N_t = N_0 \frac{2^t}{g} - 1$ .

Since  $N_t$  indicates the amount of inoculum available, we propose that infection risk (IR) would be proportional to  $N_t$ . The infection risk model was evaluated using observed weather and disease data collected from the experiment field plots in 2005-2007. With consideration of rain events and the post-infection latent period of 20-30 days, the estimated IR could explain citrus canker development at the experimental orchard in Jeju Island.

We developed a web-based disease forecasting system (<http://citrus2.epinet.co.kr>) to provide citrus growers with disease forecast information that can be used for determining spray schedule for individual citrus orchards in Jeju Island. The input variables for disease forecast are hourly temperature and leaf wetness period. The weather data used in the forecasting system were collected hourly from 22 locations in Jeju by automated weather stations of Korea Meteorological Administration. The system generates weather maps of Jeju by geospatial interpolation at the spatial resolution of 120m x 120m. Using the weather maps, the system also generates hourly infection warning maps of citrus canker at the same spatial resolution as the weather maps. The warning has four distinct levels representing levels of infection

risks. The system delivers hourly maps of air temperature, rainfall, and the infection warning maps through the web map interface upon users' requests. It also provides users with the time series data of weather and disease forecast information of any point locations on the map.

Ultrastructural aspects of citrus canker development were investigated in citrus leaves by transmission electron microscopy. A susceptible species Mexican lime and a resistant species Yuzu were spray-inoculated with a strain of *Xanthomonas smithii* pv. *citri*. Initial symptoms occurred on Mexican lime 9 days after inoculation, whereas they were found on Yuzu 11 days after inoculation. In Mexican lime, the bacterial invasion was usually accompanied by host cell wall modifications and cellular disruption. Fibrillar materials from cell wall degeneration were usually found in intercellular spaces. Damaged host cells with necrotic cytoplasm showed the localized separation of plasma membrane from the cell wall adjacent to invading bacteria. It was common to observe bacterial multiplication and electron-transparent capsule-like structures around bacteria. In Yuzu, cell wall protuberances formed outside host cell walls. Occlusion of intercellular spaces was also formed by fusion of two or more individual cell wall protuberances originated from two adjacent host cells. Papilla-like materials accumulated locally within host cells in close proximity to bacteria. Some bacteria were found to be undergoing degeneration in xylem fiber cells. Also, the shrunken, inactive bacteria were surrounded by electron-translucent fibrillar materials in intercellular spaces, implying bacterial immobilization. Such cellular responses are thought to be consequences of defense-responses of Yuzu to invading bacteria.

By survey in 64 citrus orchards in Jeju Island for 3 years (2005 to 2007), the canker disease mainly occurred in west and east area in Jeju Island, and the rate of diseased fruit and leaf was 0.2 to 1.0% and 0.6 to 2.9%, respectively. The disease progress was surveyed on Natsudaidai and grapefruit. The disease symptoms were produced in middle of June, the progress was rapidly increased in middle of July and early of Sept in case of leaves and fruits, respectively. Two hundred twenty seven isolates were resistant to streptomycin and 46 isolates were to copper among 319 isolates from 17 citrus orchards in Jeju Island. We knew that most of streptomycin resistant isolates in Jeju Island were expressed the resistance by *str* gene

on plasmid and point mutation that alters codon lysine (AAG)-41 of *rpsL* gene in chromosome to arginine (AGG).

Copper was the most effective to control of canker disease but restrictive for copper spray injury. The injury was diminished by tank mixing with paraffin oil such like oils from plants or petroleum. The control was effective in lemon cultivating orchard by forecasting model for incidence of canker disease but we think we should diminish 2 or 3 times of spraying schedule for Satsuma mandarin cultivating orchard.

New *Xanthomonas* isolates causing citrus bacterial canker in Korea were differentiated primarily on the basis of host range by comparison with reference strains. The new isolates were pathogenic to *Citrus sinensis*, *C. paradisi*, *C. limon* and *C. unshiu* and formed crater like canker on the plants, which indicating that they are *X. axonopodis* pv. *citri* A types. Cluster analysis by combining the band patterns of ERIC, BOX and REP-PCR clearly separated one group including only *X. a.* pv. *citrumelo* and the other group including *X. a.* pv. *citri* and *X. a.* pv. *aurantifolii* strains. There was a clear separation between *X. a.* pv. *citri* Asiatic types and *X. a.* pv. *aurantifolii* B, C types in the second group. Partial sequence analysis of 16S rDNA revealed that all of the strains of *X. a.* pv. *aurantifolii* B and C type, and *X. a.* pv. *citrumelo* formed a distinct cluster with similarity of 99%. These results indicate that the isolates causing citrus canker in Korea belong to the A type of *X. a.* pv. *citri*. The pattern of several carbon source utilizations and fatty acid composition reliably discriminated the pathotype of citrus bacterial canker and *X. a.* pv. *citrumelo*. The dendrogram which was constructed by 95 carbon source utilization profiles differentiated *X. a.* pv. *citri* A, A\* and A<sup>w</sup> from other pathotypes. When the dendrogram was drawn by combined analysis of carbon source utilization pattern and fatty acid composition, *X. a.* pv. *aurantifolii* B, C and *X. a.* pv. *citrumelo* formed a distinct cluster. Accurate identification of the symptoms and causal bacterium is crucial in a quarantine situation. Compared to more laborious, sophisticated and expensive protocols, here we provide a more simple multiplex PCR method. The optimum conditions for the detection of *Xanthomonas* pathogens are presented with 60°C of annealing temperature. The multiplex PCR developed in this study is suitable for monitoring pathotypes in a very short time. And the specific primer set can be used for the detection of pathotypes of the *Xanthomonas* pathogens.

# CONTENTS

Chapter 1. Background .....	23
Section 1. Background and Objectives .....	23
Section 2. Scope .....	25
Chapter 2. Internal and external Current Research Trends .....	26
Chapter 3. Contents and Results .....	28
Section 1. Ecology of citrus canker and development disease forecasting models .....	28
1. Isolation and Identification of pathogen on citrus leaves .....	28
가. Materials and methods .....	28
1) Isolation and Identification of citrus bacterial canker strains .....	28
2) Screening of GFP-tagged mutant by Tn5 .....	28
3) Screening of rifampicin resistant bacteria by spontaneous mutation .....	28
나. Results and Discussion .....	29
1) Identification of bacterial strains and their pathogenicity .....	29
2) Difference growth rate of GFP-tagged mutant .....	30
3) Difference growth rate of rifampicin resistant bacteria .....	32
2. Study the influence of environmental factor to pathogen survival and growth .....	33
가. Materials and methods .....	33
1) Survey of pathogen doubling time by temperature .....	33
나. Results and Discussion .....	34
1) Development of doubling time model .....	34

3. Structural study on leaf surface by growth stage .....	36
가. Materials and methods .....	36
1) Measurement of new leaf size .....	36
2) Sampling for microscopy .....	36
나. Results and Discussion .....	36
1) Leaf size .....	36
2) Structural changes on citrus new leaf .....	37
3) Measurement of cuticle thickness .....	38
4) Measurement of number of stoma .....	40
4. Ultrastructural study on response of susceptible and resistant species of Citrus to infection by <i>Xanthomonas smithii</i> pv. <i>citri</i> .....	41
가. Materials and methods .....	41
나. Results and Discussion .....	42
1) Light micrograph of citrus canker lesion .....	42
2) Ultrastructural differences between Mexican lime and Yuzu leaf .....	43
5. Epidemiological survey of citrus canker occurrence on orchards .....	47
6. Development of disease forecasting model for citrus canker .....	48
가. Development infection risk model based on exponential growth model .....	48
나. Valuation of model .....	49
<b>Section 2. Development of disease forecasting system for Citrus canker .....</b>	<b>53</b>
1. Microclimate observation by AWSs and development of weather data acquisition system .....	53
가. Materials and methods .....	53
1) Real-time weather observation by automated weather stations in Citrus orchards ..	53
2) Automatic weather data acquisition system .....	55
나. Results and Discussion .....	55
1) Weather observation and data acquisition system .....	55
2) Web service system providing microclimatic weather data .....	57

2. Development of near real-time agricultural mesh weather estimation and management system .....	59
가. Materials and methods .....	59
1)KMA synoptic weather data acquisition system .....	59
2)Mesh weather estimation based on spatial interpolation .....	59
나. Results and Discussion .....	60
1)Estimated mesh weather map of Jeju Island using AWS weather data .....	60
3. Development of Citrus canker disease forecasting system .....	62
가. Materials and methods .....	62
1)Management system for Citrus diseases and insect pest survey data and online community .....	62
2)Development of site-specific forecasting system for citrus canker disease .....	62
나. Results and Discussion .....	62
1)Survey data management system and community space for sharing farming knowledge .....	62
2)Development and management of site-specific forecasting system for citrus canker disease .....	64

### Section 3. Mechanisms of streptomycin resistance of citrus canker pathogen and development of environmenatly-friend control system .....

1. Incidence of citrus canker disease in Jeju Island .....	67
2. Progressive curve of citrus canker disease .....	68
3. Ecology and mechanisms of streptomycin resistance of citrus canker pathogen .....	69
3-1. Degree of distribution of streptomycin resistance of citrus canker pathogen and cross resistance with copper .....	69
가. Materials and methods .....	69
나. Results and Discussion .....	69
3-2. Mechanisms of streptomycin resistance .....	71
가. Materials and methods .....	71
1) <i>Str</i> gene .....	71

2)Point mutation of <i>rpsL</i> gene on chromosome .....	72
3)Aquisition of streptomycin resistance .....	72
나. Results and Discussion .....	72
1) <i>Str</i> gene .....	72
2)Point mutation of <i>rpsL</i> gene on chromosome .....	73
3)Aquisition of streptomycin resistance .....	74
4. Copper spray injury .....	76
4-1. Degree of copper spray injury according to copper products .....	76
가. Materials and methods .....	76
나. Results and Discussion .....	77
4-2. Diminishment of copper spray injury by mixing with paraffin oil .....	79
가. Materials and methods .....	79
나. Results and Discussion .....	79
5. Environment-friendly management of citrus canker disease .....	82
가. Materials and methods .....	82
나. Results and Discussion .....	82
6. Management system of citrus canker disease in farm .....	85
가. Materials and methods .....	85
나. Results and Discussion .....	85

## Section 4. Pathological genetic characteristics of citrus bacterial canker in Korea .....

1. Analysis of diversity of citrus bacterial canker pathogens by host range and physiochemical characteristics .....	87
가. Materials and Methods .....	87
1)Isolation and Identification of citrus bacterial canker strains .....	87
2)Host range test .....	89
3)Analysis of carbon source utilization .....	89
4)Analysis of fatty acid composition .....	89
나. Results and Discussion .....	89
1)Identification of bacterial strains and their pathogenicity .....	89



2) Differentiation of pathotypes by host range .....	90
3) Difference of carbon source utilization .....	91
4) Difference of fatty acid composition .....	91
5) Fingerprinting analysis by carbon source utilization and fatty acid composition .....	92
2. Genetic diversity of citrus bacterial canker strains .....	94
ㄱ. Materials and Methods .....	94
1) Isolation of genomic DNA .....	94
2) PCR conditions for ERIC-, BOX- and REP-PCR .....	94
3) Analysis of rep-PCR .....	95
4) Analysis of 16S rDNA .....	95
ㄴ. Results and Discussion .....	96
1) Fingerprinting analysis of citrus bacterial canker strains by rep-PCR .....	96
2) Genetic relatedness by analysis of 16S rDNA .....	99
3. Analysis of diversity on <i>pthA</i> gene and virulence .....	100
ㄱ. Materials and Methods .....	100
1) Pathogenicity test .....	100
2) Southern hybridization .....	100
3) Isolation of plasmid .....	101
ㄴ. Results and Discussion .....	101
1) Analysis of pathogenicity difference .....	101
2) Diversity of <i>pthA</i> gene .....	103
4. Development of multiplex PCR methods for differentiation of pathotypes .....	106
ㄱ. Materials and Methods .....	106
1) Bacterial strains and gDNA isolation .....	106
2) Primers and PCR conditions .....	107
3) Whole cell PCR .....	108
ㄴ. Results and Discussion .....	109
1) PCR conditions for multiplex PCR and specificity of the primers .....	109
2) Detection and differentiation of pathotypes by multiplex PCR .....	110
3) Whole cell PCR and assessment of detection limit .....	111
5. Design of specific primers for pathotype detection .....	111

가. Materials and Methods .....	111
1)Bacterial strains and culture conditions .....	111
2)Primers and PCR conditions .....	112
3)Whole cell PCR and detection limit .....	113
나. Results and Discussion .....	113
1)Detection limit of the specific primers .....	113
2)Detection of the specific primers .....	117
 Chapter 4. Achievement and Contribution to related field ...	118
 Chapter 5. Future Application of Results .....	119
 Chapter 6. A Collection of Global technology information ...	120
 Chapter 7. References .....	120

# 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	23
제1절 연구개발의 목적 및 필요성 .....	23
제2절 연구범위 .....	25
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	26
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과 .....	28
제 1 절 감귤 궤양병 발생 생태 규명 및 예찰모형 개발 .....	28
1. 감귤 잎 표면에서의 병원균의 분리 및 동정 .....	28
가. 재료 및 방법 .....	28
1) 궤양병균 분리 및 동정 .....	28
2) Tn5를 이용한 GFP-tagged mutant 선발 .....	28
3) 자연돌연변이(spontaneous mutation)를 통한 rifampicin 저항성 mutant 선발 ..	28
나. 결과 및 고찰 .....	29
1) 균주 동정 및 병원성 시험 .....	29
2) GFP-tagged mutant의 growth rate 차이 .....	30
3) Rifampicin 저항성 mutant의 growth rate 차이 .....	32
2. 감귤 잎 표면에서의 병원균의 생존과 생장에 미치는 환경 요인의 영향 규명 .....	33
가. 재료 및 방법 .....	33
1) 잎 표면에서 온도에 따른 병원균의 doubling time 측정 .....	33
나. 결과 및 고찰 .....	34
1) Doubling time 모형 개발 .....	34
3. 월동 후 감귤 잎 발육에 따른 잎 표면의 미세구조 변화 연구 .....	36
가. 재료 및 방법 .....	36
1) 감귤잎 발육 단계 측정 및 샘플 채취 .....	36
2) 현미경 관찰을 위한 샘플 채취 및 방법 .....	36
나. 결과 및 고찰 .....	36

1) Leaf size .....	36
2) 감귤 잎의 미세구조 변화 .....	37
3) 큐티클 층 두께 측정 .....	38
4) 기공 수 측정 .....	40
4. 병원균 접종 후 감수성과 저항성 종에 따른 잎의 초미세 구조적 반응 연구 .....	41
가. 재료 및 방법 .....	41
나. 결과 및 고찰 .....	42
1) 궤양 병반 모습 .....	42
2) 접종 시 Mexican lime 과 Yuzu 잎의 초미세 구조적 차이 .....	43
5. 감귤원에서의 궤양병 발생 역학조사 .....	47
6. 실시간 기상자료를 이용한 감귤 궤양병 발생 예찰 모형 개발 .....	48
가. 지수성장모형에 기초한 감염 위험도 모형 개발 .....	48
나. 모형의 평가 .....	49
제 2 절 감귤 궤양병 발생 예측 정보제공 시스템 구현 .....	53
1. 군락기상 관측 및 자료 수집체계 구축 .....	53
가. 재료 및 방법 .....	53
1) 무인기상관측기 설치 및 군락기상관측 .....	53
2) 군락기상자료 자동수집체계 .....	55
나. 결과 및 고찰 .....	55
1) 군락기상 관측 수집체계 .....	55
2) 군락기상자료 열람체계 .....	57
2. 제주도 전역 준 실시간 그물망 농업 기상 추정 및 관리체계 구축 .....	59
가. 재료 및 방법 .....	59
1) 기상청 표준기상관측자료 자동 수집체계 개발 .....	59
2) GIS 기술을 이용한 기상보간자료 생산 .....	59
나. 결과 및 고찰 .....	60
1) 무인기상관측자료를 활용한 보간기상 추정 .....	60
3. 감귤 궤양병 발생예측 서비스 시스템 구축 .....	62
가. 재료 및 방법 .....	62

1)감귤 병해충 조사정보 수집 관리 및 커뮤니티 시스템 구축 .....	62
2)국지 감귤 궤양병 발생 예측 정보 서비스 시스템 구축 .....	62
나. 결과 및 고찰 .....	62
1)조사정보수집관리 및 회원 간 정보교환 .....	62
2)국지 감귤 궤양병 예측 정보 서비스 시스템 구축 및 운영 .....	64
제 3 절 감귤궤양병균의 항생제 저항성 생태 규명 및 .....	67
1. 감귤 궤양병 발병 현황 .....	67
2. 감귤 궤양병의 진전 상황 .....	68
3. 항생제 저항성균의 생태 연구 .....	69
3-1. 항생제 저항성 균의 분포정도 및 교차저항성 .....	69
가. 재료 및 방법 .....	69
나. 결과 및 고찰 .....	69
3-2. 저항성 형질 획득 기작 .....	71
가. 재료 및 방법 .....	71
1)Str 유전자 확인 .....	71
2)rpsL 유전자 상의 point mutation 확인 .....	72
3)감귤 궤양병균의 스트렙토마이신 저항성 유전자 획득 및 발현 기작 .....	72
나. 결과 및 고찰 .....	72
1)Str 유전자 확인 .....	72
2)rpsL 유전자 상의 point mutation 확인 .....	73
3)감귤 궤양병균의 스트렙토마이신 저항성 유전자 획득 및 발현 기작 .....	74
4. 구리피해 발생 현황 조사 .....	76
4-1. 구리제 종류에 따른 구리제 살포 피해 정도 .....	76
가. 재료 및 방법 .....	76
나. 결과 및 고찰 .....	77
4-2. 구리제와 파라핀유 혼용시 구리 피해 경감 원인 .....	79
가. 재료 및 방법 .....	79
나. 결과 및 고찰 .....	79
5. 친환경적 방제 체계 확립 .....	82
가. 재료 및 방법 .....	82

나. 결과 및 고찰 .....	82
6. 농가 실증을 통한 방제 체계 확립 .....	85
가. 재료 및 방법 .....	85
나. 결과 및 고찰 .....	85
제 4 절 국내 감귤류 궤양병균의 병원유전학적 특성 규명 .....	87
1. 감귤궤양병균의 기주범위 및 생리 화학적 특성에 의한 다양성 분석 .....	87
가. 재료 및 방법 .....	87
1) 감귤류 궤양병균 분리 및 동정 .....	87
2) 기주범위조사 .....	89
3) 탄소원 이용정도 분석 .....	89
4) 지방산조성 분석 .....	89
나. 결과 및 고찰 .....	89
1) 균주 동정 및 병원성 시험 .....	89
2) 기주범위에 따른 병원형 판별 .....	90
3) 탄소원이용 정도 차이 .....	91
4) 지방산 조성차이 .....	91
5) 탄소원 이용과 지방산 조성의 차이에 따른 중첩분석 .....	92
2. 분리균주의 유전적 다양성 .....	94
가. 재료 및 방법 .....	94
1) 염색체 DNA의 분리 .....	94
2) DNA 증폭을 위한 PCR 조건 .....	94
3) rep-PCR 결과 분석 .....	95
4) 16S DNA 분석 .....	95
나. 결과 및 고찰 .....	96
1) rep-PCR에 의한 궤양병관련 Xanthomonas 균주의 유연관계 분석 .....	96
2) 16S rDNA 분석 .....	99
3. 비병원성 유전자 및 균주별 병원성의 차이 분석 .....	100
가. 재료 및 방법 .....	100
1) 병원력 검정 .....	100
2) Southern hybridization .....	100
3) Plasmid 분리 .....	101
나. 결과 및 고찰 .....	101

1)균주 및 병원형별 병원성 차이 분석 .....	101
2)감귤류 케양병균의 비병원성유전자(pthA) 분석 .....	103
4. 병원형 판별을 위한 Multiplex PCR법 개발 .....	106
가. 재료 및 방법 .....	106
1)균주 및 DNA분리 .....	106
2)프라이머 및 PCR 조건 .....	107
3)Whole cell PCR .....	108
나. 결과 및 고찰 .....	109
1)다중 PCR을 위한 PCR 조건 및 프라이머별 특이성 .....	109
2)Multiplex PCR에 의한 병원형 판별 .....	110
3)Whole cell PCR 및 검출한계 .....	111
5. 병원형 검출을 위한 특이 프라이머 개발 .....	111
가. 재료 및 방법 .....	111
1)사용 균주 및 배양조건 .....	111
2)프라이머 제작 및 PCR 조건 .....	112
3)Whole-cell PCR 및 검출한계조사 .....	113
나. 결과 및 고찰 .....	113
1)특이프라이머를 이용한 감귤케양병균의 검출 .....	113
2)검출한계 .....	117
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	118
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....	119
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	120
제 7 장 참고문헌 .....	120

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제1절 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 연구개발의 목적

본 연구개발의 목적은 감귤 및 오렌지류 수출입시 중요한 검역대상 병인 감귤퀘양병의 발생생태와 병원균의 병원학적 특성을 규명하여 환경 친화적이며 효과적인 방제체계를 개발하고, 국내에서 발생하는 병원균과 오렌지 수출국에서 발생하는 병원균의 병원유전학적 특성을 구분함으로써 수출용 감귤 생산기반을 강화하고, 수입 오렌지류 검역에 필요한 과학적 근거를 확보하는 것이다.

### 2. 연구개발의 필요성

#### 가. 기술적 측면

##### ■ 퀘양병 방제체계상의 문제점

최근 기상이변 등으로 인하여 감귤퀘양병의 발생이 심해지는 경향이 있으며, 초기 발생시기의 연도별 변이가 심하여 기존의 관행방제체계로는 효과적인 방제가 어려운 상황이다. 따라서 월동 후 초기 병 발생을 억제할 수 있는 방제체계를 구축하고, 감귤 생육기간 중에 병발생 위험도가 높은 시점을 예측하기 위해서는 지역특이적인 국지 병 예찰시스템을 구축해야 한다.

##### ■ 퀘양병 방제약제의 문제점

현재 주로 사용되고 있는 농용항생제에 대한 저항성 균이 출현하여 방제효과가 격감되고 있으며, 환경친화성이 떨어지는 퀘양병 방제약제의 문제점이 나타나고 있다. 따라서 항생제 저항성 균을 방제할 수 있는 구리제와 키토산 등의 친환경 농자재들에 대한 안전 사용체계가 확립되어야 하며 이를 이용한 퀘양병 방제 기술 개발이 필요한 실정이다.

##### ■ 오렌지류 검역상의 문제점

오렌지류에 퀘양증상을 일으키는 병원성 세균은 전 세계의 지역별, 기주식물 종류별로 크게 5종류의 병원형으로 구분되고 있으나 (Table 1), 우리나라에 존재하는 퀘양병균에 대한 병원유전학적 특성이 정확히 밝혀진 바가 없어 우리나라가 감귤 수출을 촉진하고 검역을 통하여 오렌지류 수입을 억제하는데 필요한 과학적 근거가 빈약하다.



Table 1. 감귤에 궤양증상을 일으키는 병원균 그룹과 병원성 정도 (Brunings and Gabriel 2003)

Canker group	<i>Citrus sinensis</i> (Sweet orange)	<i>C. paradisi</i> (Grapefruit)	<i>C. limon</i> (Lemon)	<i>C. aurantifolii</i> (Mexican lime)
<i>X. a. pv. citri</i> A	+++	++++	+++	++++
<i>X. a. pv. citri</i> A*	-	-	-	++++
<i>X. a. pv. citri</i> A <sup>w</sup>	-	HR	-	++++
<i>X. a. pv. aurantifolii</i> B	+	+	+++	++++(white)
<i>X. a. pv. aurantifolii</i> C	HR	HR	HR	++++

이러한 문제점을 해결하기 위해서는 우리나라 감귤원에 분포하는 궤양병원균 집단의 병원유전학적 특성을 규명하여 우리나라 감귤산업을 보호하고 발전시키는데 필요한 과학적 근거를 확보해야 하고, 검역상에 필요한 진단법을 개발할 필요성이 높다.

#### 나. 경제-산업적 측면

2003년 우리나라 감귤은 24,600ha에서 약 646,000톤을 생산하여 단위면적당 생산성이 우리나라 과수 중 가장 높으나, 감귤산업은 최근 수입 오렌지의 증가와 타 과일과의 경쟁으로 인한 소비 감소로 큰 어려움에 봉착해 있는 실정으로 감귤의 과잉 생산과 국내 가격의 하락으로 인해 수출희망 농가가 증가하는 추세이고 상대적으로 수출단가가 높은 미국으로의 수출이 바람직 하지만 (대미 수출단가 : 3,300원/3.75 Kg, 대 캐나다 수출단가 : 1,700원/3.75 Kg, 2002년 기준) 궤양병으로 인한 검역상의 문제로 어려움이 있다. 제주도에서는 1994년부터 대미감귤수출단지 조성사업이 추진되어 현재 6곳의 대미 수출단지 (256.4ha, 279농가)에서 감귤이 재배되고 있지만 궤양병 발병으로 인하여 통상 2개의 단지에서만 대미 수출이 가능하다. 이 또한 2002년도에는 미국으로 수출된 1,600톤 중 1,210톤이 궤양병원균 검출에 의해 통관되지 못하여 수출농가에 큰 피해를 안겨 주었고, 이로 인하여 2003년과 2004년에는 미국으로의 수출이 전혀 이루어지지 못하고 있는 실정이다. 또한 2003년부터는 대미 수출관리요령이 매우 강화되어 큰 부담이 되고 있다. 미국 Florid주의 경우 오렌지 생산지에서 궤양병이 발견되면 주변 1,900 피트 이내의 오렌지류 나무를 전량 소각하고 있다

#### 다. 사회-문화적 측면

최근 웰빙 바람이 급격히 확산되고 있으며 이로 인한 안전한 친환경 농산물에 대한 소비자의 요구가 급증하고 있다. 항생제를 사용하지 않거나 사용량을 경감시키는 것은 일반인들의 안전 농산물에 대한 요구를 충족시키고, 제주도의 청정 자연 환경을 보존하는데 기여한다. 친환경적으로 재배된 감귤은 우리의 식생활 문화를 개선

시킬 수 있으며, 특히 감귤 껍질에 많이 함유되어 있는 플라보노이드 계통의 유용 성분을 섭취하게 되어 국민건강 증진에 기여한다.

## 제2절 연구범위

제 1 세부과제는 ‘감귤궤양병 발생생태 규명 및 예찰모형 개발’을 주목표로 하여 감귤 잎 표면에서의 병원균의 생존과 생장에 미치는 환경요인의 영향 규명, 월동 후 감귤 잎의 발육단계에 따른 잎의 미세구조 변화와 병원균 접촉 시 감수성 품종과 저항성 품종간의 Defense Mechanism에 대한 초미세 구조적 연구, 감귤 궤양병 발생 예찰모형 개발을 연차적으로 연구하였다. 제 1 세부과제의 결과를 가지고 위탁과제가 수행한 연구개발 내용은 ‘감귤궤양병 발생 예측 정보제공 시스템 구현’에 초점을 두어 군락기상 관측 및 자료 수집체계 구축, 제주도 전역 준 실시간 그물망 농업기상추정 및 관리체계 구축, 감귤 궤양병 발생 예측 서비스 시스템 구축을 수행하였다. 제 1협동과제에서는 ‘감귤궤양병균의 항생제 저항성 생태 규명 및 환경 친화적 방제체계 개발’을 위해 항생제 저항성 균의 생태 연구, 병 발생 및 구리피해 발생 현황 조사, 친환경적 방제 체계 개발, 농가에서의 실증을 통한 방제 체계 검정을 수행하였다. 제 2협동과제에서는 ‘국내 감귤류 궤양병균의 병원유전학적 특성 규명’연구의 주요 연구내용은 국내에 분포하고 있는 감귤류 궤양병균의 병원유전학적 다양성 분석을 통하여 국내에 존재하는 감귤류 궤양병균의 병원형을 구명하고, 저항성 품종개발을 위한 국내 대표균주를 선발하며, 감귤류 궤양병균의 병원형 판별과 검출에 필요한 기술을 개발하는 것이다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

우리나라에서 감귤재배는 거의 대부분이 제주에 한정되어 있으며, 감귤퀘양병에 대한 방제 체계가 뚜렷하게 확립되어 있지 않은 실정이다. 제주에서 주로 재배되고 있는 온주밀감의 경우 검은점무늬병, 더뎡이병, 퀘양병 등이 주요 병이며 이중 검은점무늬병과 더뎡이병은 발생시기가 년차별로 차이가 거의 없으며 특히 가장 피해를 많이 주는 검은점무늬병은 우리와 재배 환경이 비슷한 일본에서도 병 발생에 대한 많은 연구가 이루어져 많은 도움이 되고 있지만 퀘양병의 경우 방제법이나 병 발생 생태에 대한 연구가 많지 않은 실정이다. 반면에 퀘양병에 약한 품종인 오렌지류나 그레이프푸르트(자몽)를 주로 재배하는 미국이나 남미등지에서는 퀘양병에 대한 연구가 활발하지만 재배환경이 우리와는 매우 상이하기 때문에 많은 도움은 되지 못하고 있다. 벼, 사과, 배 병해충에 대한 지역특이적인 예찰정보를 제공하는 국지병해충예찰정보시스템이 본 연구과제의 총괄책임자(박은우)에 의하여 개발되어 웹서비스가 최근에 시작되고 있으나 감귤 병해충 예찰정보시스템은 개발된 바가 없다. (참고 웹사이트: [www.epilove.com](http://www.epilove.com), [www.apple.go.kr](http://www.apple.go.kr), <http://www.pear.go.kr>) 본 연구과제의 총괄책임자는 GIS 기술을 이용하여 1km x 1km 수준의 공간해상도를 갖는 보간 기상자료를 확보하여 동·리 단위의 병해충 예찰정보를 제공할 수 있는 기반기술을 확보하고 있으나, 감귤 퀘양병 감염위험도를 예측할 수 있는 정확한 예찰모형은 아직 국내외에서 개발된 바가 없다.

퀘양병 방제를 위한 환경 친화적이며 효과적인 방제 약제가 없는 실정이다. 항생제에 의한 퀘양병방제 효과에 대한 의문이 여러 농가에서 제기되고 있음에도 불구하고 항생제 이외의 뚜렷한 약제나 방제방법이 개발되어 있지 않다. 난지농업연구소의 연구 결과에 따르면 제주도 감귤원에는 이미 항생제 저항성 병원균 집단이 만연되어 있다. 일본, 중국을 제외한 세계 주요 감귤 생산국들의 경우 박멸을 통한 퀘양병균-free를 목표로 하기 때문에 방제 개념이 우리와는 매우 상이하다.

스트렙토마이신 저항성은 2가지 기작, 즉 염색체 DNA상(ribosomal protein S12를 code 하는 *rpsL* 유전자)의 돌연변이와 스트렙토마이신 저항성( $Sm^R$ )유전자인 *strA-strB*를 가지고 있는 플라즈미드 획득에 의한 획득 저항성으로 밝혀져 있으며, 감귤퀘양병균에 대한 전체 염기서열이 밝혀져 많은 유전자나 단백질 등에 대한 연구가 진행되고 있다. 다국적 기업인 Syngenta에서는 밀에 발생하는 흰가루병 방제를 위해 저항성을 유도시키는 벤조티아디아졸 유도체 (benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic S-methyl ester; BTH)를 개발하여 주로 세균병 방제에 북미에서는 Actigard<sup>®</sup>, 유럽에는 Bion<sup>®</sup>라는 상품명으로 이미 시판되고 있으며 국내에서도 감귤퀘양병에 등록이 되어 있는 상태이다. 보르도액 등의 구리제와 키토산과 같은 환경 친화적 소재를 활용하는 방안이 제안

된 바 있다 (제주도 난지농업연구소).

감귤류에 궤양증상을 일으키는 병원세균은 현재 *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, *X. a.* pv. *aurantifolii*, *X. a.* pv. *citrumelo*가 보고되어 있다. 이 병원세균은 *X. campestris* pv. *citri*라는 한 가지의 병원균으로 인식되어지다가 1995년 Vauterin 등에 의하여 type A는 *X. a.* pv. *citri*로 type B, C는 *X. a.* pv. *aurantifolii*로 type E는 *X. a.* pv. *citrumelo*로 재분류되었다. 이 중 *X. a.* pv. *citrumelo*는 감귤 잎에 궤양증상보다는 유묘에 점무늬증상을 일으키는 병원균으로 감귤 세균성점무늬병(citrus bacterial spot)으로 명명되어지고 있으며 크게 문제되고 있지는 않다 (Graham, J. H. and Gottwald, T. R. 1990). *X. a.* pv. *citri*와 *X. a.* pv. *aurantifolii*는 일으키는 병 증상이 매우 유사하여 기주범위와 다른 생리유전학적 특성을 이용하여 구분되고 있다. 우리나라를 포함하여 전 세계의 열대와 아열대 지역에 분포하고 있는 *X. a.* pv. *citri* A는 아시안 균주라고 불리며 병원성이 매우 강하고 오렌지, 레몬, 자몽 등 경제적 가치를 갖는 감귤류에 극심한 병을 일으키며 감귤궤양병(citrus canker)을 일으키는 주요 병원세균이다. 그 외 오만, 사우디아라비아, 이란과 인도 등지에서 Mexican lime에만 궤양증상을 일으키는 *X. a.* pv. *citri* A\*가 보고되었으며, *X. a.* pv. *citri* A\*의 변이 균인 *X. a.* pv. *citri* Aw이 플로리다에서 발견되었다 (Mohammadi 등 2001, Cubero and Graham 2002). *X. a.* pv. *aurantifolii*에는 아르헨티나, 파라과이, 우루과이 지역에 분포하여 레몬과 멕시코 라임에 병을 일으키는 type B와 브라질에 분포하며 멕시코 라임에만 병을 일으키는 type C가 보고되어 있다.

이와 같은 병원형의 다양성으로 인하여 궤양병균을 신속하게 판별하고 진단하기 위하여 생리화학적 시험, 과지 타이핑, 혈청학적 연구 등이 이루어져 왔다. (Egel 등, 1991; Graham 등, 1990; Verniere 등., 1998). 한편 반복적 염기서열 (repetitive sequences)의 PCR인 rep-PCR을 통하여 병원균을 분류하고 병원균을 동정하려는 시도가 이루어져 왔는데 (Louws 등, 1994; Cubero and Graham, 2002), rep-PCR을 통해 감귤류 궤양병균의 다양성을 판별하려는 시도가 이루어져 왔다. 우리나라에서 주로 재배되고 있는 온주밀감은 궤양병에 대해 중도 저항성을 가지므로 상대적으로 크게 문제가 되지는 않았지만 최근 그 발생이 증가하고 있는 추세이고, 오렌지류, 그레이프푸르트, 레몬 등에는 치명적이어서 현재 국제적으로는 검역병해충으로 지정이 되어있고 미국에서는 금지병해충으로 지정이 되어있다. 2003년부터 대미 수출 관리 요령(Work plan)이 매우 강화되었기 때문에 미국으로의 수출이 더 어려울 것으로 판단되나, 국내 감귤류에 분포하는 궤양병균에 대해서는 발생정도, phage typing에 관한 연구가 일부 진행되었으며(Myung 등, 2003) 광범위하고 다수의 균주를 통한 병원학적 다양성에 대해서는 연구가 부족한 실정이다.

