creative commons
COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

碩士學位論文

감마선 처리에 의한 감귤궤양병균의 불활성화와 병원성에 미치는 영향

Effect on the Inactivation and pathogenicity of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* by the Gamma Irradiation

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

濟州大學校 大學院

農 學 科

金 京 南

2014 年 12月

감마선 처리에 의한 감귤궤양병균의 불활성화와 병원성에 미치는 영향

指導敎授 田 溶 哲

金 京 南

이 論文을 農學 碩士學位 論文으로 提出함

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

2014 年 12 月

金京南의 農學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 고 창 길 ㊞
委 員 김 주 성 ㊞
委 員 전 용 철 ㊞

濟州大學校 大學院

2014年 12月

목 차

List of Figures..... iii
List of Tables..... vi

A B S T R A C T..... 1
Ⅰ. 서 론..... 2
Ⅱ. 재료 및 방법..... 5
1. 감귤궤양병균 (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*) 분리
2. 선택 배지
3. 감귤 궤양병균 현탁액에 감마선 처리
4. 감마선 효과 검증 D10 value산정
5. 감귤 생과실에 감마선 처리
6. 감귤궤양병균 ITS (Internal transcript spacer) 동정
7. 감귤 식물체
8. 감마선을 처리한 감귤 궤양병균의 병원성 조사
Ⅲ. 결 과..... 12
1. 감마선에 의한 감귤 궤양병균 불활성화
2. 감마선 처리에 의한 감귤 생과실의 소독 효과
3. PCR을 통한 염기서열 분석에 따른 감귤궤양병균 동정
4. 감마선에 의한 감귤 궤양병균의 병원성 변화
Ⅳ. 고 찰..... 30
Ⅴ. 적 요..... 33
Ⅵ. 참 고 문 헌..... 34

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

List of Figures

Fig. 1. Photograph of bacterial colonies visually similar with *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*) A2, B3, B4, C5, C6, D7 and real colony of *Xcc* (A1). The presented photographs were inoculated with 100 ㎕ the bacterial suspension and incubated at 28 ℃ or 72 hours. 10

Fig. 2. Photograph (A) and description (B) of instruction for irradiation of gamma-ray to suspension of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (1.0×10^7 cfu / ml). The gamma-ray exposed was 100, 200, 300, and 400 Gy and the distance was 50 cm between the radiation source and the bacterial suspension. 13

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 3. Photographs of semi selective medium incubated with cell suspension of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* exposed by 0 (A), 100 (B), 200 (C), 300 (D) and 400 (E) Gy of gamma ray. The presented photographs were inoculated with 100 ml the bacterial suspension and incubated at 28 ℃ or 3 days. 14

Fig. 4. Number of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* in the suspension by treatment of different level of gamma irradiation. The concentration of the bacterial suspension was 1.0×10^7 cfu / ml. The vertical bars indicated the standard deviation of three replications of the bacterial suspensions. 15

Fig. 5. Inoculated citrus fruit (1.0×10^7 cfu / ml) was exposed by 0 (A), 30 (B), 50 (C), 70 (D) and 100 (E) Gy of γ-irradiation. The plants were inoculated with 100 ㎕ of the bacterial suspension irradiated with the γ-rays and incubated at 28 ℃

for 3 days. The concentration of the suspension of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* was 1.0 × 10^7 cfu / ml. 19

Fig. 6. Suppression of colony formation of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*) treated by γ-irradiation on semi-selective medium. The suspension of *Xcc* was exposed by 0 (A), 30 (B), 50 (C), 70 (D) and 100 (E) Gy of γ-irradiation. The plants were inoculated with 100 μℓ of the bacterial suspension irradiated with the γ-rays and incubated at 28 ℃ for 3 days. the concentration of the suspension of *Xcc* was 1.0 × 10^7 cfu / ml. 20

Fig. 7. Number of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* on the surface of citrus fruit by treatment of different level of gamma irradiation. The citrus fruits were sprayed with the bacterial suspension at the concentration with 1.0 × 10^7 cfu / ml before irradiation with gamma ray. The vertical bars indicated the standard deviation of three replications of the bacterial suspensions. 22

Fig. 8. Gel electrophoresis of PCR amplified 16S / 23S internal transcript spacer regions from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (lane 1 ~ 4) and mock bacterial strains (lane 5 ~ 7) using primer-2 (5'-ACGGGTGCAAAAAATCT-3') and primer-3 (5'-TGGTGTCGCTTGTAT-3'). M : 1kb molecular size Ladder (iNtRON Bio.) 25

Fig. 9. BLAST results on the NCBI based on the rDNA sequence of citrus canker pathogenic bacteria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. 26

Fig. 10. Disease severity on Satsuma mandarin leaves non-treated (A),

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

pre-treated with 50 (B), 100 (C) and 200 (D) Gy of gamma irradiation at 14 days after inoculation with citrus canker pathogen *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*). The concentration of the suspension of *Xcc* was 1.0 × 10^7 cfu / ml. 28

Fig. 11. Number of lesions on Satsuma mandarin leaves pre-treated with different level of gamma irradiation at 14 days after inoculation with citrus canker pathogen *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*). The concentration of the suspension of *Xcc* was 1.0 × 10^7 cfu / ml. 29

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

List of tables

Table 1. Number of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*) in the suspension by treatment of different level of gamma irradiation. 16

Table 2. The D_{10} values of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*) in the suspension 17

Table 3. Number of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*) in the surface of inoculated citrus fruit (1.0×10^7 cfu / ml). The fruits were inoculated with 100 ㎕ of the bacterial suspension irradiated with the γ-rays and incubated at 28 ℃ for 3 days. The concentration of the suspension of *Xcc* was 1.0×10^7 cfu / ml. 21

Table 4. The D_{10} values of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*) in the surface of citrus fruits. 23

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

A B S T R A C T

Citrus canker caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*) has been quarantined by many countries in the world. Recently, the usage of methyl bromide should be limited, application by gamma irradiation on the agricultural production is raised as an alternative method. In this study, the level of gamma irradiation which could decrease of population of *Xcc* in the suspension or on the surface of citrus fruit was investigated. The D_{10} value of *Xcc*, which is radiation dose required to reduce the number of the microorganism, was 55 and 28 Gy in the suspension and on the surface of citrus fruit, respectively. Furthermore, disease severity was suppressed on the citrus leaves inoculated with *Xcc* suspension pre-treated with gamma irradiation. Based on this study, it is suggested that *Xcc* on the citrus fruit could be eradicated by gamma irradiation and the results of this study may be valuable for application of gamma ray in quarantine activity.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Ⅰ. 서 론

아시아 감귤 궤양병은 *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*)에 의해 감귤류에 발생하는 병이다 (Parnall 등, 2009). 감귤 궤양병은 주로 자연 개구인 기공, 수공 또는 상처를 통하여 감귤 잎, 열매 또는 가지에 침입하여 병을 발생시킨다 (Schubert 등, 2001). 제주에서 주로 재배하는 감귤 품종 중 하나인 온주 밀감 (Satsuma mandarin)은 이 병에 대해 어느 정도 저항성을 나타내기 때문에 국내 시장에 공급하기 위해서는 이 병으로 인하여 심각한 문제는 발생하지는 않는다 (Shiotani 등, 2009).

그러나 감귤 수입국 대부분이 감귤 궤양병을 검역 대상 병으로 지정되어 있어 수출을 위해서는 감귤 궤양병을 철저하게 관리해야 한다. 감귤 수입국 미국인 경우 캘리포니아 주와 플로리다 주에서 주로 생산되는 대부분의 감귤류가 감귤궤양병에 감수성이므로 감귤 궤양병에 대한 지속적인 검역을 실시하였다. 그러나 궤양병의 확산을 저지하지 못하여 결국 2006년에는 더 이상 감귤궤양병 무발생 지역에서 제외되었다 (Dewdney 와 Graham, 2014). 그 결과 검역이 다소 완화는 되었지만 국외로부터 수입되는 감귤에 대해서는 여전히 감귤 궤양병에 대한 검역이 실시되고 있다. 또한 유럽 연합에 속한 나라인 경우도 나라 간 차이는 있지만 감귤 궤양병에 대한 검역은 감귤류 수입에 있어서는 필수 조건으로 여겨진다 (Shiotani 등, 2009).

지금까지 감귤 궤양병 방제는 수확 후 관리보다는 재배 중 방제 수단이 주로 수행되었는데 (Hyun 등, 2012; Graham 등, 2008) 감귤 재배지 주위를 방풍하거나 구리제 또는 항생제 계통의 농약 살포가 효과가 있다고 알려져 있다 (Gottwald 와 Timmer, 1995; Behlau 등, 2010). 감귤궤양병의 전반은 주로 강풍과 폭우를 동반한 태풍에 의하여 감염된 나무로부터 건전한 나무로 전반하여 피해를 주는 것으로 알려졌으며, 플로리다에서는 태풍에 의한 병 전반 피해를 감소시기 위해 병에 감염된 나무를 일정 거리 내에서 제거하는 것을

제주대학교 중앙도서관

규제 화하였다 (Gottwald 등, 1992, 1997, 2001; Schubert 등, 2001).

제주도에서 주로 재배하는 온주밀감품종은 감귤궤양병에 저항성 (Myung 등, 2003)이기 때문에 큰 문제가 되지는 않으나 만감류인 스위트오렌지 등은 감수성이어서 일반 온주밀감 재배농가 인근에 재배할 경우 감귤궤양병의 전염원을 생성하여 감귤궤양병이 많이 발생할 수도 있다 (Graham 와 Gottwald, 1991; Koizumi, 1985).

감귤궤양병은 주로 스트렙토마이신, 보르도액와 같은 화학적 약제를 5 월 중순, 6 월 말, 7 ~ 8 월 초 강풍와 폭우를 동반한 태풍이 발생하기 전, 후로 살포하여 방제한다. 또한 방풍림을 설치하여 외부로부터 병원균의 유입을 차단하고 간벌을 통해 내부 감염된 나무로부터 건전한 나무로의 전반을 최소화한다 (Hyun 등, 2012).

감귤 궤양병은 상처를 통하여 감염되므로 수확 후 관리 소홀로 인해 감귤 궤양병의 발생될 수도 있다. 그러나 수확 후 감귤 생과실에 대한 관리로는 감귤 궤양병 보다는 상처에 의해 발생하는 감귤 푸른곰팡이병 (병원균 Penicillium digitatum)에 대한 연구가 주로 수행되었다 (Eckert 와 Eaks, 1989). 미국 캘리포니아 주에서는 감귤 푸른곰팡이병을 유기합성농약인 imazalil, thiabendazole, sodium o-phenylphenate을 살포함으로써 주로 방제하고 있다고 하였다 (Holmes 와 Eckert, 1999; Palou 등, 2002; Smilanick 등, 2006).