## 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

### 제 1 절 감귤 궤양병 발생 생태 규명 및 예찰모형 개발

#### 1. 감귤 잎 표면에서의 병원균의 분리 및 동정

##### 가. 재료 및 방법

##### 1) 궤양병균 분리 및 동정

2004년 7-8월경 제주도 16개 지역에서 병든 감귤 잎을 채집하여 총 36개의 병원균을 순수 분리하였다. 채집된 균은 병원성 test를 통하여 random하게 두 개를 선발하였고 채집된 균이 *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*인지를 확인하기 위하여 Bergey's Manual의 생리실험을 수행하였다. 주 생리실험 항목은 Gram staining, Urease 생성, NA+5%glucose 에서의 mucoid 생성, 단백질 가수 분해반응, peptone 이용 시 H<sub>2</sub>S 발생여부, Nitrate 환원 반응, 성장 시 Methionine 요구성, Gelatin과 Starch 분해 반응, Pectinase 분비, 염 농도에 따른 내성, Dye's medium C에서 Trehalose와 Cellobiose 이용 시 산의 생성 등이다.

##### 2) Tn5를 이용한 GFP-tagged mutant 선발

순수 분리한 36개의 병원균에서 spontaneous mutation을 통하여 총 36개의 rifampicin 저항성 mutant를 선발하고, kanamycin 와 GFP maker를 가지고 있는 *E. coli* DH5α(pAG408)과 mating 하여, 총 33개의 kanamycin과 rifampicin 저항성이며 GFP maker를 가진 mutant들을 선발하였다. 병원성 test를 통하여 random하게 선발된 모균주 bf13에 따른 18개의 GFP marker tagged mutant는 YDC(yeast extract, dextrose, calcium carbonate) agar plate에서 growth rate, 발광정도 및 병원성 test를 통하여 1차 선발하고, wild type(bf13)과 growth rate 비교하였다.

##### 3) 자연돌연변이(spontaneous mutation)를 통한 rifampicin 저항성 mutant 선발

순수 분리한 36개의 병원균에서 spontaneous mutation을 통하여 총 36개의 rifampicin 저항성 mutant를 선발하였다. 모균주인 Xj31과 총 36개의 rifampicin resistance mutant의 growth 상태 및 YDC(yeast extract, dextrose, calcium carbonate) agar plate에서 growth rate, 병원성 test를 통하여 1차 선발하고, wild type(Xj31)과 growth rate 비교하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 균주 동정 및 병원성 시험

GFP maker 균주의 모균주인 bf13과 rifampicin resistance 균주의 모균주인 xj31 참조 균주인 Xac xck 9211, 9367과는 달리 생장 시 Methionine을 필요로 하였으며, Gelatin을 분해하지 못하였고, 염 농도가 1%이상에서는 참조 균주 및 공시균주 모두 생장하지 못하였다.



Fig 1. 병원성 test 결과 (bf13, Xj31: wild type, gfp5: GFP marker tagged mutant, rx31: rifampicin resistance)

Table 1. 선발된 wild type에 대한 생리적 특성 분석 결과 (Xac xck 9211, 9367: KCCM 등록 균주, \*:Bergy's manual of Determinative bacteriology ninth ed. 참조)

Bacterial Species		bf13	Xj31	Xac Xck 9211	Xac Xck 9367	X. axonopodis*	X. campestris*	X. citri*
Characteristics								
Urease		-	-	-	-	-	-	-
Nitrate Reduction		-	-	-	-	-	-	-
Mucoid growth on NA+5% glucose		-	-	-	-	-	+	
Methionine require for growth		-	-	+	+		d	-
Hydrolysis of:	Gelatin	-	-	+	+	-	d	
	Starch	+	+	+	+	-	d	+
Milk proteolysis		-	-	-	-	-	+	
H <sub>2</sub> S from peptone		+	+	+	+	+	+	
Acid production	Cellulose	-	-	+	-	-	+	
	Trehalose	+	+	+	+	+	+	
Maximum NaCl tolerance (%)	0	+	+	+	+	+	+	
	1	+	+	+	+	+	+	
	2	-	-	+	-	-	+	
	3	-	-	-	-	-	+	
	4	-	-	-	-	-	+	

BIOLOG data 에서는 wild type과 달리 rifampicin resistance 균주는 L-glutamic acid와 monomethyl succinate를 사용하지 못하였고, GC fatty acid 에서는 wild type과 rifampicin resistance 균주의 지방산이 대부분 비슷하게 존재하고 있다. wild type과 rifampicin resistance 균주는 탄소원 이용 양상이나 지방산의 양을 비교한 결과로 보아 큰 차이가 없는 것을 알 수 있다. 따라서 두 균주를 동일하다고 볼 수 있다.

Table 2. wild type과 rifampicin resistance type 균주간의 차이를 알아보기 위한 BIOLOG, GC fatty acid 분석 결과 (w: wild type(Xj31), r: rifampicin resistance type(rx31))

BIOLOG			GC fatty acid		
carbon source	w	r	peak name	w	r
Fructose	+	+	11:0 ISO	6.2±0.5	5.2±0.9
Dextrin	+	+			
Fucose	+	+	11:0 ISO 3OH	3.1±0.3	2.6±0.5
Glycogen	+	+	12:0 3OH	2.7±0.3	2.8±0.4
Galactose	+	+			
Gentiobiose	+	+	13:0 ISO 3OH	6.3±0.6	5.6±1.2
α-D-glucose	+	+			
Sucrose	+	+	15:0 ISO	24.4±0.7	26.5±0.8
L-alanyl-glycine	+	+	15:0 ANTEISO	8.5±0.2	10.2±0.9
N-acetyl-D-galactosamine	+	+			
Trehalose	+	+	16:0 ISO	4.6±0.2	2.6±0.3
Lactulose	+	+	16:0	3.2±0.1	3.8±0.6
Serine	+	+			
Maltose	+	+	IOS 17:1 w9c	8.0±0.3	7.7±0.1
L-glutamic acid	+	-			
Cellobiose	+	+	17:0 IOS	8.5±0.6	9.0±0.9
Mannose	+	+	17:1 w8c	1.6±0.1	1.5±0.1
Monomethyl succinate	+	-			

## 2)GFP-tagged mutant의 growth rate 차이

GFP marker가 삽입된 균주는 발광이 강할수록 growth rate가 떨어지고, 발광이 심한 균주는 병원성도 떨어지는 것으로 나타났다. 그러나 선발된 균주는 growth rate와 발병 정도에는 큰 차이가 없는 것으로 나타났다.



Fig. 2. YDC agar plate 상에서의 wild type의 형태와 LB agar plate 상에서 UV를 쬐어 준 GFP marker가 삽입된 균주의 발광 정도(bf13: wild type, gfp5, 22, 24, 27, 30: GFP marker 삽입 균주)

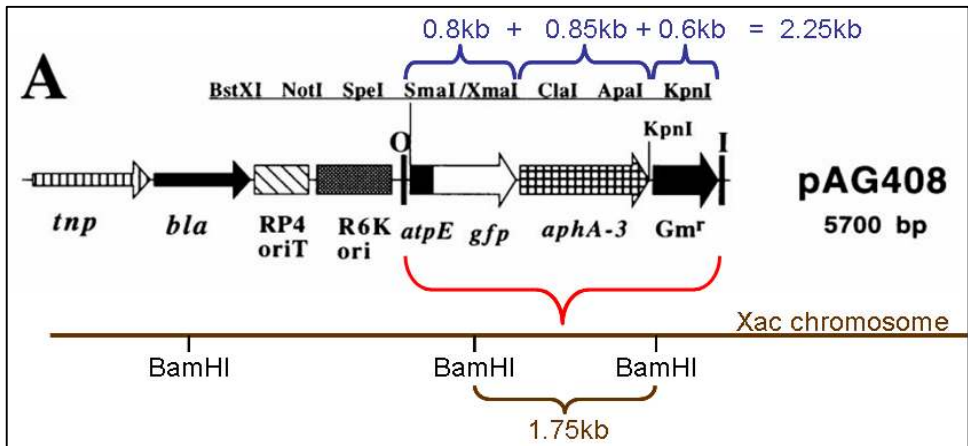


Fig. 3. GFP marker가 삽입된 *E. coli* DH5 $\alpha$ (pAG408)의 mini-transposon인 pAG408의 구조와 *X. a. pv. citri*에 insert 되었을 것으로 예상되는 부분 (O: outer end, I: inner end)



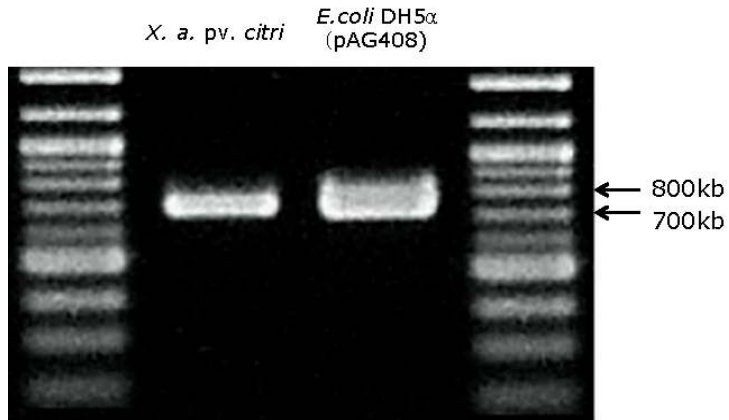


Fig. 4. GFP marker가 삽입된 *E. coli* DH5α(pAG408)와 *X. a. pv. citri*를 GFP 특이 primer로 PCR 한 결과

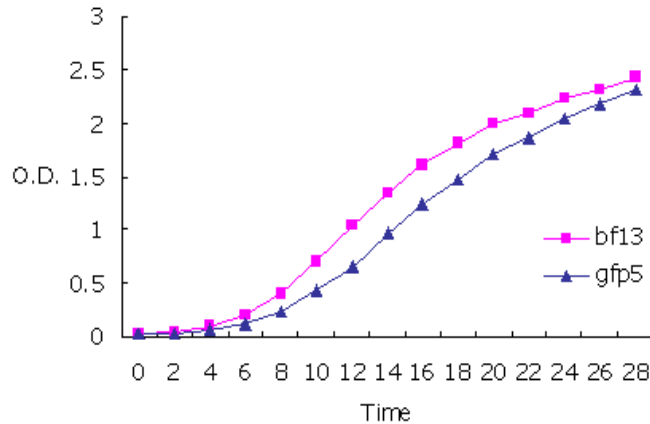


Fig. 5. wild type 균주와 GFP marker가 삽입된 균주의 growth rate 비교 실험 (bf13: wild type, gfp5: GFP marker 삽입 균주)

### 3) Rifampicin 저항성 mutant의 growth rate 차이

YDC agar plate 상에서 rifampicin resistance 균주는 wild type 보다 늦게 자랐으며, LB broth에서의 growth rate는 두 균주간의 차이가 거의 없었다.

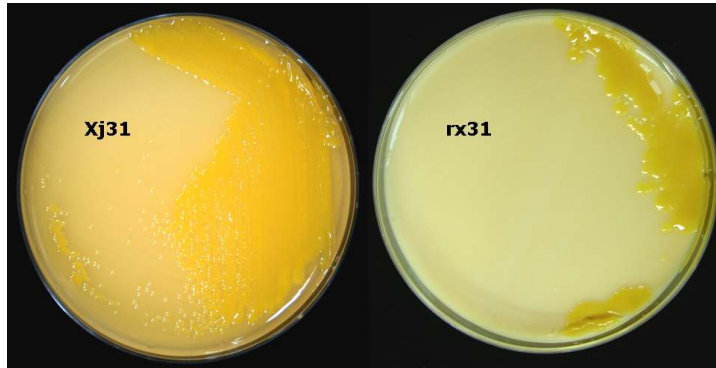


Fig. 6. YDC agar plate 상에서의 분리한 wild type와 rifampicin resistance 균주의 형태

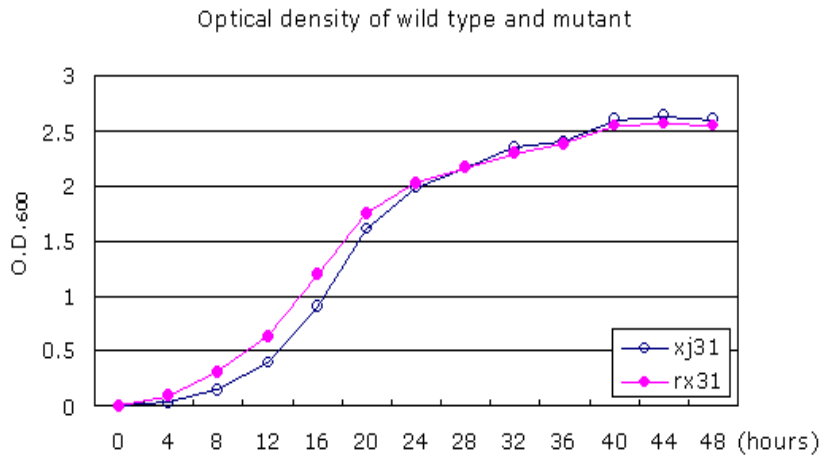


Fig. 7. LB borth에서 wild type과 rifampicin resistance type 균주의 growth rate 실험 (Xj31: wild type, rx31: rifampicin resistance type)

## 2. 감귤 잎 표면에서의 병원균의 생존과 생장에 미치는 환경 요인의 영향 규명 가. 재료 및 방법

### 1) 잎 표면에서 온도에 따른 병원균의 doubling time 측정

폭 4~5cm, 길이 5~7cm의 건전한 어린잎을 떼어, rifampicin resistance mutant(rx31)의 농도를 약  $10^5$  cell/ml로 맞춘  $\text{CaCO}_3$ -Silwet buffer( $\text{CaCO}_3$  2%, Silwet 200ppm)에 30초 동안 침지하여 접종한다. 30초 후 잎을 꺼내어 실온에서 건조시키고, 건조된 잎을 습실 처리된 plastic box 안의 해면에 고정시킨 후, 각 공시처리 온도(10, 14, 18, 22, 26, 30, 34 $^{\circ}\text{C}$ )에서 incubation 하였다. 접종 직후부터 0, 12, 24, 48, 96, 144시간이

지났을 때에 잎을 꺼내어 지름이 5mm인 cork borer로 disc 10개씩을 만들었다. CaCO<sub>3</sub>-Silwet buffer 1ml이 들어있는 1.5ml test tube에 10개의 disc를 넣고 250rpm, 28°C shaking incubator에서 1시간동안 shaking incubation하였다. Incubation한 원액을 이용하여 dilution plate method (live cell 측정)와 real-time PCR (total cell 측정)의 두 가지 방법으로 세균의 개체수를 측정하였다. Dilution plate method에서는 rifampicin을 첨가한 배지를 사용하고, real-time PCR에서는 *Xanthomonas*의 pthA gene을 primer로 사용하여 집중한 병원균만을 선별할 수 있도록 하였다. 7개의 각 처리 온도에서 growth period 동안 단위면적당 세균밀도변화를 측정하였다. Fig. 8은 세균의 밀도에 자연 log값을 취한 그래프이다. 각 처리 온도별로 단순선형회귀분석을 하여 다음의 지수성장모형(exponential growth model)에서 specific growth rate,  $k$ 를 구하고 이를 doubling time,  $g$ 로 환산하였다.

지수성장모형:

$$N(t) = N_0 \cdot e^{kt} = N_0 \cdot 2^{t/g}$$

$N(t)$  : 시간  $t$ 에서의 개체군의 크기

$N_0$  : 시간  $t=0$ 에서의 개체군의 크기 (개체군 크기의 초기값)

$k$  : specific growth rate

$t$  : 시간 (hour)

$g$  : doubling time (온도에 대한 2차함수)

Specific growth rate,  $k$ 를 doubling time,  $g$ 로 환산하는 방법:

$$2^{t/g} = e^{kt}$$

$$\frac{t}{g} \ln 2 = kt$$

$$g = \frac{\ln 2}{k}$$

각 온도별로 구해진  $g$ 를 온도에 관한 이차함수에 적합 시켜서, 온도를 이용하여 doubling time을 추정하는 회귀모형을 개발하였다.

#### 나. 결과 및 고찰

##### 1) Doubling time 모형 개발

생균수 및 DNA량 측정 결과 26°C에서 성장률이 가장 높았고, 10°C에서 가장 늦게 증가함을 알 수 있었다. Dilution plate method를 이용하여 측정한 생균수와 Real-time PCR을 이용하여 측정한 DNA량이 정확히 일치하지는 않았으나, 대부분

12~24시간 이후에 증가하는 경향을 보였다. Doubling time 측정 결과로 보아 26℃ 인 조건에서 세균이 가장 빠르게 증식하며, 10℃인 조건에서 가장 느리게 증식함을 알 수 있었다.

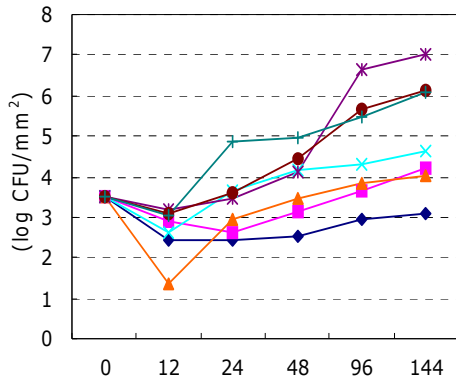


Fig. 8. Dilution plate method를 이용한 생균수 측정 결과

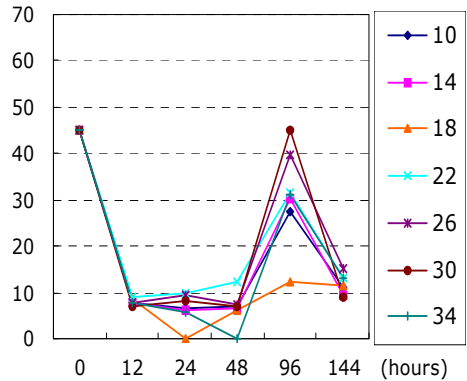


Fig. 9. Real-time PCR을 이용한 DNA 측정 결과

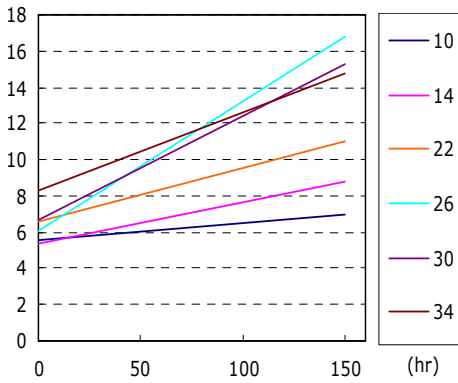


Fig. 10. 온도별 Growth rate

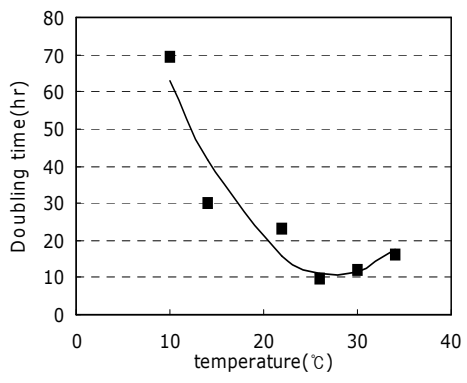


Fig. 11. 병원균의 온도별 Doubling time

-온도( $T$ )에 따른 doubling time,  $g$ 의 모형:

$$g = 139.42 - 9.34 T + 0.17 T^2 \quad (R^2=0.90)$$

### 3. 월동 후 감귤 잎 발육에 따른 잎 표면의 미세구조 변화 연구

#### 가. 재료 및 방법

##### 1) 감귤잎 발육 단계 측정 및 샘플 채취

제주도에서 받은 하례히메 품종을 인공 온실(26℃)에서 키워 새순이 1~2cm 되었을 때 10개의 잎을 선정하여 5일 간격으로 잎의 길이와 폭을 Caliper로 측정하였다.

##### 2) 현미경 관찰을 위한 샘플 채취 및 방법

현미경 관찰을 위하여 잎을 선정하여 먼저 잎의 사이즈를 측정하고 한 개의 잎 당 3개의 조각을 얻어 고정을 시킨 후 탈수, 포매, 중합, 절편제작, 염색 과정을 거쳐 LM을 이용하여 큐티클 층이 뚜렷이 보이는 부분을 X400 배로 확대하여 잎의 아랫부분의 큐티클 층 두께를 측정하였고, SEM을 이용하여 기공수를 측정하였다.

#### 나. 결과 및 고찰

##### 1) Leaf size

25일 동안 관찰한 결과 하례히메 잎의 길이와 폭이 처음 측정한 날을 기준으로 10일 후 까지 가장 많이 신장하는 것을 알 수 있었다. 이 기간에서 잎의 길이와 폭이 처음 기준 사이즈보다 평균적으로 4.2cm, 2cm 신장하였다는 것을 알 수 있다.

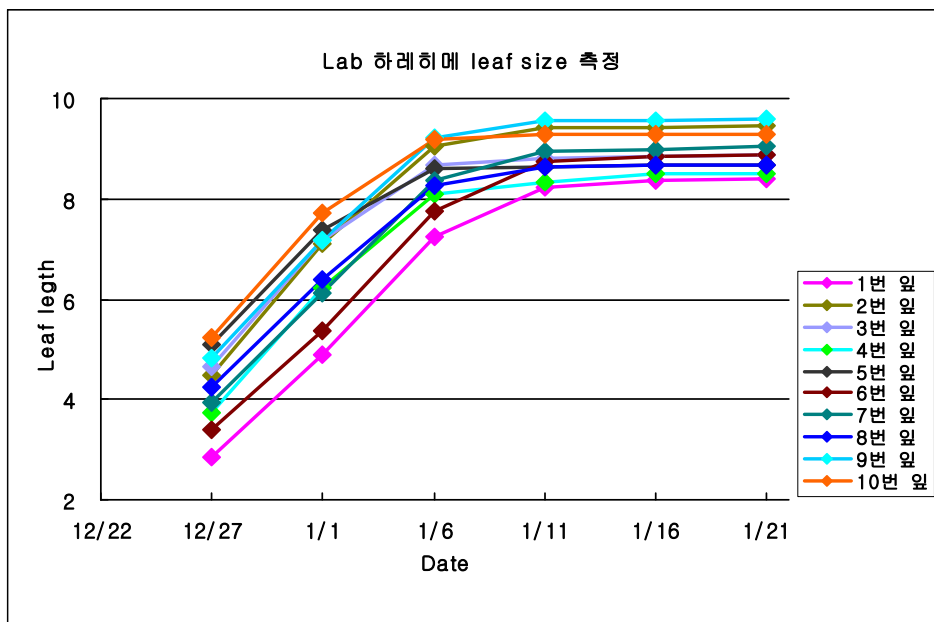


Fig. 12. Lab 하례히메 잎의 길이 측정 변화

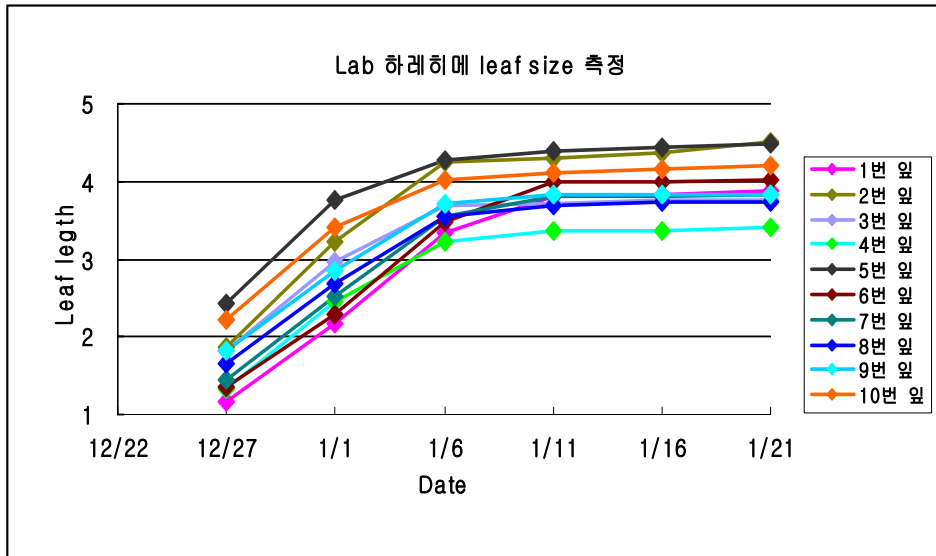


Fig. 13. Lab 하레히메 잎의 폭 측정 변화

## 2) 감귤 잎의 미세구조 변화

Fig. 14, 15 에서 보는 바와 같이 잎의 사이즈가 커짐에 따라서 잎의 구조가 변화하는 것을 알 수 있었다. Fig. 15에서는 큐티클 층을 눈으로 구분하기가 어렵지만 Fig. 17에서는 표피 세포 윗부분에 짙은 푸른색으로 구별이 지어지는 것을 확인 할 수 있었다. 어린 잎 일수록 엽육 조직인 책상조직과 해면조직의 미분화로 어느 부분이 윗면이고 아랫면인지 구분할 수 없었지만 성숙 잎에서는 두 조직이 정확히 분화가 되어 책상조직이 있는 부분이 잎의 윗면이고 그렇지 않은 부분이 아랫면인 것을 확인할 수 있었다. 또한 아랫면은 윗면과 달리 기공이 있고, 표피 세포가 없는 점이 특징이다. 두 조직의 분화로 해면 조직 사이사이에 intercellular space가 생성되어 있는 것을 확인 할 수 있었다. Fig.에서는 잘 나와 있지는 않지만 어린잎에서 볼 수 없었던 또는 작은 사이즈의 calcium oxalate 와 oil gland 가 잎이 커지면서 군데군데 분포되어지고 사이즈가 커지는 것을 관찰 할 수 있었다.

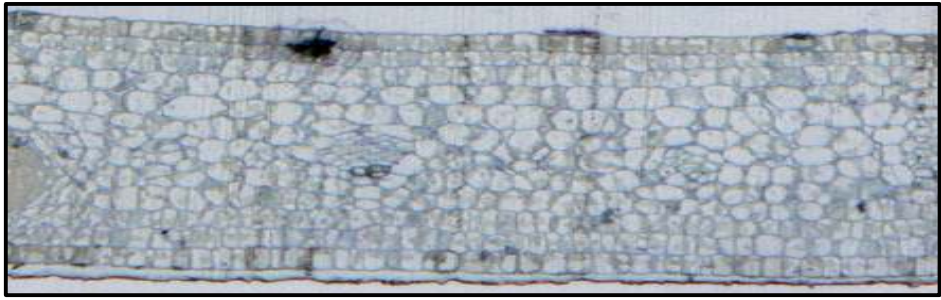


Fig. 14. 광학 현미경 사진 - Lab 하레히메 (2.58×0.90cm) X200

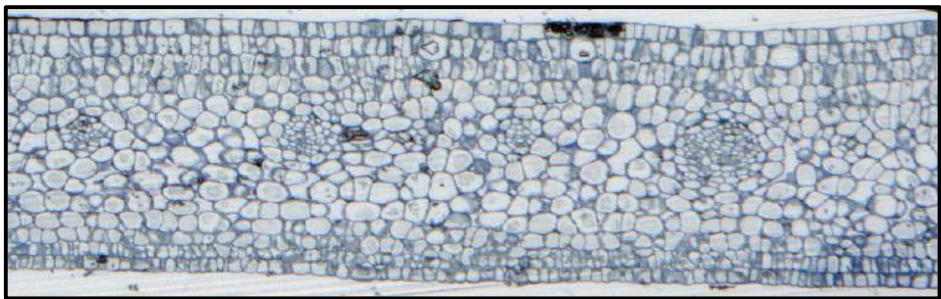


Fig. 15. 광학 현미경 사진 - 제주 하레히메 (6.99×3.32cm) X200

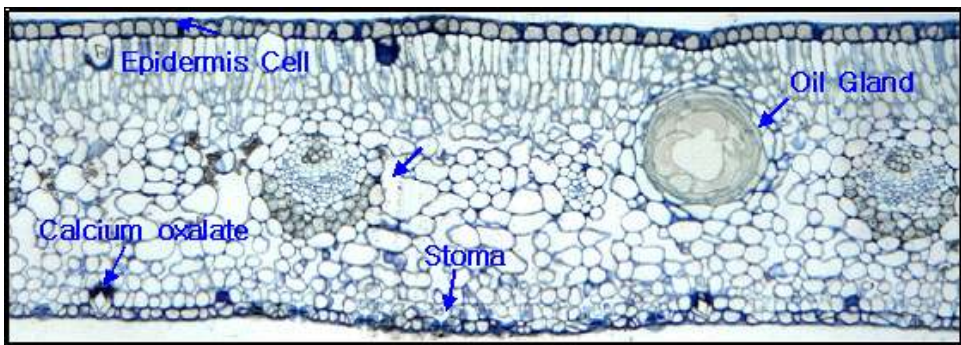


Fig. 16. 광학 현미경 사진 - 제주 하레히메(14.2×4.74cm) X200

### 3) 큐티클 층 두께 측정

큐티클 층의 두께를 측정한 결과 Fig. 18과 같이 잎의 사이즈가 커짐에 따라서 두께가 커지는 것을 알 수 있었다. 한 샘플에 대하여 사진이 5장 이상을 얻으므로 하나의 잎 길이에 대한 측정 결과가 5개 이상이 나왔다. Fig.에서 보면 중간 부분에 큐티클 층의 두께가 다른 작은 샘플에 비해서 두께가 얇은 결과를 얻을 수 있었다. 이는 감귤 잎이 서로 다른 가지의 높이와 위치에서 받는 환경적 요인이 다르므로 최

적조건이 주어졌다 하더라도 잎이 다른 잎에 가려 그 조건을 받지 못한다면 다른 좋은 위치에 놓인 잎에 비해 대사 작용이 활발하지 못하므로 이에 상응하여 잎의 성장에도 영향을 미칠 것으로 판단된다. 즉 반드시 잎의 사이즈가 커질수록 큐티클 층의 두께도 이에 상응하여 두꺼워 진다고 말하기는 어렵다고 생각된다.

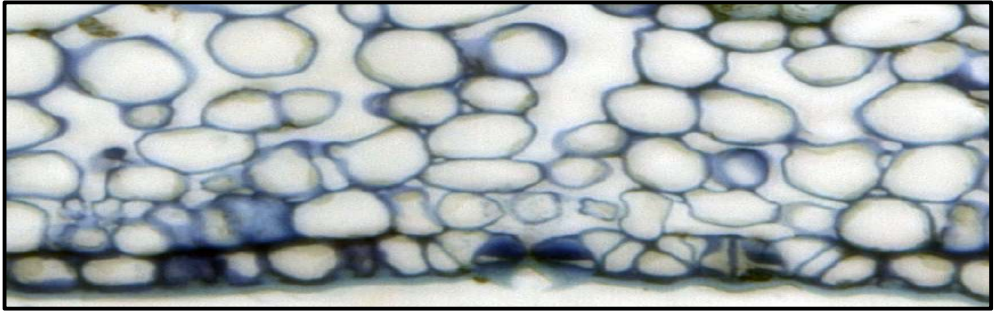


Fig. 17. 광학현미경을 이용하여 사진을 찍은 후 컴퓨터 프로그램으로 큐티클 층의 두께를 측정할 수 있는 사진



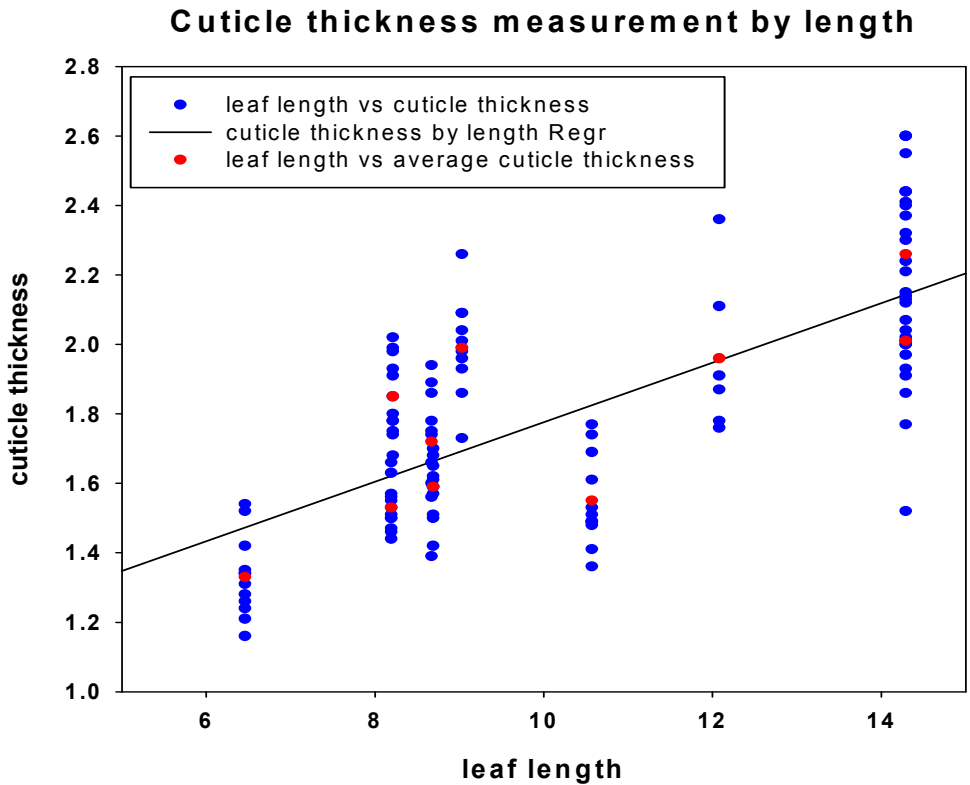


Fig. 18. 제주 온주밀감 새순의 큐티클 층의 두께

#### 4) 기공 수 측정

SEM 사진을 통해서 보면 사이즈가 작은 잎과 큰 잎에서의 기공 숫자가 많이 차이나는 것을 알 수 있다. 큐티클 층 두께에서와 마찬가지로 반드시 잎이 커짐에 따라 비례하여 기공 숫자가 증가하지 않는다는 것을 알 수 있었는데 그 이유도 마찬가지라고 생각되어진다. 위의 실험을 하면서 집중 시 spray infection을 하였는데 감귤 잎을 관찰하면서 매우 어린잎에서는 병징이 나타나지 않고 어느 정도 잎이 자라야 병징이 나타나는 것을 알 수 있었다. 현미경 사진들과 데이터를 통해서 이와 같은 관찰을 비교해 볼 때, 세균이 증식을 하여 균집화가 되어야 병징이 나타나듯이 가장 어린잎에서는 세포조직이 치밀하게 짜여 있고 phytoanticipins의 양이 많아서 세균의 증식이 힘들어 균집화까지 일어나지 않을 것이라는 생각이 들었다. 또한 spray infection시에 병원균이 들어가는 통로인 기공숫자가 큰 잎에 비해 적고, 기공 사이즈도 작아서 들어가는 비율이 큰 잎에 떨어진다고 생각된다.

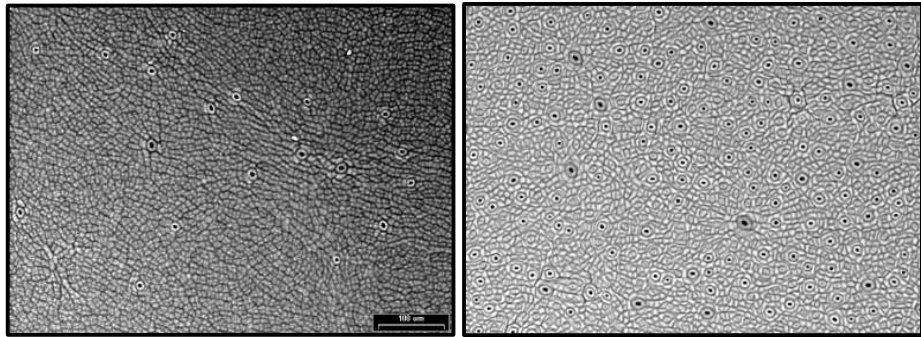


Fig. 19. SEM 을 이용하여 잎이 사이즈별로 기공 사진을 찍어 숫자 파악 (잎의 사이즈 2.0 X 0.7cm, 6.38 X 3.08cm)

Table 3. 제주 온실 온주 밀감 새순을 사이즈별로 체크하여 기공숫자를 측정

	1	2	3	4	5
Size(cm)	2.04*0.72	3.02*0.15	4.26*0.84	5.68*2.53	6.38*3.08
1	18	24	44	111	153
2	25	28	40	110	196
3	25	24	51	105	221
4	33	30	50	105	175
5	25	24	43	98	163
6	18	23	48	95	193
7	18	26	40	82	176
8	34	22	53	88	150
9	34	22	53	82	188
10	46	23	55	82	161
Average 2.66*504.27um	27.60	24.60	47.70	95.80	177.60
1mm*1mm	81.37	72.52	140.62	282.43	523.58

#### 4. 병원균 접종 후 감수성과 저항성 종에 따른 잎의 초미세 구조적 반응 연구

##### 가. 재료 및 방법

감귤 궤양병 진전에 있어서 초미세 구조적 측면을 투과전자현미경을 통하여 감수성과 저항성 종을 비교하였다. 감수성종인 Mexican lime (*Citrus aurantifoli*) 과 저항성종인 Yuzu (*Citrus junos*) 를 *Xanthomonas smithii* pv. *citri* 로 스프레이

접종을 하였는데, 접종 후 9일 후에 멕시코 라임에서 첫 병반이 나타났고 유자는 11일 후에 나타났다. 나타난 병반을 1X3mm으로 시료를 만들어 고정, 탈수, 포매, 중합, 절편제작, 염색과정을 통해 LM을 이용해 전형적인 canker 형성 시일의 구조를 관찰하고 TEM을 이용하여 감수성과 저항성 종에서 어떤 방어기작을 일으키는지 알아보았다.

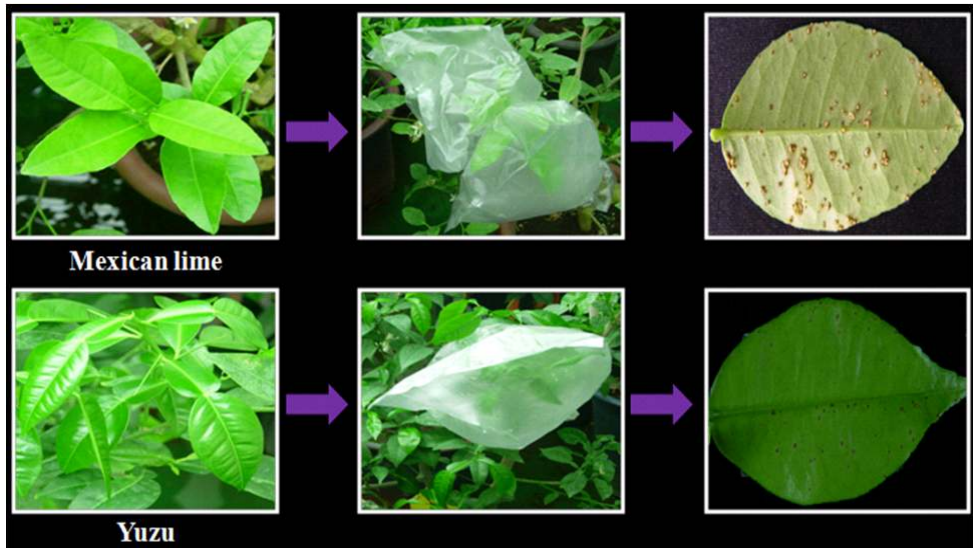


Fig. 20. Spray inoculation and incubation. Canker symptoms of Mexican lime and Yuzu leaf.

#### 나. 결과 및 고찰

##### 1) 궤양 병반 모습

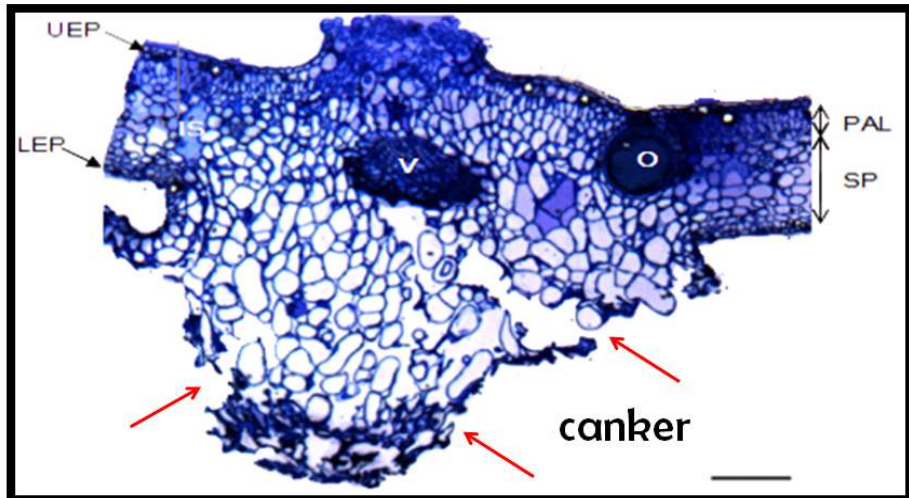


Fig. 21. Light micrograph of an inoculated leaf of Mexican lime leaf. Bar=100 $\mu$ m. LEP=lower epidermis cell, O=oil gland, UEP=upper epidermis cell, V=vein

## 2)접종 시 Mexican lime 과 Yuzu 잎의 초미세 구조적 차이

멕시코 라임에서 세균의 침입은 일반적으로 기주 세포벽 변형과 세포 파괴를 동반하였으며 세포벽 분해로 인하여 나타나는 fibrillar materials 는 세포간극에서 흔히 발견되었다. 괴저된 세포질로 이루어진 손상된 기주 세포들은 침입하는 세균에 인접한 세포벽으로부터 원형질막의 균집된 분리를 보여주었다. 궤양은 과도한 세포 분열로 인한 기주 세포 수의 증가로 인하여 잎의 뒷면에서 진전되는 것을 보여주었고 세균 증식과 electron-transparent capsule-like structures로 둘러싸인 세균들을 일반적으로 볼 수 있었다. Mexican lime 의 기주 세포벽 바깥쪽에서는, 다른 전자밀도를 가진 추가된 층이 세균 세포들 근처에서 뚜렷이 보였으며, Mexican lime 과 Yuzu 둘 다를 침입하는 세균 세포들 안쪽에 봉입체들이 발견되었다.

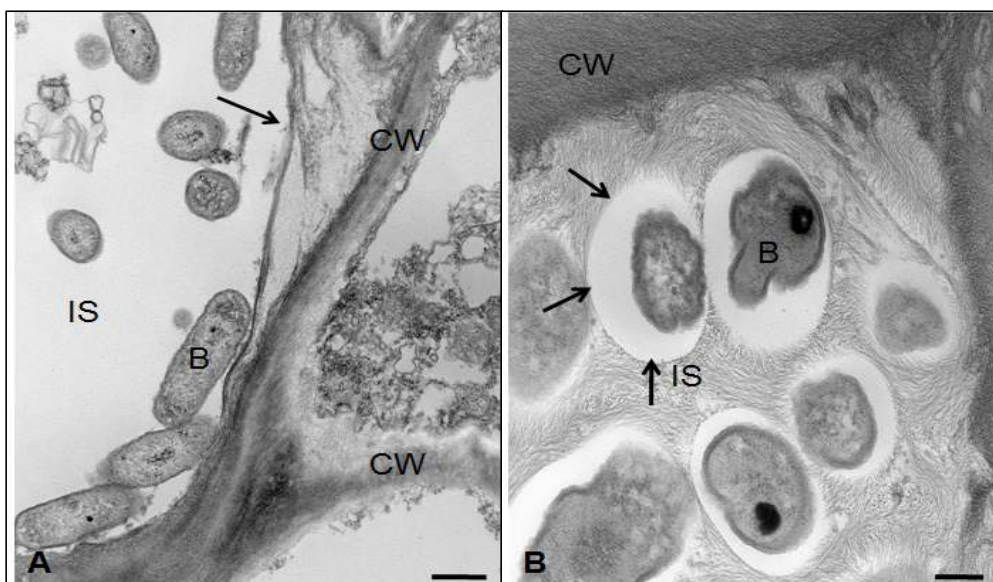


Fig. 22. A. Degeneration of host cell wall. Bar=0.5 $\mu$ m. B, Electron-transparent capsule-like structures around bacteria in the intercellular space. Bar=1 $\mu$ m.

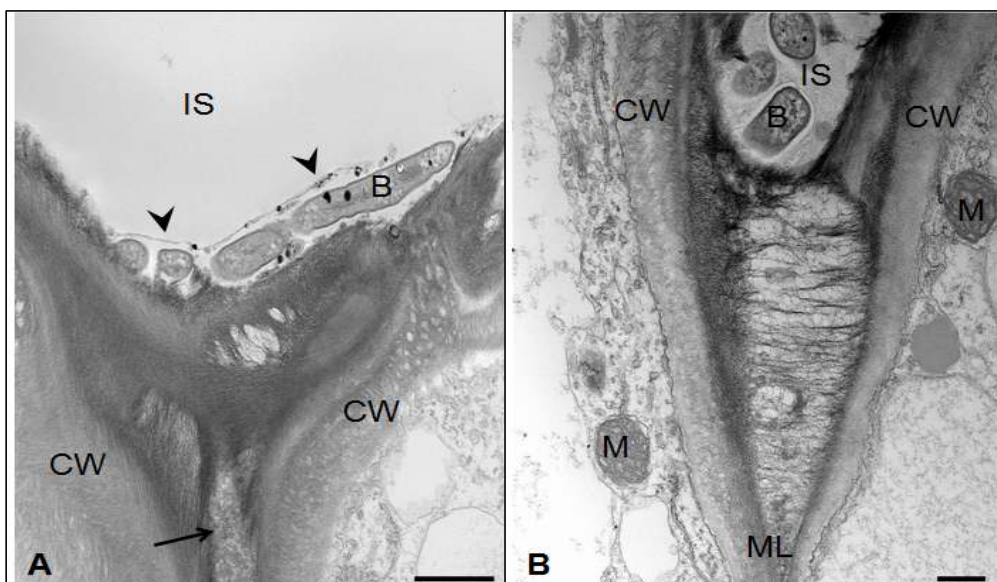


Fig. 23. A, Unenveloped bacteria adjacent to host cell wall. Bar=1 $\mu$ m. B, Dissolution of middle lamella and host cell wall. Bar=0.5 $\mu$ m.

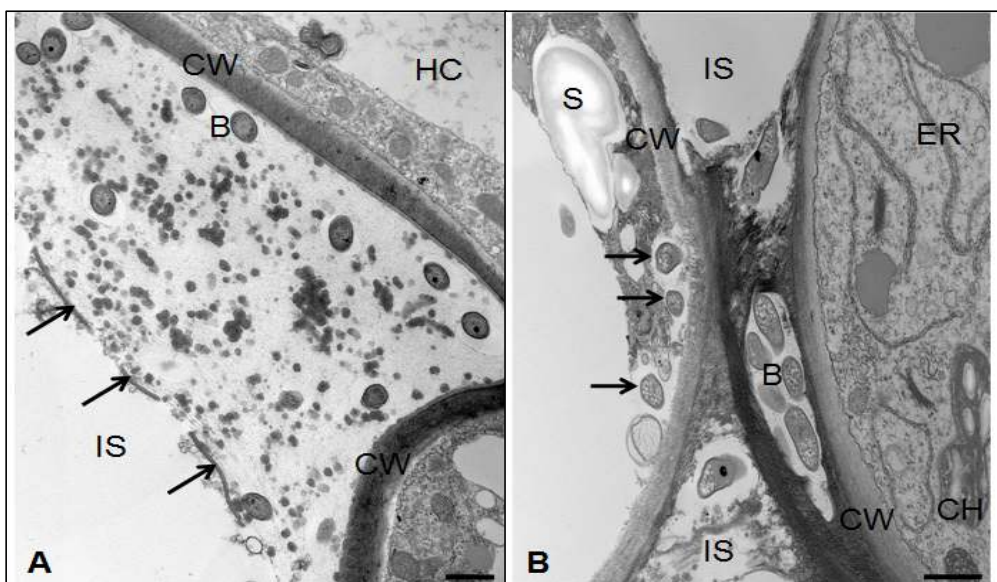


Fig. 24. A, Extramural layer on the host cell wall appeared in the vicinity of bacteria. Bar=1 $\mu$ m. B, Intracellular invasion of bacteria. Bar=1 $\mu$ m.

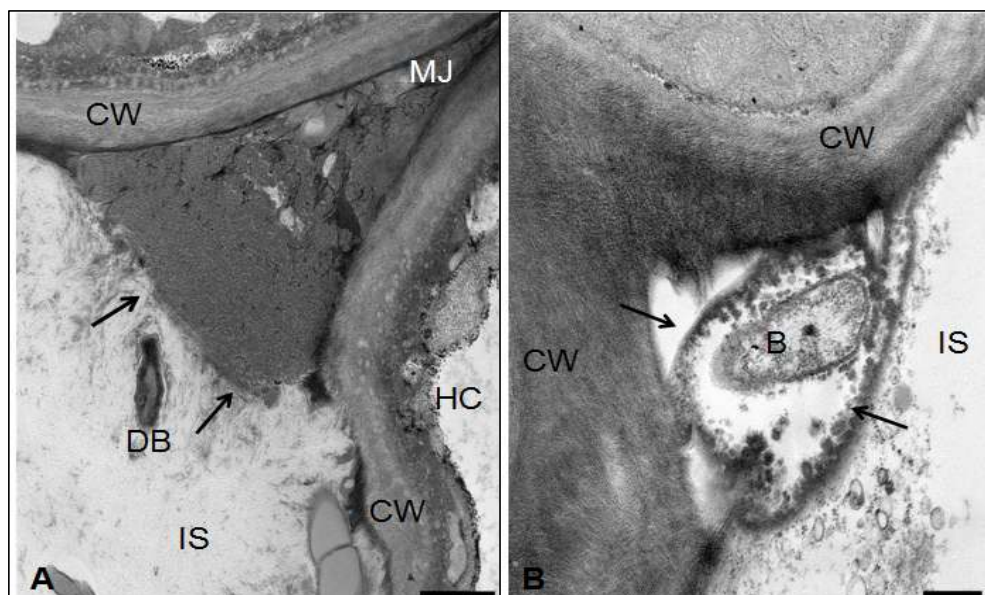


Fig. 25. A, Accumulated electron-dense materials in middle lamella junction. Bar=1 $\mu$ m. B, Pellicle-bound bacterium in the intercellular space. Bar=0.5 $\mu$ m.

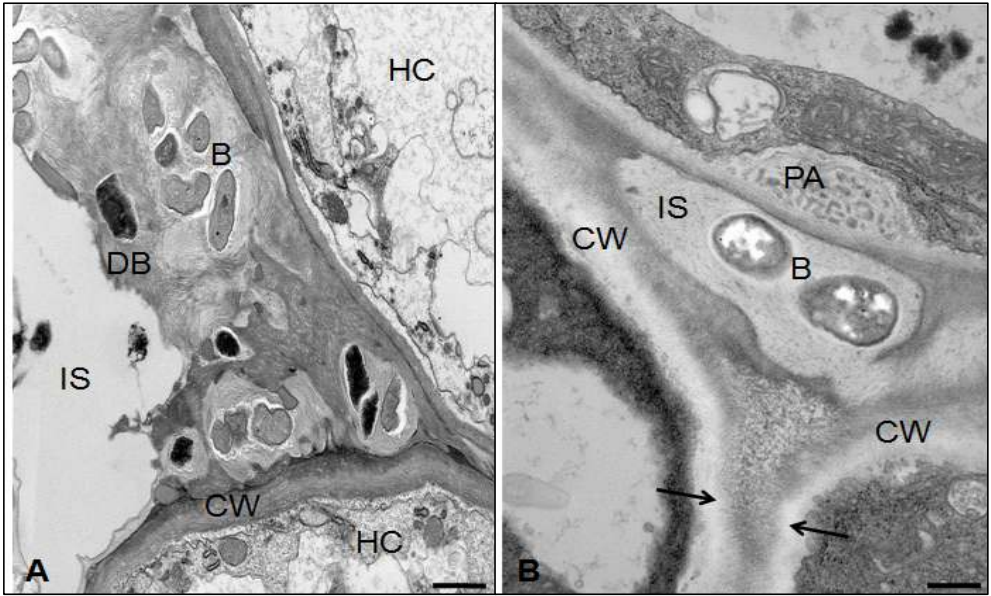


Fig. 26. A, Concentrated host cell wall fibrillar materials on degenerated and intact bacteria. Bar=1 $\mu$ m. B, Accumulation of papilla-like materials in inside host cell. Bar=0.5 $\mu$ m.

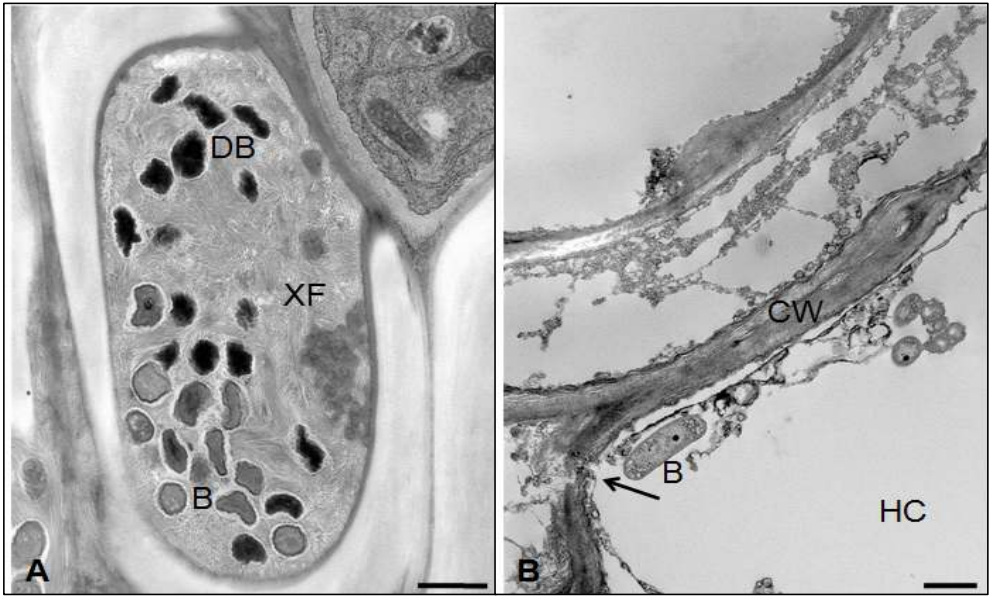


Fig. 27. A, Colonization of the xylem fiber cell with bacteria with either electron-dense or translucent cytoplasm. Bar=1 $\mu$ m. B, Bacterium in the damaged host cell. Bar=1 $\mu$ m.

B = bacterium, CH = chloroplast, CW = host cell wall, DB = degenerated bacteria, ER = endoplasmic reticulum, HC = host cell, IS = intercellular space, M = mitochondrion, MJ = middle lamella junction, PA = papilla-like materials, S = starch, XF = xylem fiber cell

유자 잎의 경우에는, 세포벽 돌기들이 침입하는 세균과 인접한 기주 세포벽 바깥쪽에 종종 형성이 되었고 인접한 두 기주 세포들로부터 비롯된 두 개 또는 그 이상의 개별 세포벽 돌기의 융합으로 인하여 세포간극 맞물림이(교합) 형성되었다. Papilla-like materials 는 세균에 근접하여 기주 세포 안쪽에 국부적으로 축적되었다. 몇 세균들은 xylem fiber cell에서 퇴화되어가는 것을 발견하였고, 쪼그라들고 비활동적인 세균들은 세포간극에서 electron-transparent fibrillar materials 에 의해 둘러싸여져 있었는데 이것은 세균의 고정화를 의미한다. 이와는 대조적으로, 감수성인 Mexican lime의 병든 조직의 세포간극은 온전하거나 증식된 세균들을 포함하고 있었다. 감염된 기주 세포들은 세포벽 으로부터 원형질막 분리와 electron-dense cytoplasm 의 특징들이 나타났는데 이러한 기주 세포 반응들은 침입하는 세균들에 대한 과민성 반응이라고 생각된다.

## 5. 감귤원에서의 궤양병 발생 역학조사

### 제 3절의 1. 감귤 궤양병 발병 현황 결과와 동일



6. 실시간 기상자료를 이용한 감귤 궤양병 발생 예찰 모형 개발

가. 지수성장모형에 기초한 감염 위험도 모형 개발

일정한 온도, 영양분 및 습윤한 조건에서 이분법에 의해 개체군의 크기가 이상적으로 증가한다고 가정하는 지수성장모형(exponential growth model)을 이용하여 궤양병균 개체군의 성장을 모사하였다.

$$N(t) = N_0 \cdot e^{kt} = N_0 \cdot 2^{t/g}$$

$N(t)$  : 시간  $t$ 에서의 개체군의 크기

$N_0$  : 시간  $t=0$ 에서의 개체군의 크기 (개체군 크기의 초기값)

$k$  : specific growth rate

$t$  : 시간 (hour)

$g$  : doubling time (온도에 대한 2차 함수)

온도가 가변적인 포장 상태에서 영양분 및 수분 등의 조건이 충분하게 주어진다고 가정하고, 궤양병균 개체군의 크기를 모사하기 위하여, 위 모형을 다음과 같이 이전 시간의 개체군 크기를 이용하여 현재 시간의 개체군의 크기를 계산할 수 있는 형태로 바꾸었다.

$$N(t) = N(t-1) \cdot 2^{1/g}$$

$N(t)$  : 시간  $t$ 에서의 개체군의 크기

$N(t-1)$  : 시간  $(t-1)$ 에서의 개체군의 크기

$g$  : 시간  $(t-1)$ 에서  $t$ 까지 동안의 doubling time

실제 포장에서는 수분 조건 또한 가변적이므로, 위 모형을 엽면습윤시간  $W$ 를 이용한 다음과 같은 형태의 모형으로 수정하였다.

$$[1] \quad \begin{aligned} N(t) &= N(t-1) \cdot 2^{W/g} \\ &= N(t-1) \cdot 2^{W(139.42 - 9.34T + 0.17T^2)} \end{aligned}$$

$W$  : 시간  $(t-1)$ 에서  $t$ 까지 동안의 엽면습윤지속시간

$T$  : 시간  $(t-1)$ 에서  $t$ 까지 동안의 평균기온

지속적으로 건조한 조건이 유지되면 개체군이 사멸하거나 생리적인 활성이 매우 떨어지므로, 이 효과를 적용하기 위해 다음과 같은 모형을 추가하였다.

[2] 건조시간이 24시간 이상 지속되면 개체군의 크기를 초기화함 ( $N=N_0$ )

개체군의 초기 크기( $N_0$ )를 1로 놓고, 위의 모형 [1]과 [2]를 동시에 고려하는 모형을 개발하였다.

병원균이 감염된 후 외에 병징이 나타나기까지의 잠복기간이 문헌에 나타난 연구 결과에 따르면 20-30일 정도 걸린다. 따라서 위 모형[1]과 [2]에 의하여 추정된 개체군 크기 값으로부터 일별로 30-20일 전 기간 동안의 개체군 크기 값의 이동합(Moving sum of daily population size)을 구하여 이 이동합의 제곱근 값을 병원균의 일일 감염위험도(Daily Infection Risk)로 간주하였다.

#### 나. 모형의 평가

제주 감귤연구소 실험포장에서 관측한 2005년, 2006, 2007년의 시간별 기상관측자료를 이용하여 감염위험도 모형(모형 [1]과 [2])을 구동시킨 결과를 병 발생 조사 결과와 비교하였다 (Fig. 28-33). 2005년(Fig. 29)의 경우 9월 중순에 발생한 병징을 제외하고는 대체로 병발생 경향을 정확하게 예측하였으며, 2006년(Fig. 31)에는 5월 하순-6월 초순 동안의 기상자료가 확보되지 못하여 6월 하순의 초기 병발생에 대한 감염시기 예측이 불가능하였다. 하지만 나머지 기간 동안의 병발생에 대해서는 비교적 정확한 추정을 한 것으로 판단된다. 2007년(Fig. 33)에는 6월 중순부터 7월 중순 사이에 나타난 병징의 감염시기를 정확히 예측하지 못하였다. 하지만 5월 하순-6월 초순 동안의 감염위험도가 2 이상인 경우가 2차례 나타난 것으로 볼 때 본 모형의 감염위험도 자료에 대한 분석이 좀 더 이루어져야 할 것으로 판단된다.

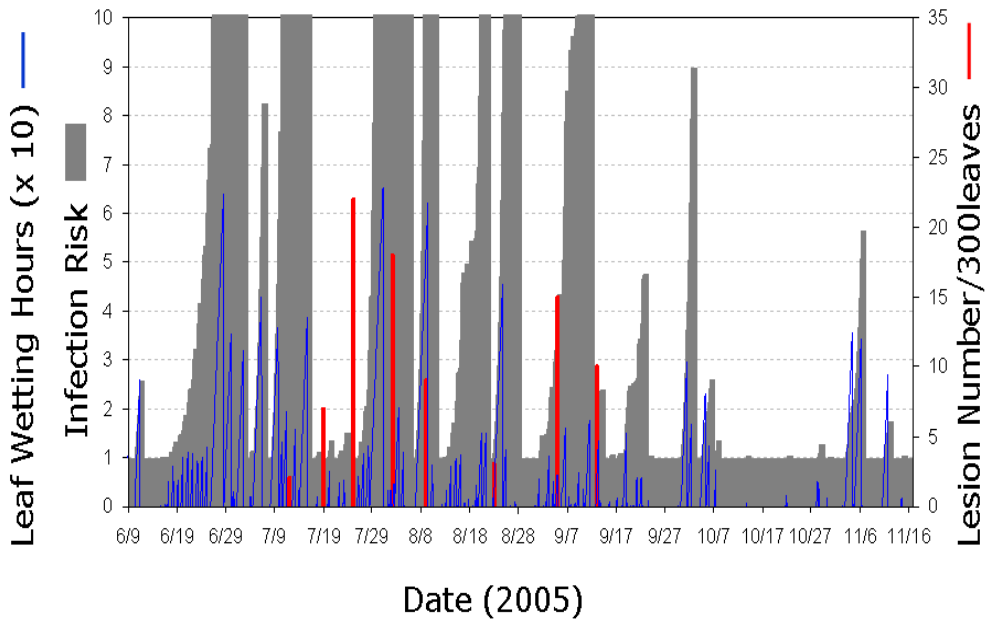


Fig. 28. 2005년도의 감귤 궤양병 발생 조사 결과와 감염 위험도 추정 모형의 결과 비교

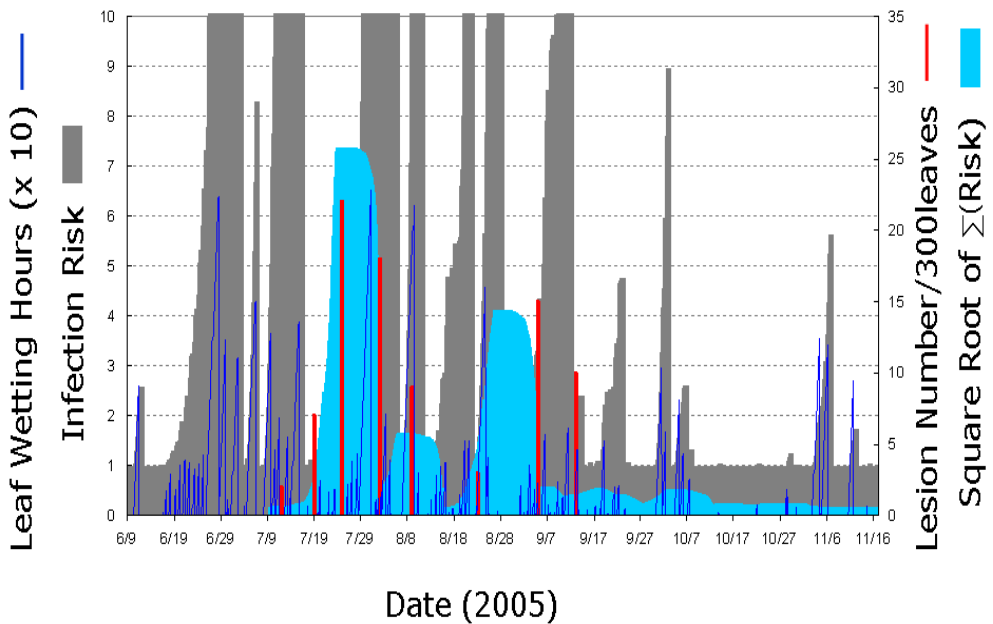


Fig. 29. 2005년도의 감귤 궤양병 발생 조사 결과와 병원균의 잠복기간(20-30일)을 고려한 잠복기간 동안 추정된 감염위험도 비교

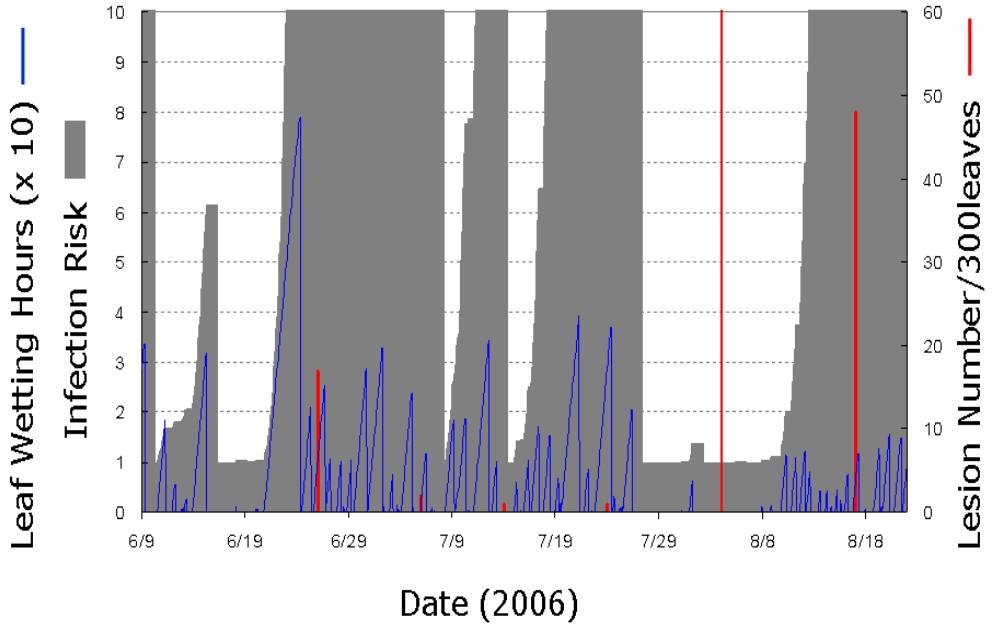


Fig. 30. 2006년도의 감귤 궤양병 발생 조사 결과와 감염 위험도 추정 모형의 결과 비교

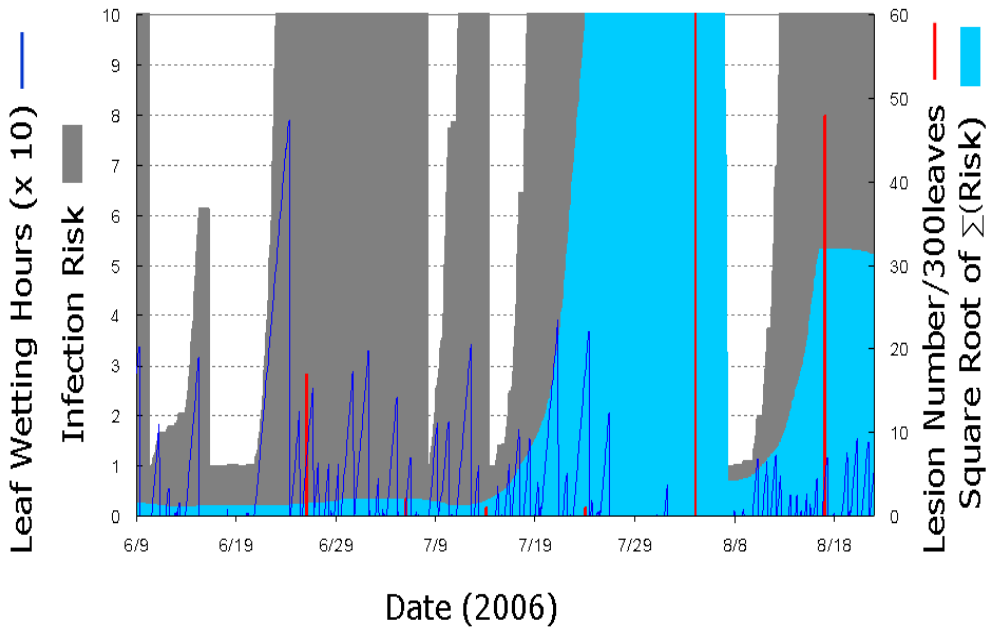


Fig. 31. 2006년도의 감귤 궤양병 발생 조사 결과와 병원균의 잠복기간(20-30일)을 고려한 잠복기간 동안 추정된 감염위험도 비교

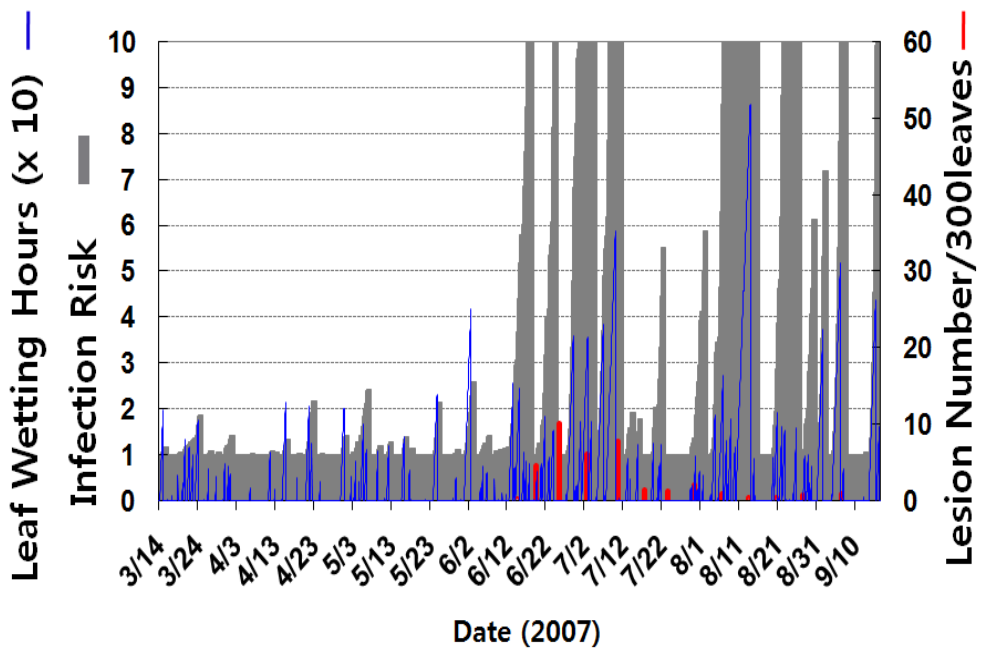


Fig. 32. 2007년도의 감글 퀘양병 발생 조사 결과와 감염 위험도 추정 모형의 결과 비교

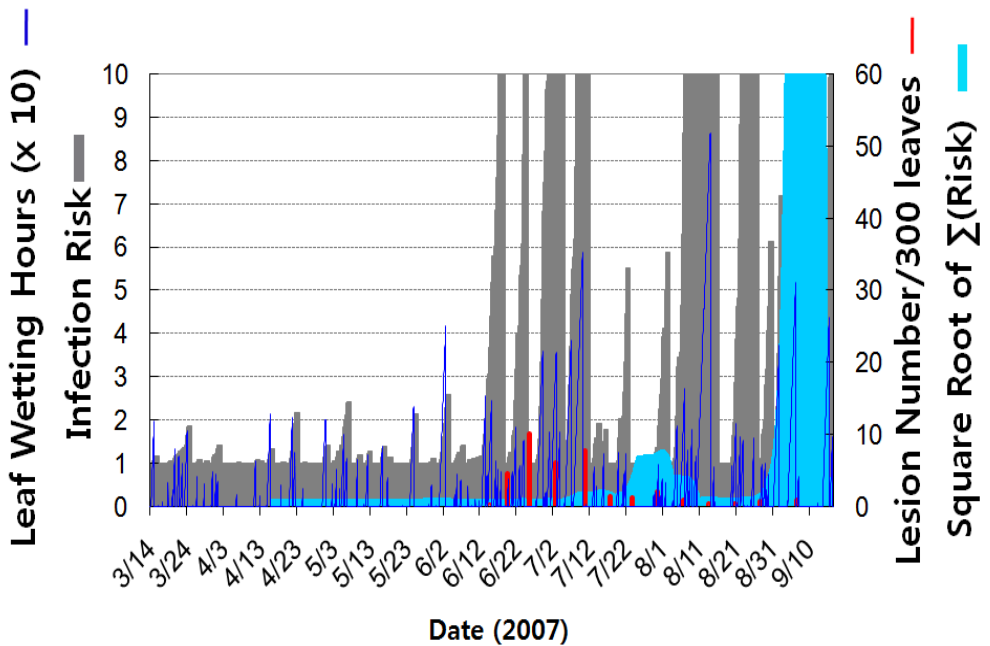


Fig. 33. 2007년도의 감글 퀘양병 발생 조사 결과와 병원균의 잠복기간(20-30일)을 고려한 잠복기간 동안 추정된 감염위험도 비교

## 제 2 절 감귤 궤양병 발생 예측 정보제공 시스템 구현

### 1. 군락기상 관측 및 자료 수집체계 구축

#### 가. 재료 및 방법

##### 1) 무인기상관측기 설치 및 군락기상관측

2005년 5월 20일에 난지농업연구소 감귤시험장 포장(Fig. 1 참조)에 미국 Campbell Sci. Inc.에서 제조한 자료기록기(CR10X)와 기상센서(기온-습도(HMP35C), 지온(107), 일사(LI200X), 강우(TE525M), 풍향-풍속(034A), 엽면습윤(237)) 설치하였다. 또한 2007년 4월 10일에 군락기상관측시스템을 2개 지역(Fig. 2, 3 참조)을 추가 설치하였고 다음과 같은 관측요소와 수집 간격으로 수행하였다. (Table 1참조)