Methyl bromide는 농수산물 및 식품류의 수확 후 검역 목적으로 사용될 뿐만 아니라 제초제, 살선충제, 살충제, 살균제로 균류, 선충, 곤충, 진드기, 설치류, 잡초, 일부 세균 등의 소독에 사용되며, 미국에서는 상업적인 목적으로 40여 년 동안 토양 훈증 검역에 사용되었다. 또한 매년 2만 톤 가량 사용될 정도로 매우 효과적이고 우수하다고 알려져 있다 (Ristaino 와 Thomas, 1997).

그러나 methyl bromide가 유독성 기체로 세포활성을 억제하고, 급성 신경장애 피해를 주며, 오존층 파괴물질로 규정되어 최근 몬트리올 환경 협약에 의해 사용이 제한됨에 따라 (FAO, 2003) 수출입 식품류 및 농수축산물의 검역처리를 위한 methyl bromide 대체 방안이 강구되고 있다 (Lee 등, 2007; Noh

제주대학교 중앙도서관 JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

등, 2001). 기존에 보고된 methyl bromide 대체방안으로는 저농도 산소 및 고농도 이산화탄소처리, phosphine 훈증, 열처리, 저온처리 등이 제안되었으나 처리시간에 따른 효과가 불완전하고 이화학, 물리적 변화 및 품질저하 등의 문제점이 발생한다고 알려져 있다 (Kwon 등, 2002).

최근 이온화 에너지는 근래에 주목받고 있는 살균방법으로 1980년 World Trade Organization (WHO), Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), International Atomic Energy Agency (IAEA)에서 10,000 Gy 이하로 조사된 식품은 안전하다는 발표가 있었고, 1986년 Food and Drung Administration (FDA) 및 1989년 United States Department of Agriculture (USDA)에서도 검역의 일환으로 해충검역 및 숙도지연에 1,000 Gy 이하 이온화 에너지 조사를 승인한 바 있다. 또한 2002년에는 유럽, 미국, 캐나다 등을 포함한 52여 개국에서 이온화 에너지 사용이 허가되어 200여기 이상의 이온화 에너지 조사시설을 이용하여 실용화 방면에서 여러 연구를 추진한다고 보고된 바 있다 (Lee 등, 2001; Seo 등, 2008; Noh 등, 2001). 한편, 감마선과 같은 이온화 에너지가 식품의 안전적인 보존을 위해 이용되고 있으며 최근 50 개국 이상이 식품에 이온화 에너지 적용을 허가하고 있다 (Farkas 와 Farkas, 2011). 이온화 에너지는 의료 기구의 살균, 가공 식품의 살균 처리, 곤충의 살처분, 농작물의 돌연변이 육종 등 다양하게 이용되고 있으며 (Kátia, 2012; Andres 등, 2007; Froelicher 등, 2007) 감귤에서는 감마선 처리에 의해 과실의 부패가 지연되고 저장 중 과실의 품질에 좋은 영향을 미친다고 보고되었다 (Gihan 등, 2010). 그러나 감귤 궤양병균과 같은 검역 대상 병원균에 대한 이온화 에너지를 이용한 사례는 아직 까지 보고되지 않았다.

제주대학교 중앙도서관

본 연구에서는 현탁액 형태의 감귤 궤양병균과 생과실 과피에 존재하는 감귤궤양병균의 밀도를 효과적으로 감소시킬 수 있는 이온화 에너지 감마선의 선량을 알아보고자 한다. 또한 감마선을 처리한 감귤 궤양병균을 감귤 잎에 접종하여 감마선에 의한 감귤 궤양병균의 병원성 변화 여부를 bio-test를 통해 알아보았다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 감귤궤양병균 (*Xcc*) 분리

감귤궤양병균에 걸린 잎을 서귀포 토평에 위치한 감귤농가에서 10 ~ 15 개를 채집하였다. 실험에 앞서 petri dish 8 개를 준비하여 6 개에는 멸균수를 나머지 2 개에는 각각 1 % 차아염소산나트륨 수용액과 70 % 에탄올을 2 / 3 채워놓았다. 실험은 채집한 잎이 2차 감염이 되지 않도록 멸균상태인 clean bench에서 실시하였다. 감귤궤양병균에 의해 잎의 앞 / 뒷면에 원형의 불규칙한 모양으로 부풀어 올라 분화구 형태를 띤 감염부위 가장자리를 도치램프로 화염 멸균한 메스로 약 0.5 × 0.5 ㎝의 크기로 12 ~ 16 개가 되도록 절단하였다. 절단된 0.5 cm의 정사각형 잎은 멸균된 핀셋을 이용하여 사전에 준비된 1 % 차아염소산나트륨 수용액에서 30 초간 1회 침지소독하고, 멸균수에서 1 분간 3회 세척하고, 70 % 에탄올에서 30 초간 1회 침지소독, 멸균수에서 1 분간 3회 세척한 후 필터페이퍼에 절단된 잎 조직에 흡수된 물기를 제거하고 1 % water agar배지에 4 개씩 치상한 후 25 ℃ incubator에서 2 일간 배양하였다. water agar배지에 치상한 잎 조직에서 72 시간동안 배양된 배지에서 균총을 떼어내어 Tryptic Soy Agar (TSA)배지에서 순수분리 한 뒤 28 ℃ incubator에서 72 시간동안 배양 한 뒤 계대배양 하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

2. 선택 배지

병원 세균인 *Xcc*를 선택적으로 선발하기 위해서 semi selective medium (SSM)배지를 실험에 이용하였다. SSM은 고압멸균 전에 peptone 5.0 g, beef extract 3.0 g, soluble starch 10.0 g, agar 15 g, CaCl 20.25 g, tween80

10.0 ml, distilled water 1,000 ml, crystal violet solutionat 1 % 150 ㎕를 듀란병에 넣고 121 ℃에서 15 분간 고압 멸균 처리하였다. 고압 멸균된 용액에 cephalexin 50.0 mg, methyl thyophanate 10.0 mg 과 chlorothalonil 10.0 ml을 추가한 선택배지 혼합액을 고압멸균기에서 121 ℃로 15 분간 고압 멸균하여 제조하였다 (Cleci 등, 2009).

3. 감귤 궤양병균 현탁액에 감마선 처리

감귤 궤양병균은 서귀포 토평에 위치한 감귤원의 감귤 (품종 : 궁천조생) 잎에서 분리한 균주를 이용하였다. 감귤 궤양병균 100 ㎕를 tryptic soy broth (TSB; Becton, Dickson and Company, France)배지에 접종한 후 28 ℃ shaking incubator (HB-201SL, Hanbaek Scientific Co., Korea)에서 120 rpm 으로 48 시간 동안 배양 진탕배양 하였다. 배양된 감귤 궤양병균의 농도를 1.0×10^7 cfu / ml 가 되도록 현탁액을 작성하였다.

제주대학교 중앙도서관

감귤 궤양병균 현탁액을 제주대학교 원자력과학기술연구소의 ^{60}Co 감마선 조사 시설인 γ-ray irradiator (C-188 irradiator, MDS Nordion, Canada)을 이용하여 감마선을 100, 200, 300, 400 Gy 로 처리하였으며 감마선을 처리하는 동안 대조구로 감마선을 처리하지 않은 감귤 궤양병균 현탁액을 상온에 보관하였다.

서로 다른 수준의 감마선을 처리된 감귤 궤양병균 현탁액과 무처리한 현탁액에서 100 ㎕ 씩 선택배지 (SSM)에 접종하여 루프를 이용하여 골고루 도말한 뒤 28 ℃ 에서 72 h 동안 배양하였다.

본 실험은 3 번의 분리된 실험을 실시하였으며 각각의 실험에 3개의 반복된 현탁액을 이용하였다.

4. 감귤 생과실에 감마선 처리

감귤 생과실에 표면에 존재하는 감귤 궤양병균이 어느 정도의 감마선 선량에 의해 살균되는 지 알아보기 위해 본 실험을 실시하였다. 감귤은 시중에 판매하는 일정한 크기의 5 번과 감귤 (59 ~ 60 cm)을 구입하여 흐르는 물로 깨끗이 세척하여 표면에 있는 먼지와 미생물들을 모두 제거한 후 상온에서 건조하였다. 농도가 1.0×10^7 cfu / ml 인 감귤궤양병균 현탁액을 생과실 표면에 이슬이 맺힐 정도로 골고루 접종하였다. 감귤 궤양병균이 접종된 감귤 생과실을 상온에서 1 시간동안 물기가 없어지도록 건조한 후 감귤궤양병균 현탁액에 처리한 방법과 동일하게 감마선을 처리하였다. 단, 감귤 생과실 표면에 감마선이 골고루 조사 (照射)되게 하기 위해 감귤 생과실을 turn table (콤팩트 회전진열대, 한국)위에 올려놓고 이들을 방사능 50 cm 간격 주위에 설치하여 2.7회 / 분 (1 턴 약 22 초) 속도로 회전하면서 감마선을 처리하였다. 감마선 처리는 0, 30, 50, 70, 100 Gy 선량으로 하였으며 감마선을 처리 하지 않은 감귤은 상온에 보관하였다.

제주대학교 중앙도서관

감마선이 처리된 감귤 생과실은 각각 멸균수 150 ml가 담긴 500 ml 비커에 넣고 shaking incubator에서 150 rpm의 속도로 2 시간 동안 세척하였으며, 비커입구는 이물질로 인한 2차 오염이 발생하지 않도록 알루미늄 호일로 봉하였다. 그 후 세척액 100 ㎕를 선택배지 (SSM)에 접종하여 도말한 뒤 28 ℃ incubator에서 72 시간 동안 배양하였다.

본 실험은 3 번의 분리된 실험을 실시하였으며 각각의 실험에 3개의 반복된 생과실을 이용하였다.

5. 감마선 효과 검증 D_{10} value산정

감마선을 처리한 감귤 궤양병균 현탁액과 생과실의 세척액을 배양한 배지에서 생성된 감귤 궤양병균 균총 수를 육안으로 관찰하여 계수하였다. 계수된 균총 수는 추세선 그래프로 기울기를 구한 다음 D_{10} value를 아래 공식과 같이

산출하였다. D_{10} value는 초기 미생물 농도와 비교하여 90 % 사멸시키거나 원래 균수에 비해 개체수가 10 배 감소시키는 선량을 말한다 (Whitby 와 Gelda, 1979).

$$D_{10}\ value = \frac{D_t}{Log_{10}\ N_0 - Log_{10}\ N_t}$$

D_t = 집단에서 균총이 관찰되는 선량 (Radiation dose)

N_0 = 초기 균총 수

N_t = D_t 에서 생존한 균총 수

6. 배양된 균의 ITS (Internal transcript spacer) 염기 서열 분석을 통한 동정

선택배지에서 생성된 균총을 육안으로 균총의 색상, 모양, 크기 등으로 구분하여 감귤궤양병균으로 판단한 세균을 유전자 염기서열 분석을 통하여 동정하였다. 이를 위해 육안으로 감귤궤양병균으로 판단되는 균총을 임의로 선택하여 (Fig. 1) DNA kit (DNeasy® Blood & Tissue Kit, Qiagen)을 DNA를 추출하였다.