Table 1. 관측요소 및 관측, 수집시간 간격

관 측 요 소	단 위	관측 시간 간격	수집 시간 간격
평균기온	℃	1시간 및 1일 (평균)	1시간 (실시간)
평균상대습도	%		
평균지온	℃		
강우량	mm		
풍향	°		
풍속	m/s		
일사량	MJ/m <sup>2</sup>		
엽면습윤지속시간비율	min/min		



Fig. 1. 감귤연구센터 시험포장에 신규로 설치된 무인기상관측기(AWS)



Fig. 2. 남원읍 의귀리 포장 추가설치 AWS



Fig. 3. 대정읍 무릉리 포장 추가설치 AWS

## 2)군락기상자료 자동수집체계

가) 기상자료 자동 수집 체계는 WDMS(Weather Data Management Server) S/W를 이용하여 기상자료를 수집하고 있다. 본 수집 시스템은 각각의 관측 사이트로부터 자료기록기(Data logger)에 저장된 기상데이터를 정해진 시간 동시에 수집 가능한 무선통신 방법으로 가능하다. 상기 관측기 데이터로거에 CDMA 무선모뎀을 이용할 때 음성통화방식이 아닌 패킷 데이터 통신 방식을 이용하며, 서버 쪽의 모뎀에 접속하지 않고 인터넷을 통해 기상자료저장 관리 서버에 직접 접속하는 방식이다. 즉, 서버의 TCP/IP 포트로 향하는 기상관측기 클라이언트의 접속 방식 형태로 수집된다. 기존에 상용화되어있는 CDMA 모뎀은 5V 직류전원을 사용하여야 하므로 데이터로거의 12V 직류전원을 감압할 수 있는 전류 변압부를 통해야 하며 관측기에 제공되는 외부 전력원이 없이 독립적 작동환경을 갖추어 설치하였다.

나) 무선 전화 모뎀 및 ADSL 전용선을 통해 수집하고 개발 언어 및 도구는 C, Java, MySQL, PHP를 사용, OS는 Linux 커널 2.4, DBMS는 MySQL 3.23 를 이용하여 군락기상 실험자료 자동 수집 체계 구현하였다.

## 나. 결과 및 고찰

### 1)군락기상 관측 수집체계



추가로 설치된 3지역의 무인기상관측기와 더불어 기설치 난지농업연구소 관측기 설치 장소(Fig.4 참조)에서 기온, 상대습도, 일사량, 강수량, 풍향/풍속(일부지역미 설치) 등을 병행하여 관측 자료를 수집하였다. 기설치 장비에는 병 예측에 필요한 결로 센서가 없었으며 수집 체계에 관한 구성과 데이터베이스의 구조는 아래와 같다. (Fig. 5, 6, 7참조)



Fig. 4. 기설치된 난지농업연구소 무인기상관측기 관측 지점

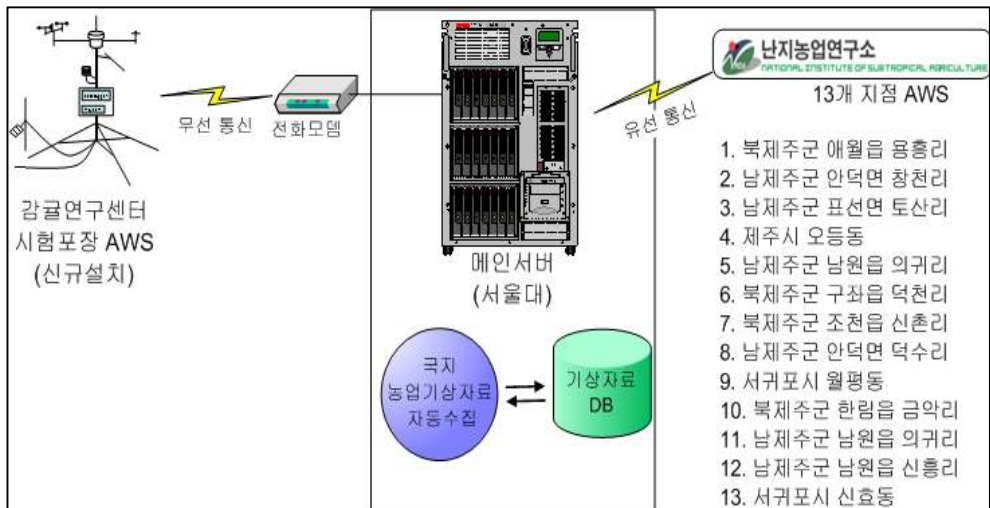


Fig. 5. 군락기상자료 수집체계 구성도

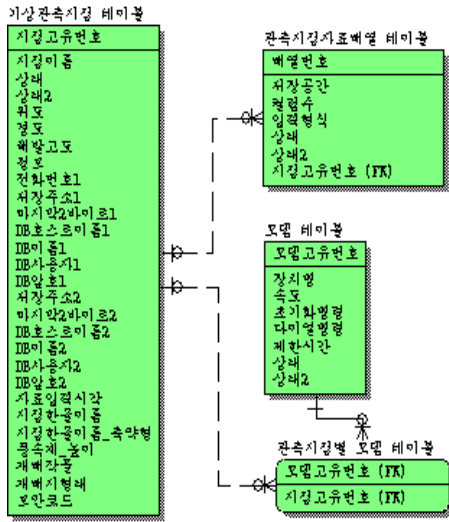


Fig. 6. 군락기상관측자료 DB  
논리모델

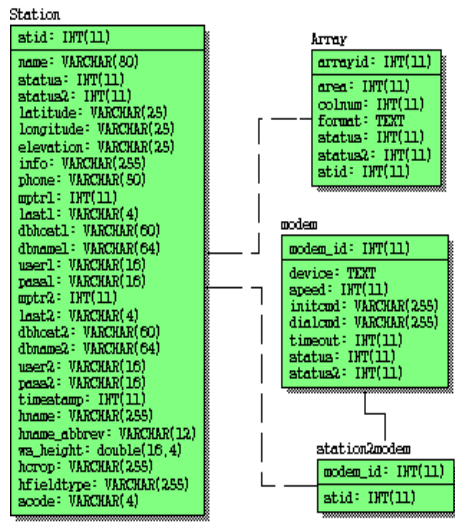


Fig. 7. 군락기상관측자료 DB  
물리모델

## 2) 군락기상자료 열람체계

군락실태자료 열람을 용이하게 하기 위해 서울대학교 식물병역학연구실에서 운영하는 홈페이지(<http://epilab.snu.ac.kr>)를 통해 시간별, 일별, 요소별 및 관측 지점별로 표출되는 웹페이지를 구현하였으며 아래 Fig.과 같은 열람 화면을 제공하였다. (Fig. 8, 9참조)

기상자료 보기

### STEP 1: 지역과 자료의 종류를 선택하세요.

1) 지역	제주도 난지농업연구소 감귤연구센터 시험포장 (#53)
2) 자료의 종류 (오른쪽 에서 Control키를 누르신 상태에서는 두가지 이상을 동시에 선택하실 수 있습니다.)	<ul style="list-style-type: none"> <li>전라북도 농업기술원 메칼담 (익산) (#5)</li> <li>제주도 감귤 계약병 시험포장1 (남원) (#81)</li> <li>제주도 감귤 계약병 시험포장2 (대정) (#82)</li> <li>제주도 감귤연구센터 (#69)</li> <li>제주도 난지농업연구소 감귤연구센터 시험포장 (#53)</li> <li>제주도 남제주군 덕주리 (#63)</li> <li>제주도 남제주군 봉산농원 (#55)</li> <li>제주도 남제주군 연구소2 (#67)</li> <li>제주도 남제주군 의귀리 (#60)</li> <li>제주도 남제주군 창천리 (#57)</li> <li>제주도 남제주군 토산리 (#58)</li> <li>제주도 북제주군 금악리 (#65)</li> <li>제주도 북제주군 덕천리 (#61)</li> <li>제주도 북제주군 신촌리 (#62)</li> <li>제주도 북제주군 용흥 (#56)</li> <li>제주도 서귀포시 신효동 (#68)</li> <li>제주도 서귀포시 월평동 (#64)</li> <li>제주도 서귀포시 하원동 (#66)</li> <li>제주도 제주시 아라 (#59)</li> </ul>
3) 시간 간격	<input type="radio"/> 일별(1440분 간격) <input checked="" type="radio"/> 시간별(60분 간격)
다음 단계로	

Fig. 8. 관측지점 및 자료 선택화면

기상자료 보기

### STEP 3: 선택하신 자료입니다.

- 2006년 1월 부터 2월 까지 제주도 난지농업연구소 감귤연구센터 시험포장 에서 관측된 일별 기상 자료입니다.
- 그래프로 보시려면 아래 표의 맨 윗줄에서 기상자료 종류 부분을 클릭해 주세요.

날짜	기온 (C)			상대습도 (%)			지온(5cm) (C)			일사량 (MJ/SQ-m)	강우량 (0.1mm단위) (mm)	염면습윤 #1 (fraction)	염면습윤 #2 (fraction)	풍속 (m/s)	풍향 (deg)	풍향의 SD (deg m/s)
	평균	최고	최저	평균	최고	최저	평균	최고	최저							
06/01/01	7.61	10.7	6.178	87	99.9	71.5	5.703	6.218	5.305	2.9099	0	0.358	0.474	1.163	16.02	41.03
06/01/02	7.43	14.85	4.029	62.51	100	23.48	6.141	6.306	5.972	10.069	0	0.346	0.352	2.07	32.6	71.3
06/01/03	5.128	11.68	0.524	51.16	79.8	13.33	5.502	5.981	5.095	7.1221	0	0	0	1.172	350.9	78.3
06/01/04	2.143	4.437	-0.293	53.53	95.1	18.5	4.826	5.457	4.32	3.1424	0	0.058	0.085	3.477	20.14	37.22
06/01/05	-0.825	3.689	-3.008	70.3	95.7	41.13	3.895	4.339	3.689	6.5857	0	0.139	0.122	2.458	12.91	44.74
06/01/06	-0.284	6.427	-4.261	75.4	98.2	37.37	3.394	3.698	3.207	8.9345	0	0.548	0.514	1.652	19.97	68.17
06/01/07	0.701	5.333	-3.199	70.1	100	40.79	3.397	3.444	3.309	9.0579	0	0.486	0.47	2.242	10.82	50.99
06/01/08	3.027	9.55	-2.469	67.98	88.4	40.01	3.218	3.462	3.036	8.4519	0	0.018	0	0.894	333.6	74.3
06/01/09	2.754	11.4	-3.365	69.46	93.9	40.36	3.33	3.681	2.98	8.2264	0	0.005	0.001	0.899	309.4	80.5
06/01/10	4.735	12.71	-2.336	68.96	96	40.78	3.184	3.538	2.81	10.544	0	0	0	0.97	345.4	81
06/01/11	6.163	13.54	0.902	70.1	96.2	37.04	3.421	4.012	2.976	10.105	0	0.001	0	1.15	16.28	71.3
06/01/12	9.36	12.44	4.271	80.1	100	69.11	4.353	5.39	3.785	1.9256	0	0.095	0.095	1.178	10.64	47.82
06/01/13	14.41	21.54	10.19	93	100	60.45	8.28	9.99	5.381	8.5659	0	0.508	0.501	0.853	209.9	88.5

Fig. 9. AWS로부터 수집한 군락기상자료 열람용 웹페이지

2. 제주도 전역 준 실시간 그물망 농업 기상 추정 및 관리체계 구축  
 가. 재료 및 방법

1) 기상청 표준기상관측자료 자동 수집체계 개발

시간별 기온, 상대습도, 일사, 강우, 풍속을 수집하였고 기상청에서 농촌진흥청 농업기상정보시스템으로의 자료가 수집되고 감글계양병 예찰서버로 수신하였다.

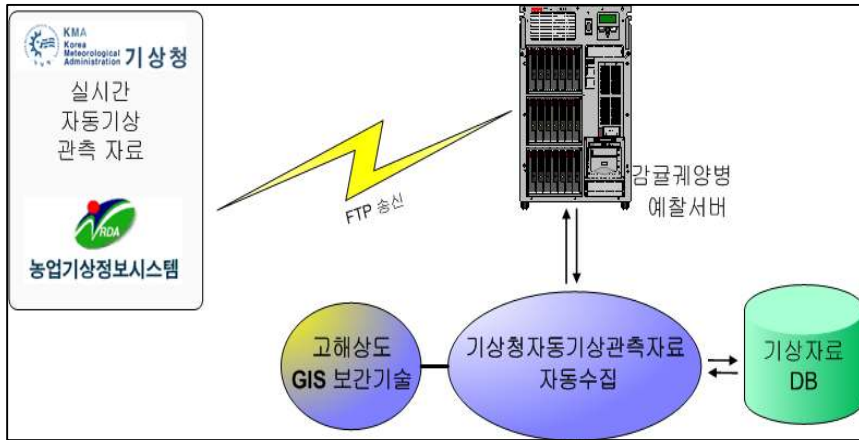


Fig. 10. 기상청 자동기상관측 자료 수집 체계

2) GIS 기술을 이용한 기상보간자료 생산

WDIS(Weather Data Interpolation Server)를 이용해 기상자료 자동 보간 S/W를 구축하였고 격자 해상도는 120m × 120m를 사용하였다. 기온의 보간은 거리제곱역산가중법(IDSW; inverse distance squared weighting)을 이용하여 공간내삽으로 추정점의 시간별 기온을 추정된 후에 표준대기의 높이에 따른 기온감율(-0.0065℃/m)을 이용한 고도보정(elevation correction)을 적용시켜서 추정하였다.

Table 2. 단순공간내삽(기온 이외의 요소들에 대하여 적용)

$T = \frac{\sum \frac{T_i}{d_i^2}}{\sum \frac{1}{d_i^2}}$
T: 추정 점에서의 기상요소 추정값
T <sub>i</sub> : i번째 관측지점에서의 기상요소 관측값
d <sub>i</sub> : i번째 관측지점과 추정 점까지의 거리

Table 3. 고도보정공간내삽(기온에 대하여 적용)

$T = \frac{\sum \frac{T_i}{d_i^2}}{\sum \frac{1}{d_i^2}} + \left( z - \frac{\sum \frac{z_i}{d_i^2}}{\sum \frac{1}{d_i^2}} \right) \Gamma$
T: 추정 점에서의 기온 추정값
T <sub>i</sub> : i번째 관측지점에서의 기온 관측값
d <sub>i</sub> : i번째 관측지점과 추정 점까지의 거리
Z: 추정 점의 해발고도
Z <sub>i</sub> : 추정 점의 해발고도
Γ: 표준대기의 고도에 따른 기온감률(-0.0065℃/m)

일반적으로 기상을 추정할 지점에서의 거리가 가까운 인접 지점 수 개(보통 4~5개)만을 보간에 이용(nearest neighbor method)하지만, 제주도의 기상보간에는 제주도에 영향을 주는 모든 관측지점을 이용하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 무인기상관측자료를 활용한 보간기상 추정

감귤 궤양병 발생 예측모형 구동 입력에 필요한 값을 보간 기상을 생성해내기 위해 기상청에서 설치한 표준기상관측장비(22개 지점)를 이용하여 요소별 기상 값을 추출해낸 결과는 아래 Fig.과 같다. (Fig. 11, 12, 13, 14)

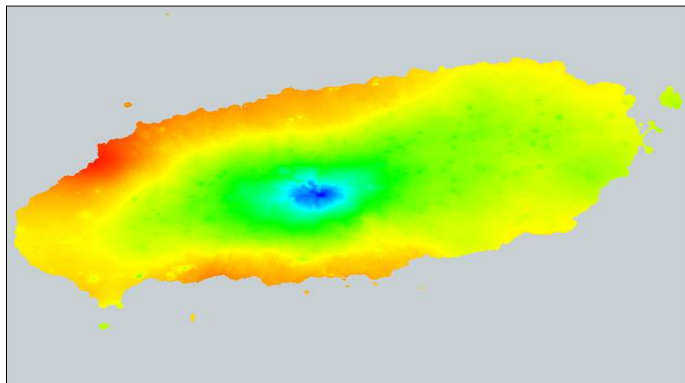


Fig. 11. 제주도 전역에 대한 120m×120m 해상도의 그물망 기온 보간 지도 (2006년 5월 5일 22시)

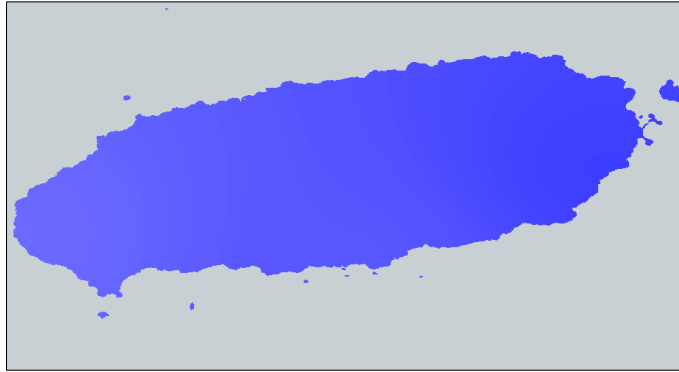


Fig. 12. 제주도 전역에 대한 120m×120m 해상도의  
그물망 상대습도 보간지도 (2006년 5월 5일 14시)

기상청에서 관측하고 있는 자동기상관측기의 경우 결로 센서가 없기 때문에 이를 대체할 수 있는 습도 값을 이용하여 엽면습윤시간 비율을 보간 하였다. 각각 거리 제곱역산가중법을 이용하여 공간내삽하여 추정된 상대습도와 강우량을 바탕으로 다음의 방법으로 엽면습윤시간 비율을 추정하였고 추정 방법은 상대습도가 90%를 초과하거나 강우량이 있을 경우 시간당 엽면습윤시간을 1로, 그렇지 않은 경우 0으로 하였다.

Table 4. 상대습도를 이용한 엽면습윤시간비율 추정 방법의 의사코드(pseudo-code)

```

IF (RH > 90 or RAIN >= 0.1) THEN WET = 1
ELSE WET = 0;

```

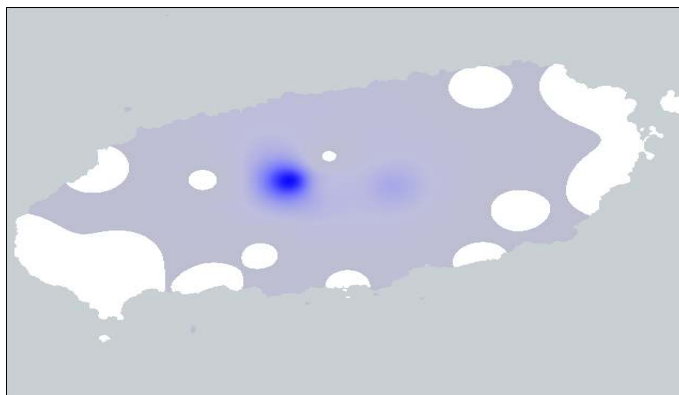


Fig. 13. 제주도 전역에 대한 120m×120m 해상도의  
그물망 강우량 보간지도 (2006년 5월 5일 22시)

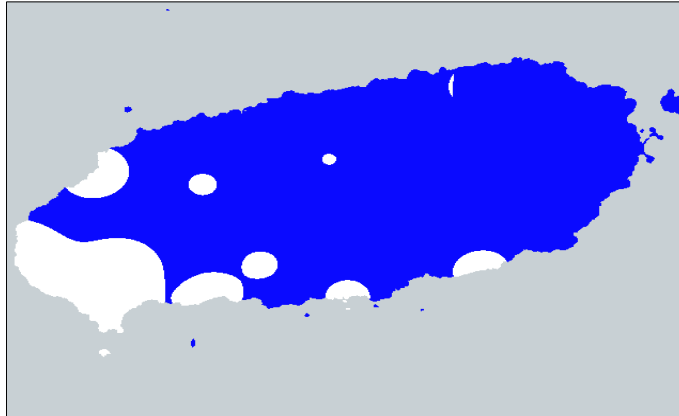


Fig. 14. 제주도 전역에 대한 120m×120m 해상도의 그물망 염면습윤시간 추정 보간지도 (2006년 5월 5일 10시)

### 3. 감귤 궤양병 발생예측 서비스 시스템 구축

#### 가. 재료 및 방법

##### 1) 감귤 병해충 조사정보 수집 관리 및 커뮤니티 시스템 구축

웹 기반으로 관리 가능한 병해충 조사자료 수집 체계는 감귤 시험장에서 수행하고 있는 총 10가지의 항목을 기준으로 구성하였다.

##### 2) 국지 감귤 궤양병 발생 예측 정보 서비스 시스템 구축

제1세부과제(서울대)에서 연구된 결과인 감귤 궤양병에 관한 지수성장모형에 기초한 감염 위험도 모형을 이용하여 지도기반의 웹 시스템을 구축하였다

#### 나. 결과 및 고찰

##### 1) 조사정보수집관리 및 회원 간 정보교환

본 시스템에서는 규격화된 형식으로 정보의 관리를 체계적으로 수집 관리하여 자료 이용의 효율성을 높일 수 있도록 감귤시험장에서 조사되고 있는 방식의 웹기반의 조사항목 관리체계를 구축하였다. 병해충 항목으로는 검은점무늬병(이병과율), 더듬이병(이병엽율, 이병과율), 궤양병(이병엽율, 이병과율), 잿빛곰팡이병(이병엽율, 이병과율), 굴응애(마리/잎), 총채벌레(마리/트랩), 녹응애(이병엽율, 이병과율), 진딧물(발생신초율), 자나방류(마리/주), 깍지벌레류(마리/주) 등이 있으며 자료는 병해충 조사 DB에 저장하여 관리하며 웹상에서 입력/수정/삭제가 가능하도록 구성하였다.(Fig. 15, 16, 17 참조)

사용자 정보	병해충 발생상황 정보 입력	병해충 발생상황 정보 목록	커뮤니티
한용규님 안녕하세요 <a href="#">로그아웃</a>			
감귤 병해충 발생상황 정보 입력			
조사자	[hanyk(한용규)]		
조사날짜	2008년 3월 31일		
조사지역	<input type="text"/>		
검은점무늬병(이병과율)	<input type="text"/>		
더덩이병(이병엽율)	<input type="text"/>		
더덩이병(이병과율)	<input type="text"/>		
괘양병(이병엽율)	<input type="text"/>		
괘양병(이병과율)	<input type="text"/>		
젓빛곰팡이병(이병엽율)	<input type="text"/>		
젓빛곰팡이병(이병과율)	<input type="text"/>		
굵응애	<input type="text"/>	마리/잎	
총채벌레	<input type="text"/>	마리/트랩	
녹응애(이병엽율)	<input type="text"/>		
녹응애(이병과율)	<input type="text"/>		
진딧물(발생신초율)	<input type="text"/>		
자나방류	<input type="text"/>	마리/주	
꼭지벌레류	<input type="text"/>	마리/주	
[입력완료] [ 돌아가기 ]			

Fig. 15. 감귤 병해충 조사항목 입력화면

사용자 정보	병해충 발생상황 정보 입력	병해충 발생상황 정보 목록	커뮤니티
한용규님 안녕하세요 <a href="#">로그아웃</a>			
감귤 병해충 발생상황 정보 조회			
번호	조사자	조사지역	조사년월일
1	김부겸	북제주군 애월읍	2008-03-31
2	한용규	남원을 익귀리	2008-03-31
3	신용순	대정읍 무릉리	2008-03-31
4	김부겸	북제주군 애월읍	2008-03-31
5	신용순	대정읍 무릉리	2008-03-30
6	한용규	남원을 익귀리	2008-03-03

Fig. 16. 조사자료 목록 열람 및 관리 화면(웹)

감귤 병해충 발생상황 정보 조회																	
번호	조사자	조사지역	조사년월일	검은점무늬병(이병과율)	더덩이병(이병엽율)	더덩이병(이병과율)	괘양병(이병엽율)	괘양병(이병과율)	젓빛곰팡이병(이병엽율)	젓빛곰팡이병(이병과율)	굵응애(마리/잎)	총채벌레(마리/트랩)	녹응애(이병엽율)	녹응애(이병과율)	진딧물(발생신초율)	자나방류(마리/주)	꼭지벌레류(마리/주)
1	한용규	남원을 익귀리	2008-03-31	1	4							2				45	
2	신용순	대정읍 무릉리	2008-03-31								20	30					
3	김부겸	북제주군 애월읍	2008-03-31	1333	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	99
4	신용순	대정읍 무릉리	2008-03-30	33	2	3	4	5	6	7	8	9	10				14
5	김부겸	북제주군 애월읍	2008-03-25	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0	4	5	6	7
6	한용규	남원을 익귀리	2008-03-03								34	23				2	1

Fig. 17. 활용 가능한 파일로 다운로드(엑셀)



또한 감귤 생산과 관련된 농가, 지도원 및 연구원간의 과학적인 영농 기술과의 정보 교류를 위해 웹상의 사이버 커뮤니티 구축하였다.(Fig. 18 참조)

사용자 정보	병해충 발생상황 정보 입력	병해충 발생상황 정보 목록	커뮤니티		
한용규님 안녕하세요					로그아웃
커뮤니티 게시판					
지금까지 총3 건이 등록되었습니다.!!					
[새글쓰기]				페이지: 1 / 1	
번호	제목	이름	날짜	보기	선택
3	감귤병해충 조사자료관리에 대해서	한용규	2008-03-31	2	삭제
2	병해충 상황	김부겸	2008-03-31	2	삭제
1	커뮤니티 게시판 오픈	신용순	2008-03-31	22	삭제

[이전으로..] [다음으로..]

Fig. 18. 회원 간 정보교환을 위한 사이버커뮤니티 게시판화면

## 2)국지 감귤 궤양병 예측 정보 서비스 시스템 구축 및 운영

인터넷 웹 기반을 통한 궤양병 예측정보 서비스로 지도상에서 120m<sup>2</sup>급 고해상도 격자별 속성값 표출하도록 구성하였으며, 병 발생위험 가능성 및 기상 추정 정보를 제공받을 수 있도록 구현하였다.(Fig. 19, 20, 21 참조)



Fig. 19. 감귤병해충 예찰정보시스템 초기 접속화면(<http://citrus.epinet.co.kr>)

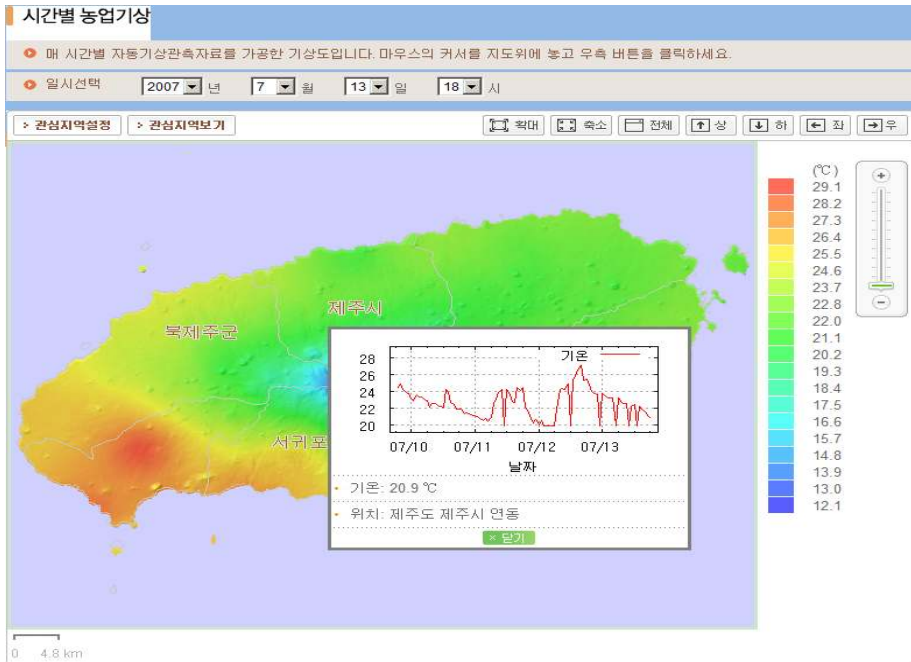


Fig. 20. 시간별 평균기온 보간 기상 지도 및 격자 속성정보

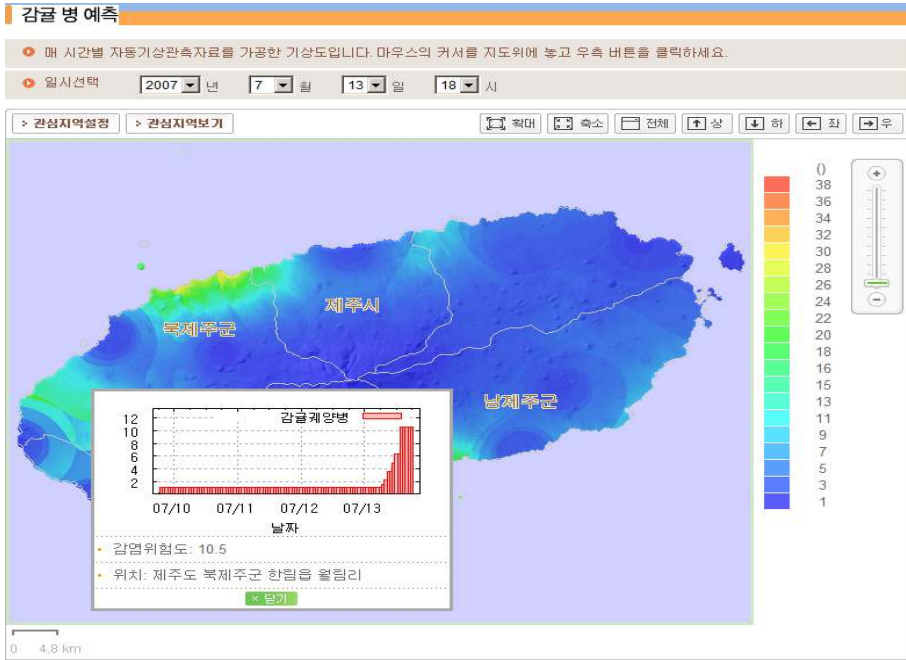


Fig. 21. 시간별 감귤궤양병 발생 예측 지도 및 격자의 속성 화면

### 제 3 절 감귤궤양병균의 항생제 저항성 생태 규명 및 환경친화적 방제체계 개발

#### 1. 감귤 궤양병 발병 현황

2005년부터 2007년까지 3년간 제주도 감귤 재배지의 64개 조사 포장에서의 감귤 궤양병 발병을 조사하여 본 결과 전체적으로 잎의 경우 0.6~2.9% 발병하였으며 열매의 경우 0.2~1.0%정도 감염된 것으로 조사되었다 (Table 1). 또한 지역별로는 제주도 서쪽지역인 한경, 한림지역이나, 동북지역인 조천 지역에서가 다른 지역에 비하여 발병률이 훨씬 높았다(Fig. 1).

Table 1. 최근 3년간 제주도내 감귤궤양병 발병 현황

지 역	조사 농가수	궤양병 발병율(%)					
		2005년도		2006년		2007년	
		잎	열매	잎	열매	잎	열매
서귀동, 남원	16	0.5	0.2	0.3	0.8	0.5	0.3
표선, 성산	13	1.7	0.1	0.7	0.8	0.5	0.0
제주동, 조천	9	7.1	1.0	0.2	1.5	0.3	0.0
제주서, 애월	6	0.4	0.2	1.6	0.2	0.1	0.0
한림, 한경	7	8.6	1.3	7.6	2.1	1.4	1.2
서귀서, 대정	13	2.4	0.8	1.4	0.7	0.7	0.1
합 계	64	2.9	0.5	1.5	1.0	0.6	0.2

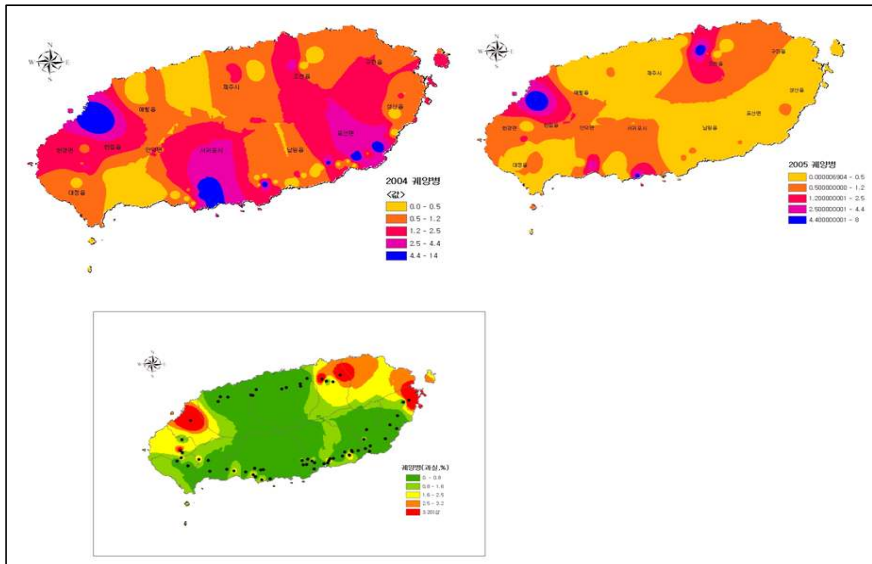


Fig. 1. 지역별 감귤궤양병 발병 정도

## 2. 감귤 궤양병의 진전 상황

2007년도 궤양병에 매우 감수성이 높은 하귤과 자몽 잎에서의 병진전 상황을 1주일 마다 조사해 본 결과 6월 중순경에 첫 병징이 나타나기 시작하여 7월 중순경까지 급격히 병이 진전되었다. 열매의 경우 7월 24일 이전에 병이 발생하기 시작하여 9월 초순경에 급격히 증가하였다 (Fig. 2).

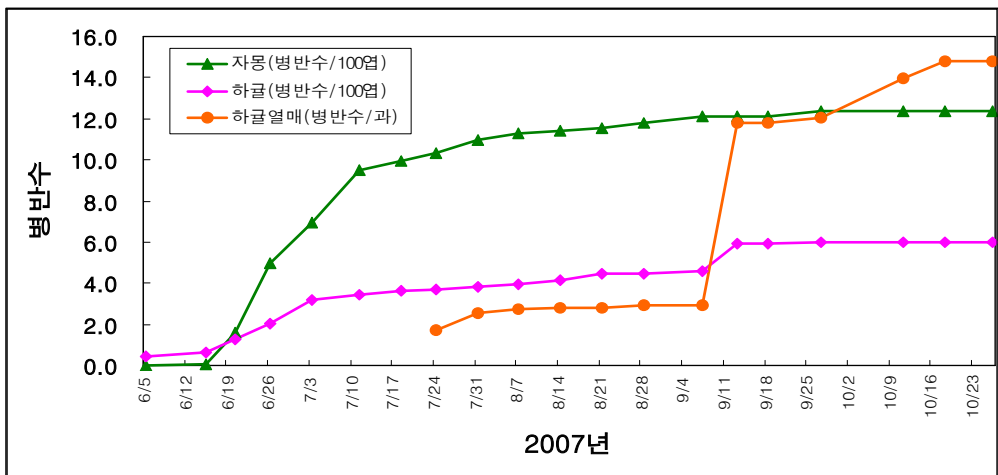


Fig. 2. 감귤궤양병의 진전상황

### 3. 항생제 저항성균의 생태 연구

#### 3-1. 항생제 저항성 균의 분포정도 및 교차저항성

##### 가. 재료 및 방법

스트렙토마이신을 전혀 사용하지 않은 농가에서부터 년 4회 사용하는 제주도내 17개 관원에서 총 319개 케양병을 분리하여 스트렙토마이신과 구리 저항성 여부를 조사하였다. 스트렙토마이신 저항성 조사는 paper disc(8mm)에 40 $\mu$ g의 스트렙토마이신을 적용하고 이 디스크를 200 $\mu$ l(약 10<sup>12</sup>cfu/ml)의 배양액으로 도말 접종된 YNA(yeast extract 5g, nutrient broth 8g, agar 15g/1L)에 치상하고 2일 후 뚜렷한 저지원을 형성한 균을 감수성, 저지원이 형성되지 않은 균주는 저항성 균주로 분류하였다. 구리의 경우 2mM 황산구리가 들어있는 YNA배지에 YNA배지에서 1일 동안 배양된 균주를 접종하여 colony를 형성하는 균주는 구리 저항성, 전혀 colony를 형성하지 못하는 균주는 구리에 감수성으로 분류하였다.

##### 나. 결과 및 고찰

제주도내 17개 관원에서 총 319개 케양병균을 분리하여 스트렙토마이신과 황산구리에 대한 저항성여부를 배지내에서 조사해 본 결과 스트렙토마이신 저항성 균주는 71.2%인 227개 균주이었으며 구리 저항성 균주는 총 120개 균주 중에서 38.3%인 46개 균주 이었다 (Table 2). 스트렙토마이신과 구리에 대한 교차저항성 정도를 알아본 결과 스트렙토마이신과 구리 모두에 저항성인 균주는 조사되어진 121개 균주들 중 26.4%인 32개 균주이었으며, 스트렙토마이신에 감수성이면서 구리에 저항성인 균주는 12.4%인 15개 균주이었다. 또한 구리에는 감수성이지만 스트렙토마이신에 저항성인 균주는 42.2%인 51개 균주이었으며 스트렙토마이신과 구리 모두에 감수성인 균주는 19.0%로써 23개 균주이었다 (Table 3).

Table 2. 감귤에 사용되는 항생제 및 구리에 대한 저항성 정도

과 원	저항성 균주 수/시험균주 수		항생제 살포 회수
	Streptomycin	Copper	
A(남군82-1)	36/39	23/37	1
B(강평삼)	9/13	3/8	2
C(현입아)	7/8	0/7	2
D(김남구)	5/6	0/5	2
E(보목)	1/13	9/13	0
F(하례포장)	10/20	8/18	0
G(대포부지화)	4/11	2/11	2
H(태흥1리)	6/8	1/5	?
I(신사균)	10/10	0/9	3
J(상가J)	5/8	0/7	3
K(보목-1)	7/8		?
L(고산)	35/50		0
M(애월)	25/29		3
O(상가(양))	32/38		5
P(고흥준)	35/39		4
Q(세화)	0/9		?
R(하천)	0/10		?
총 계	227/319 (71.2%)	46/120 (38.3%)	

Table 3. 스트렙토마이신과 구리에 대한 교차 저항성 정도

과 원	형질 발현 균주 수/시험균주 수			
	ST(+)-Cu(+)	ST(-)-Cu(+)	ST(+)-Cu(-)	ST(-)-Cu(-)
A(남군82-1)	21/37	2/37	13/37	1/37
B(강평삼)	3/9	1/9	3/9	2/9
C(현임아)	0/7	0/7	6/7	1/7
D(김남구)	0/5	0/5	5/5	0/5
E(보목)	1/13	8/13	0/13	4/13
F(하례포장)	4/18	4/18	5/18	5/18
G(대포부지화)	2/11	0/11	2/11	7/11
H(태흥1리)	1/5	0/5	4/5	0/5
I(신사균)	0/9	0/9	9/9	0/9
J(상가J)	0/7	0/7	4/7	3/7
총 계	32/121 (26.4%)	15/121 (12.4%)	51/121 (42.2%)	23/121 (19.0%)

### 3-2. 저항성 형질 획득 기작

#### 가. 재료 및 방법

##### 1) Str 유전자 확인

*Erwinia amylovora*에 대해 개발된 프라이머 (strB-F : 5'-GGAACGCGTGGGCTACA-3', strB-R : 5'-GCTAGATCGCGTTGCTCCTCT-3')를 사용하여 감귤궂양병균의 플라즈미드상에 위치한다고 알려져 있는 스트렙토마이신 저항성 유전자(Str)를 PCR를 사용하여 증폭하고 클로닝한 후 염기서열을 분석하여 감귤궂양병 스트렙토마이신 저항성 유전자 증폭용 프라이머, strB-1(forward) : 5'-AACCCCTGCCTTCTGCCCTTCTC-3'와 strB-1(reverse) : 5'-ATCGCGTTGCTCCTCTTCTCCATC-3'를 제작하였다. 이때 증폭은 programmable thermocycler (Perkin-Elmer Cetus thermal cycler, model 480)를 사용하였고 증폭 조건은 95 °C에서 2분간 초기 denaturation, 이어서 총 35 사이클의 94 °C, 30초간 denaturation, 60 °C, 1분간 annealing, 72 °C, 2분간 extension, 그리고 72 °C에



서 10분간 final extension이었다.

DNA 분리는 AccuPrep Gel Purification Kit (Bioneer, Seoul, Korea)를, 클로닝과 형질전환은 Topo TA Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA 92008, USA)를, 플라스미드 분리는 AccuPrep Plasmid Extraction Kit (Bioneer, Seoul, Korea)을 사용하였으며 염기서열 분석은 M13 forward and SP6 reverse primers를 사용하여 양방향으로 Biosystems 3730XL DNA sequencer (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA)에서 실시하였다.

## 2) rpsL 유전자 상의 point mutation 확인

NCBI상의 감귤 궤양병균의 전체 게놈 상에서 rpsL 유전자 염기서열을 이용하여 rpsL 유전자를 증폭시킬 수 있는 프라이머를 제작하고 각각의 균주들로부터 rpsL 유전자를 증폭하여 클로닝하고 염기서열을 분석하여 실제 돌연변이 여부를 확인하였다.

## 3) 감귤 궤양병균의 스트렙토마이신 저항성 유전자 획득 및 발현 기작

항생제 감수성 균주인 남군 87-27 균주를 rifampicin 50 µg/ml이 들어있는 YNA(액체 배지)에서 균이 자랄 때까지 5일간 배양하여 rifampicin 저항성 균주(남군 82-27-rif)를 만들었으며 이 균주는 테스트 결과 여전히 스트렙토마이신에 대해서는 감수성을 보이고 있었다. 남군 82-27-rif 균주와 str 유전자를 가지고 있는 스트렙토마이신 저항성이며 rifampicin에 대해 감수성 균주인 남군 82-54 균주를 YNA 액체 배지에 동일 양으로 접종하여 2일간 배양하였다. 여기에서 일정량을 취하여 YNA 배지, rifampicin (50 µg/ml), 스트렙토마이신(50 µg/ml), 그리고 rifampicin와 스트렙토마이신(각각 50 µg/ml) 들어있는 YNA 고체 배지에 도말 접종하고 1일 후 자라난 균주들의 밀도를 조사하여 항생제 감수성 균주에서 저항성 균주로 전환된 대체의 밀도를 조사하였다.

## 나. 결과 및 고찰

### 1) Str 유전자 확인

StrB-1 프라이머를 사용하여 플라스미드 상에 있는 스트렙토마이신 저항성 유전자의 유무를 조사해 본 결과 전체 조사 73개 균주 중에서 66개 균주가 스트렙토마이신 저항성을 보였으며 이는 균주들 중 62개 균주가 str 유전자를 가지고 있는 것으로 조사되었다(Fig. 3, Table 4). 이들 결과로부터 제주도내에 있는 스트렙토마이신 저항성 감귤 궤양병균들은 str 유전자를 지닌 플라스미드에 의해 스트렙토마이신 저항성을 표현하는 것으로 추정 된다

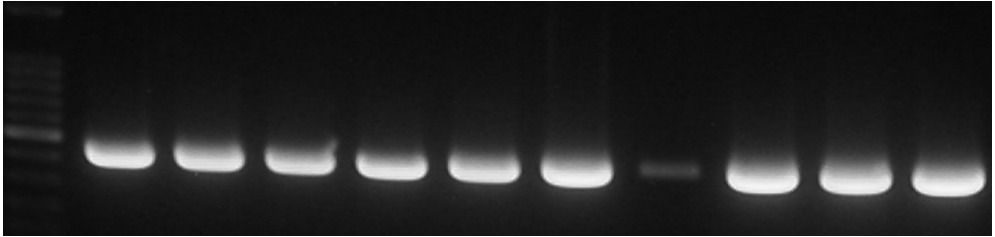


Fig. 3. 감귤 궤양병균으로부터 PCR에 의한 스트렙토마이신 저항성 유전자(Str) 검정

Table 4. 감귤 궤양병균의 스트렙토마이신 저항성 형질과 Str 유전자와의 관계

과 원	형질 발현 균주 수/시험균주 수			
	ST(+)-PCR(+)	ST(-)-PCR(+)	ST(+)-PCR(-)	ST(-)-PCR(-)
남균82-1	37/38	0/38	0/38	1/38
강평삼	8/13	3/13	1/13	1/13
현임아	8/8	0/8	0/8	0/8
김남구	4/5	1/5	0/5	0/5
연포장	1/1	0/1	0/1	0/1
보성-1	4/8	1/8	3/8	0/8
합 계	62/73(84.9%)	5/73(6.9%)	4/73(5.6%)	2/73(2.8%)

ST(+) : streptomycin 저항성, ST(-) : streptomycin 감수성,

PCR(+) : PCR에 의한 Str 저항성 유전자 증폭, PCR(-) : Str 유전자 없음

## 2)rpsL 유전자 상의 point mutation 확인

또한 제주도 감귤궤배지에서 분리된 균주들에 대해서 Streptomycin 저항성 여부를 조사한 결과 29개 균주들 중에서 26개 균주들은 저항성 균주였으며 3개

균주만이 감수성 균주였다. 이들 항생제 저항성인 26개 균주들 중 23개 균주에서 뚜렷이 Str 유전자가 PCR에 의해 증폭되었다. 위 감수성 균주 3개 균주는 Str 유전자가 증폭되지 않았으며 또한 rpsL 유전자상에서 point mutation도 일어나지 않아서 41번째 아미노산 염기서열이 AAG를 유지하였다. 하지만 항생제 저항성 균주 19개 중 str유전자가 없는 1개 균주를 포함한 15개 균주는 41번째 아미노산을 code하는 염기서열이 AGG로 변하였다. 하지만 항생제 저항성을 표현하면서도 4개 균주는 41번째 아미노산 염기서열이 AAG를 유지하였다. 따라서 항생제 저항성 19개 균주들 중 14개 균주는 Plasmid상의 항생제 저항성 유전자인 str 유전자와 동시에 염색체 DNA상의 rpsL 유전자에 point mutation이 있음을 알 수 있었고 항생제 저항성 균주들 중 4개 균주는 Plasmid상의 str유전자에 의해서만, 그리고 1개 균주는 rpsL 유전자의 point mutation에 의해 항생제 저항성이 발현되고 있음을 알 수 있었다(Table 5, Fig. 4, 5).

### 3) 감귤 궤양병균의 스트렙토마이신 저항성 유전자 획득 및 발현 기작

실험 결과 스트렙토마이신 감수성인 남균 87-27균주는 스트렙토마이신 저항성균주인 남균82-54균주와 혼합 배양을 통하여 3.3:1의 비율로 스트렙토마이신 저항성 균주로 전환되었음을 알 수 있었다. 이는 자연계에서도 항생제 감수성 균주가 항생제 저항성 균주와 만나서 항생제 저항성 형질을 획득할 수 있을 가능성을 제시해준다고 할 수 있겠다.

Table 5. 군주별 항생제 저항성과 플라스미드상의 *Str* 유전자 존재여부, 및 *rpsL* 유전자상의 point mutation 여부

군주명	Streptomycin 저항성	Str 유전자 증폭여부	Codon 41 of <i>rpsL</i> gene	a.a. of 41 of <i>rpsL</i> gene
신호(SIN)-1	+	+	AGG	R(arg)
보목(B)-18	+	-	AGG	R(arg)
보목(B)-93	+	+	AGG	R(arg)
강평삼(KPS)-50	+	+	.	.
신사균(SSG)-22	+	+	AAG	K(lys)
김남구(KNK)-28	+	+	AGG	R(arg)
의귀(E)-53	+	+	.	.
포장(P)-10	+	+	AGG	R(arg)
상가(Sang) F-40	+	+	AGG	R(arg)
상가(Sang) D-10	+	+	AGG	R(arg)
구역(G)-17	+	+	AGG	R(arg)
태흥(T)-20	+	+	AAG	K(lys)
태흥(T)-27	+	+	AAG	R(arg)
부열(BY)13-2	+	+	.	.
포장(P)-52	+	+	AAG	K(lys)
포장(P)-50	+	+	AGG	R(arg)
봉성(B)2-18	-	-	.	.
남군(N)82-14	+	+	AGG	R(arg)
남군(N)82-29-1	+	+	AAG	K(lys)
남군(N)82-29-3	+	+	AGG	R(arg)
남군(N)82-54	+	+	AGG	R(arg)
남군(N)82-65	+	+	AGG	R(arg)
남군(N)82-29-4	+	+	AGG	R(arg)
남군(N)87-2	+	+	.	.
남군(N)87-27	-	-	AAG	K(lys)
남군(N)87-55	-	-	AAG	K(lys)

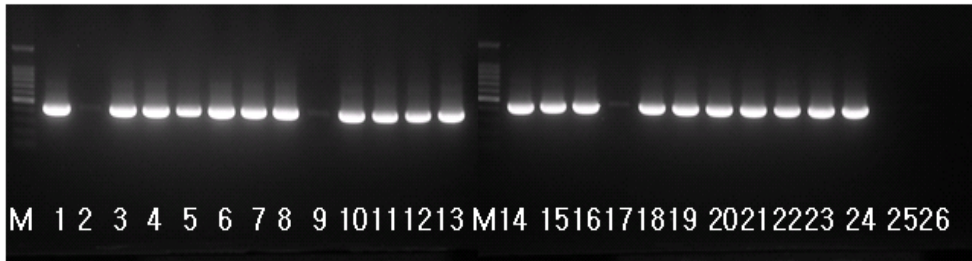


Fig. 4. PCR에 의한 str 유전자 증폭

Lane M: 100bp DNA ladder, 1: 신호-1, 2:보목-18, 3:보목-93, 4:감평삼-50, 5:신사균-22, 6:김남구-28, 7:의귀-53, 8:포장-10, 9:상가 F-40, 10:구역-17, 11:상가 D-10, 12:태홍-20, 13:태홍-27, 14:부열13-2, 15:포장-52, 16:포장-50, 17:봉성2-18, 18:남군82-14, 19:남군82-29-1, 20:남군82-29-3, 21:남군82-54, 22:남군82-65, 23:남군82-29-4, 24:남군87-2, 25:남군87-27, 26:남군87-55

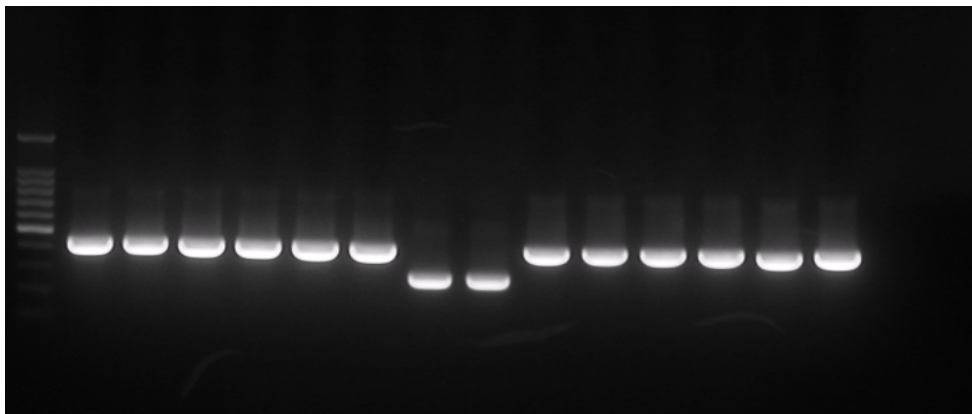


Fig. 5. PCR에 의한 rpsL 유전자 증폭

#### 4. 구리피해 발생 현황 조사

##### 4-1. 구리제 종류에 따른 구리제 살포 피해 정도

###### 가. 재료 및 방법

본 시험에 사용된 구리제는 자가 보르도액 (2-4식 : 황산동 2 g + 생석회 4 g/L, 5-5식: 황산동 5 g + 생석회 5 g/L), 보르도액 CM150 (505: 5-5식, 408: 2-4식), 보르도믹스처 입상수화제(Cu로서 20%, 상표명 - 피쳐, Syngenta Korea), 쿠퍼수화제(Cu로서 35%, 상표명-코사이드, 주식회사 동부한농), 트리베이직코퍼설 페이트 액상수화제(Cu로서 15%, 상표명-새빈나, Syngenta Korea)를 사용하였다.

새순에서의 구리피해를 조사하기 위하여 구리제를 발아초기인 4월 말에서 5월 초 경에 살포하고 7일 후 피해 신초 수를 조사하였다. 과실의 경우 5월 말부터 8월까지 매달 1-2회 구리제를 각각의 나무에 처리하였다. 구리제 살포 1일전에, 그리고 구리제 살포의 해당 시기 이외에는 약 15일 간격으로 구리피해와 증상이 매우 유사한 검은점무늬병을 방제하기 위하여 만코지를 살포하였다. 착색이 80%이상 진전된 11월 중순경에 구리피해정도를 조사하였다. 구리피해 정도는 아래와 같이 검은점무늬병 이병도 조사 기준으로 조사하였다. 구리피해도(%)= [(1A+3B+5C+7D+9E)/9 x 표본수] x 100

0: 구리피해 면적 0, A: 구리피해 면적 <1%, B: 구리피해 면적 1-5%, C: 구리피해 면적 6-25%, D: 구리피해 면적 26-50%, E: 구리피해 면적 51-100%.

#### 나. 결과 및 고찰

중요한 궤양병 방제 수단중의 하나인 구리제 들에 대한 살포 피해를 새순과 열매에 대해 조사해 본 결과 열매에서도 항상 구리피해의 가능성이 있어 궤양병 방제에 있어서 큰 제한이었으며 특히 자가 제조 보르도액의 경우 피해가 가장 심하였다 (Table 6, 7, 8).

Table 6. 새순에 대한 구리제 별 구리 피해 정도('05)

처 리	구리피해율(%)
자가 보르도액(5-5식)	93.1
자가 보르도액(5-5식) + 아연	83.0
자가 보르도액(5-5식) + 동계기계유	8.3
보르도액 (피 처)	0.01
보르도액 (피 처) + 동계기계유	0.01
보르도액(이 노)	0.01
보르도액(이 노) + 동계기계유	0.01
유기동제	86.7
유기동제 + 탄산칼슘	27.5
유기동제 + 탄산칼슘 + 동계기계유	0.03
쿠푸러스옥사이드(신기동)	0.02

※ 5월 3일 살포, 5월 11일 조사

- 자가 보르도액 : 황산동과 생석회를 이용하여 자가에서 제조한 보르도액, 아연 첨가 시 황산동과 동일 양 첨가
- 유기동제 : 구리입자에 아미노산이 킬레이트 된 구리제 사용

- 탄산칼슘 : 크레프논 200배 사용
- 동계기계유유제는 100배

Table 7. 과실에 대한 구리제 별 구리 피해 정도('05)

처 리 <sup>1</sup>	살포시기에 따른 구리피해 과율(%)					피해도(%) <sup>2</sup>
	6월7일	6월21일	7월6일	7월25일	8월16일	연속살포 <sup>3</sup>
자가 보르도액2-4	0	0	0	0	0	38.5
자가보르도(2-4) + 기계유	0	0	0	0	0	25.2
보르도액 CM150 (4-4)	0	0	0	0	0	22.2
보르도액 CM150+기계유	0	0	0	0	0	13.3
보르도액(피쳐)	0	0	0	0	0	21.5
보르도액(피쳐) + 기계유	0	0	0	0	0	20.0
Cuprik	0	0	0	0	0	73.3
Cuprik + 기계유	0	0	0	0	0	56.3
IC 보르도	0	0	0	0	0	28.9
IC 보르도+기계유	0	0	0	0	0	19.3
Authors 보르도	0	0	0	0	0	23.7
Authors보르도+기계유	0	0	0	0	0	16.3
새빈나	0	0	0	0	0	20.0
새빈나+기계유	0	0	0	0	0	18.5
새빈나+크레프논	0	0	0	0	0	13.3
새빈나+크레프논+기계유	0	0	0	0	0	12.6

- <sup>1</sup> 자가 보르도액 : 황산동과 생석회를 이용하여 자가에서 제조한 보르도액
- 탄산칼슘 : 크레프논 200배 사용
- 기계유 : 동계기계유유제 400배
- <sup>2</sup> 검은점무늬병 이병도 조사 기준에 따름
- <sup>3</sup> 6월 7, 21일, 7월 6, 25일, 8월 16일 연속 살포

Table 8. 신초와 열매에 대한 구리제 별 구리제 살포 피해 정도('06)

처 리	구리피해도(%)	
	신초	열매
자가 보르도액(2-4식)	29.7	12.8
자가 보르도액(2-4식)+동계기계유400배	.	3.82
자가 보르도액(2-4식)+동계기계유100배	2.5	2.55
자가 보르도액(5-5식)	32.8	50.61
자가 보르도액(5-5식)+동계기계유400배	.	39.77
자가 보르도액(5-5식)+동계기계유100배	17.4	16.5
자가 보르도액(5-5식)+CAA-1(500배 )	0.4	33.3
자가 보르도액(5-5식)+CAA-2(500배)	2.0	50
자가 보르도액(5-5식, 고순도 동)	22.2	63.1
자가 보르도액(5-5식, 고순도 생석회)	65.8	35.2
자가 보르도액(5-5식, 고순도 동, 생석회)	19.0	52.72
보르도믹스처(피쳐)	.	6.89
트리베이직코퍼셀페이트 + 탄산칼슘	.	12.58
쿠퍼하이드록사이드 + 탄산칼슘	.	17.52

CAA : 식물성 파라핀유, 황산동 : 98.5%(상록화학, 황산동)

고순도 동 : 99% 이상 (동양제철화학주식회사, 황산구리)

생석회 : 극동화학(생석회분말)

고순도 생석회 : 90% 이상(동양제철화학주식회사, 산화칼슘)

#### 4-2. 구리제와 파라핀유 혼용시 구리 피해 경감 원인

##### 가. 재료 및 방법

구리제와 파라핀유와의 혼용에 의한 구리피해 경감효과를 알아보기 위하여 혼용에 의한 구리피해 정도를 위와 같은 방법으로 조사하였고 또한 그 기작을 알아보기 위하여 살포 1일, 60일 후 잎에 부착된 구리 함량을 조사하였다. 엽면적당 구리 함량은 살포된 잎을 채취하여 3N HCl 용액 속에서 구리 성분을 추출하고 ICP를 사용하여 측정하였다.

##### 나. 결과 및 고찰

시험 결과 구리제에 기계유유제를 혼용하여 살포할 경우 구리피해가 증대되



지 않고 오히려 감소됨을 알 수 있었다. 앞서의 실험에서 어린 잎(순)에 자가 제조 보르도액을 살포하면 거의 모든 잎이 괴사하였지만 자가 제조 보르도액 2-4식에 기계유유제 100배를 혼용하여 살포하였을 경우 45.8%에서 95.8%까지 구리피해엽율이 감소함을 알 수 있었다. 과실에 있어서도 동일한 나무에 약 20일 간격으로 5회 연속(2004년 6월 3일과 23일, 7월 16일, 8월 3일과 20일) 동일한 구리제를 살포하였을 경우 자가 제조 보르도액 5-5식을 살포한 구에서의 구리 피해도는 55.3%이었지만 기계유유제 150배를 혼용하여 살포하였을 경우에는 구리피해도가 43.5%로 구리 피해를 21.3% 경감시킬 수 있었다. 2005년도의 경우도 자가 제조 보르도액 2-4식을 기계유유제 150배와 혼용하여 살포한 구에서 자가 제조 보르도액 2-4식을 단용으로 살포한 구에서 보다 구리피해를 48.1% 경감시킬 수 있었다. 그리고 보르도액 이외의 구리제에 있어서도 기계유유제를 혼용하여 살포하였을 경우 구리피해가 감소함을 알 수 있었다(Table 6, 7, 8).

구리제와 기계유유제를 혼용하여 살포 하고 1일 후 감귤 잎 표면에 부착된 구리함량을 조사한 결과 자가 제조 보르도액 5-5식과 2-4식에 기계유유제 100배를 혼용하여 살포하였을 경우 구리제만 살포하였을 때 보다 구리 부착량이 약 17.5% 와 20% 가량 줄어들었지만 살포 60일 후에 조사한 결과는 기계유유제가 혼용 살포된 잎에서 훨씬 많은 구리가 부착되어 있음을 알 수 있었다.(Table 10). 하지만 더뎡이병에 대한 방제 효과에 있어서는 기계유유제 100배를 혼용하여도 그 방제 효과에 있어서는 거의 차이가 없음을 알 수 있었다. Table 8의 결과에서 보르도액 2-4식을 살포한 구에서 보르도액 5-5식과 기계유유제를 혼용 살포한 구에서 보다 구리피해가 많이 나오는 것으로 보아 구리제에 기계유유제를 혼용하여 살포할 경우 구리 피해 경감은 초기 부착되는 구리의 양의 감소에 의한 것만이 아님을 알 수 있었다.

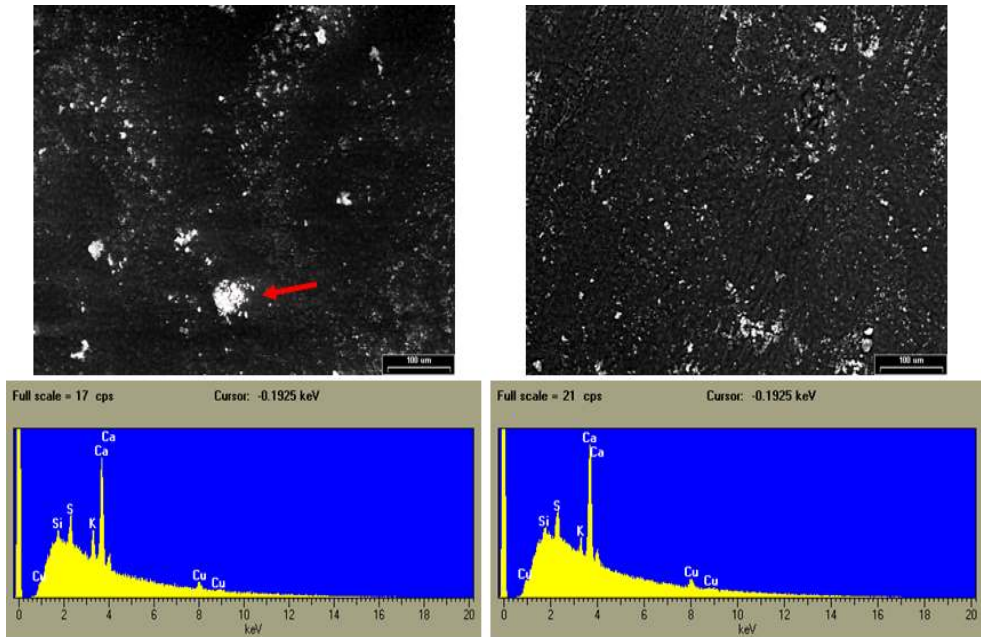
또한 구리제 단용구와 구리제와 기계유유제를 혼용 살포한 감귤 나무의 잎을 주사전자현미경으로 분석하여 본 결과 구리제 단용구에서 기계유유제 혼용 살포구에 비하여 구리 입자들이 뭉쳐져 있음을 알 수 있었다(Fig. 6). 이상의 결과들로 구리제에 기계유유제를 혼용살포 할 경우 구리피해가 감소하는 것은 식물체 표면에 부착되는 구리양의 감소에서 기인된 것이 아니라 식물체 표면에 구리입자가 뭉쳐져 있는 정도가 덜하기 때문인 것으로 판단된다.

Table 9. 지역별 구리제와 파라핀오일을 혼용 살포 농가 중 구리 피해 발생 농가

지 역	구리피해 발생 농가 수 / 조사 농가 수
서귀포, 대정	0/15
남원, 표선, 성산	0/8
제주, 조천, 함덕	0/10
애월, 한림, 한경	0/8
기타(해남)	0/1
총 계	0/42

Table 10. 감귤 잎에 부착되는 구리 및 칼슘 함량 비교

처 리 <sup>1</sup>	부착량 (ppm)/ 잎 (100cm <sup>2</sup> )			
	1일 후		60일 후	
	Ca	Cu	Ca	Cu
자가보르도(5-5)	8.04 ± 0.31 a <sup>2</sup>	4.00 ± 0.18 a	1.19 ± 0.26a	1.37 ± 0.12a
자가보르도(5-5) +기계유 100배	6.31 ± 1.02 b	3.30 ± 0.47 b	1.66 ± 0.27a	1.84 ± 0.29a
자가보르도(5-5) +기계유 400배	8.54 ± 0.87 a	3.83 ± 0.22 a	1.50 ± 0.11a	1.66 ± 0.36a
자가보르도(2-4)	7.03 ± 0.77 a	1.66 ± 0.21 a	0.84 ± 0.26b	0.33 ± 0.09b
자가보르도(2-4) +기계유 100배	5.69 ± 0.32 b	1.33 ± 0.08 b	1.84 ± 0.47a	0.66 ± 0.13a



### 보르도액 2-4

### 보르도액 2-4+기계유유제

Fig. 6. 분석주사전자현미경을 이용한 구리제 살포 식물체 표면 구리 분석 분석

## 5. 친환경적 방제 체계 확립

### 가. 재료 및 방법

퀘양병에 대한 방제 실험은 퀘양병 발병이 많은 레몬 재배 포장에서 실시하였으며 5월 말부터 8월말까지 2주 간격으로 5-6회 살포하였으며 봄순과 과실에서 이병엽률과 과율을 조사하였다.

### 나. 결과 및 고찰

친환경 농자재들에 대한 퀘양병 방제 효과를 조사해 본 결과 구리제들이 효과가 있음을 알 수 있었으며 스트렙토마이신 저항성 균주들이 분포가 적을 경우 스트렙토마이신도 효과가 있음을 알 수 있었다(Fig 7, 8, 9, 10). 또한 2007년도 실험결과에서 실리콘도 어느 정도 효과를 보임에 따라 실리콘에 대해서는 추후 검정이 요구되어진다.