DNA 추출하기 위해서 선택배지 (SSM)에 배양된 감귤궤양병균으로 추측되는 세균을 10 ml Tryptic Soy Broth (TSB)에 접종한 후 28 ℃에서 120 rpm으로 48 시간 동안 진탕 배양하였다. 그 중 1.5 ml 세균현탁액을 −80 ℃인 Ultra Low Temperature Freezer (MDF-U4086S; Sanyo Electric Biomedical Co.,Ltd, Japan)에 10 분간 냉동한 뒤, 실온에서 5 분간 해동하고 4 ℃ 에서 10,000 rpm으로 1 분간 원심분리하여 상등액을 제거하고 20 mM Tris HCl, 2 mM EDTA, 10 % SDS, 20 mg / ㎖ lysozyme을 섞은 lysis buffer 180 ㎕을 첨가한 후 vortex하였다. Protain K를 20 ㎕ 분주한 뒤 다시 vortex 하였다. 그 후 현탁액에 AL Buffer를 200 ㎕ 첨가하고 56 ℃ water bath에서 30 분간 배양하였다. 배양된 혼합용액에 15 초간 votex 하고 lysis buffer 200 ㎕를 첨가 한 뒤 votex 하였다. 그 후 95 % ethanol을 넣고 vortex하여 용액을

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

새로운 column에 넣은 후 8,000 rpm으로 1 분간 원심 분리하였다. column에서 걸러진 용액을 취한 후 collection tube는 교환하였다. column에 AW1 buffer 500 ㎕를 첨가한 후 8,000 rpm으로 1 분간 원심분리를 하여 column에서 걸러진 용액을 취하고 다시 collection tube로 교환하고 AW2 buffer 500 ㎕를 분주하고 4 ℃에서 14,000 rpm으로 3 분 동안 원심분리를 하였다. Column에서 걸러진 용액을 취하고 새로운 collection tube로 교환한 뒤 14,000 rpm으로 1 분 원심분리 하고 collection tube 대신 micro tube를 column에 꽂은 뒤 60 ℃ incubator에서 5 분간 건조 시킨 후 column에 AE buffer 200 ㎕를 첨가하고 상온에서 1 분간 보관한 뒤에 4 ℃에서 8,000 rpm으로 1 분간 원심분리 하여 column은 버리고 micro tube 에 추출된 DNA를 사용하였다.

DNA의 internal transcribed spacer (ITS)의 염기서열을 증폭시키기 위해 primer-2 (5'-ACGGGTGCAAAAAATCT-3')와 primer-3 (5'-TGGTGTCGCTTGTAT-3')를 사용하였다 (Shiotani 등, 2009). PCR 반응액은 total DNA 1 ㎕에 10 pMol primer 0.5 ㎕, 10 × buffer 2 ㎕, dNTP 2 ㎕, Taq DNA polymerase (iNtRON Biotechnology Inc., Seoul, Korea) 0.5 ㎕를 혼합한 후 나머지 volume을 3차 증류수로 20 ㎕로 조정한 후 PCR Thermal cycler Dice TP600 (TaKaRa, Japan)을 사용하여 96 ℃ 2 분간 처리한 후, 94 ℃에서 30 초, 55.9 ℃에서 30 초, 72 ℃에서 30 초 처리를 30회 반복 후 72 ℃에서 2 분간 처리하여 DNA를 증폭시켰다.

증폭된 DNA 5 ㎕를 0.01 % ethidium bromide (EtBr)가 함유된 1 % agarose gel에서 전기영동 한 후 UV하에서 증폭 유무를 확인하였다. DNA elution은 NucleoSpin® kits (Macherey-Nagel, Germany)에 기술된 방법대로 수행하였다. DNA sequence는 분석전문업체인 Macro Gen에 의뢰하여 분석하였고 분석된 자료는 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 홈페이지의 Basic Local Alignment Search Tool (Blast; http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)를 이용하여 이미 등록된 염기서열과 상동성을 비교하여 감귤궤양병균을 동정하였다.

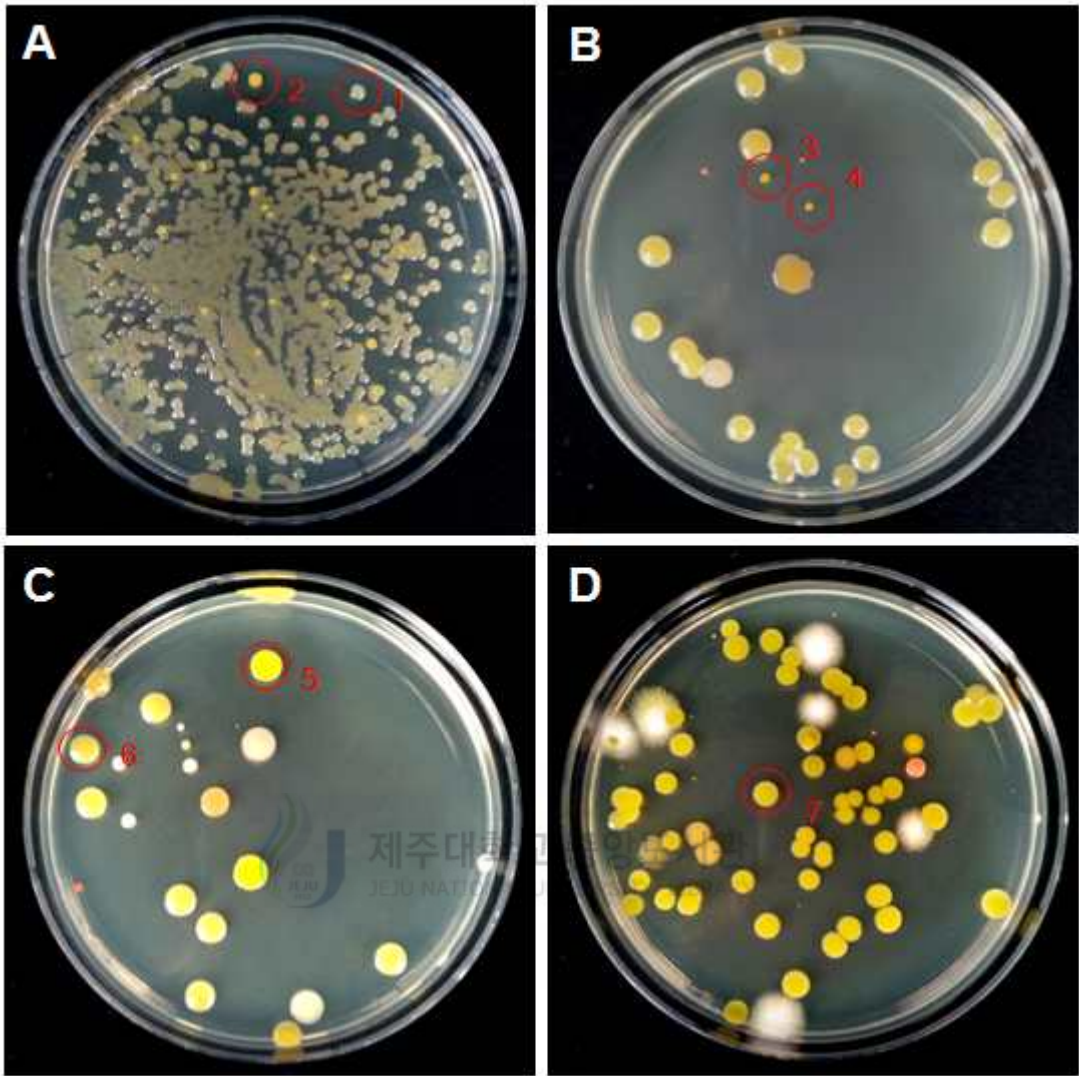


Fig. 1. Photograph of bacterial colonies visually similar with *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*) A2, B3, B4, C5, C6, D7 and real colony of *Xcc* (A1). The presented photographs were inoculated with 100 ㎕ the bacterial suspension and incubated at 28 ℃ or 72 hours.

7. 감마선을 처리한 감귤 궤양병균의 병원성 조사

감귤나무 (품종 : 궁천조생)에서 신초가 발생한 가지를 선택하여 전정가위를 이용하여 절취한 후 절단된 부위를 1 % 차아염소산나트륨 용액에 30 초 동안 표면살균을 하고, 멸균수에 30 초 ~ 60 초 세척한 뒤 멸균수가 채워진 100 ㎖ 플라스크에 새순을 꽂았다. 이때 플라스크의 입구에는 공기를 통한 오염을 막기 위해 알루미늄 호일로 입구를 봉하였으며, 새순을 꽂을 때도 멸균된 Loop로 호일에 구멍을 뚫어 절단된 부위의 오염을 최소화하였다.

감마선을 50, 100, 200 Gy로 처리한 감귤 궤양병균 현탁액을 멸균수로 균농도가 1.0 × 10^7 cfu / ml가 되도록 조정하였다. 감귤궤양병균 현탁액 100 ml 에 tween20 10 ㎕를 첨가하여 접종원을 제작하여 감귤 신초에 골고루 살포하였다. 비교구로서는 감마선을 처리하지 않은 감귤 궤양병균을 살포하였다.

접종된 감귤의 잎을 28 ℃의 100 % 상대습도가 유지되는 dew chamber에서 24시간 습실 처리 후 28 ± 1 ℃ 의 식물배양실의 옮겨 병 진전 과정을 관찰하였다. 병 발생 정도는 병원균 접종 14 일이 경과 후 감귤 잎에 형성된 감귤 궤양병 병반수를 계수하여 조사하였다. 실험은 동일한 방법으로 3 번을 실시하였고 각 실험마다 처리구당 3 개의 감귤 가지를 이용하였다. 결과는 분산분석과 처리평균 사이의 비교를 위하여 Duncan검정 (P = 0.001)을 실시했으며, Statistical Analysis System (SAS Institute, version 8.02) program을 이용하였다.

제주대학교 중앙도서관

Ⅲ. 결　　과

1. 감마선에 의한 감귤 궤양병균 불활성화

감귤궤양병균 (*Xanthonmonas citri* subsp. *citri*) 현탁액을 제주대학교에 위치한 원자력과학기술연구소에서 처리수준을 달리하여 감마선을 처리한 감귤궤양병균현탁액을 선택배지 (SSM)에 100 ㎕씩 접종하여 28 ℃에서 72 시간 배양한 결과, 무처리한 실험구와 비교하여 감마선을 처리한 실험구에서는 콜로니 개체수가 확연히 감소하였다 (Fig. 2, Fig. 3).

감마선 100 Gy를 처리하였더니 감귤 궤양병균의 농도가 1,000배 정도 감소하였고 감마선 처리 수준을 높일수록 감귤궤양병균의 수가 감소하였다 (Table 1). 감귤 궤양병균 현탁액에서 감귤 궤양병균을 완전히 치사시키는 감마선 선량은 300에서 400 Gy 사이의 범위에 있었다 (Fig. 4).

초기의 균수에서 90 %의 균이 감소하는 감마선 선량인 D_{10} value는 53에서 58 Gy 사이의 선량인 것으로 나타났다 (Fig. 4, Table 2).

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

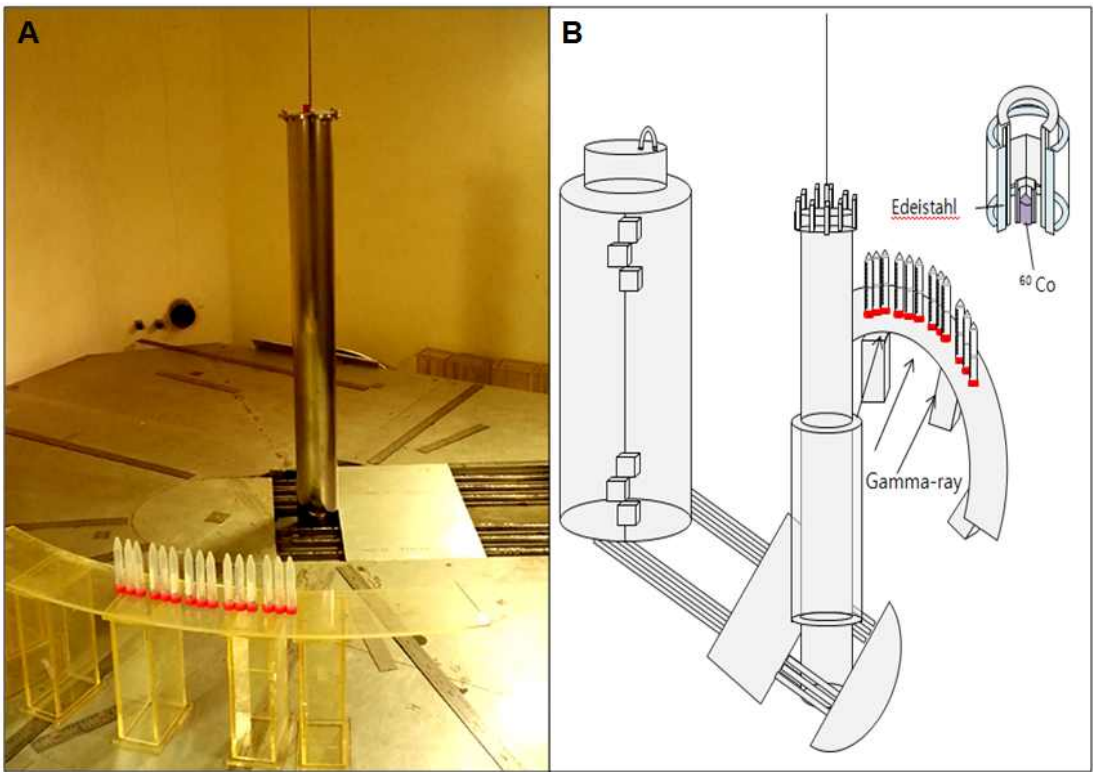


Fig. 2. Photograph (A) and description (B) of instruction for irradiation of gamma-ray to suspension of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (1.0×10^7 cfu / ml). The gamma-ray exposed was 100, 200, 300, and 400 Gy and the distance was 50 cm between the radiation source and the bacterial suspension.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

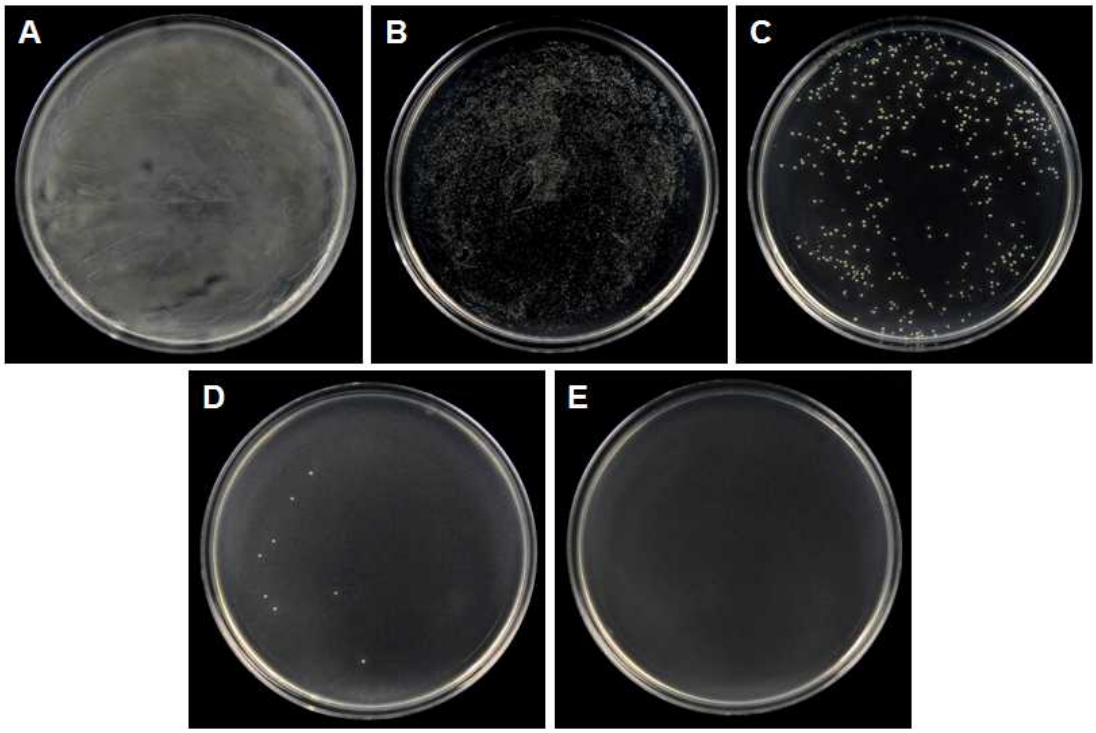
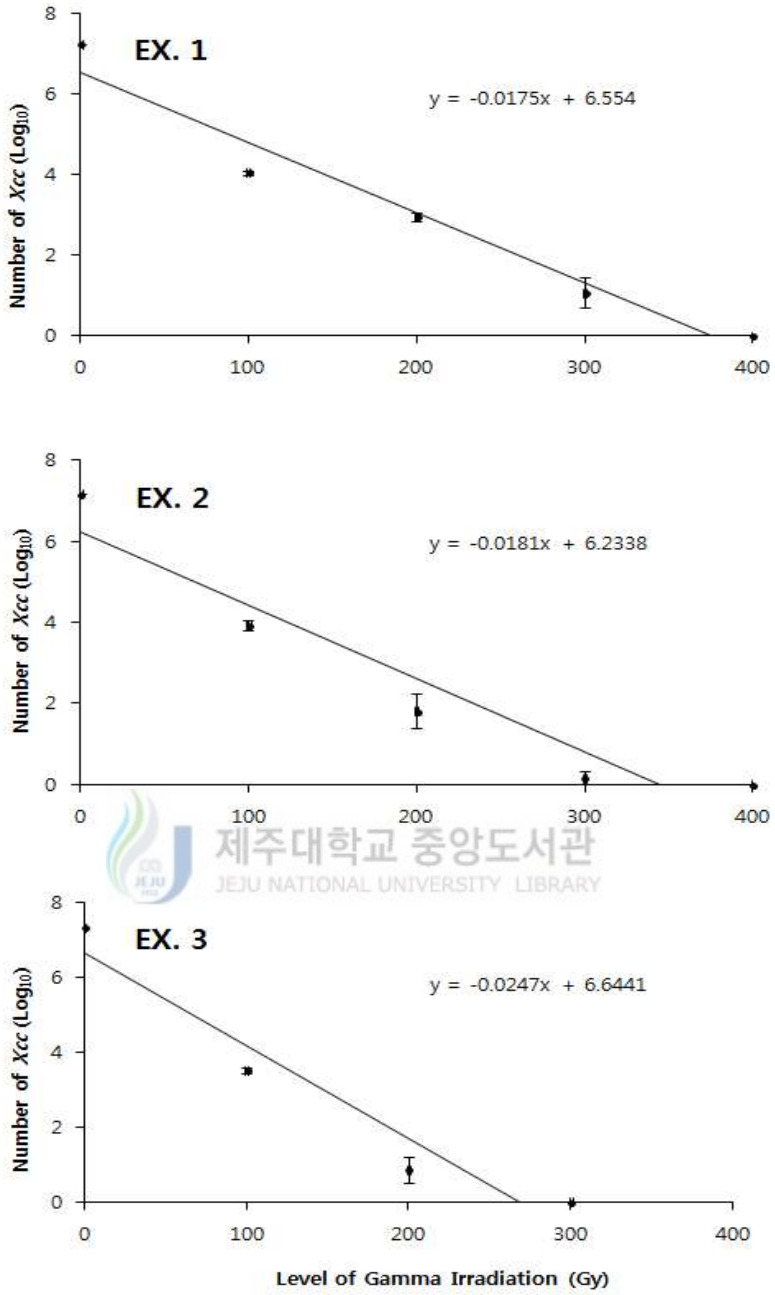


Fig. 3. Photographs of semi selective medium incubated with cell suspension of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* exposed by 0 (A), 100 (B), 200 (C), 300 (D) and 400 (E) Gy of gamma ray. The presented photographs were inoculated with 100 ml the bacterial suspension and incubated at 28 ℃ or 3 days.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 4. Number of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* in the suspension by treatment of different level of gamma irradiation. The concentration of the bacterial suspension was 1.0×10^7 cfu / ml. The vertical bars indicated the standard deviation of three replications of the bacterial suspensions.

Table 1. Number of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*) in the suspension by treatment of different level of gamma irradiation.

Treatment (Gy)	Number of *Xcc*[a] (Log_{10})	Duncan[c]
0	7.3 ± 0.1	a
100	3.8 ± 0.3	b
200	1.9 ± 1.0	c
300	0.4 ± 0.6	d
400	0	d

[a]Values represent mean ± standard deviation of three separated experiments. (The concentration of *Xcc* was 1.0 × 10^7 cfu / ml.)

[b]The different letters are significantly (P = 0.001) different according to Duncan's multiple test.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Table 2. The D_{10} values of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*) in the suspension.

	Experiment	D_{10} value (Gy)	R^2
*Xcc**	1	57	0.9546
	2	55	0.9064
	3	53	0.9296

*The concentration of *Xcc* was 1.0×10^7 cfu / ml.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

2. 감마선 처리에 의한 감귤 생과실의 소독 효과

감귤 궤양병균을 1.0 × 10^7 cfu / ml 농도로 접종한 감귤 생과실에 감마선을 처리 (Fig. 5)하였더니 감귤 생과실 표면에 존재하는 감귤 궤양병균이 감마선에 의해 그 수가 감소하는 것으로 나타났다. 처리된 생과실은 감마선 처리로 인한 형태, 모양 등 외관상 변화는 확인되지 않았다.