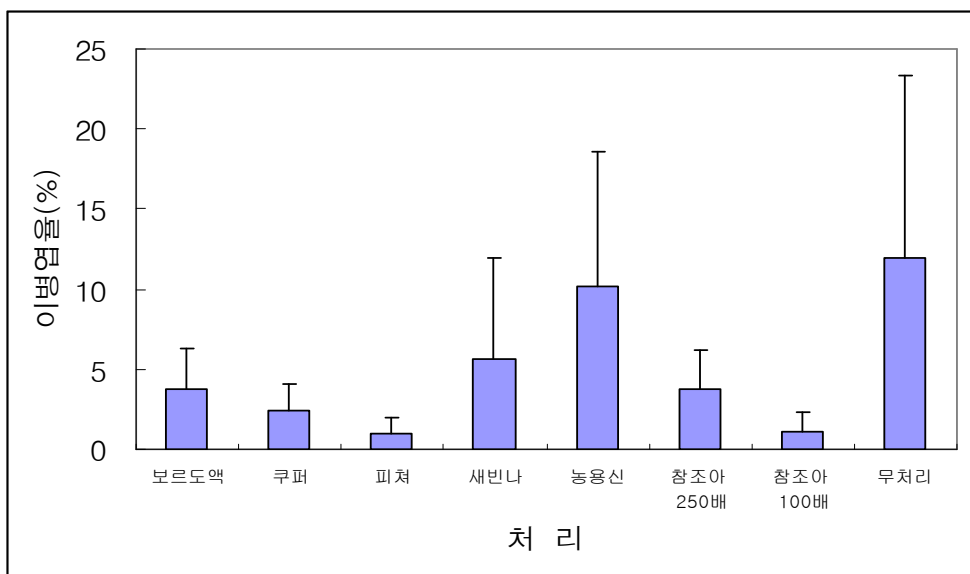


Fig. 7. 농자재별 봄순에서의 방제 정도(포장-1)('06)

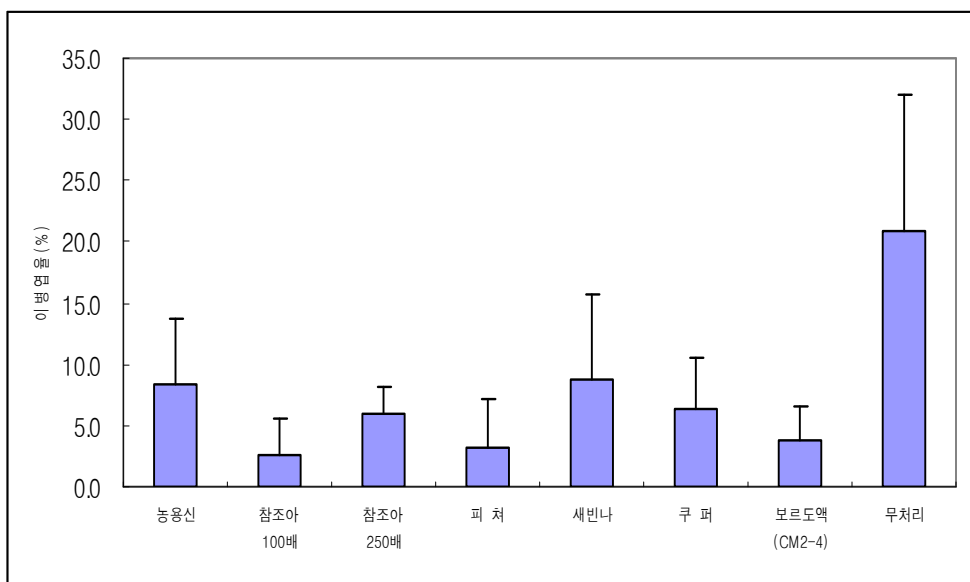


Fig. 8. 농자재별 봄순에서의 방제 정도(포장-2)('06)

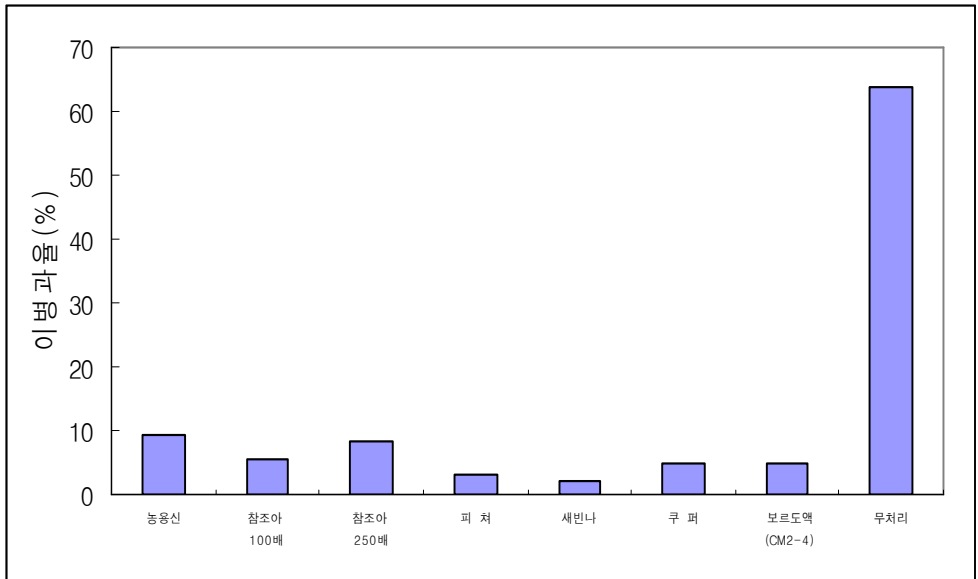


Fig. 9. 농자재별 과실에서의 방제 정도(포장-2)('06)

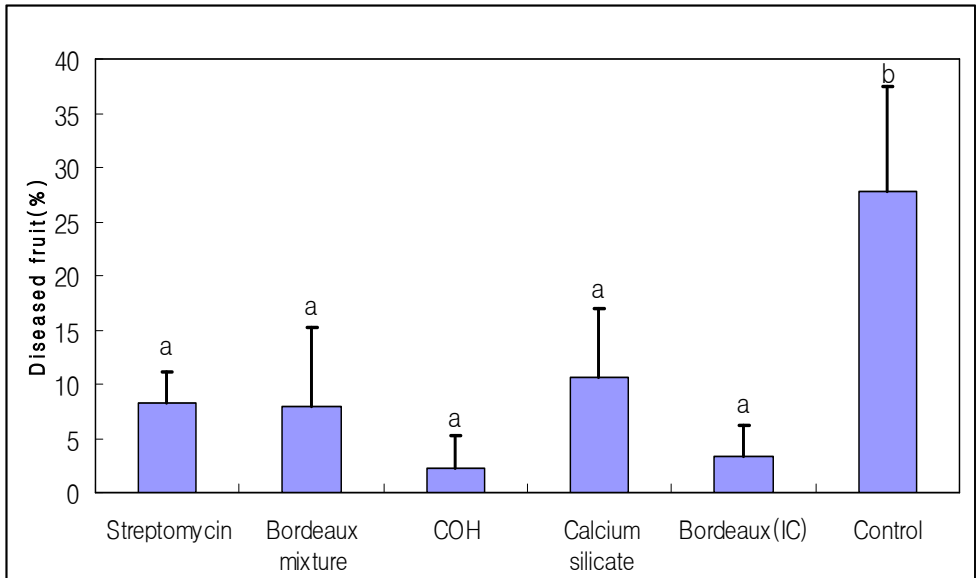


Fig. 10. 농자재별 과실에서의 방제 정도(포장-2)('07). C.V=65.5

## 6. 농가 실증을 통한 방제 체계 확립

### 가. 재료 및 방법

퀘양병에 대한 방제 실험은 퀘양병 발병이 많은 레몬 재배 포장에서 실시하였으며 관행방제는 5월 말부터 8월말까지 2주 간격으로 5-6회 스트렙토마이신을 살포하였으며 예찰프로그램에 의한 방제구는 예찰 프로그램의 발병도 위험지수가 2를 상회할 때 스트렙토마이신을 살포하였다(Fig 11).

### 나. 결과 및 고찰

예찰프로그램에 따라 총 5회 약제를 살포하여 2주간격 총 6회 살포한 구와의 병 발생 정도를 비교하였다.

위험도 지수에 따라 스트렙토마이신을 5월29일, 6월18일, 7월5일, 8월1일, 8월15일 살포하였으며 2주 간격으로 살포한 처리구는 5월29일, 6월18일, 7월5일, 7월20일, 8월5일, 8월19일이었다. 잎이나 과실에서의 병발생 차이는 거의 없었다 (Fig. 12, 13).

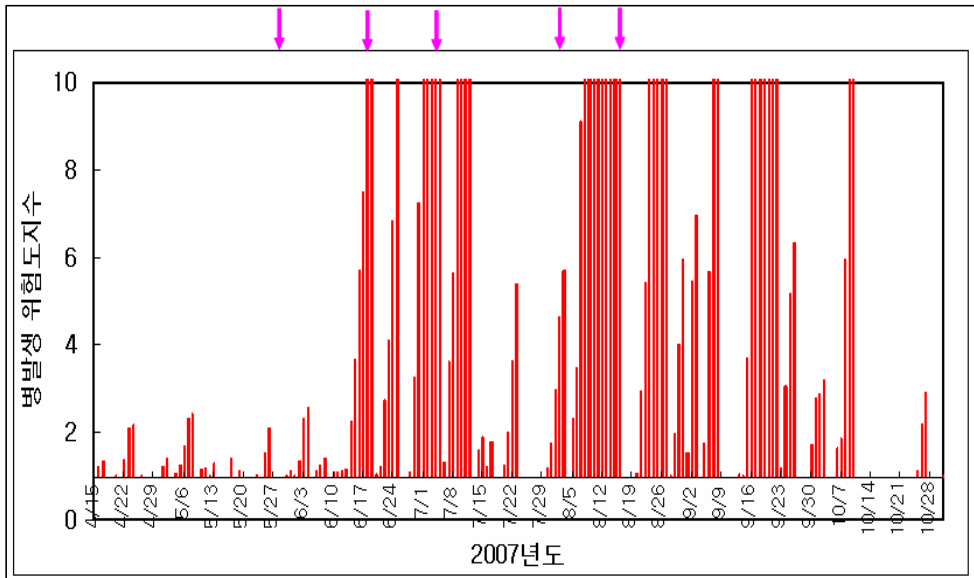


Fig. 11. 2007년도 감귤퀘양병 발생위험도(↓: 방제시기)

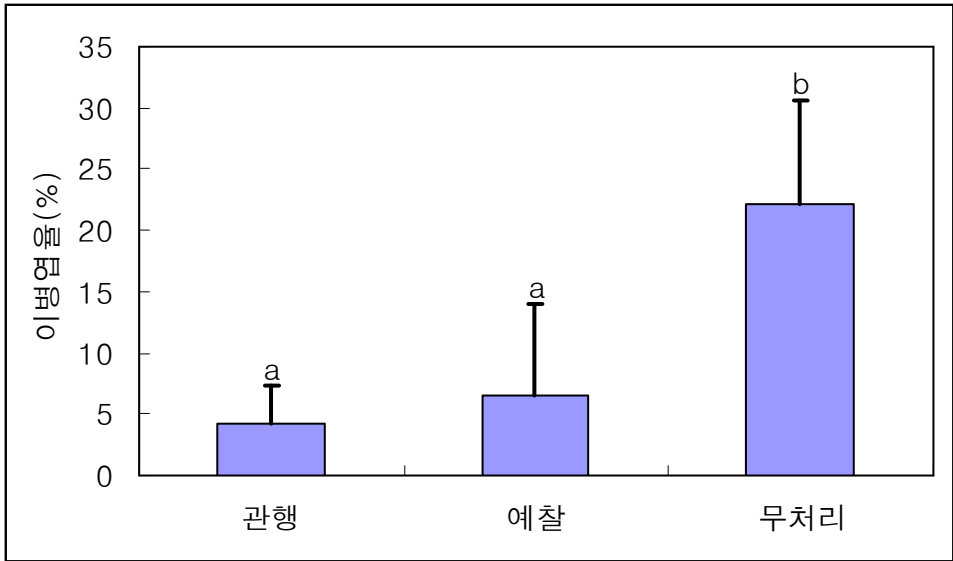


Fig. 12. 예찰프로그램에 의한 방제의 효과(잎)('07)

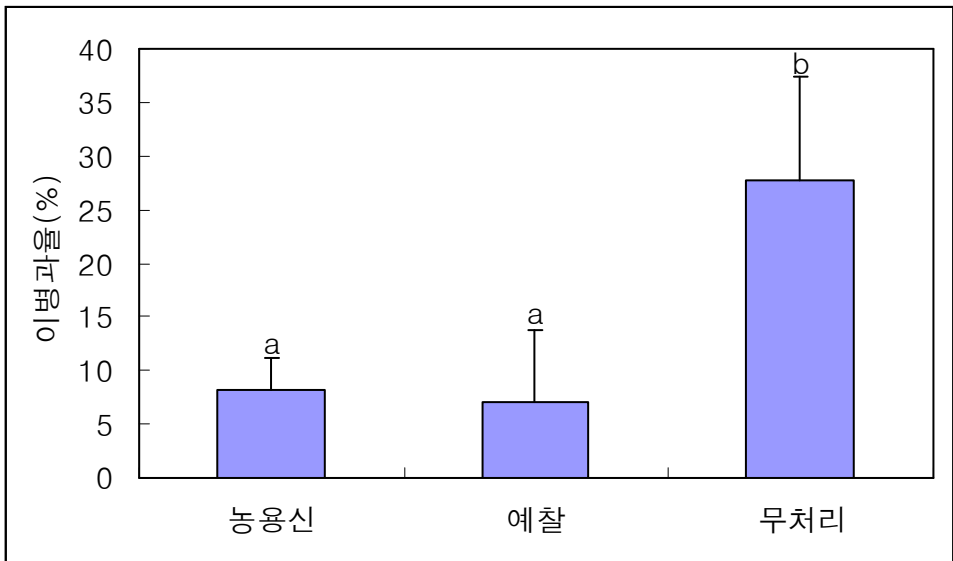


Fig. 13. 예찰프로그램에 의한 방제의 효과(열매)('07)

## 제 4 절 국내 감귤류 궤양병균의 병원유전학적 특성 규명

### 1. 감귤궤양병균의 기주범위 및 생리 화학적 특성에 의한 다양성 분석

#### 가. 재료 및 방법

##### 1) 감귤류 궤양병균 분리 및 동정

감귤궤양병 증상을 보이는 이병 샘플을 1997년부터 2005년까지 제주도와 남부해안지역에서 수집하였다. 이병조직으로부터 일반적인 세균분리방법에 따라 nutrient agar 또는 yeast peptone glucose agar (0.5% yeast extract, 0.5% peptone, 1% glucose and 1.5% agar)를 이용하여 균을 분리하였다. 분리된 병원균을  $10^5$  cfu/ml 농도로 희석하여 *Citrus paradisi* (grapefruit)와 *C. unshiu* (mandarin)에 접종하거나, 고추와 담배에  $10^8$  cfu/ml 농도로 접종한 후 약 26°C의 온실에 보관하면서 병원성 및 과민성 반응여부를 시험하였다. 한편, 병원성이 밝혀진 표준균주를 Table 1에서와 같이 여러 국제기관에서 분양을 받아 대조균주로 사용하였다.



Table 1. *Xanthomonas* isolates and reference strains used in this study

Pathotype	Strains	Origin	Source <sup>a</sup>
<i>X. a. pv. citri</i> A	CFBP2859	Brazil	CIRAD
	JH410-1	China	CIRAD
	C43, CFBP1814	France	CIRAD
	CFBP2900	Japan	CIRAD
	JJ238-3, JK4-3	Korea	CIRAD
	CFBP2525	New Zealand	CIRAD
	JK148-2	Philippines	CIRAD
	M9, A-5246, M5, A-5208	USA	DPI
<i>X. a. pv. citri</i> A*	IR01, IR02, IR03, IR04	Iran	PPDSI
	JF90-2	Oman	CIRAD
	JK2-10	Saudi Arabia	CIRAD
	A-1609	USA	DPI
<i>X. a. pv. citri</i> A <sup>w</sup>	A-2032	USA	DPI
<i>X. a. pv. aurantifolii</i> B	CFBP2868, CFBP2903	Argentina	CIRAD
<i>X. a. pv. aurantifolii</i> C	CFBP2866	Brazil	CIRAD
<i>X. a. pv. citrumelo</i> (CBS)	XC05-252, A-1902, A-1887	USA	DPI
Korean isolates	SL-0870, 0874, 4021, 4024, 4026, 4028, 4029, 4034, 4036, 4040, 4041, 4042, 4043, 4044, 4045, 4046, 4047, 4049, 4050, 4052, 4054, 4056, 4057, 4059, 4060, 4062, 4063, 4064, 4066, 4067, 4068, 4070, 4071, 4072, 4073, 4090, 4091, 4093, 4095, 4096, 4098, 4099, 4100, 4468, 4469, 4474, 4477, 4478, 4483, 4484, 4492, 4493, 4500, 4501, 4510, 4511, 4516, 4517, 4518, 4519, 4520, 4525, 4526, 4528, 4529, 4530, 4537, 4538, 4539, 4547, 4548, 4553, 4554, 4556, 4558, 4560, 4562, 4564, 4566, 4567, 4568, 4915, 4916, 4917, 4918, 4920, 4922, 4925, 4926, 4928, 4931, 4932, 4933, 4934, 4935, 4937, 4943, 4945, 4946, 4947, 4949, 4950, 4952, 4953, 4954, 4955, 4956, 4958, 4990, 4993, 4995	Korea	PPD
	KACC10443	Korea	KACC

<sup>a</sup>CIRAD; The Agricultural Research Centre for International Development, DPI; Division of Plant Industry, Florida, USA, PPD; Plant Pathology Division, NIAST, Korea, PPDSI; Plant Pests and Diseases Research Institute, Iran, KACC; Korean Agricultural Culture Collection.

## 2)기주범위조사

분리한 균을 $10^5$  cfu/ml 농도로 희석하여 *C. sinensis* (sweetorange), *C. paradisi* (grapefruit), *C. limon* (lemon) 및 *C. unshiu* (mandarin)의 새로 자란 잎에 접종하였다. 접종 후 온실에 보관하면서 약 1개월 동안 병반 및 궤양증상 형성여부 등을 관찰한 후 품종에 따른 병원성 정도를 대조균주와 비교하였다.

## 3)탄소원 이용정도 분석

분리된 균주의 탄소원 이용정도는 GN Microplate (Biolog Inc., Hayward, CA)를 이용하여 조사하였다. 조사된 95개의 탄소원 이용정도는 fingerprinting II informatix™ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 프로그램을 이용하여 균주간의 유연관계를 분석하였다.

## 4)지방산조성 분석

분리된 균주를 trypticase soy broth agar (BBL laboratories, Cockeysville, MD)에 28°C에서 24시간동안 배양한 후 지방산 (fatty acid methyl esters) 조성을 조사한 후 (Graham et al., 1990) 역시 fingerprinting II informatix™ 소프트웨어를 이용하여 균주간의 유연관계를 분석하였다.

## 나. 결과 및 고찰

### 1)균주 동정 및 병원성 시험

1997년부터 2005년까지 총 31가지 기주에서 291개 균주를 분리하여 분리된 균주 중 병원성과 과민성반응이 확인되고, 탄소원이용정도와 지방산 분석을 거쳐 궤양병균으로 동정된 총 112개의 국내 분리균을 실험에 사용하였다. 또한 외국에서 발생하는 감귤류 궤양병 관련 균주 28개를 전 세계 11지역에서 도입하여 대조균주로 사용하였다 (Table 1). 한편 전남 고흥과 경남 남해의 유자 등의 감귤류 재배지역에서 궤양병 발병조사를 하였으나 감염주를 발견하지 못하여, 제주지외의 지역에서는 궤양병이 발병하지 않은 것으로 생각된다.

Table 2. Pathogenicity of reference strains and Korean isolates of *Xanthomonas* on different host plants

CBC group	Strain	Host <sup>a</sup>				Canker
		GF	Lemon	SO	MD	
<i>X. a. pv. citri</i> A	CFBP2900, CFBP2859, JK148-2	+++ <sup>b</sup>	+++	+++	+++	Y
	JJ238-3, JK4-3, M9, 5246, M5, A-5208, CFBP1814, CFBP2525, JH410-1	+++	+++	+++	++	Y
	C43	+	+	+	+	Y (small)
<i>X. a. pv. citri</i> A*	IR01, IR02, IR03, IR04, JF90-2, JK2-10, 1609	-	-	-	-	N
<i>X. a. pv. citri</i> A <sup>w</sup>	A-2032	HR	-	-	-	N
<i>X. a. pv. aurantifolii</i> B	CFBP2868, CFBP2903	+	++	+	-	N
<i>X. a. pv. aurantifolii</i> C	CFBP2866	HR	HR	HR	v	N
<i>X. a. pv. citrumelo</i> (CBS)	XC05-252, 1902, 1887	++	+	++	+	N
Korean isolates	Total 112 strains(Table1)	+++	+++	+++	+++	Y

<sup>a</sup>GF; grapefruit (*C. paradisi*), lemon (*C. limon*), SO; sweetorange (*C. sinensis*) and MD; Mandarin (*C. unshui*) <sup>b</sup>Pathogenicity was recorded 6 weeks after inoculation. HR; hypersensitive reaction, -; no pathogenicity, +; weak, ++; moderate, +++; severe pathogenicity, v; variable. N; no canker

## 2)기주범위에 따른 병원형 판별

감귤류 중 *C. sinensis* (sweetorange), *C. paradisi* (grapefruit), *C. limon* (lemon) 과 *C. aurantifolii* (Mexican lime)에 접종을 통하여 병원형을 판별할 수 있다고 보고되어 있어 (Brunings and Gabriel, 2003), 본 실험에서도 4개의 감귤류를 이용하여 총 112개 균주에 대하여 병원성을 조사하고, 대조균주와 비교하였다. *X. a. pv. citri* A 균주는 실험한 4개의 기주에 대해 병원성을 보였으나 A\* 와 A<sup>w</sup> 균주는 모두 병원성을 보이지 않았다 (Table 2). *X. a. pv. aurantifolii* B 그룹은 mandarin을 제외한 다른 기주에 약한 병원성을 보였으며, *X. a. pv. aurantifolii* C 그룹은 grapefruit와 lemon 및 sweetorange에 과민성 반응을 보였다. 병징은 일반적으로 약 1주일 후부터 발생하기 시작하여 *X. a. pv. citri*에 의해 형성된 분화구 모양의 궤양은 *X. a. pv. citrumelo*에 의해 형성된 평평한 모양의 병반과 확실히 구분되었다. 세균성 반점병 (CBS)은 4개의 기주에 대해 약한 병원성을 보였는데, 궤양은 형성하지 않았다. 국내에서 분리된 모근 균은 대조균주로 사용한 *X. a. pv. citri* A과 유사하게 강한 병원성을 보이고, 궤양을 형성하여 모두 *X. a. pv. citri* A 그룹에 속하는 것으로 생각된다.

### 3) 탄소원 이용 정도 차이

탄소원 이용 정도는 Biolog GN microplate를 이용하여 95개의 탄소원에 대해 조사하였다. Glycogen과 dextrin 및 maltose는 *X. a. pv. citri* A, A<sup>w</sup>, A\* 그룹과 CBS에 의해 이용되었으나 *X. a. pv. aurantifolii* B와 C 그룹은 이용하지 못하였다 (Table 3). Saccharic acid는 *X. a. pv. aurantifolii* B type에 의해서만 이용되었고, galactose는 B type 만이 이용하지 못하였다. Tween 40과 leucine은 주로 CBS에 의해서만 이용되었고, 다른 그룹은 거의 이용하지 못하였다. 전체적으로 분석할 때 A, A\* 와 A<sup>w</sup> type간은 탄소원 이용 정도에 따라 구분하기가 어려웠으나 *X. a. pv. aurantifolii* B, C type과 CBS는 위와 같은 탄소원 이용 정도에 따라 쉽게 구분이 가능하며, 균을 분리 후 동정과정에서 일반적으로 사용하는 탄소원 이용 정도를 분석하면 계양병균의 병원형 분석에 유용한 자료로 사용될 수 있을 것으로 생각된다. 한편, raffinose, fucose 및 alaninamide 등의 탄소원 이용 정도도 병원형 구분에 이용이 가능할 것으로 생각되나 균주에 따라 약간의 차이가 있었다.

Table 3. Oxidation of carbon sources by different pathotypes of CBC and CBS

Carbohydrate	CBC pathotype					CBS
	A	A*	A <sup>w</sup>	B	C	
Glycogen	100 <sup>a</sup>	100	100	0	0	100
Dextrin	100	100	100	v	v	100
Maltose	100	100	100	0	0	100
L Fucose	100	85.7	100	0	100	100
D Galactose	100	100	100	0	100	100
D Saccharic acid	v	0	0	100	v	0
Tween 40	1.8	0	0	0	0	100
Leucine	v	v	0	0	v	100

<sup>a</sup>Percentage of strains with positive results from all of the strains in Table 1. v; variable but negligible, some strains used slowly but the change of color was negligible. Representative carbon sources which showing distinctive difference are listed. The carbon source utilization patterns on the GN microplate were read with a microplate reader. A; *X. axonopodis* pv. *citri* A, A\*; *X. a. pv. citri* A\*, A<sup>w</sup>; *X. a. pv. citri* A<sup>w</sup>, B, C; *X. a. pv. aurantifolii* strains, and CBS; *X. a. pv. citrumelo*.

### 4) 지방산 조성 차이

분석된 지방산 중 병원형에 따라 두 배 이상의 차이를 보이는 지방산을 Table 4에 나타내었다. *X. a. pv. citri* A\* 와 A<sup>w</sup> type은 9-methyldecanonic acid, 3-hydroxy-11-methyldodecanoic acid, 9-hexadecanoic acid 및 15-methylhexadecanoic

acid의 구성에 따라 *X. a. pv. citri* A type과 구분이 가능하였다. 한편, 12-methyltetradecanoic acid와 cis-9-hexadecanoic acid는 *X. a. pv. aurantifolii* B와 C type을 구별하는데 사용이 할 것으로 사료된다. 또한 *X. a. pv. aurantifolii* B와 C type간에는 15-methylhexadecanoic acid와 cis-7-15-methylhexadecanoic acid의 구성에 많은 차이를 보였다.

Table 4. Difference of fatty acid profiles depending on the strains of CBC and CBS

Fatty acid <sup>a</sup>	CBC pathotype					CBS
	A	A*	A <sup>w</sup>	B	C	
11:0 ISO	4.9±1.04	2.8±0.29	2.8±0.39	4.7±0.38	3.4±0.22	3.7±0.19
13:0 ISO 3OH	5.9±1.40	2.6±0.13	2.5±0.41	6.3±0.22	5.7±0.34	3.5±0.07
15:0 ISO	9.8±0.64	12.7±1.19	13.9±0.88	8.9±0.34	6.6±0.17	8.9±1.01
15:0 ANTEISO	18.8±1.44	13.9±1.21	12.3±8.10	28.8±5.52	28.0±1.39	17.4±0.97
16:1 w7c	5.5±1.17	10.9±0.92	10.9±2.34	3.3±2.40	2.2±0.57	9.3±0.30
16:0	13.3±1.19	17.1±1.07	20.1±0.11	13.0±3.16	8.7±0.59	19.0±0.95
ISO 17:1 w9c	11.6±1.65	8.4±1.35	5.6±0.11	6.7±1.82	13.9±1.19	8.9±0.69
17:0 ISO	6.9±0.60	4.1±0.77	2.4±0.67	8.6±3.17	15.2±0.71	4.2±0.39

<sup>a</sup>11:0 ISO: 9-methyldecanoic acid, 13:0 ISO 3OH: 3-hydroxy-11-methyldodecanoic acid, 15:0 ISO: 13-methyltetradecanoic acid, 15:0 ANTEISO: 12-methyltetradecanoic acid, 16:1 w7c: cis-9-hexadecanoic acid, 16:0: hexadecanoic acid, ISO 17:1 w9c: cis-7-15-methylhexadecanoic acid, 17:0 ISO: 15-methylhexadecanoic acid. Representative fatty acids which showing distinctive difference are listed.

#### 5) 탄소원 이용과 지방산 조성의 차이에 따른 중첩분석

감귤류에 궤양병을 일으키는 *Xanthomonas* 병원균의 병원형을 탄소원 이용정도에 따라 분석하였을 때, *X. a. pv. aurantifolii* B, C type 과 *X. a. pv. citrumelo*는 *X. a. pv. citri* A, A\* 및 A<sup>w</sup> type과 약 89%의 유사도를 보이며 다른 병원형 그룹과 구분이 가능하였다 (Fig. 1).

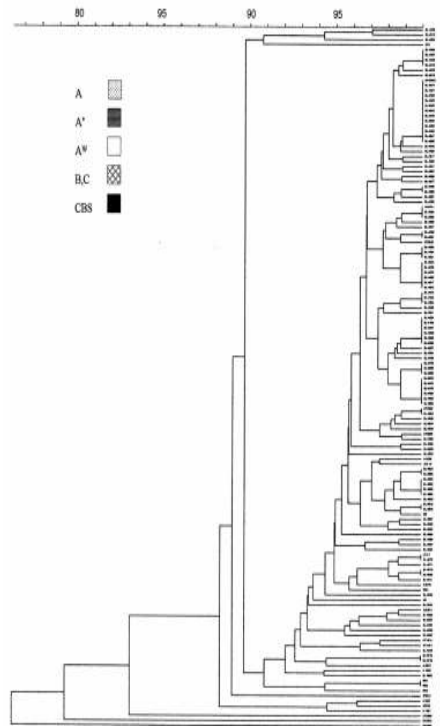


Fig. 1. Dendrogram showing relationship between *Xanthomonas* strains by carbon source utilization pattern. The data was analyzed by the fingerprinting II informatix<sup>TM</sup> software. The lines indicate the CBC group as follows, A; *X. axonopodis* pv. *citri* A, A<sup>\*</sup>; *X. a.* pv. *citri* A<sup>\*</sup>, A<sup>w</sup>; *X. a.* pv. *citri* A<sup>w</sup>, B, C; *X. a.* pv. *aurantifolii* strains, and CBS; *X. a.* pv. *citrumelo*.

The *X. a.* pv. *citri* A<sup>\*</sup> 와 A<sup>w</sup> 는 *X. a.* pv. *citri* A type 과 같은 그룹에 위치하였다. 그러나 50여개의 지방산 조성에 의한 분석결과 각각의 병원형은 확연히 구별되는 그룹을 형성하지는 않았다 (data not shown). 한편, 탄소원 이용정도와 지방산 조성여부를 동시에 분석한 결과 *X. a.* pv. *aurantifolii* B, C type 및 *X. a.* pv. *citrumelo* E type은 동일한 그룹을 형성하며 다른 병원형과 구별이 가능하였다. (Fig. 2)

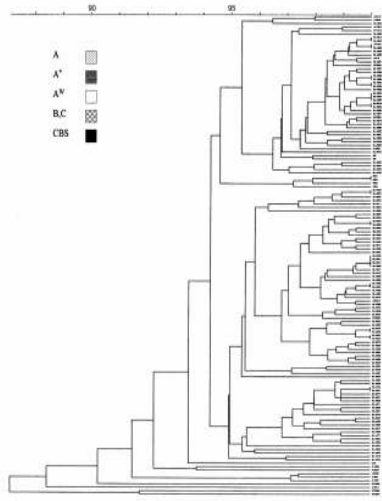


Fig. 2. Dendrogram showing relationship between *Xanthomonas* strains by combined metabolic and fatty acid profiles. The data of carbon source utilization and composition of fatty acid were combined and analyzed using the fingerprinting II informatix™ software.

## 2. 분리균주의 유전적 다양성

### 가. 재료 및 방법

#### 1) 염색체 DNA의 분리

Genomic DNA는 Shiotani 등(2000)의 방법을 약간 변경하여 분리하였다. 궤양 병과 관련된 *Xanthomonas* 균주를 peptone sucrose agar (1% polypeptone, 1% sucrose and 0.2% L-glutarmate) 나 LB 배지에 28°C에서 2일간 배양한 후 균을 획득하였다. 이 균을 5 M NaCl을 이용하여 씻은 후 SDS와 proteinase K를 최종 2% 및 250 ug/ml 함유한 Tris-EDTA 완충액 (pH 8.0) (Sambrook et al., 1989) 600μl에 현탁하였다. 이 현탁액을 37°C에서 1시간 동안 처리한 후 5M NaCl을 100μl 첨가한 후 잘 섞어 주었다. Cetyltrimethylammoniumbromide (CTAB)-NaCl (10% hexadecyltrimethyl ammonium bromide in 0.7 M NaCl) 용액을 8μl 첨가한 후 65°C에서 10분간 배양한 후 DNA는 phenol chloroform isoamyl alcohol (25:24:1)을 이용하여 분리하였으며, 분리된 DNA는 -20°C에 보관하며 사용하였다.

#### 2) DNA 증폭을 위한 PCR 조건

분리된 DNA를 주형으로 하여 다음과 같은 조건으로 rep-PCR을 실시하였다. BOX PCR은 총 25  $\mu$ l의 반응 액에 1 X Taq 완충액, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 uM의 primer BOX1R (Louws et al. 1994)과 각각의 deoxynucleoside triphosphate (dNTP)를 0.25 mM씩 넣고, 2 U of EX-Taq polymerase (Takara)를 이용하여 94°C에서 1분, 52°C에서 1분 및 65°C에서 8분간 30회 PCR을 실시하였는데, 최초 단계에서 94°C에서 7분간, 마지막 단계로는 72°C에서 10분간의 반응을 실시하였다. ERIC-PCR은 1 X Taq buffer, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 uM primer ERIC1R, 2 uM primer ERIC2 (Louws et al. 1994)와 각각의 dNTP를 0.25 mM 및 2 U의 EX-Taq polymerase를 사용하여 변성과 신장은 BOX PCR과 같은 조건에서 실시하였는데, 결합은 50°C조건에서 실시하였다. REP-PCR은 1 X Taq buffer, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 uM의 REP1R-I와 REP2-I 프라이머 및 각각의 dNTP 1.25 mM과 2 U의 EX-Taq polymerase를 이용하여 신장온도가 45°C인 것을 제외하고 BOX PCR과 동일한 조건에서 실시하였다. 반응 후 PCR 산물은 1 X TBE buffer에서 1.5 % agarose gel을 이용하여 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색된 band를 UV하에서 조사하였다.

### 3)rep-PCR결과 분석

BOX, ERIC 및 REP-PCR을 통하여 분석된 band 패턴은 밴드의 유무에 따라 유사도를 NTSYS, version 2.1 (Rohlf, 2000) 소프트웨어를 이용하여 UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) 방법으로 분석하여 균주간의 유전적 연관성을 조사하였다.

### 4)16S DNA 분석

16S rDNA의 염기서열은 세균의 동정이나 균주간의 유사도 차이 분석 등에 사용되어져 왔다. (Louws et al., 1995). 본 실험에서는 16S rDNA를 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') 프라이머와 1492R(5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3') 프라이머 (Lane, 1991)를 통하여 분석한 후 균주 간 유사도를 조사하였다. 먼저 50 ng의 DNA를 주형으로 하여 5 pmol의 프라이머, 각각의 dNTP 0.2 mM, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> 및 1 U의 E-Taq DNA polymerase (SolGent Ltd., Korea)를 50  $\mu$ l의 반응액에 넣은 후 DNA thermal cycler (Perkin-Elmer, Norwalk, CN, USA)를 이용하여 다음과 같은 조건에서 PCR을 실시하였다. 최초 95°C에서 15분간 반응 후 95°C에서 20초간의 변성, 50°C에서 40 초간의 결합 및 72°C에서 1분간의 신장반응을 30회 실시한 후 마지막으로 72°C에서 5분간 반응하였다. 반응한 PCR 산물을 SolGent PCR purification kit를 이용하여 순수 분리한 후 SolGent Ltd. (Korea)에 의뢰하여 BigDye terminator sequencing kit와 ABI



PRISM 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems, Norwalk, CN, USA)를 이용하여 염기서열을 분석하였다. 이 염기서열을 fingerprint II informatix™ software (BioRad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 UPGMA 방법으로 유연관계를 분석하였는데, 최종으로 사용된 염기서열은 총 880 bp로 *X. a. pv. citri* 306 strain (NCBI accession number, AE012039)의 1,017bp에서 1,896bp의 염기서열과 같은 위치였다.