감마선 30 Gy를 처리하였을 때 감귤 생과실 표면에 존재하는 감귤 궤양병균 개체수 10 배가 감소하였고 처리수준이 증가함에 따라 균 개체 수는 점차 감소하였고 100 Gy를 처리하였을 때 감귤 궤양병균 대부분이 치사하였다 (Fig. 6, Table 3). 감귤 생과실에 존재하는 감귤 궤양병균에 대한 감마선 D_{10} value는 29에서 31 사이로 나타났다 (Fig. 7, Table 4).

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

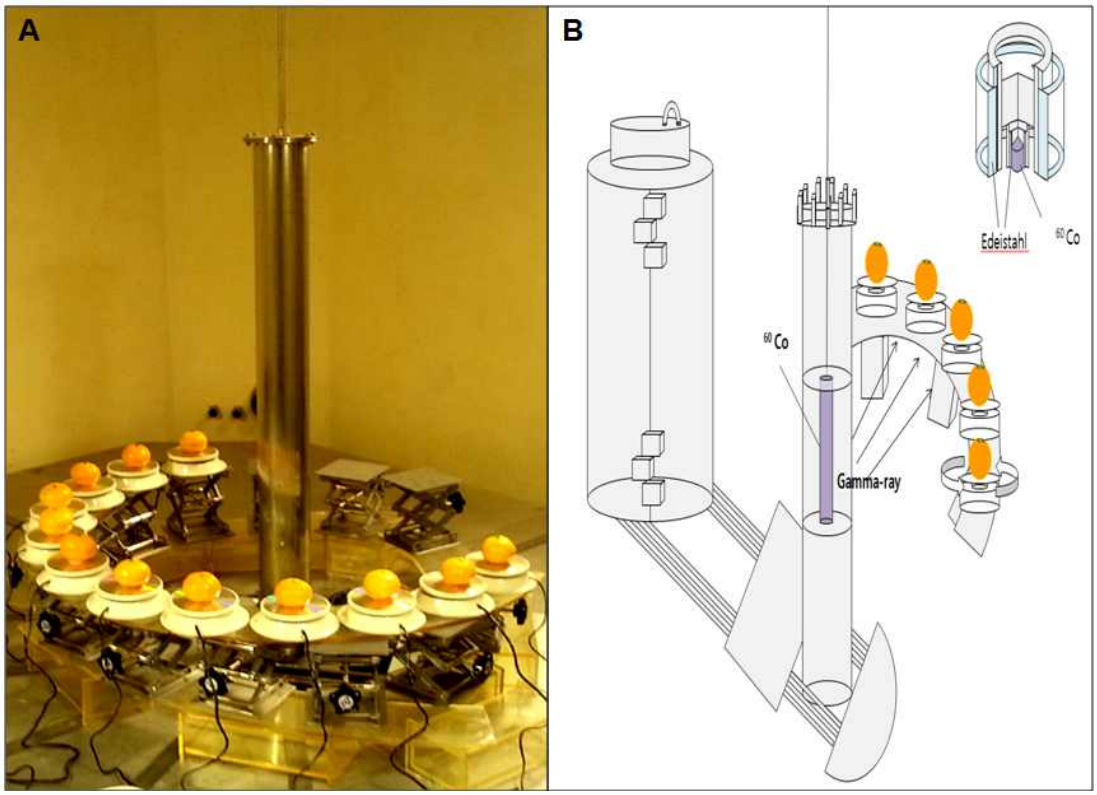


Fig. 5. Inoculated citrus fruit (1.0×10^7 cfu / ml) was exposed by 0 (A), 30 (B), 50 (C), 70 (D) and 100 (E) Gy of γ-irradiation. The plants were inoculated with 100 ㎕ of the bacterial suspension irradiated with the γ-rays and incubated at 28 ℃ for 3 days. The concentration of the suspension of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* was 1.0×10^7 cfu / ml.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

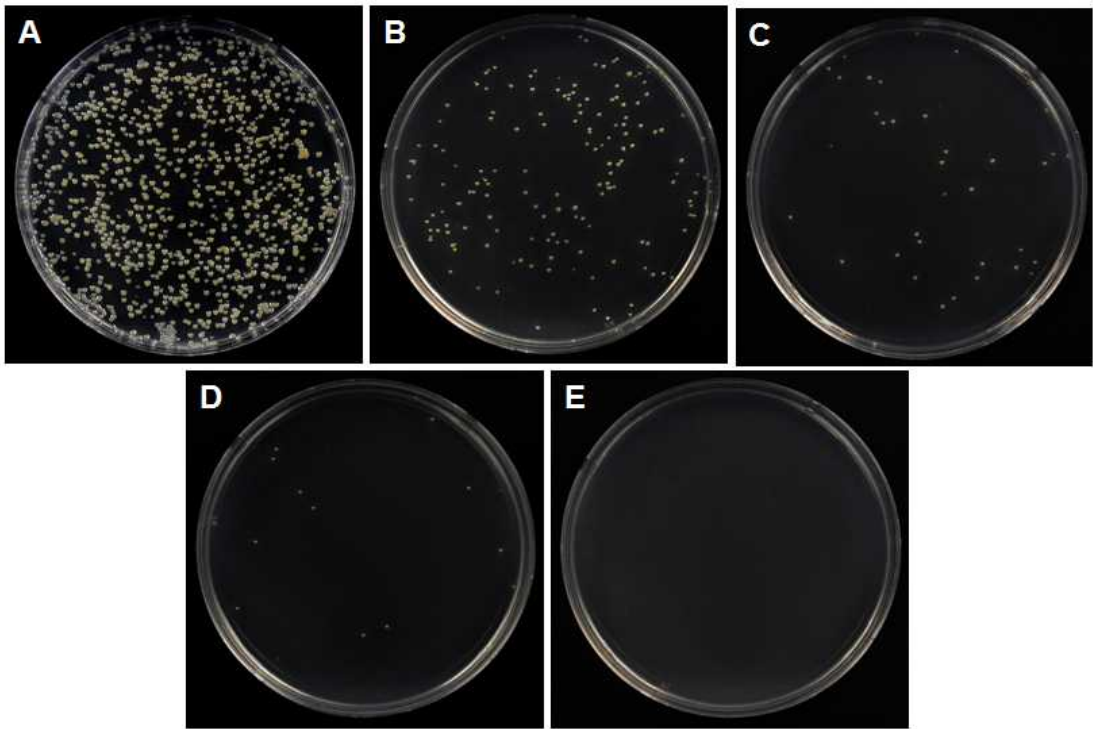


Fig. 6. Suppression of colony formation of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*) treated by γ-irradiation on semi-selective medium. The suspension of *Xcc* was exposed by 0 (A), 30 (B), 50 (C), 70 (D) and 100 (E) Gy of γ-irradiation. The plants were inoculated with 100 ㎕ of the bacterial suspension irradiated with the γ-rays and incubated at 28 ℃ for 3 days. the concentration of the suspension of *Xcc* was 1.0 × 10^7 cfu / ml.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

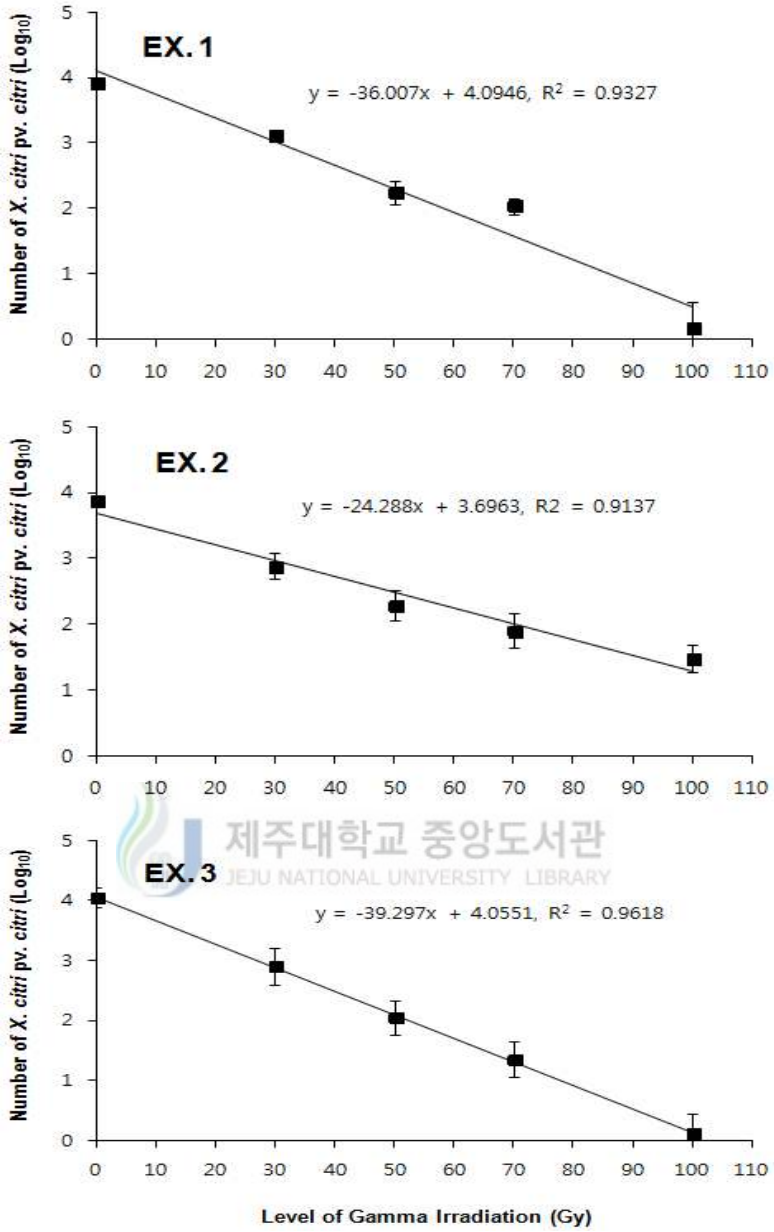
Table 3. Number of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*) in the surface of inoculated citrus fruit (1.0×10^7 cfu / ml). The fruits were inoculated with 100 ㎕ of the bacterial suspension irradiated with the γ-rays and incubated at 28 ℃ for 3 days. the concentration of the suspension of *Xcc* was 1.0×10^7 cfu / ml.

Treatment (Gy)	Number of *Xcc*[a] (Log_{10})	Duncan[b]
0	4.0 ± 0.1	a
30	3.0 ± 0.1	b
50	2.2 ± 0.1	c
70	1.8 ± 0.4	c
100	0.6 ± 0.8	d

[a]Values represent mean ± standard deviation of three separated experiments. (The fruits were sprayed with the suspension of *Xcc* in the concentration of 1.0×10^7 cfu / ml and dried at the room temperature.)

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

[b]The different letters are significantly (P=0.001) different according to Duncan's multiple test.



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 7. Number of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* on the surface of citrus fruit by treatment of different level of gamma irradiation. The citrus fruits were sprayed with the bacterial suspension at the concentration with 1.0×10^7 cfu / ml before irradiation with gamma ray. The vertical bars indicated the standard deviation of three replications of the bacterial suspensions.

Table 4. The D_{10} values of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*) in the surface of citrus fruits.

	Experiment	D_{10} value (Gy)	R^2
*Xcc**	1	29	0.9327
	2	31	0.9137
	3	25	0.9618

*The fruits were sprayed with the suspension of *Xcc* in the concentration of 1.0×10^7 cfu / ml and dried at the room temperature.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

3. PCR을 통한 염기서열 분석에 따른 감귤궤양병균 동정

육안으로 선별한 감귤 생과실 표면에 존재하는 세균이 감귤궤양병균인지 동정하기 위해 DNA 염기 서열을 분석한 결과 lane 1의 감귤궤양병균은 250bp에서 밴드를 형성하여 감귤궤양병균으로 동정되었고 육안으로 감귤궤양병으로 선발된 세균도 lane 1 ~ 4에서 동일한 크기의 밴드를 생성함으로써 감귤궤양병균으로 동정되었다 (Fig. 8). 그러나 균총의 모양과 색깔로 감귤궤양병균이 아닌 것으로 판단된 세균 lane 5 ~ 7은 밴드를 형성하지 않아 감귤궤양병균이 아닌 것으로 나타났다 (Fig. 8).

감귤궤양병균으로 동정된 균을 sequence 하여 Gene bank에서 비교한 결과 *Xcc* 100 %의 상동성을 보였다 (Fig. 9). 이 병원균은 *Xcc* 와 동일하다고 보고되어있다 (Schaad 등, 2006).

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

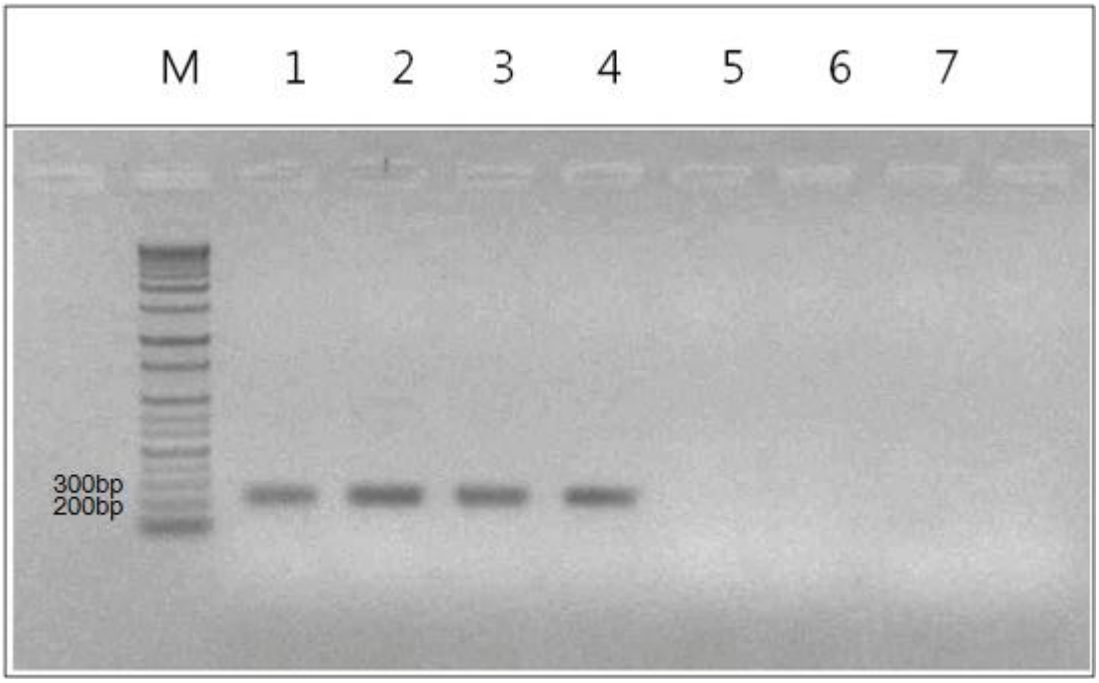
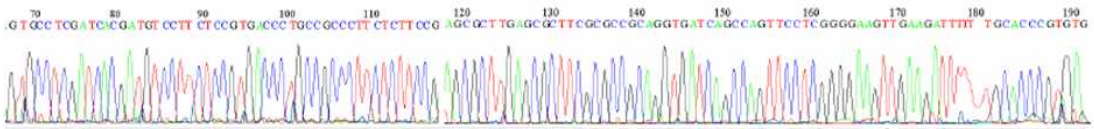


Fig. 8. Gel electrophoresis of PCR amplified 16S / 23S internal transcript spacer regions from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (lane 1 ~ 4) and mock bacterial strains (lane 5 ~ 7) using primer-2 (5'-ACGGGTGCAAAAAATCT-3') and primer-3 (5'-TGGTGTCGCTTGTAT-3'). M : 1kb molecular size Ladder (iNtRON Bio.)

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 9. BLAST results on the NCBI based on the rDNA sequence of citrus canker pathogenic bacteria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* .



Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Xanthomonas axonopodis Xac29-1 plasmid pXAC64, complete sequence	344	344	96%	3e-91	100%	CP004400.1

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

4. 감마선에 의한 감귤 궤양병균의 병원성 변화

감마선을 처리하지 않은 감귤궤양병균 현탁액을 접종한 감귤 잎에서는 8 일째부터 잎의 접종부위에 작은 황화반점이 발생하였으며, 접종 10 일째에는 황화된 병반의 직경이 1 mm로 진전되었고 잎 뒷면에 옅은 백색을 띤 황화 원형의 돌출된 병반이 관찰되었다. 접종 15 일째에는 황화 원형모형이 더욱 크게 진전되었으며 잎 뒷면의 황화 원형이 분화구 모양으로 돌출되면서 전형적인 감귤궤양병의 증상을 나타내었다 (Fig. 10).

감귤 궤양병균 현탁액에 감마선을 처리한 후 감귤 잎에 접종하였더니 감마선 처리 수준에 따라 병 발생이 억제되었다 (Fig. 10). 감마선을 50 Gy로 처리한 현탁액을 접종한 감귤 잎에서는 무처리한 감귤 궤양병균을 접종한 잎에 비해 병반수가 감소하였고 100 Gy를 처리한 현탁액을 접종한 잎에서는 병반수가 현저하게 감소하였으며 200 Gy의 궤양병균 현탁액은 감귤 잎에 거의 병반을 형성시키지 못했다 (Fig. 10, Fig. 11).

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

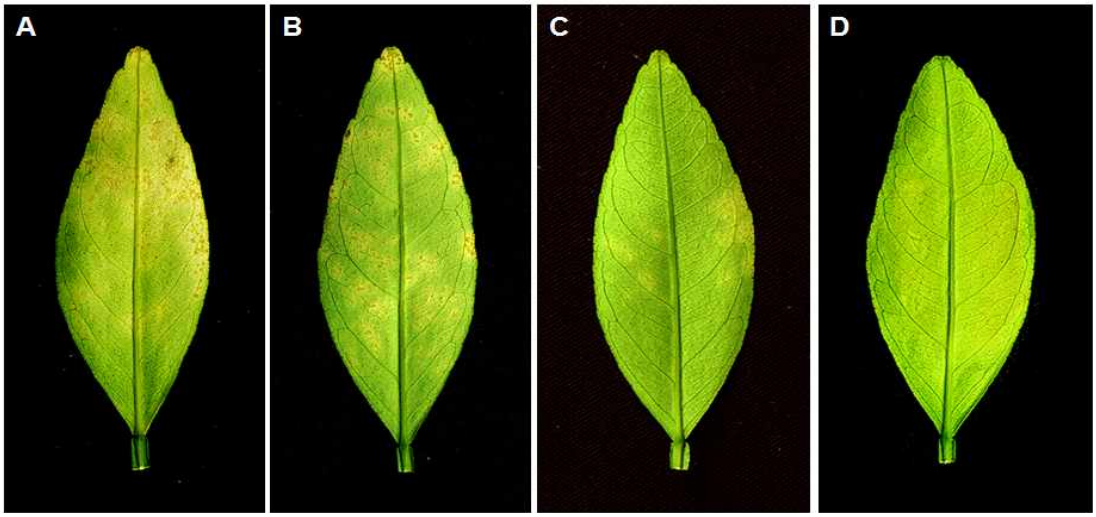


Fig. 10. Disease severity on Satsuma mandarin leaves non-treated (A), pre-treated with 50 (B), 100 (C) and 200 (D) Gy of gamma irradiation at 14 days after inoculation with citrus canker pathogen *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*). The concentration of the suspension of *Xcc* was 1.0×10^7 cfu / ml.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

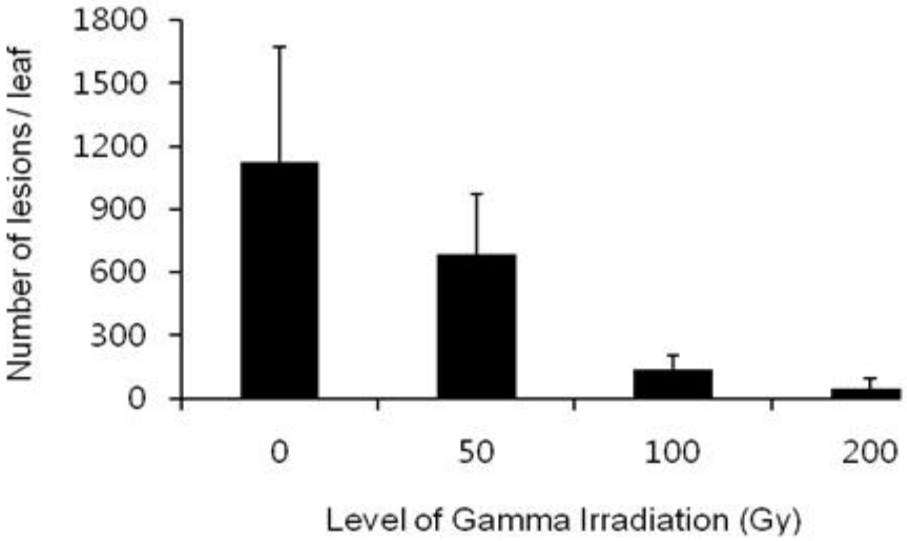


Fig. 11. Number of lesions on Satsuma mandarin leaves pre-treated with different level of gamma irradiation at 14 days after inoculation with citrus canker pathogen *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*). The concentration of the suspension of *Xcc* was 1.0 × 10^7 cfu / ml.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Ⅳ. 고　　찰

본 연구에서는 감마선 조사 (照射)를 통한 감귤궤양병균 살균 기술을 확립하기 위하여 감귤생과실 과피에 존재하는 감귤궤양병균의 밀도를 효과적으로 감소시키는 선량 D_{10} value에 대해 알아보았다. 또한 감마선에 의한 감귤궤양병균의 병원성 변화에 대해 알아보기 위해 bio-test를 실시하였다.