#### 나. 결과 및 고찰

##### 1) rep-PCR에 의한 궤양병관련 *Xanthomonas* 균주의 유연관계 분석

BOX, ERIC 및 REP-PCR에서 의해 형성된 밴드는 약 100에서 40,000 bp내에 위치하였다. ERIC PCR의 밴드패턴을 이용하여 유연관계를 비교한 결과 크게 두개의 그룹으로 나누어졌다 (Fig. 3). 이 중 하나는 모든 *X. a. pv. citri* 균주를 75%의 유사도로 포함하고 있었으며, *X. a. pv. aurantifolii* 와 *X. a. pv. citrumelo* E type은 두 그룹의 중간에 위치하였다. 모든 균주의 평균 유사도는 약 43% 정도였으며, 한국에서 분리한 균주는 *X. a. pv. citri* A\* 및 A"와는 다른 그룹을 형성하였고, 국내 분리 균주 간에는 90% 이상의 유사도를 가지고 있었다.

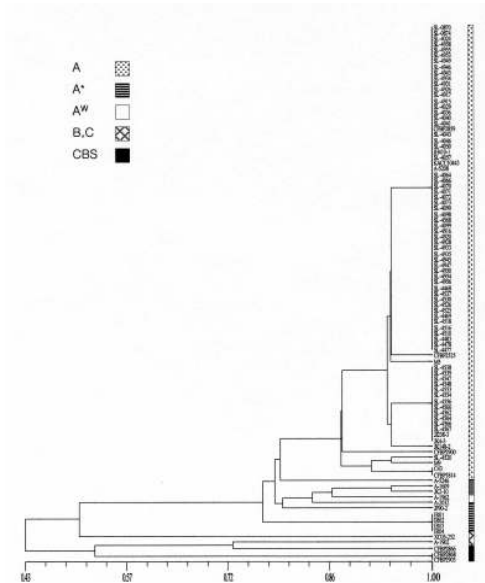


Fig. 3. Dendrogram showing relationships between *Xanthomonas* causing CBC based on ERIC-PCR analysis. Similarities were calculated by using the Dice coefficient, and clustering was achieved by UPGMA using the NTSYS version 2.1.

BOX PCR에 의한 분석결과 크게 두개의 그룹으로 나누어졌는데, 하나는 모든 *X. a. pv. citri* 와 *X. a. pv. aurantifolii* type을 포함하였고, 다른 그룹에는 *X. a. pv. citrumelo* type이 포함되었는데 두 그룹 간에 평균적인 유사도는 43%였다 (Fig. 4). 동일 그룹에 포함되었던 *X. a. pv. citri*, *X. a. pv. aurantifolii* B 및 C는 약 50%의 유사도로 서로 다른 소그룹으로 분리되었다. *X. a. pv. citri* A type은 A\* 및 A<sup>w</sup> type과 구별되지 않았으며 국내 분리균간에는 약 80%이상의 유사도를 보였다.

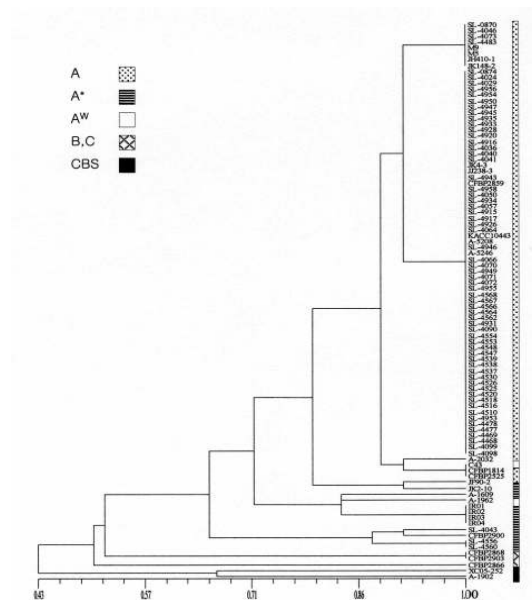


Fig. 4. Dendrogram of relationships based on BOX-PCR analysis. Similarities were calculated by using the Dice coefficient, and clustering was achieved by UPGMA using the NTSYS version 2.1.

REP PCR 결과에 대한 층첩분석 결과 약 59%의 유사도로 두개의 그룹으로 나눌 수 있었다 (Fig. 5). 이 중 한 그룹은 *X. a. pv. aurantifolii* B를 포함하였으며 다른 한 그룹에는 다른 모든 병원형이 포함되었다. 후자의 그룹에서 *X. a. pv. citrumelo*는 약 70%의 유사도로 다른 병원형과 구분되었고, *X. a. pv. aurantifolii* C type은 *X. a. pv. citri* 와 75%의 유사도로 분리되었다. 그러나 위의 결과에서와 비슷하게 *X. a. pv. citri* A와 A\* 및 A<sup>w</sup> 간에는 구별이 되지 않았다.

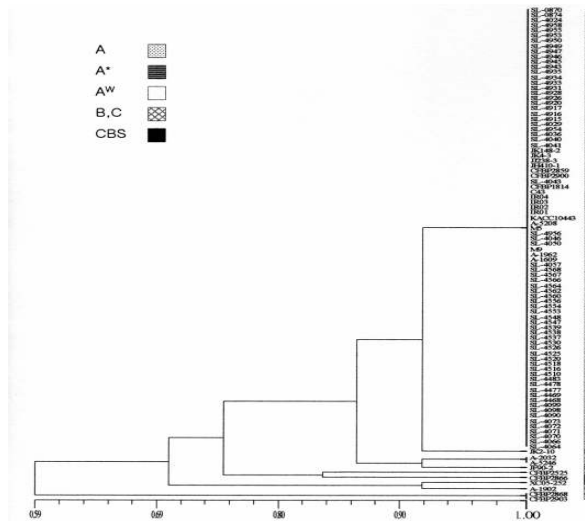


Fig. 5. Dendrogram of relationships based on REP-PCR analysis. Similarities were calculated by using the Dice coefficient, and clustering was achieved by UPGMA using the NTSYS version 2.1.

ERIC, BOX 및 REP PCR 결과 모든 균주에서 대부분의 밴드가 유사하게 존재하는 것을 확인할 수 있었으나, 일부 밴드의 두께에 차이를 보였고, 몇몇 밴드가 균주 간 다양성을 보이며 존재하는 것을 확인할 수 있었다. 위에서 분석된 각각의 결과와는 별도로 세 종류의 rep PCR 결과를 종합적으로 중첩 분석을 한 결과 약 50%의 유사도로 두개의 그룹의 확연하게 분리되는 것을 확인할 수 있었다. 이 중 한 그룹은 단지 *X. a. pv. citrumelo* type만을 포함하였고, 또 다른 그룹은 *X. a. pv. citri*와 *X. a. pv. aurantifolii* type을 포함하였다 (Fig. 6). 또한 후자의 그룹에서 *X. a. pv. citri* A type은 *X. a. pv. aurantifolii* B 및 C type과 확연하게 구분이 되었다. Cubero와 Graham (2002, 2004)은 A\*와 A<sup>w</sup>은 A type과 관련성이 높으나 단지 Mexican lime과 Alemow에만 병원성을 보이는 것으로 보고한 바 있다. 본 실험의 rep-PCR 결과도 A\*와 A<sup>w</sup> type이 A type과 관련성이 높은 것으로 나타났으나, 세 개의 PCR 결과를 종합적으로 분석한 결과 A\*와 A<sup>w</sup> type이 A type과 확연히 구분되는 것을 확인할 수 있었다. Trindade 등 (2005)은 각각의 rep PRC 분석결과와 세 개의 결과를 종합하여 분석한 결과가 유사한 결과를 보였다고 보고하였으나, 본 실험의 결과는 ERIC, BOX 및 REP PCR결과를 종합하여 분석하였을 때 균주간의 다양성 구별력이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

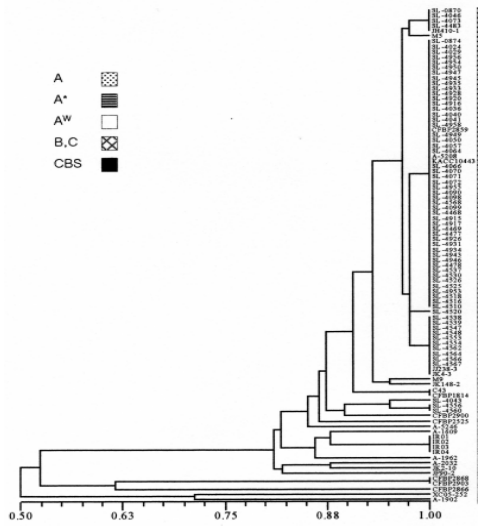


Fig. 6. Dendrogram showing relationships among *Xanthomonas* strains causing CBC based on combined analysis of ERIC-, BOX- and REP-PCR results.

## 2) 16S rDNA 분석

16S rDNA를 일부 분석한 결과 *Xanthomonas* 균주 간에는 유사도가 매우 높은 것으로 보고되었는데, 각 균주간의 16S rDNA의 중첩분석결과 다양한 그룹을 형성하는 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 7). 홍미류계도 중첩분석결과 *X. a. pv. aurantifolii* B, C type과 *X. a. pv. citrumelo*는 99%의 유사도를 보이며 동일한 그룹을 형성하였다. 16S DNA는 매우 유사도가 높은 균주들을 구별하는데 유용하지 못한 것으로 보고되었는데 (Fox et al., 1992), 본 실험에서도 궤양병 관련 병원형을 구별하지는 못하였으나, Asiatic pathotype과 B, C 및 E type간에는 서로 다른 그룹을 형성하는 것을 확인 할 수 있었다.

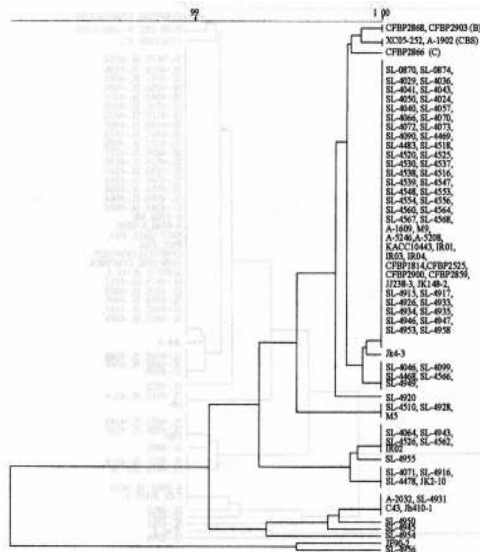


Fig. 7. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of the *Xanthomonas* strains causing CBC. The tree was constructed by using the fingerprinting II informatix software with UPGMA method.

### 3. 비병원성 유전자 및 균주별 병원성의 차이 분석

#### 가. 재료 및 방법

##### 1) 병원력 검정

병원형 및 동일 병원형에서의 균주에 따른 병원성의 차이를 분석하고자 8개의 감귤류 품종에 총 9개의 균주를  $10^5$  cfu/ml 농도로 침적중한 후 병반직경을 시기별로 조사하였다.

##### 2) Southern hybridization

각각의 균주들로부터 분리된 총 DNA를 BamHI 제한효소를 처리한 후 0.8% agarose gel을 이용하여 전기영동 하였다. 이 겔을 10분 동안 250mM HCl에 담근 후 증류수로 행군 다음 Denaturaion sol.(1.5M NaCl, 0.5N NaOH)에 gel를 넣고 실온에서 부드럽게 흔들어주면서 DNA를 변성시켰다. 이를 증류수로 수차례 씻어준 후 neutralization sol.을 넣어 실온에서 부드럽게 shaking 하여 gel을 neutralization하였다. 이를 membrane에 transfer한 후 UV 에 cross linkage 시킨 후  $P^{32}$ 로 label 된 probe를 사용하여 반응시킨 후 반응여부를 관찰하였다.

### 3) Plasmid 분리

각각의 균으로부터 plasmid는 AxyPrep plasmid midi prep kit (Axygen)를 사용하여 분리하였다. 분리방법의 사용 매뉴얼에 따라 실시하였는데, kit를 이용하여 분리하기 전에 각각의 균주들을 1M NaCl로 2회 세척 후 사용하였다.

#### 나. 결과 및 고찰

##### 1) 균주 및 병원형별 병원성 차이 분석

국내분리 균주와 외국도입균주의 병원성 차이를 비교한 결과 대체적으로 국내균주의 병원성이 강하였는데, 이는 국내분포 균주가 병원성이 강하고 기주 범위가 넓은 *X. a. pv. citri* A type에 속하기 때문으로 생각된다 (Fig 8).

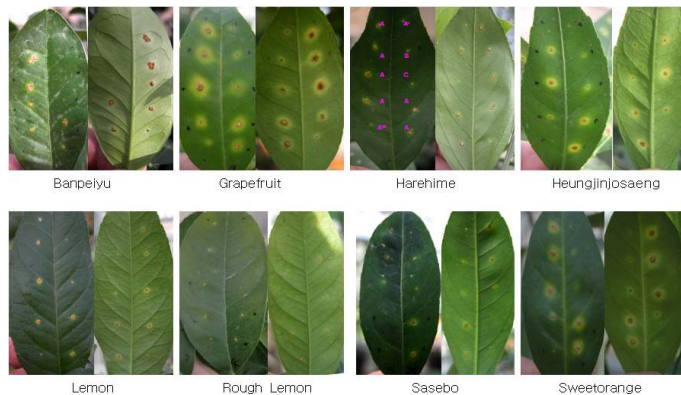


Fig. 8. Difference of virulence according to the difference of CBC strains

한편, 균종 및 품종에 따라 병원성에 있어 다양한 반응을 보였는데, 만백유, 자몽, 스위트오렌지 등에서 병원성의 강약의 차이에 관계없이 비교적 병진전이 빨라 이들이 비교적 궤양병에 약한 것으로 생각된다 (Fig. 9).

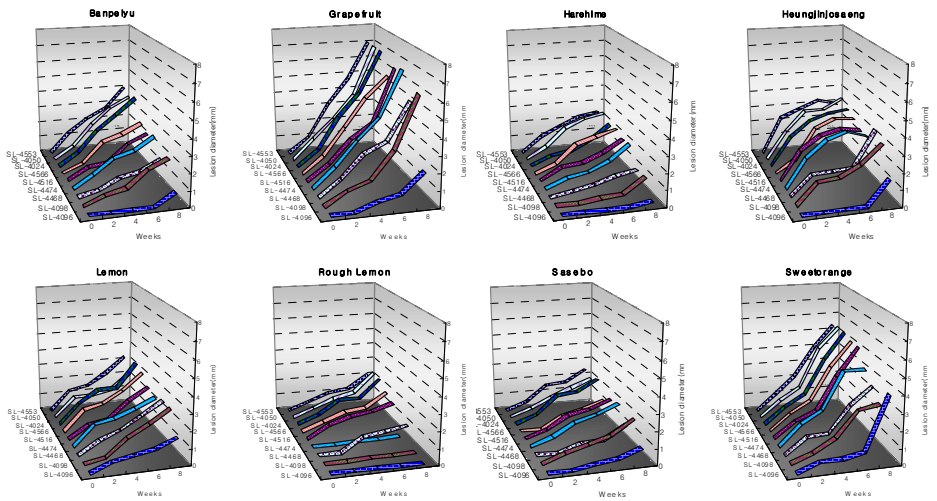


Fig. 9. Difference of disease progress according to the strains on each citrus varieties

그리고, 병원성이 강한 균주는 품종에 관계없이 병진전 속도도 빠르고, 전체 시험품종에 대한 병반 직경도 높은 편이었다 (Fig. 10). 추후 병원성이 강한 균주는 저항성 검정 등에 대표균주로 이용할 수 있을 것으로 생각되며, 이러한 병원성의 차이와 유전적 차이의 상관관계에 대한 연구도 필요할 것으로 생각된다.

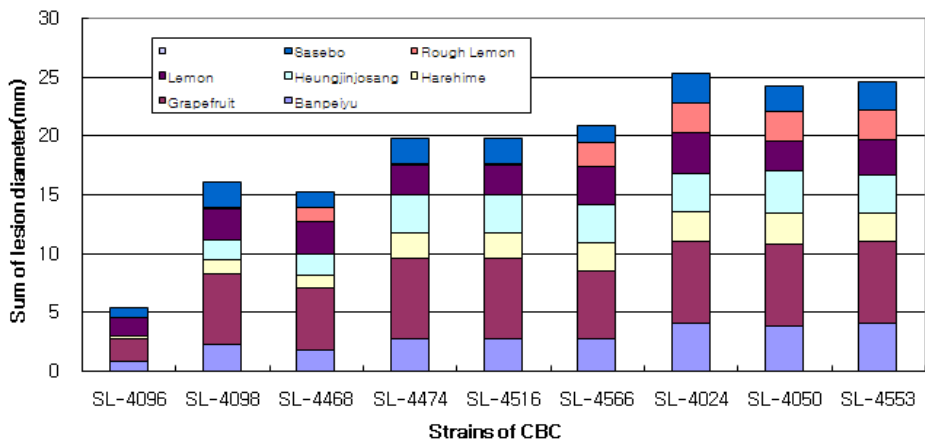


Fig. 10. Difference virulence of Korean isolates

## 2) 감글류 케양병균의 비병원성유전자(*pthA*) 분석

감글류 케양병균과 관련된 병원형의 전체 염색체 DNA를 분리하여 *Bam*HI으로 처리한 후 *Avr*BS3 유전자를 이용하여 비병원성 유전자의 존재여부를 확인하였다(Fig. 11). 모든 균주는 약 3-4kbp 사이에 1-4개의 *pthA* 유전자를 가지고 있었다.

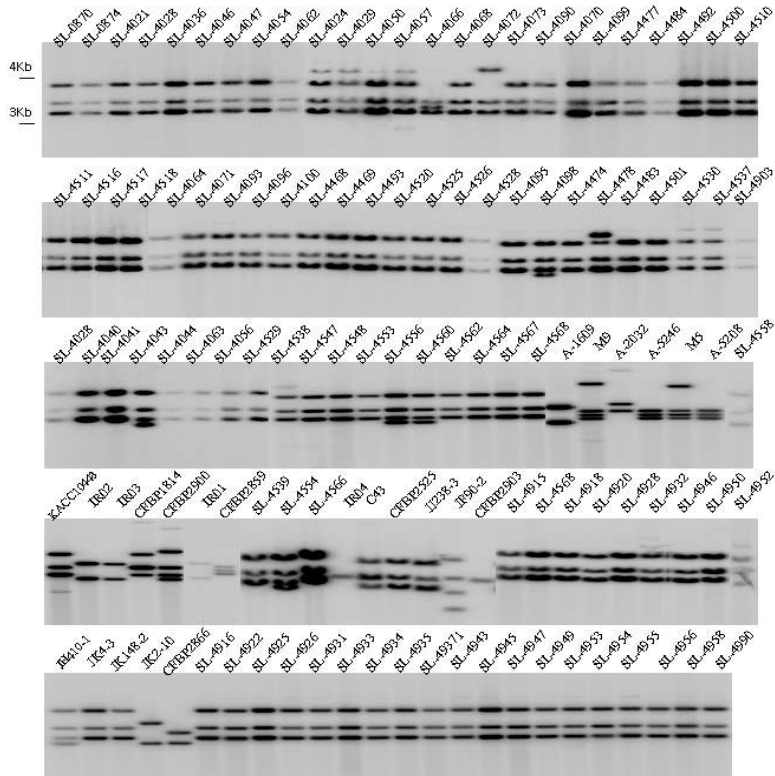


Fig. 11. Southern hybridization patterns of *pthA* genes of *Bam*HI-digested total DNA from *Xanthomonas* strains.

한편, *pthA* 유전자의 수와 위치에 따라 총 13개의 그룹으로 나누어 볼 수 있었는데, *pthA* 유전자가 2개와 3개인 경우는 3개의 그룹으로, 4개인 경우는 총 6개의 그룹으로 나누어 졌다( Fig. 12).



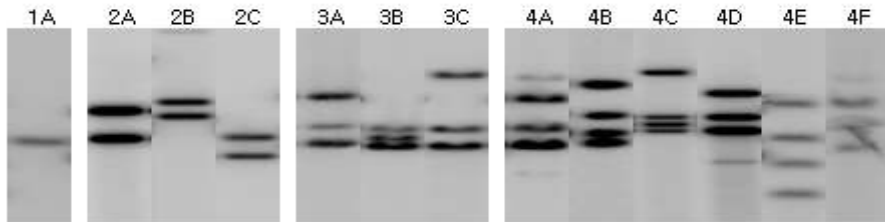


Fig. 12. Representative group of CBC strains according to the numbers and size of *pthA* gene

이들 그룹에 따라 감귤 궤양병균관련 *Xanthomonas* 균주의 병원형을 구분하여 본 결과 *X. a. pv. citri* A type의 경우 모두 3개 이상의 *pthA* 유전자를 가지고 있었으며, *X. a. pv. citri* A\*와 A<sup>w</sup>는 1-2개를, *X. a. pv. aurantifolii* B와 C type은 1-3개를 보유하고 있었다 (Table 5). *X. a. pv. citri* A type의 병원성이 강하고 기주범위가 넓은 것은 상대적으로 *X. a. pv. citri* A type이 가지고 있는 *pthA* 유전자의 수가 많은 것과는 밀접한 관련이 있을 것으로 생각된다.

Table 5. Difference of *pthA* gene depending on the pathotypes of CBC

<i>pthA</i> Group	Pathotype					계
	A	A*	A <sup>w</sup>	B	C	
1A	-	1	-	1	-	2
2A	-	5	-	-	-	5
2B	-	-	1	-	-	1
2C	-	-	-	-	1	1
3A	89	-	-	1	-	90
3B	4	-	-	-	-	4
3C	1	-	-	-	-	1
4A	8	-	-	-	-	8
4B	7	-	-	-	-	7
4C	2	-	-	-	-	2
4D	1	-	-	-	-	1
4E	-	1	-	-	-	1
4F	1	-	-	-	-	1
Total	113	7	1	2	1	124

한편, 균주의 플라스미드를 분리하여 플라스미드 보유 개수와 위치에 따라 Fig. 13과 같이 9개의 그룹으로 구분하였다.

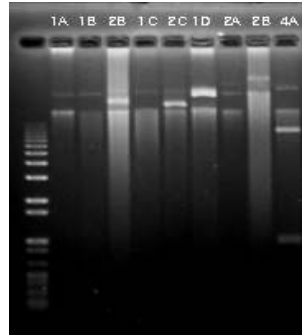


Fig. 13. Plasmid profiles of *Xanthomonas axonopodis pv. citri* strains

이들 플라스미드 그룹과 병원형과의 관련성을 조사한 결과 *X. a. pv. citri* A type의 경우 1-3개까지 다양하게 보유하고 있었으며, *X. a. pv. citri* A\*와 A<sup>w</sup>는 1개를, *X. a. pv. aurantifolii* B와 C type 역시 1개를 보유하고 있었다 (Table 6).

Table 6. Diversity of plasmid numbers according to the pathotypes of strains

Plasmid group	A	A*	A <sup>w</sup>	B	C	계
p1A	5	-	-	-	-	5
p1B	3	-	-	-	-	3
p1C	1	3	-	-	-	4
p1D	3	-	1	-	-	4
p1E	1	1	-	1	-	3
p1F	1	-	-	1	1	3
p2A	3	-	-	-	-	3
p2B	1	-	-	-	-	1
p4A	-	1	-	-	-	1
계	18	5	1	2	1	27

병원형과 위에서 정한 *pthA* 유전자 및 plasmid의 패턴에 따른 관련성을 종합적으로 고찰하여 보면 *X. a. pv. citri* A type의 경우 보유하고 있는 플라스미드의 수는 적을지라도 보유하고 있는 *pthA* 유전자의 수가 많은 것을 알 수 있었으며, 플라스미드 수와 *pthA* 유전자의 수 및 병원형과의 관련성은 낮은 것으로 나타났다 (Table 7).

Table 7. Diversity of *pthA* gene and plasmid number depending on the pathotype of CBC

Pathotype	<i>pthA</i> type	Plasmid type									계
		p1A	p1B	p1C	p1D	p1E	p1F	p2A	p2B	p4A	
A	3A	1	2	-	1	1	1	-	-	-	6
	3B	-	-	1	-	-	-	1	-	-	2
	4A	2	-	-	-	-	-	1	-	-	3
	4B	1	1	-	1	-	-	1	-	-	4
	4C	-	-	-	1	-	-	-	1	-	2
	4F	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
A*	1A	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
	2A	-	-	2	-	1	-	-	-	-	3
	4E	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
A <sup>w</sup>	2B	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1
B	1A	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
	3A	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
C	2C	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
계		5	3	4	4	3	3	3	1	1	27

#### 4. 병원형 판별을 위한 Multiplex PCR법 개발

##### 가. 재료 및 방법

##### 1) 균주 및 DNA분리

감귤류 궤양병과 관련된 *Xanthomonas*속 균주(Table 8)를 병원형에 따라 peptone sucrose agar (1% polypeptone, 1% sucrose and 0.2% L-glutarmate) 또는 LB 배지상에서 약 2일정도 배양한 후(28℃) 위에서 언급한 것과 동일한 방법으로 DNA를 분리하였다.

Table 8. Bacterial strains used in this study

Type	Name	Origin	Source <sup>a</sup>
<i>X. a. pv. citri</i> A	CFBP2900	Japan	CIRAD
	M9	USA	DPI
	SL-4510	Korea	PPD
<i>X. a. pv. Citri</i> A*	IR01	Iran	PPDSI
	JK2-10	Saudi Arabia	CIRAD
<i>X. a. pv. citri</i> A <sup>w</sup>	A-2032	USA	DPI
<i>X. a. pv. aurantifolii</i> B	CFBP2868, CFBP2903	Argentina	CIRAD
<i>X. a. pv. Aurantifolii</i> C	CFBP2866	Brazil	CIRAD
<i>X. a. pv. citrumelo</i> CBS	XC05-252, A-1902	USA	DPI

<sup>a</sup>CIRAD; The Agricultural Research Centre for International Development, DPI; Division of Plant Industry, Florida, USA, PPD; Plant Pathology Division, NIAST, Korea, PPDSI; Plant Pests and Diseases Research Institute, Iran.

## 2) 프라이머 및 PCR 조건

세균병은 병징으로부터 병원균을 분리한 후 탄소원이용, 지방산 분석 등을 통하여 동정을 병원성을 검정하는 단계를 거치게 되는데, 감귤 궤양병균은 이외에도 병원형을 확인해야 한다 (Fig. 14). 그런데, 병원형 확인에 기존의 기주범위를 이용한 방법은 많은 시간과 기주를 항상 준비해 두어야 하는 단점이 있다.

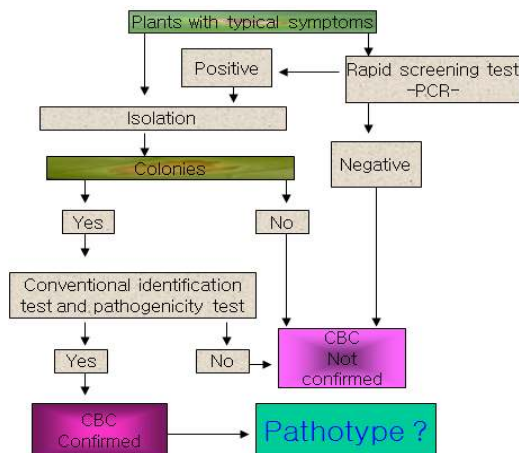


Fig. 14. Diagram for the diagnosis of CBC on symptomatic samples

본 실험에서는 신속하고 정확한 병원형 판별 방법을 개발하기 위해, 앞에서 분리한 DNA를 주형으로 하여 multiplex PCR을 실시하고자 각각의 프라이머에 대한 사전 실험을 실시하였다. 프라이머는 기존에 보고된 2/3 (Hartung et al., 1993), J-pth1/J-pth12 (Cubero and Graham, 2002), J-Rxg/J-Rxc2 (Cubero and Graham, 2002), XACF/XACR (Park et al. 2006) 및 Xac01/Xac02 (Coletta-Filho et al. 2006)를 사용하였다 (Table 9). PCR은 주형 50 ng에 2.5 mM의 각각의 dNTP, 2.0 uM의 각각의 primer와 2.0 U 의 e-Taq DNA polymerase를 반응액으로 하여 최초 94°C에서 3분간 반응 후 94°C에서 45초, 62°C에서 45초 및 72°C에서 45초간 30회 반응 후 마지막으로 72°C에서 10분간 반응을 시켰다. 먼저 각각의 프라이머에 대하여 기 보고된 결과와 동일한 결과가 얻어지는지의 여부를 58°C, 60°C 및 62°C의 신장온도를 이용하여 시험하였다.

프라이머를 3개씩 2조합 즉 하나는 2/3, J-pth1/J-pth2 및 XACF/XACR와 다른 하나는 2/3, J-pth1/J-pth2 및 Xac01/Xac02를 사용하였다. Multiplex PCR을 위해서는 25ng의 주형과 0.1 uM의 각각의 프라이머를 사용하였다. Multiplex PCR 반응후 3.0% (w/v) agarose 전기영동 후 ethidium bromide로 염색한 후 UV하에서 관찰하였다.

Table 9. Primers used in this study for the detection of CBC strains

Primers	Sequence	Expected size	Sources
2 3	5'-CAC GGG TGC AAA AAA TCT-3' 5'-TGG TGT CGT CGC TTG TAT-3'	222 bp	Hartung et al., 1993
J-pth1 J-pth2	5'-CTTCAACTCAAACGCCGGAC-3' 5'-CAT CGC GCT GTT CGG GAG-3'	197 bp	Cubero & Graham, 2002
J-Rxg J-Rxc2	5'-GCGTTGAGGCTGAGACATG-3' 5'-CAA GTT GCC TCG GAGCTATC-3'	179 bp	Cubero & Graham, 2002
XACF XACR	5'-CGT CGC AAT ACG ATT GGA AC-3' 5'-CGG AGG CAT TGT CGA AGG AA-3'	561 bp	Park et al., 2006
Xac01 Xac02	5'-CGCCATCCCCACCACCACCAC GAC-3' 5'-AACCGCTCAATGCCATCCACTTCA-3'	581 bp	Coletta-Filho et al., 2006

### 3) Whole cell PCR

새로 배양한 세포를 1M NaCl로 두 번 세척한 후  $10^8$  cfu/ml (OD<sub>600</sub>=0.3)로

조절하였다. 이를 기준으로 10진희석하여 multiplex PCR에 의한 검출한계를 시험하였다. 각각의 농도의 희석액에서 1ul 씩을 주형으로 하여 총 25ul의 배양액에서 PCR을 실시하였다. PCR은 최초 변성시간을 4분으로 한 것 외에는 위에서 기술한 것과 동일한 조건에서 실시하였다.

#### 나. 결과 및 고찰

##### 1) 다중 PCR을 위한 PCR 조건 및 프라이머별 특이성

기준에 보고된 각각의 프라이머를 이용하여 병원형 검출시험을 실시한 결과 프라이머 2/3에서는 *X. a. pv. citri* A와 A\* type의 모든 균주가 검출되었고, 프라이머 J-pth1/J-pth2 에서는 *X. a. pv. citri* A, A\*와 A<sup>w</sup> type 및 *X. a. pv. aurantifolii* B와 C type이 검출되었는데, *X. a. pv. aurantifolii* B type에서는 약간의 변이가 있었다. 프라이머 XACF/R, J-Rxg/Xc2 and Xac01/02은 모든 *X. a. pv. citri* A, A\*와 A<sup>w</sup> type이 검출되었다. *X. a. pv. citrumelo* E type은 위의 어느 프라이머로도 검출되지 않았다 (Fig. 15). 결합온도는 58°C와 60°C에서 비슷한 결과를 보였는데, 좀 더 높은 특이성이 요구되는 온도인 60°C에서 multiplex PCR을 실시하기로 하였다.

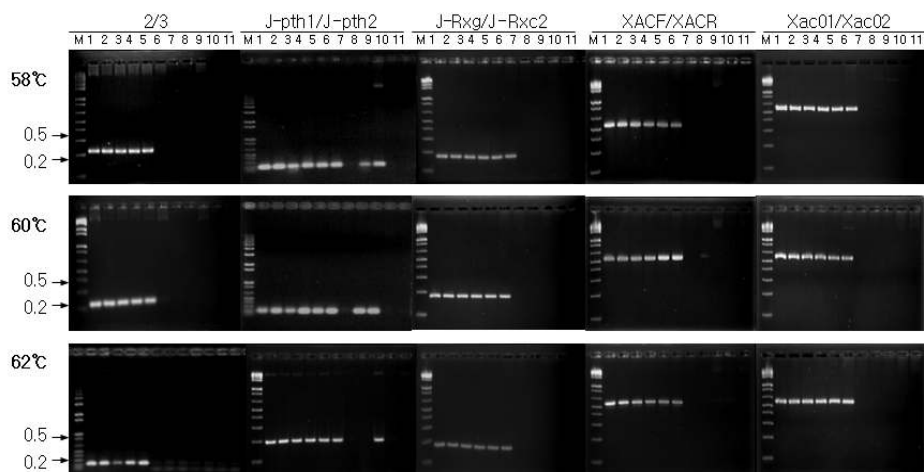


Fig. 15. Specific amplification of *Xanthomonas* pathotype targets by PCR using isolated DNA. Lane M: 1-kb plus DNA ladder (Invitrogen<sup>TM</sup>); lanes 1-3: strains of *X. a. pv. citri* (A), lanes 4-5: *X. a. pv. citri* (A\*), lane 6: *X. a. pv. citri* (A<sup>w</sup>), lane 7-8: *X. a. pv. aurantifolii* (B); lane 9: *X. a. pv. aurantifolii* (C); lanes 10-11: *X. a. pv. citrumelo* (E). Note that the specific band should be detected at the size as described in Table 1. The arrow indicated the size of 0.2 and 0.5 kb

## 2) Multiplex PCR에 의한 병원형 판별

감귤 궤양병의 검출을 위해 위에서와 같이 많은 프라이머들이 보고되어있는데, 이들을 이용하여 검출 및 병원형 구분을 동시에 해결하는 방법을 찾고자, 이들 primer를 이용해 multiplex PCR을 실시하였다. 두개의 그룹 즉 (2/3, J-pth1/J-pth2 및 XACF/XACR)과 (2/3, J-pth1/J-pth2 및 Xac01/Xac02)에서 비슷한 결과를 보였는데, A, A\*, A<sup>w</sup>와 B, C 그룹간은 XACR/XACR 프라이머로, A, A\*와 A<sup>w</sup>, B, C 그룹은 2/3프라이머로 구분이 가능하였으며, J-pth1/2 프라이머로 모든 궤양병균의 검출이 가능할 수 있음을 확인하였다(Fig. 3). 한편, *X. a. pv. citrumelo* E type이 (2/3, J-pth1/J-pth2 및 XACF/XACR)의 조합에서 검출되어 서로 다른 프라이머 조합에 의한 반응으로 보고 이들 프라이머를 이용하여 PCR을 실시한 결과 Xac01과 J-pth2에 의해서 특이 밴드가 형성됨을 확인할 수 있었다. 이들 조합은 *X. a. pv. citrumelo* E type의 검출에 특이적으로 사용될 수 있을 것으로 생각된다 (Fig. 16)

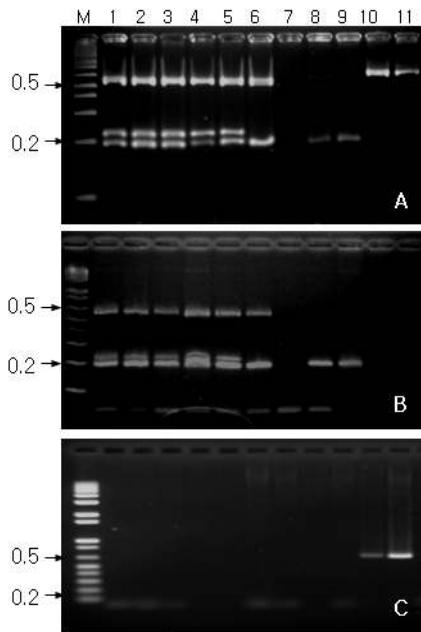


Fig. 16. Multiplex PCR performed for the differentiation of *Xanthomonas* pathotypes. The combinations of primers, A: 2/3, J-pth1/J-pth2 and Xac01/Xac02, B: 2/3, J-pth1/J-pth2 and XACF/XACR, C: primer Xac01/J-pth2 for the specific detection of *X. a. pv. citrumelo*. The order of strains in each lane is same as described in Fig. 1.