감마선에 처리에 의한 감귤궤양병균 밀도 감소 정도는 현탁액에서 최초 30 Gy에서 병균의 감소효과를 나타내었고 300 ~ 400 Gy에서는 전혀 생존하지 않았다. 감마선의 D_{10} value는 살아있는 생물에 대한 미생물의 종류, 산소의 유무, 수분 함량, 온도 및 배지의 종류 등에 영향을 받는 것으로 알려져 있다 (Aquino, 2012). 본 실험에서 사용한 감귤궤양병균은 TSB배지로 현탁액을 작성하였고, 혐기성 조건, 수분함량 100 %, 온도 18 ℃인 상태에서 감마선에 조사하였다. 감마선이 살아 있는 세포에 미치는 영향은 간접적 또는 직접적인 영향으로 나눌 수 있다. 간접적인 영향은 보통 생물에 존재하는 물 분자가 감마선에 의해 수산화기 (OH^-)와 전자 (e^-)그리고 수소이온 (H^+)을 생성함으로써 나타난다. 이 중 OH^-라디칼 이 살아있는 세포에 간접적 영향을 미치는데 중요한 역할을 한다. 또한 감마선에 의한 살아 있는 세포의 직접적인 영향은 이온화 에너지에 의해 생성된 OH^-라디칼이 세포 내의 DNA 분자 주위에 수산화층 (hydration layer)을 형성하여 DNA에 손상을 입힌다고 알려져 있다 (Borrely 등, 1998). 본 실험을 통하여 감마선에 의한 감귤궤양병균의 D_{10} value가 60 Gy 이하로 비교적 저선량으로 밝혀짐에 따라 감귤 생과실에 대한 감마선을 이용한 소독 처리가 감귤 생과실에 대한 살균 방법으로 현장에 적용하기에 매우 용이할 것으로 판단된다.

감귤 생과실에 감귤궤양병 병징이 없더라도 감귤궤양병균은 존재할 수도 있다. 따라서 감귤생과실에 존재하는 감귤궤양병균이 어느 수준의 감마선 처리로 인하여 제거할 수 있는지 알아보기 위하여 감귤궤양병균을 접종한 과실표피에

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

감마선을 서로 다른 수준으로 처리한 결과 처리 수준을 높아짐에 따라 생존하는 감귤궤양병균 수가 감소하였다 (Fig. 5, Fig. 6). 본 실험에서 D_{10} value가 30 Gy 정도의 매우 낮은 선량으로 나타남에 따라 만약 100 Gy 이상의 고선량으로 처리한다면 감귤 생과실에서 감귤궤양병균이 생존할 가능성은 매우 희박하다고 본다. 게다가 100 Gy 이상의 감마선을 처리하더라도 감귤 생과실의 당산도, 착색도 또는 경도 등이 처리하지 않은 생과실과 차이가 없는 것으로 나타나, 감마선 처리가 감귤의 품질에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다 (data 미제시). 감귤궤양병균을 감귤 과실에서 완전박멸을 하지 않을 경우 플로리다의 경우처럼 병의 확산을 막을 수 없을 것이다(Dewdney 와 Graham, 2014). 감귤 수입국 입장에서는 수출 감귤에 감귤궤양병 병징이 없을 뿐 아니라 발병의 원인이 될 수 있는 감귤궤양병균 자체도 없는 것을 원한다. 감마선을 이용할 경우 낮은 선량으로 감귤의 손상을 최소화하면서 감귤궤양병균을 효과적으로 박멸 할 수 있다. 따라서 methyl bromide 정도의 효과를 내면서 과실에 대한 피해는 최소화 시킬 수 있는 감마선은 그 활용 가치가 높다고 할 수 있겠다. 낮은 수준의 감마선은 여러 가지 과실 또는 채소의 수확 후 저장 기간을 연장하는 것으로 보고되었다 (Thomas, 1988). 또한 감마선 처리는 저장 중인 감귤에 물리화학적, 영양적 그리고 관능적 성질을 향상시킨다고 하였고 (Mahrouz 등, 2002), 감귤의 부패를 지연시키고 좋은 품질이 유지시킨다고 보고되었다 (Gihan 등, 2010). 감마선 처리는 백합에 잎마름병을 일으키는 *Botrytis elliptica*의 포자발아와 균사생장을 억제시킬 뿐 아니라 백합잎절편에 잎마름병발생도 억제시킨다고 보고하였다 (Kim과 Yun, 2014). 또한 감마선을 1,500 Gy 수준으로 'Nagpur' mandarin을 포함한 3 가지 품종에 감귤류에 처리하였더니 'Nagpur' mandarin 에서는 처리하지 않은 한 감귤에 비해 Penicillium에 의한 부패 속도를 지연시킨다고 하였다 (Ladanya 등, 2003).

감마선을 처리한 감귤궤양병균을 감귤 잎에 접종한 결과 control에서는 10^3 ~ 10^4 lesions / leaf이 관찰되었으며, 50 Gy를 처리한 감귤궤양병균 현탁액을 잎에 접종하였더니 10^2 ~ 10^3 lesions / leaf으로 병반의 수가 감소하는 것을 관찰되었고 100 Gy를 처리한 현탁액은 10^1 ~ 10^2 lesions / leaf 의 병반을 형성하였다 (Fig. 10C). 그리고 200 Gy를 처리한 현탁액을 접종한 잎에서는

제주대학교 중앙도서관

병반이 발생하지 않은 잎이 대다수를 차지하였다 (Fig. 10D). 이는 감마선에 의한 감귤궤양병균의 밀도 감소에 따른 병반의 감소로 보여 진다. 고선량 200 Gy를 처리 하였을 시 병반이 발생하지 못한 이유는 감마선에 의해 밀도가 감소함에 따라 생존한 감귤궤양병균이 최소 발병 농도인 10^6 cfu / ml 미치지 못하기 때문으로 보여 진다 (Kang 등, 2012). 생존한 감귤궤양병균이 감마선에 의해 병원성의 변화가 일어나는지에 대한 여부는 앞으로 연구할 가치가 있을 것으로 보여 진다. 감마선에 의해 감귤궤양병균의 밀도가 감소하므로 만약 감귤 생과실 표면에 감귤궤양병균이 존재한다고 하더라도 이를 통해 다른 감귤류로의 전반은 어려울 것으로 보인다. 따라서 감귤궤양병이 발생하지 않는 감귤 수입국으로의 감귤 수출 시 감마선을 이용하여 감귤 생과실을 살균 처리한다면 좋은 효과가 있을 것으로 기대된다. 또한 본 연구는 감마선을 이용한 감귤 생과실 살균 처리 방법을 개발하는데 기본 정보를 제공하는데 역할을 할 수 있다고 판단된다.

일반적인 균들의 D_{10} value를 비교해보면 진균인 *Aspergillus* spp.의 범위는 210 ~ 320 Gy나타내고 *Penicillium* spp. 계통은 240 ~ 420 Gy를 나타낸다고 알려져 있다 (Naznin 등, 2013). 세균인 *Bacillus* spp.는 820 ~ 980 Gy를 *Micrococcus* spp.는 700 ~ 860 Gy, *Staphylococcus* spp.는 590 ~ 890 Gy를 *Streptococcus* spp.는 930 ~ 1,200 Gy의 고선량에서 D_{10} value가 형성되는데 반해 *Xcc*는 53 ~ 57 Gy에서는 D_{10} value가 10 ~ 20 배 낮은 수준에 나타났다. 또한 과실에 외관 및 품질에 피해를 주는 선량 범위 안에 D_{10} value가 형성되어 방사선 조사에 다른 보조제처리를 하지 않아도 될 정도로 효과가 있었다. 이는 감귤검역에 활용될 경우 별도의 보조제 처리 없이 감마선 조사로만 병원균을 억제하기 때문에 검역처리의 간편화를 도모할 수 있을 것으로 판단된다 (Blank 와 Corrigan, 1994).

제주대학교 중앙도서관

Ⅴ. 적　　요

감귤 궤양병은 *Xcc*에 의해 발생하는 병으로서 많은 나라에서 이 병에 대해 검역을 실시하고 있다. 최근 methyl bromide의 검역 시 사용이 제한됨에 따라 감마선을 이용한 농수축산물에 대한 살균 방안이 대두되고 있다. 본 연구에서는 현탁액 형태의 감귤 궤양병균과 생과실 과피에 존재하는 *Xcc*의 밀도를 감소시킬 수 있는 감마선의 선량을 알아보았다. 미생물의 밀도를 90 % 감소시키는 선량인 *Xcc*의 D_{10} value는 현탁액과 감귤 생과실 과피에서 각각 55 와28 Gy 였다. 또한 감귤 감마선을 처리한 감귤 궤양병균 현탁액을 감귤 잎에 접종하였더니 병 발생이 억제되었다. 본 연구를 통하여 감마선 처리에 의해 감귤 생과실에 존재하는 *Xcc*를 박멸 할 수 있다고 판단되며 본 연구결과는 감마선을 검역에 활용하는데 가치가 있다고 생각된다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Ⅵ. 참 고 문 헌

Andres, V. S., Ortego, F. and Castaera, P. 2007. Effects of Gamma-Irradiation on Midgut Proteolytic Activity of the Mediterranean Fruit Fly, Ceratitis capitata (Diptera : Tephritidae). Arch Insect Biochem. 65 : 11 ~ 19.

Aquino, K. A. S. 2012. Sterilization by Gamma Irradiation, Gamma Radiation, Prof. Feriz Adrovic (Ed.), ISBN : 978-953-51-0316-5, InTech, Available. URL http://www.intechopen.com/books/gammaradiation/sterilization-by-gamma irradiation.

Behlau, F., Belasque, J., Graham, J. H. and Leite, R. P. 2010. Effect of frequency of copper applications on control of citrus canker and the yield of young bearing sweet orange trees. Crop Prot. 29, 300-305.

Blank, G. and Corrigan, D. 1994. Comparision of resistance of fungal spores to gamma and electron beam radiation. International Journal of Food Microbiology. 26, 269 ~ 277.

Borrely, S. I., Cruz, A. C., Del Mastro, N. L., Sampa, M. H. O. and Somessari, E. S. 1998. Radiation processing of sewage and sudge. A review. Prog Nucl Energ. 33, 3 ~ 21.

Cleci, D., Antonio, C. M., Jose, O. M. and Renata, C. C. 2009. Semi-Selective Culture Medium for *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* Detection in Cotton Seeds (Gossypium hirsutum L.). Asian J Plant Pathol. 3, 39 ~ 49.

Dewdney, M. M. and Graham, J. H. 2014. Florida Citrus Pest Management Guide : Citrus Canker. IFAS Extension, U Fla. 1 ~ 5.