### 3) Whole cell PCR 및 검출한계

새로 배양한 세균세포를  $10^6$  cells/ml 로 조절하여 실험한 결과 DNA를 주형으로 이용했을 때와 동일한 결과를 얻을 수 있었다 (Fig. 17). 이상의 결과로 볼 때 일정농도 이상의 세균세포를 직접적으로 이용해도 multiplex PCR을 실시하는데 전혀 문제가 없을 것으로 사료되고, 검출한도는 약  $10^5$  cells/ml로 반응액당 약 100개 정도의 세포가 이용될 때 검출 및 구별이 가능할 것으로 생각된다 (Fig. 17).

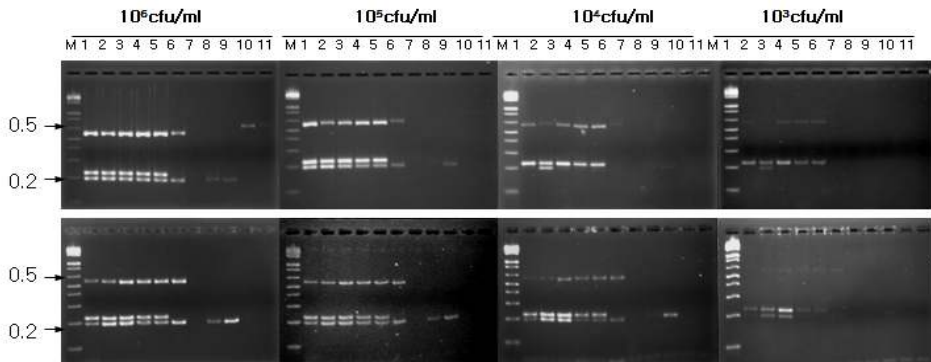


Fig. 17. Limits of detection of *Xanthomonas* strains with cultured cells. PCR amplification from a tenfold dilution series of cultured cells. Two combinations of primer mixture, A: 2/3, J-pth1/J-pth2 and XACF/XACR, B: 2/3, J-pth1/J-pth2 and Xac01/Xac02, were tested for differentiation of the pathotypes. The order of strains in each lane is same as described in Fig. 15.

## 5. 병원형 검출을 위한 특이 프라이머 개발

### 가. 재료 및 방법

#### 1) 사용 균주 및 배양조건

감귤류 궤양병과 관련된 *Xanthomonas*속 균주 (Table 10)를 병원형에 따라 peptone sucrose agar (1% polypeptone, 1% sucrose and 0.2% L-glutarmate) 또는 LB 배지상에서 약 2일정도 28°C에서 배양한 후 위에서 언급한 것과 동일한 방법으로 DNA를 분리하여 사용하였다.



Table 10. Bacterial strains used in this study

Type	Name	Origin	Source <sup>a</sup>
<i>X. a. pv. citri</i> A	CFBP2900	Japan	CIRAD
	M9	USA	DPI
	SL-4510	Korea	PPD
<i>X. a. pv. citri</i> A*	IR01	Iran	PPDSI
	JK2-10	Saudi Arabia	CIRAD
<i>X. a. pv. citri</i> A <sup>w</sup>	A-2032	USA	DPI
<i>X. a. pv. aurantifolii</i> B	CFBP2868, CFBP2903	Argentina	CIRAD
<i>X. a. pv. aurantifolii</i> C	CFBP2866	Brazil	CIRAD
<i>X. a. pv. citrumelo</i> CBS	XC05-252, A-1902	USA	DPI
<i>X. o. pv. oryzae</i>	10860	Korea	KACC
<i>X. a. pv. phaseoli</i>	10559	Korea	KACC
<i>X. a. pv. glycines</i>	8ra	USA	PPD
<i>X. a. pv. pruni</i>	S4383	Korea	PPD
<i>X. a. pv. vesicatoria</i>	S4656	Korea	PPD
<i>Pseudomonas syringae</i> <i>pv. tomato</i>	DC3000	USA	TIGR

<sup>a</sup>CIRAD; The Agricultural Research Centre for International Development, DPI; Division of Plant Industry, Florida, USA, PPD; Plant Pathology Division, NIAST, Korea, PPDSI; Plant Pests and Diseases Research Institute, Iran, KACC; Korean Agricultural Culture Collection.

## 2) 프라이머 제작 및 PCR 조건

위에서 실시했던 ERIC-PCR 과정 중에 각 병원형별로 특이한 밴드를 각각의 병원형 검출을 위한 특이 프라이머 제작에 사용하고자 각각의 밴드에서 DNA를 추출하여 pGEM-T (Promega) vector에 클로닝 하였다. 이의 염기서열을 분석한 후 NCBI를 통하여 상동염기서열을 분석한 결과 몇 가지의 유사한 염기서열을 찾을 수 있었다. 이를 근거로 특이프라이머를 제작하였다.

PCR은 50ng의 DNA를 주형으로 하여 각각의 2.5 mM의 dNTP, 2.0 uM의 프라이머, 2.0 U 의 E-Taq DNA polymerase (Solgent Corp.)를 이용하여 실시하였다. *X. a. pv. citri* A\* 와 Aw type의 검출을 위해 XcAsF 와 XcAswR를 사용해 최초 94°C에서 2분간 반응후 94°C에서 45초, 65°C에서 45초 및 72°C에서 45초간 30회 반응을 실시하였고, 마지막으로 72°C에서 10분간 반응하였다. *X. a. pv. aurantifolii* B type의 검출을 위해서는, 67°C 결합조건에서 XaBF와 XaBR를 이용하고, *X. a. pv. aurantifolii* C type의 검출을 위해서는 69°C에서 XaCF1과 XaCR1을 이용하여 위와 동일한 조건에서

PCR을 실시하였다. 전기영동 후 2% (w/v) agarose gels를 이용하여 실시하였다.

### 3) Whole-cell PCR 및 검출한계조사

새로 배양한 세포를 5M NaCl로 두 번 세척한 후  $10^8$  cfu/ml ( $OD_{600}=0.3$ )로 조절하였다. 이를 기준으로 10진희석하여 multiplex PCR에 의한 검출한계를 시험하였다. 각각의 농도의 희석액에서 1ul 씩을 주형으로 하여 총 25ul의 배양액에서 PCR을 실시하였다. PCR은 최초 변성시간을 4분으로 한 것 외에는 위에서 기술한 것과 동일한 조건에서 PCR을 실시하였다.

## 나. 결과 및 고찰

### 1) 특이 프라이머를 이용한 감귤쾌양병균의 검출

NCBI의 database를 이용하여 상동성 검색을 한 후 ClustralW를 통하여 각각의 병원형에 특이한 염기서열을 찾았다. 여러 가지의 프라이머와 PCR 조건으로 실험한 후 *X. a. pv. citri* A\* 와 A<sup>w</sup> type의 검출을 위한 XcAsF와 XcAswR 프라이머로 674 bp의 산물을 얻었다 (Fig. 19 and 19). 한편, XcBF와 XcBR을 이용하여 *X. a. pv. aurantifolii* B type에 특이적인 281 bp의 PCR 산물을 얻을 수 있었다 (Fig. 20과 21). 또한 프라이머 XaCF1과 XaCR1을 이용하여 373 bp의 *X. a. pv. aurantifolii* C에 특이적인 PCR 산물을 얻을 수 있었다 (Fig. 22와 23).

한편 이들 프라이머의 특이성을 확인하기 위해 다양한 종류의 *Xanthomonas* 속 균을 이용하여 PCR을 실시하였는데, 프라이머 XcAsF와 XacSR의 경우 *X. a. pv. vesicatoria*와 *P. s. pv. syringae*에서 예상치 않은 밴드가 형성되었으나 감귤의 쾌양병 검출을 위해서는 사용이 가능할 것으로 생각된다. 한편, 프라이머 XaBF와 XaBR 또는 XaCF1과 XaCR1을 이용한 실험에서는 다른 비 특이 밴드가 형성되지 않았다.

```

A* GCGATCGCTAAGTTCGACCTACGCAAAAAGTGGCTGTGGGACTGCTAGGACTGGCACTG 60
Aw GTGATCGCTAAGTTCGACCTACGCAAAAAGTGGCTGTGGGACTGCTAGGACTGGCACTG 60
Xav GTGATCGCTAAGTTCGACCTACGCAAAAAGTGGCTGTGGGACTGCTAGGACTGGCACTG 60
Xcc GTGATCGCTAAGTTCGACCTACGCAAAAAGTGGCTGTGGGACTGCTAGGACTGGCACTG 60
*****
A* TCATACAGTGGCGGGCCATGCTGCTCCGGATGTCGGTCAATAGCCCGCTGGAGCACACA 120
Aw TCATACAGTGGCGGGCCATGCTGCTCCGGATGTCGGTCAATAGCCCGCTGGAGCACACA 120
Xav TCATACAGTGGCGGGCCATGCTGCTCCGGATGTCGGTCAATAGCCCGCTGGAGCACACA 120
Xcc TCATACAGTGGCGGGCCATGCTGCTCCGGATGTCGGTCAATAGCCCGCTGGTGGACACA 120
*****
A* GGGCTGGGGGCCACTGCTCCCTCTGCTACTGATCTCTCGGCTGTGACCACTTGCACCTG 180
Aw GGGCTGGGGGCCACTGCTCCCTCTGCTACTGATCTCTCGGCTGTGACCACTTGCACCTG 180
Xav GGGCTGGGGGCCACTGCTCCCTCTGCTACTGATCTCTCGGCTGTGACCACTTGCACCTG 180
Xcc GGGCTGGGGGCCACTGCTCCCTCTGCTACTGATCTCTCGGCTGTGACCACTTGCACCTG 180
*****
A* TATACGTTTCGAGCGAGATGGGATCCGCTACCTGCAAGTCAATGGCCCTAGTGGCGATGC 240
Aw TATACGTTTCGAGCGAGATGGGATCCGCTACCTGCAAGTCAATGGCCCTAGTGGCGATGC 240
Xav TATACGTTTCGAGCGAGATGGGATCCGCTACCTGCAAGTCAATGGCCCTAGTGGCGATGC 240
Xcc TATACGTTTCGAGCGAGAGGAAATCCGCTATCTGCAAGTCAATGGCCCTAGTGGCGATGC 240
*****
A* CGAAGTGCAAATCGGGTGGATCGACGGTACCCGTTGGTTCATGCCCCGTTGGTATCGATGC 300
Aw CGAAGTGCAAATCGGGTGGATCGACGGTACCCGTTGGTTCATGCCCCGTTGGTATCGATGC 300
Xav CGAAGTGCAAATCGGGTGGATCGACGGTACCCGTTGGTTCATGCCCCGTTGGTATCGATGC 300
Xcc CGAAGTGCAAATCGGGTGGATCGACGGTACCCGTTGGTTCATGCCCCGTTGGTATCGATGC 300
*****
A* GACCGATGACCGGTTGCTACAGACACTCCCGCGTGGTACAGCTGGCTCATCTGACT 420
Aw GACCGATGACCGGTTGCTACAGACACTCCCGCGTGGTACAGCTGGCTCATCTGACT 420
Xav GATGGTATGACCGGTTGCTACAGACACTCCCGCGTGGTACAGCTGGCTCATCTGACT 420
Xcc GATGGTATGACCGGTTGCTACAGACACTCCCGCGTGGTACAGCTGGCTCATCTGACT 420
*****
A* AAAAATTGATCGTGTCCCTGTTGGTTCGAAACAAAGAGCTGATCTTGGCCGATGCTG 480
Aw AAAAATTGATCGTGTCCCTGTTGGTTCGAAACAAAGAGCTGATCTTGGCCGATGCTG 480
Xav AAAAATTGATCGTGTCCCTGTTGGTTCGAAACAAAGAGCTGATCTTGGCCGATGCTG 480
Xcc AAAAATTGATCGTGTCCCTGTTGGTTCGAAACAAAGAGCTGATCTTGGCCGATGCTG 480
*****
A* GCGCCGGCAGGTGCCACCATACGAGCGCACCCCTGCTGGACAACCTCTGCTGTGTTCTCAG 540
Aw GCGCCGGCAGGTGCCACCATACGAGCGCACCCCTGCTGGACAACCTCTGCTGTGTTCTCAG 540
Xav GCGCCGGCAGGTGCCACCATACGAGCGCACCCCTGCTGGACAACCTCTGCTGTGTTCTCAG 540
Xcc GCGCCGGCAGGTGCCACCATACGAGCGCACCCCTGCT-----TGTGTTGTTCTCAG 531
*****
A* AGCCGTCGCACTGGCAGGCTTCTCTCTGCGCTTATCCCGGTAATAAGATACAGCAATGCC 600
Aw AGCCGTCGCACTGGCAGGCTTCTCTCTGCGCTTATCCCGGTAATAAGATACAGCAATGCC 600
Xav AGCCGTCGCACTGGCAGGCTTCTCTCTGCGCTTATCCCGGTAATAAGATACAGCAATGCC 600
Xcc AGTGTCTCGACTGGCAGGCTTCTCTCTGCGCTTATCCCGGTAATAAGATACAGCAATGCC 591
*****
A* CTGGAGCCCGGCGCAGTTTTCCGACCCCTGGCCCTTGGTGGTATGACCCCTTTTGGAGGCG 660
Aw CTGGAGCCCGGCGCAGTTTTCCGACCCCTGGCCCTTGGTGGTATGACCCCTTTTGGAGGCG 660
Xav CTGGAGCCCGGCGCAGTTTTCCGACCCCTGGCCCTTGGTGGTATGACCCCTTTTGGAGGCG 660
Xcc CTGGAGCCCGGCGCAGTTTTCCGACCCCTGGCCCTTGGTGGTATGACCCCTTTTGGAGGCG 651
*****
A* ACRGGCAATCCGCT 674
Aw ACRGGCAATCCGCT 674
Xav ACRGGCAATCCGCT 674
Xcc ACRGGCAATCCGCT 665

```

Fig. 18. Alignment of *X. a. pv. citri* A\* and A<sup>w</sup> pathotype specific sequences of CBC. The sequence was aligned with ClustralW. The position of the *X. a. pv. citri* A\* and A<sup>w</sup> specific primer are indicated by box. A\*; *X. a. pv. citri* A\*, A<sup>w</sup>; *X. a. pv. citri* A\*, Xav; *X. a. pv. vesicatoria* 85-10, Xcc; *X. c. pv campestris* strain 8004.

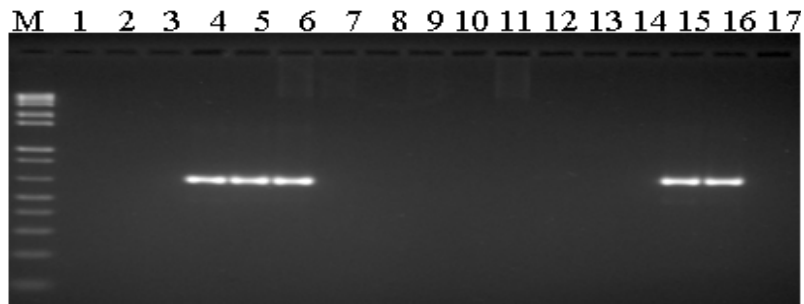


Fig. 19. Specific amplification of target DNA from *X. a. pv. citri* A\* and A<sup>w</sup> strains by the PCR. The position of the predicted 500 bp product is marked in the margin. PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis and stained with ethidium bromide. The primer set XacSF and XacSR were used for the PCR. M: 1kb plus





## 2) 검출한계

이들 특이 프라이머의 검출한계 설정을 위한 실험결과 XcAsF와 XcAswR에서는  $10^4$  cfu/ml 농도까지 검출이 되었고, XcBF와 XcBR 및 XaCF1과 XaCR1에서는 각각  $10^5$  cfu/ml 및  $10^6$  cfu/ml 농도까지 검출이 되었다 (Fig. 24). 이는 각 반응당 약  $10^2$ 에서  $10^4$ 까지의 세균 세포가 사용되었을 때의 농도로 검출한계는 예상보다 낮았으나 배양 후 병원형 판별에는 사용이 가능할 것으로 생각된다.

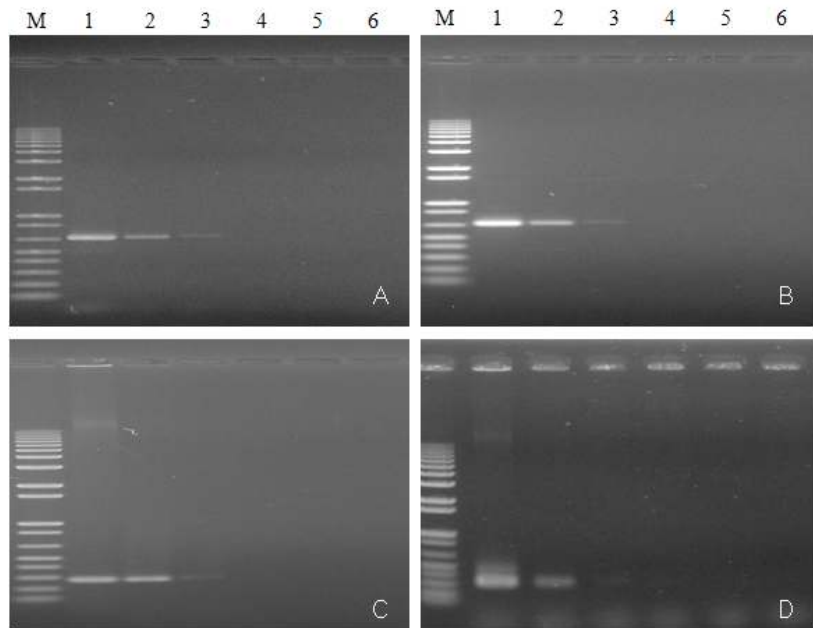


Fig. 24. Estimates of limits of detection by PCR amplification for each *Xanthomonas* pathotype. DNA amplification from a tenfold dilution series of cultured cells using the primer set XacSF and XacSR for the detection of *X. a. pv. citri* A\* (A) and *X. a. pv. citri* A<sup>W</sup> (B), XacBF and XacBR for *X. a. pv. aurantifolii* B (C), and XacCF and XacCR for *X. a. pv. aurantifolii* C (D). M: 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen TM); lanes 16: 107, 106, 105, 104, 103, and 102 cell, respectively. Note that the 1 ul was used as template from each dilution sample.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

본 연구과제에서 달성한 연구 성과는 다음과 같다. 1) 감귤 잎 표면에서 궤양 병원균의 성장속도에 미치는 온도 영향을 병원세균의 **double time**으로 정량화시켜 병원균의 감염위험도를 추정하는 감염모형을 개발하였고; 2) 병원균의 침입에 대한 오렌지 중 중 이병성 종과 저항성 종 간의 차이를 미세구조학적으로 비교하였으며; 3) 앞에서 개발한 궤양병 감염모형을 이용하여 공간해상도가 120m x 120m 수준의 고해상도 농가맞춤형 궤양병 예찰정보시스템을 개발하여 인터넷 상에서 제주도 전역의 궤양병 발생예측 정보를 매시간별로 제공하고 있다. 또한 4) 제주도 전역의 감귤과원에서 발생하는 병원균 집단에서 항생제 저항성 균주가 광범위하게 발생함을 밝히었고; 5) 궤양병 방제용 항생제 저항성 문제를 해결하기 위하여 구리제 농약을 이용한 병방제 체계를 제시하였다. 6) 우리나라에 분포하는 궤양병 병원균의 병원형과 유전적 특성을 해외 균주와 비교하여 특성을 분석하였고; 7) 병원형과 유전적 차이를 이용하여 수입 오렌지류 과일의 검역에 필요한 기초자료를 확보하였으며; 8) 궤양병원균의 병원형 판별과 진단에 필요한 유전적 **probe**를 개발하였다.

본 연구과제는 궤양병 발생의 생태적 특성을 바탕으로 궤양병 예찰정보시스템을 구축하여 제주 감귤 재배지에서 적절한 농약살포 시기를 결정하는데 실질적으로 도움이 될 수 있다. 궤양병 발생 예찰 정보를 생산하기 위해 기상청 표준기상관측자료를 이용, 가공하는 체계를 구축하였으며, 국가 기상 관측망을 이용하는 산업기상의 여러 가지 응용 사례로 비추어 볼 때 농업분야로 반영된 대표적 사례로 볼 수 있겠다. 감귤궤양병 발생 예찰 모형을 통하여 감귤 궤양병의 최초 발생 시점 예측 가능성을 높였으므로 실제 농가에서 최초 병 방제 시기 결정에 큰 도움이 될 것으로 생각한다. 따라서 감귤 궤양병만을 위한 방제 체계가 확립됨으로써 궤양병이 문제가 되는 농가에서는 큰 도움이 될 것이다. 또한 우리나라에 분포하는 궤양병 병원균의 분포 및 병원형의 다양성이 구명으로 오렌지류 수출국과의 병원형의 차이가 밝혀져 수입 오렌지류 검역에 필요한 과학적 근거가 확보되었으며, 금후 검역관련 협상에 기초자료로 활용이 가능할 것으로 생각된다. 또한 다양한 균주의 병원형시험을 통하여 금후 국내 대표균주로 사용할 수 있는 균주가 선발되어 저항성 검정 등에 활용이 가능할 수 있을 것으로 생각된다. 더불어 궤양병원균 병원형 판별 및 진단을 신속 정확하게 할 수 있는 방법이 개발되어 금후 검역에 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구 과제의 활용 계획으로서는 공간해상도 120m<sup>2</sup>격자로의 감귤병해충 궤양병 예찰정보제공은 초정밀 농업응용기상정보로서 농장 단위까지의 맞춤형 생산지원 서비스로 활용이 가능하며, 또한 감귤 병해충 조사자료 관리시스템은 연구원이 조사한 실측값에 근거한 실시간 GIS 분석 및 예찰자료로서도 차후 확대가 가능한 데이터므로 감귤과원 병해충종합관리 서비스를 위한 연계사업 확장으로도 즉시 활용 가능할 수 있겠다. 부족한 농가 수준의 시험을 2008년도에 더 수행하여 온주밀감 과원에서 방제 체계를 확립하며 기관 내 홈페이지에서 감귤 궤양병 발생을 예찰할 수 있도록 모델을 장착하여 선진 농가나 지도 기관에서 활용할 실정이다. 마지막으로 국내 감귤류에 궤양병을 일으키는 병원형은 *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* A type만이 존재하므로 금후 *X. a.* pv. *citri* A\*와 A<sup>w</sup>, *X. a.* pv. *aurantifolii* B 및 C type 발생 지역의 오렌지류 수입에 대한 억제 수단으로 활용가능하다는 것을 식물 검역소에 건의하였고, 제주 지역이외에서는 발생이 확인되지 않은 남해안 지역의 병해관리 철저 및 금후 청정 수출단지로 육성 관리가능 ('05년; 전남, 74ha 재배, 847ton 생산)할 것으로 생각되어 이에 대한 정책적 고려가 필요할 것으로 생각된다. 또한 생리 화학적 특성에 의한 병원형 판별, multiplex PCR에 의한 병원형 판별 및 병원형 검출을 위한 특이 프라이머 등은 검역 현장에서 신속하고 정확한 병원형 검출을 위해 사용될 수 있을 것으로 생각되어 그 활용을 건의할 예정이다.



## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 제 7 장 참고문헌

1. B. Boher, M., Nicole, M. P., and Geiger, J. P. 1997. Extracellular polysaccharides from *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* interact with Cassava cell walls during pathogenesis. *Mol. Plant-Microbe Interact* 10:803-811.
2. Baxter, T., and Jensen, T. E. 1993. Uptake of magnesium, strontium, barium, and manganese by *Plectonema boryanum* (Cyanophyceae) with special reference to polyphosphate bodies. *Protoplasma* 104:81-89.
3. Bock, C. H., Parker, P. E., and Gottwald, T. R. 2005. Effect of simulated wind-driven rain on duration and distance of dispersal of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from canker-infected citrus trees. *Plant Dis.* 89:71-80.
4. Brown, I., Mansfield, J. W., Irlam, I., Conrads-Strauch, J., and Bonas, U. 1993. Ultrastructure of interactions between *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* and pepper, including immunocytochemical localization of extracellular polysaccharides and the AvrBs3 protein. *Mol. Plant-Microbe Interact* 6:376-386.
5. Bruning, A. M. and Gabriel, D. W. 2003. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Molecular Plant Pathology* 4:141-157.
6. Coletta-Filho, H.D., Takita, M.A., de Souza, A.A., Neto, J.R., Destefano, S.A.L., Hartung J.S. and Machado M.A. 2006. Primers based on the rpf gene region provide improved detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in naturally and artificially infected citrus plants. *Journal of Applied Microbiology.* 100:279-285.
7. Cubero, J. and Graham, J.H. (2002) Genetic relationship among worldwide strains of *Xanthomonas* causing canker in citrus species and design of new primers for their identification by PCR. *Appl. Environ. Micro.* 68, 1257-1264.
8. Dienelt, M. M., and Lawson, R. H. 1989. Histopathology of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* from Florida and Mexico in wound-inoculated detached leaves of *Citrus aurantifolia* : Transmission electron microscopy. *Phytopathology* 79:336-348.

9. Egel, D.S., Graham, J.H. and Stall R.E. 1991. Genomic relatedness of *Xanthomonas campestris* strains causing diseases of citrus. Appl. Environ. Microbiol. 57:2724-2730.
10. El-Ghaouth, A., Arul, Wilson, C., and Benhamou, N. 1994. Ultrastructural and cytochemical aspects of the effect of chitosan on decay of bell pepper fruit. Physiol. Mol. Plant Pathol 44:417-432.
11. El-Ghaouth, A., Wilson, C. L., and Wisniewski, M. 1998. Ultrastructural and cytochemical aspects of the biological control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in apple fruit. Phytopathology 88:282-291.
12. George, M. G. 2005. PartB: The Gammaproteobacteria. p.83-81. In Brenner, D. J., Krieg, N. R. and Staley, J. T. (eds.). Bergy's Manual of Systematic Bacteriology Second ed., vol. 2. Springer Verlag, New York.
13. Goodman, R. N., Huang, P.-Y., and White, J. A. 1976. Ultrastructural evidence for immobilization of an incompatible bacterium, *Pseudomonas pisi*, in tobacco leaf tissue. Phytopathology 66:754-764.
14. Goto, M. 1962. Studies on citrus canker. Bull. Fac. Agric. Shizuoka Univ. 12:3-12.
15. Goto, M. 1992. Plant diseases of international importance. 7. Citrus canker. Pages 170-208 in: Disease of Fruit Crops. J. Kumar, H. S. Chaube, U. S. Sing, and A. N. Mukhopadbyay, eds. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ.
16. Graham, J. H., J. S. Hartung, A. R. Chase (1990): Pathological, restriction fragment length polymorphism and fatty acid profile relationships between *Xanthomonas campestris* from citrus and noncitrus hosts. Phytopathology 80,826-836.
17. Graham, J.H. and Gottwald, T.R. 1990. Variation in aggressiveness of *Xanthomonas campestris* pv. *citrumelo* associated with citrus bacterial spot in Florida citrus nurseries. Phytopathology, 80, 190-196.
18. Hartung, J.S., Daniel, J.F. and Pruvost, O.P. 1993. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* by the polymerase chain reaction. Appl. Environ. Micro. 59, 1143-1148.
19. Huang, P.-Y., Huang, J.-S., and Goodman, R. N. 1975. Resistance mechanism of

- apple shoots to an avirulent strain of *Erwinia amylovora*. *Physiol. Plant Pathol.* 6:293-287.
20. Hung, J.-s. 1986. Ultrastructure of bacterial penetration in plants. *Ann. Rev. Phytopathol.* 24:141-157.
  21. Kim, K. W., Park, E. W., Kim, Y. H., Ahn, K. K., Kim, P. G., and Kim, K. S. 2001. Latency- and defense-related ultrastructural characteristics of apple fruit tissues infected with *Botryosphaeria dothidea*. *Phytopathology* 91:165-172.
  22. Koizumi, M. 1976. Incubation period of citrus canker in relation to temperature. *Bull. Fruit Tree Res. Stn. SE. B (Okitsu)* 3: 33-46.
  23. Koizumi, M. 1977. Behavior of *Xanthomonas citri* (Hase) Dowson and histological changes of diseased tissue in the process of lesion extension. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 43:129-136.
  24. Koizumi, M. 1979. Ultrastructural changes in susceptible and resistant plants of Citrus following artificial inoculation with *Xanthomonas citri* (Hase) Dowson. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 45:635-644.
  25. Lane D.J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. (In: Stackebrandt E. Goodfellow M. (Eds), *Bacterial Systematics* (pp. 115-175), John Wiley & Sons, New York).
  26. Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T. & de Bruijn F.J. (1994). Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied Environmental Microbiology*, 60: 2286-2295.
  27. Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T. & de Bruijn, F.J. (1995). Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology*, 85: 528-536.
  28. Mazzucchi, U., Bazzi, C., and Bonatti, P. M. 1982. Encapsulation of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* in relation to its growth in tobacco leaves both pretreated and not pretreated with protein-lipopolysaccharide complexes. *Physiol. Plant Pathol.* 21:105-112.
  29. Mohammadi, M., Mirzaee, M.R. and Rahimian, H. 2001. Physiological and biochemical characteristics of Iranian strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, the causal agent of citrus bacterial canker disease. *J. Phytopathol.* 149, 65-75.

30. Myung, I.-S., Nam, K.-W. and Kwon, H.-M. 2003. Dispersal of citrus bacterial canker caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in nursery plots of Unshiu orange. *Plant Pathol. J.* 19:205-209.
31. Park, D.S., Hyun J.W., Park, Y.J., Kim, J.S., Kang, H.W., Hahn, J.H., and Go, S.J. 2006. Sensitive and specific detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by PCR using pathovar specific primers based on *hrpW* gene sequences. *Microbiol Res.* 161(2):145-9.
32. Peltier, G. L. 1920. Influence of temperature and humidity on the growth of *Pseudomonas citri* and its host plants and on infection and development of the disease. *J. Agric. Res.* 20:447-506.
33. Politis DJ, G. R. 1978. Localized cell wall appositions : incompatibility response of tobacco leaf cells to *Pseudomonus pisi*. *Phytopathology* 68:309-316.
34. Pruvost, O., Boher, B., Brocherieux, C., Nicole, M., and Chiroleu, F. 2002. Survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in leaf lesions under tropical environmental conditions and simulated splash dispersal of inoculum. *Phytopathology* 92:336-346.
35. Rohlf F.J. (2000). NTSYSpc: Numerical Taxonomy System, ver. 2.1. (New York, Exeter Publishing).
36. Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (Eds.). (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. (New York, Cold Spring Harbor Laboratory).
37. Schaad, N. W., Jones, J. B., and Lacy, G. H. *Xanthomonas*, In: N. W. Schaad, J. B. Jones, W. Chun (Eds.), *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*, third ed, APS Press, St. Paul, MN, 2001. pp 175-200.
38. Schouten, H. J. 1989. A possible role in pathogenesis for the swelling of extracellular slime of *Erwinia amylovora* at increasing water potential. *Neth. J. Plant Pathol* 95:169-174.
39. Sequeira, L., Gaard, G., and De Zoeten, G. A. 1977. Interaction of bacteria and host cell walls: It's relation to mechanisms of induced resistance. *Physiol. Plant Pathol.* 10:43-50.
40. Shiotani, H., Ozaki, K. & Tsuyumu, S. (2000). Pathogenic interactions between *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and cultivars of pummelo (*Citrus grandis*).

- Phytopathology, 90: 1383-1389.
41. Sing, V. O., and Schroth, M. N. 1977. Bacteria-plant cell surface interactions: Active immobilization of saprophytic bacteria in plant leaves. *Science* 107:759-761.
  42. Stall, R. E., Miller J. W., Marco, G. M., and deEchenique, B. I. C. 1980. Population dynamics of *Xanthomonas citri* causing canker of citrus in Argentina. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 93:10-14.
  43. Stall, R. E., Miller, J. W., Marco, G. M., and Canteros de Echenique, B. I. 1982. Timing of sprays to control canker of grapefruit in Argentina. *Proc. Int. Soc. Citric.* 1:414-417.
  44. Trindade, L.C., Lima, M.F. & Ferreira, M.A.S.V. (2005). Molecular characterization of Brazilian strains of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* by rep-PCR fingerprinting. *Fitopatologia Brasileira*, 30, 46-54.
  45. Van Alfen, N. K., McMillan, B. D., and Wang, Y. 1987. Properties of the extracellular polysaccharides of *Clavibacter michiganense* subsp. *insidiosum* that may affect pathogenesis. *Phytopathology* 77:501-505.
  46. Verniere, C. J, Gottwald, T. R., and Provost, O. 2003. Disease development and symptom expression of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in various citrus plant tissues. *Phytopathology* 93:832-843.
  47. Verniere, C., Hartung, J.S., Pruvost O.P., Civerolo E.L., Alvarez A.M., Maestri, P. and Luisetti, J. 1998. Characterization of phenotypically distinct strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from Southwest Asia. *Eur. J. Plant Pathol.* 104:477-487.
  48. Yasuko Kaneko, K. N., and Nagayama, K. 2007. Observation of in vivo DNA in ice embedded whole Cyanobacterial cells by Hilbert differential contrast transmission electron microscopy(HDC-TEM). *Plasma and fusion research* 2:S1007-1001-1004.
  49. 현재욱, 고상욱, 김동환, 한승갑, 김광식, 권혁모, 임한철. 2005. 친환경적 감귤 병 방제를 위한 구리제의 효율적 사용. *식물병연구* 11(2): 115-121.
  50. Schnabel, E. L., and Jones, A. L. 1999. Distribution of tetracycline resistance genes and transposons among phylloplane bacteria in michigan apple orchards.

Applied and Environmental Microbiology 65:4898-4907

51. McManus, P. S., Stockwell, V. O., Sundin, G. W., and Jones, A. L. 2002. Antibiotic use in plant agriculture. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40:443-465.
52. da Silva, A.C.R., et al. 2002. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* 417 (6887): 459-463.

## 주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술 개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.