Eckert, J. W., Eaks, I. L., 1989. Postharvest disorders and diseases of

제주대학교 중앙도서관 JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

citrus fruits. In : Reuther, W., Calavan, E., Clair, Carman, G. E., Jeppson, L. R. (Eds.), The Citrus Industry., revised ed. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, Oakland, CA. 179-259.

FAO. 2003. Guideline for the use of irradiation as a phytosanitary measures. International Plant Protection Convention, ISPM No. 18, Rome, Italy.

Farkas, J. & Farkas, C. M. 2011. History and future of food irradiation. Trends Food Sci-Tech. 22, 121 ~ 126.

Froelicher, Y., Bassene, J. B., Jedidi-Neji, E., Dambier, D., Morillon, R., Bernardini, G., Costantino, G. and Ollitrault, P. 2007. Induced parthenogenesis in mandarin for haploid production : induction procedures and genetic analysis of plantlets. Plant Cell Rep. 2007. 26 : 937-944.

Gottwald, T. R., Graham, J. H. and Egel, D. S. 1992. Analysis of foci of Asiatic citrus canker in a Florida citrus orchard. Plant Dis. 76, 389-396.

Gottwald, T. R. and Timmer, L. W. 1995. The efficacy of windbreaks in reducing the spread of citrus canker caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri.* Trop. Agric. 72, 194 ~ 201.

Gottwald, T. R., Graham, J. H. and Schubert, T. S. 1997. An epidemiological analysis of the spread of citrus canker in urban Miami, Florida and synergistic interaction with the Asian citrus leaf miner. Fruits. 52, 371-378.

Gihan, A. M., Kareem M. K., El-Tobgy and Abo-El-Seoud, M. 2010. Application of combined biocides and gamma radiation for keeping good quality stored grapefruits. Arch Phytopathol Pfl. 43, 712 ~ 721.

Gottwald, T. R., Hughes, G., Graham, J. H., Sun, X. and Riley, T. 2001. The citrus canker epidemic in Florida : The scientific basis of

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

regulatory eradication policy for an invasive species. Phytopathology. 91, 30-34.

Graham, J. H. and Gottwald, T. R. 1991. Research perspectives on eradication of citrus bacterial disease in Florida. Plant Dis. 75 : 1193 ~ 1200.Graham, J. H. and Gottwald, T. R. 1991. Research on eradication of citrus bacterial disease in Florida. Plant Dis. 75 : 1193 ~ 1200.

Holmes, G. J., Eckert, J. W., 1999. Sensitivity of Penicillium digitatum and P. italicum to postharvest citrus fungicides in California. Phytopathology. 89, 716 ~ 721.

Hyun, J. W. 2012. Sensitivity of Penicillium digitatum and P. italicum to postharvest citrus fungicides in California. Publication of citrus-jeju. Jeju city citrus-agricultural cooperative association. 198 : 40 ~ 45.

Hyun, J. W., Kim, H. J., Yi, P. H., Hwang, R. Y. and Park, E. W. 2012. Mode of Action of Streptomycin Resistance in the Citrus Canker Pathogen (*Xanthomonas smithii* subsp. *citri*) in Jeju Island. Plant Pathol. J. 28, 207 ~ 211.

Kátia Aparecida da Silva Aquino. 2012. Sterilization by Gamma Irradiation, Gamma Radiation, Prof. Feriz Adrovic (Ed.), ISBN : 978-953-51-0316-5, InTech, Available from : http://www.intechopen.com/books/gammaradiation/sterilization-by-gamma-irradiation.

Kim, J. H. and Yun, S. C. 2014. Effect of gamma irradiation and its convergent treatments on lily leaf blight pathogen, *Botrytis elliptica* and the disease development. Res. Plant Dis. 20, 71 ~ 78.

Kwon, J. h., Kang, H. J., Jo, D. J., Chung, H. S., Kwon, Y. J., Byun, M. W., Choi, S. J. and Choi, J. U. 2002. Effects of Gamma Radiation and Methy Bromide Fumigation on Quality of Asian Pears. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 31(1) : 57 ~ 63

제주대학교 중앙도서관

Ladaniya, M. S., Singh, S. and Wadhawan, A. K. 2003. Response of 'Nagpur' mandarin, 'Mosambi' sweet orange and 'Kagzi' acid lime to gamma radiation. Radia Phys Chem. 67, 665-675.

Lee, H. J., Oh, S. W., Lee, J. S., Chae, H. J. and Moon, J. D. 2007. A Case of Polyneuropathy Associated with Methyl Bromide Intoxication. Korea J Occup Environ Med. 19 (3) : 238 ~ 243.

Mahrouz, M., Lacroix, M., D' aprano, G., Oufedjikh, H., Boubekri, C. and Gagnon, M. 2002. Effect of γ-Irradiation Combined with Washing and Waxing Treatment on Physicochemical Properties, Vitamin C and Organoleptic Quality of Citrus clementina Hort. Ex. Tanaka. J. Agric. Food Chem. 50, 7271 ~ 7276.

Myung, I. S., Hyun, J. W., Kim, K. S., Lee, S. C. and Lim, H. C. 2003. Evaluation of Shiranuhi, a hybrid of Kiyomi tangor and Nakano No. 3 Ponkan, for resistance to citrus canker in growth chamber. Plant Pathology J. 19 (5) : 253 ~ 256.

Naznin, A., Fahmida, B. A., Md, A. M. and Asaduzzanman, S. M. 2013. Radiation Response of Bacteria Associated with Human Cancellous Bone. Journal of pharmacy and Biological Sicences. 6, 79 ~ 84.

Noh, M. J., Kwon, J. H., Kwon, Y. J., Huh, E. Y., Kwon, Y. S. and Byun, M. W. 2001. Comparative Effects of Gamma Irradiation and Methyl Bromide Fumigation on Disinfestation and Physicochemical Properties of Mung Bean. J. Korea Soc. Food Sci. Nutr. 30(3) : 444 ~ 449

Palou, L., Usall, J., Muñoz, J. A., Smilanick, J. L., Viñas, I. 2002. Hot water, sodium carbonate and sodium bicarbonate for the control of postharvest green and blue molds of clementine mandarins. Postharvest Biol Tec. 24, 93 ~ 96.

Parnell, S., Gottwald, T. R., Van den Bosch, F. and Gilligan, C. A. 2009. Optimal strategies for the eradication of Asiatic citrus canker in heterogeneous host landscapes. Plant Pathology J. 99, 1370 ~ 1376.

제주대학교 중앙도서관

Ristaino, J. B. and Thomas, W. 1997. Agriculture, methyl bromide, and the ozone hole : Can we fill the gaps?. Plant Disease 81, 964 ~ 977.

Schaad, N. W., Postnikova, E., Lacy, G., Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, P. E., Stromberg, V. K. and Vidaver, A. K. 2006. Emended classification of Xanthomonad pathogens on citrus. Syst Appl Microbiol.29 : 690 ~ 695.

Schubert, T. S., Rizvi, S. A., Sun, X., Gottwald, T. R., Graham, J. H. and Dixion, W. N. 2001. Meeting the challenge of eradication citrus canker in Florida-Again. Plant Dis. 85, 340 ~ 356.

Shiotani, H., Uematsu, H., Tsukamoto, T., Shimizu, Y., Ueda, K., Mizuno, A. and Sato, S. 2009. Survival and dispersal of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* from infected Satsuma mandarin fruit. Crop Prot. 28, 19 ~ 23.

Smilanick, J. L., Mansour, M. F., Mlikota Gabler, F., Goodwine, W. R., 2006. The effectiveness of pyrimethanil to inhibit germination of *Penicillium digitatum* and to control citrus green mold after harvest. Postharvest Biol Tec. 42 (1) : 75 ~ 85.

Thomas, P. 1988. Radiation preservation of foods of plant origin. Part VI. Mushrooms, tomatoes, minor fruits and vegetables, dried fruits and nuts. CRC Crit. ReV. Food Sci. Nutr. 26, 313 ~ 358.

Whitby, J. L. and Gelda, A. K. 1979. Use of incremental doses of cobalt 60 radiation as a means to determining radiation sterilization dose. Journal of Parenteral Drug Association, 33, 144-155.

Yang, J. S., Kang, S. Y. and Jeun, Y. C. 2014. Suppression of citrus canker by pretreatment with rhizobacterial strains showing antifungal activity. Res. Plant Dis. 20 (2) : 101 ~ 106.

제주대학교 중앙도서관

감사의 글

시간이 유수처럼 빠르다는 것을 새삼 느끼는 시간이었습니다. 2년 짧다면 짧고 길다면 긴 시간 동안 참 많은 것을 경험한 기간이지 않나 싶습니다.

식물병리학 실험실에 석사과정으로 들어가 실험을 하는 동안 여러 사람들을 사귀고 많은 것을 배울 수 있는 뜻 깊은 시간 이었습니다. 실험을 하면서 힘든 점도 많았지만 힘이 되어주는 사람들이 있었기에 힘들었던 기억 보다는 즐거웠던 기억이 많은 것 같습니다. 이와 같이 힘이 되어 주신 분들 덕분에 이 논문을 완성할 수 있었다고 생각됩니다. 이 글을 통해 도움을 주셨던 모든 분들께 감사의 마음을 전하고자 합니다.

부족한 저를 끝까지 믿어주시고 조언과 충고로 이렇게 논문까지 낼 수 있게 지도해주신 전용철 지도교수님께 고개 숙여 감사의 마음을 전하고 싶습니다. 바쁘신 일정 속에서도 논문 심사를 맡아 주시고 많은 관심과 조언으로 도움을 주신 송창길 교수님, 김주성 교수님께도 진심으로 감사드립니다. 또한 학부생에서 부터 대학원까지 많은 가르침을 주신 강영길 교수님, 현해남 교수님, 김동순 교수님께도 진심으로 감사의 마음을 전합니다.

그리고 실험실에 큰 버팀목으로 항상 신경 써 주시고 우리 실험실 인원들을 위해 격려와 조언을 아낌없이 주셨던 고평열 박사님께 정말 감사드립니다. 이 논문이 나오기까지 많은 실험을 함께하고 도와주었던 우리 실험실 식구들 윤정이, 재신이, 지순이, 민아, 승학이, 은주에게는 해준 것 없이 도움만 받은 것 같아 항상 미안하고 더 없이 고마운 마음이 큽니다. 석사과정 동안 많은 도움을 주셨던 하영삼 조교 선생님, 김용근 조교선생님 그리고 많은 농학과 대학원 선생님들께도 감사드립니다. 또한 논문검토를 도와준 친구 수환이, 윤재, 영준이, 종은이 에게도 고맙다는 말을 전합니다.

마지막으로 내 곁에서 항상 힘이 되어주고 격려와 응원 아끼지 않았던 우리 지운이 내 뒤에서 물신양면으로 큰 도움이 되어준 사랑하는 우리 가족 아버지, 형 그리고 조카들 보이지 않는 곳에서 항상 묵묵히 바라봐 주었던 우리 할머니께 감사한 마음을 전하면서 이 논문을 바칩니다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY