

우리나라 포도나무 줄기혹병 병원세균의 분리 및 동정

丁光鎭* · 沈在燮¹
(주)한정화학, ¹충북대학교

Isolation and Identification of Pathogenic Bacteria of Grapevine Crown Gall in Korea

Kwang-Jin Chung* and Jae-Seop Shim¹

Hahn-Jung Chemicals Inc., #6-13 Nonhyun-dong, Kangnam-ku, Seoul 135-010, Korea

¹Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea

ABSTRACT : Fifty-six bacterial strains were isolated from galls and sap of grapevine showing crown gall symptoms and rhizosphere soils of the plants with crown galls on stems in grapevine orchards in Namyangju, Pocheon and Suwon, Korea to examine the etiology of grapevine crown gall. Seven of the 56 strains were pathogenic bacteria which induced galls on grapevine seedlings. The 7 strains were classified as *Agrobacterium* biovar 3 on the basis of their growth on selective media and their cultural and biochemical properties, showing positive responses in oxidase production, growth in the presence of 2% NaCl and alkali production from Na L-tartrate, and negative responses in production of 3-ketolactose and acid production from *meso*-erythritol and ethanol. Also according to these results, all of the 7 pathogenic isolates were suggested to be *Agrobacterium vitis*.

Key words : *Agrobacterium* biovar 3, *Agrobacterium vitis*, grapevine crown gall, selective media, biochemical properties.

포도는 사과, 배 등과 더불어 농가소득에 기여하는 바가 큰 과수이다. 포도나무의 줄기혹병은 포도를 재배하는 지역이면 드물지 않게 볼 수 있는 병으로 이병된 줄기는 수세가 약해지고 말라죽으며, 지역에 따라 이 줄기혹병이 다발생하여 포도 재배농가에 심각한 타격을 주고 있다(8). 그러나 국내에서는 아직 포도나무 줄기혹병에 대한 연구 보고가 전무하다.

포도나무 줄기혹병은 작고 밀집된 혹이 줄기를 따라 발생하는데 이병주의 22~43%가 발병후 2~3년 내에 고사한다(6). 이 병은 묘목에 의하여 전파되고(21), 전정 및 줄기의 비틀림에 의한 상처부위로 침입한다(5, 14). Lehoczky(15, 16)는 병원균이 도관을 통하여 전신적으로 전파한다고 보고하였다.

포도나무 줄기혹병의 병원균은 *Agrobacterium radiobacter* pv. *tumefaciens* biotype 3 또는 *A. tumefaciens* biovar(biotype) 3로 알려져 왔다(3, 4, 17, 19). 그러나 Holmes와 Roberts(7)는 이러한 *A. tumefaciens*

biovar(biotype) 3의 strain들을 *A. rubi* 집단에 포함시켰으며, Ophel과 Kerr(18)는 포도나무에서 분리된 *Agrobacterium* biovar 3의 strain들을 *A. vitis*로 명명하였다.

본 연구는 포도나무 재배포장에서 채집한 토양, 포도나무 줄기의 혹 및 수액으로부터 병원균을 분리동정하여 병원균의 특성을 조사하여 포도나무 줄기혹병 방제의 기초자료로 활용코자 실시하였다.

재료 및 방법

공시세균 및 세균의 분리. 본 실험에 사용된 공시 균주는 포도나무 줄기혹병에 이병된 포도나무 줄기혹으로부터 분리하여 얻은 7균주와 이 연구에서 대조군으로 이용된 농업과학기술원으로부터 분양받은 *A. tumefaciens* C58, Wait Agricultural Research Institute로부터 분양받은 *A. radiobacter* K84 균주를 포함하여 모두 9균주를 포도 줄기혹병 병원균의 동정을 위한 세균학적 특성 및 병원성 검정에 공시하였다.

토양이나 이병식물로부터 세균의 분리는 Kerr와

*Corresponding author.

Brisbane(10), Burr와 Katz(4) 등의 방법인 희석평판법에 의하여 실시하였다. 남양주, 포천 및 수원의 포도나무 줄기혹병 이병 포장에서 채집한 시료(토양, 이병 줄기 또는 혹) 1 g과 살균수 9 ml를 넣고 잘 섞은 후 상등액 1 ml를 취하여 10^{-7} 까지 희석하였고, 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} 의 희석액으로부터 각각 20 μ l를 취하여 nutrient agar(NA) 평판배지에 도말, 건조시킨 후 28°C의 항온기에서 48시간 배양하였다. NA 평판배지에서 나타난 세균의 균총중 모양과 색깔 등이 *Agrobacterium*과 유사한 균총을 떼어 내어 yeast mannitol agar(YM) 사면배지에 이식하여 28°C에서 48시간 배양한 후 4°C 저온항온기에 보관하면서 공시균으로 사용하였다.

병원성 검정. 분리한 세균들을 YM 사면배지에 이식하여 28°C 항온기에서 48시간 배양 후 살균수를 부어 세균현탁액(약 10^8 cells/ml)을 만들어 토마토(품종: 영광) 유묘에 침적중환 후 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 의 온실로 옮긴 후 14일 동안 혹의 형성 유무를 관찰하여 병원성을 검정하였다. 토마토에 혹을 형성한 세균 균주는 위의 방법과 마찬가지로 세균현탁액을 만든 다음 포트에 심겨진 2년생 포도나무(품종: 거봉) 줄기에 침적중환하여 온실에서 7~14일 후 혹의 형성 유무를 조사하였다.

병원성 *Agrobacterium* 균주의 biovar 식별. 포도나무 유묘에 병원성인 *Agrobacterium* 균주의 biovar를 식별하기 위하여 공시균의 세균현탁액을 10^{-5} 까지 희석 후 *Agrobacterium* biovar 1, 2와 3 선택배지(10) 및 Roy와 Sasser(20)의 biovar 3 선택배지에 20 μ l씩 3지점에 점적중환하여(dropping method) 28°C 항온기에서 4일간 배양후 선택배지에서의 성장여부에 따라 병원세균의 biovar를 간이 검색하였다.

병원성 *Agrobacterium* 균주의 세균학적 특성 조사.

분리한 병원성 *Agrobacterium* 균주를 NA 평판배지에 접종한 다음 28°C 항온기에서 48시간 배양 후 단일 균총의 모양, 크기, 색 등을 조사하였다. 또한 Gram 염

색후 세균균주를 광학현미경 하에서 관찰하였고, 병원균의 octopine 분해능, 내염성 및 기타 생화학적 특징은 Bernaerts와 De Ley(2), Kerr와 Panagopoulos(11) 및 Kovacs(13)의 방법으로 조사하였다.

결 과

병원균의 분리 및 병원성 검정. 이 시험에서 남양주에서는 Campell-Early 품종의 줄기혹에서 1균주, 토양에서 20균주를 분리하였고, 포천에서는 미확인 품종의 포도나무에서 줄기혹으로부터 2균주를, 수원에서는 Kyoho 품종의 줄기혹에서 3균주, 수액에서 5균주, Niagara 품종의 줄기혹에서 7균주 수액에서 2균주 등 총 56개의 *Agrobacterium* 유사 세균 균주를 희석평판법으로 분리하였다. 분리한 세균을 토마토 유묘를 이용하여 병원성을 검정한 결과 수원에서 채집한 Niagara 품종의 줄기혹으로부터 분리한 7균주가 혹을 형성하였다. 토마토 유묘에 혹을 형성시키는 세균 7균주를 기주작물인 포도나무 유묘에 침적중환하여 14일 후 혹의 형성 여부를 조사한 결과 7균주 모두 전형적인



Fig 1. Pathogenicity of a strain of *Agrobacterium* sp. isolated from grapevine, showing crown gall produced on the grapevine stem.

Table 1. Determination of *Agrobacterium* biovars for *Agrobacterium* strains based on growth on selective media^a

Selective medium ^b	<i>Agrobacterium</i> strains ^c								
	C58	K84	G11	G13	G14	G16	G17	G18	G19
For biovar 1	+ ^d	-	-	-	-	-	-	-	-
For biovar 2	-	+	-	-	-	-	-	-	-
For biovar 3	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Roy and Sasser (18)	+	+	+	+	+	+	+	+	+

^a Based on the result shown in Fig. 2.

^b Media for biovars 1-3 (Kerr and Brisbane (9)).

^c C58 : *A. tumefaciens* C58; K84 : *A. radiobacter* K84; G- : pathogenic strains used in this study.

^d Symbols : + : good growth, - : no growth.

*Agrobacterium*의 흑을 형성하여(Fig. 1) 이들 균주 모두가 병원성 *Agrobacterium* 균주임을 확인하였다.

병원성 *Agrobacterium* 균주의 biovar 식별. 분리한 병원성 *Agrobacterium* 균주의 biovar를 Kerr와 Brisbane(10)의 선택배지 및 Roy와 Sasser(20)의 biovar 3 선택배지를 이용한 biovar의 식별 결과는 Table 1 및 Fig. 2와 같다. 즉 포도나무 줄기흑에서 분리한 7균주의 병원성 *Agrobacterium* 균주는 Kerr와 Brisbane(10)의 biovar 3 선택배지와 Roy와 Sasser(20)의 biovar 3 선택배지에서 잘 자라므로 *Agrobacterium* biovar 3로 판단되었다. 대조균주인 *A. tumefaciens* C 58과 *A. radiobacter*인 K84는 각각 Kerr와 Brisbane의 biovar 1과 biovar 2 선택배지에서 자라므로 biovar 1과

biovar 2로 판단되었다. 그러나 이들 대조균주는 또한 Roy와 Sasser의 선택배지에서도 자랐다.

병원균의 세균학적 특징. 포도나무 줄기흑으로부터 분리한 병원성 *Agrobacterium* 균주는 모두 Gram 음성의 간균이며, 크기는 $0.5\sim 1 \times 2\sim 2.5 \mu\text{m}$ 이었다. 또한 28°C 의 NA 평판배지에서 2~3일간 배양하였을 때 균총의 형태는 원형(circular)의 전연상(entire)으로 볼록(convex)하며, 지름이 2~3 mm의 밝은 베이지색이었다. 이들 병원성 균주의 배양적 및 생화학적 특징은 모두 같았으며 그 결과는 Table 2와 같다. 이들 병원성 *Agrobacterium* 균주는 *A. tumefaciens* C58(biovar 1)과는 달리 3-ketolactose를 생산하지 못하며, dulcitol이나 ethanol로부터 산을 생산하지 못하고, Na L-tartrate로부터 알칼리를 생산할 수 있었다. 또한 *A. radiobacter* K84와 다른 점은 meso-erythritol이나 dulcitol로부터 산을 생산하지 못하였고, 염분이 2% 녹아 있는 NA 액체 배양기에서 생장하며, oxidase 생성에 양성 반응을 나타내었다. 이들 병원성 균주는 *A. tumefaciens* biovar 3과 거의 일치하며, *A. rubi*와는 meso-erythritol로부터 산의 생성에 차이가 있었다.

고 찰

본 연구에서는 줄기흑병에 이병된 포도의 흑, 수액 및 토양으로부터 *Agrobacterium*과 유사한 균주를 분리하여 병원성을 검정한 결과 수원에서 채집한 줄기흑으로부터 분리한 7균주가 포도나무 유묘에 줄기흑을 형성하여 병원성이 있는 것으로 나타났다. 흑을 형성하는 세균으로는 *Agrobacterium*뿐만 아니라 *Corynebacterium*과 *Pseudomonas*가 있는데(1), 이 시험에서 포도나무 줄기흑에서 분리한 균주에 의해 형성된 흑은 표면이 매우 울퉁불퉁하고, 전형적인 octopine type의 거친 흑(8)을 형성하여 *Agrobacterium*에 의한 것임을 알 수 있었다. 분리한 나머지 균주들은 병원성이 없었는데 이 균주들은 아마도 비병원성 *Agrobacterium* 균주들이거나 또는 다른 속의 세균일 것으로 생각된다. 우리나라에서는 이러한 줄기흑병의 발생을 조사가 이루어지지 않고 있는데 필자들이 포천, 남양주 및 나주지역을 조사한 바로는 3~80%의 이 병주율을 보여 지역적으로는 심하게 발생하고 있음을 알 수 있었다(자료미제시). 앞으로 보다 자세한 병발생 조사가 이루어져 이 병의 방제대책 수립이 이루어져야 할 것으로 생각된다.

식물병원성 *Agrobacterium* 속의 분류는 기주의 종류와 병징에 의해 일반적으로 각종 목본식물에 crown

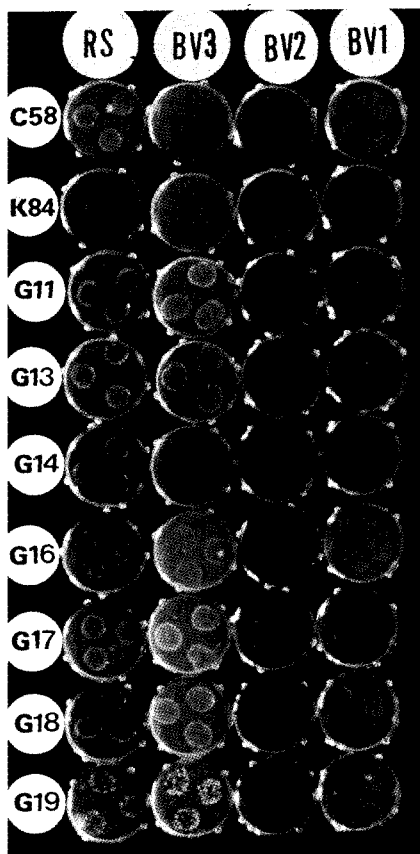


Fig. 2. Determination for *Agrobacterium* biovars of the bacterial strains pathogenic to grapevine by growth on selective media for biovars 1-3 (BV1-BV3) and Roy and Sasser medium (RS) (20). C58 : *A. tumefaciens* C58 - biovar 1 control; K84 : *A. radiobacter* K84 - biovar 2 control; G- : pathogenic *Agrobacterium* strains.

Table 2. Characteristics of *Agrobacterium* species and strains

Characteristics	Present strains ^a									<i>A. tumefaciens</i> biovar 3 ^b	<i>A. rubi</i> ^c	
	C58	K84	G11	G13	G14	G16	G17	G18	G19			
Production of 3-ketolactose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- ^b	-
Acid production from:												
<i>meso</i> -Erythritol	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	- ^b	-
Dulcitol	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	- ^b	-
Ethanol	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- ^b	-
Alkali production from:												
Na L-tartrate	-(d) ^d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Oxidase production	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Growth in the presence of 2% NaCl	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Octopine catabolism			+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Pathogenicity:												
Tomato	+		+	+	+	+	+	+	+	+	d ^e	-
Grapevine			+	+	+	+	+	+	+	+		-

^a C58 : *A. tumefaciens* C58; K84 : *A. radiobacter* K84. For these 2 strains, all characteristics examined (except alkali production from Na L-tartrate in C58) correspond to *Agrobacterium* biovars 1 and 2, respectively, as described in Bergey's Manual of Systemic Bacteriology (12). G- : pathogenic strains used in this study. Symbols: + : 90% or more of the strains are positive, - : 90% or more, negative, d : 11-89%, positive.

^b Data compiled from Bergey's Manual of Systemic Bacteriology (12). Variable results for some other biovar 3 strains indicated by ^b.

^c Data compiled from Bergey's Manual of Systemic Bacteriology (12).

^d The symbol in the parenthesis indicated for *A. tumefaciens* biovar 1 in Bergey's Manual of Systemic Bacteriology (12).

^e Biovar 3 strains were mainly isolated from grapevines.

gall을 형성하는 *A. tumefaciens*, 털뿌리(hairy root)를 형성하는 *A. rhizogenes*, *Rubus* spp.에 cane gall을 형성하는 *A. rubi*로 분류되어 왔다(1). 그러나 병원성 자체가 균주간 이동이 가능한 plasmid의 종류에 의해 좌우되기 때문에 이들은 병원성이 아닌 유전적 및 표현형적인 특성을 기준으로 Keane 등(9)에 의해 biovar 1, 2, 3로 분류되었다. Biovar 1에는 *A. tumefaciens*와 비병원성인 *A. radiobacter*가 포함되어 있고 biovar 2에는 *A. tumefaciens*, *A. radiobacter*, *A. rhizogenes*가 포함되며, biovar 3에는 *A. tumefaciens*가 포함되어 있는데 주로 포도에서 분리된 균주들이며, *A. rubi*는 어느 biovar에도 포함되지 않고 별도로 취급하고 있다(12). 지금까지 많은 연구자들이 포도나무의 수액과 줄기혹 및 토양으로부터 병원성 *Agrobacterium* biovar 3를 분리하였다(3, 14, 15, 16). 그런데 Holmes와 Roberts(7)는 이 biovar 3를 *A. rubi*의 일종으로 간주하였으나, Ophel과 Kerr(18)는 포도에서 분리한 균주들이 *A. rubi*와는 유전적으로 달라 *A. vitis*로 명명하였다. 현재는 포도에서 분리한 *Agrobacterium* biovar 3를 *A. vitis*로 취급되고 있다(22). 따라서 본 시험에서 분리된 병원성 *Agrobacterium* 균주들은 선택배지에서의 성장과 세균학적 특성으로 보아 *Agrobacterium* biovar 3였고 *A. rubi*와는

meso-erythritol에서 산을 생성에 차이가 있고, 또한 위의 최근 이 분야의 분류학적 동향으로 보아 *A. vitis*로 동정하는 것이 타당할 것으로 생각된다.

요 약

우리나라 포도재배 지역인 포천, 남양주 및 수원 지역의 포도나무 줄기혹병에 이병된 포장으로부터 채집한 줄기혹(gall), 수액(sap) 및 근권토양으로부터 56균주의 유사 *Agrobacterium*를 분리하였으며, 이들 중 7균주가 포도나무 유묘의 줄기에 혹을 형성시키는 병원성 *Agrobacterium*이었다. 병원성 *Agrobacterium* 균주는 *Agrobacterium* biovar의 선택배지에서의 성장, oxidase의 생성, Na L-tartrate로부터 알칼리의 성장, 2% NaCl 첨가 배지에서 성장, 3-ketolactose의 비생산, *meso*-erythritol과 ethanol로부터 산을 생성하지 못하는 등 *Agrobacterium* biovar 3인 *A. vitis*로 동정되었다.

참고문헌

1. Agrios, G. N. 1988. *Plant Pathology*, Third Edition. Academic Press, Inc., Sandiego, California. 803pp.

2. Bernaerts, M. J. and De Ley, J. 1963. A biochemical test for crown gall bacteria. *Nature* (London) 197 : 406-407.
3. Burr, T. J. and Hurwitz, B. 1981. Occurrence of *Agrobacterium radiobacter* pv. *tumefaciens* (Smith and Townsend) Conn biotype 3 on grapevines in New York state. *Phytopathology* 71 : 206.
4. Burr, T. J. and Katz, B. H. 1982. Isolation of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 from grapevine gall and sap, and from vineyard soil. *Phytopathology* 73 : 163-165.
5. Chamberlain, P. G. 1962. The occurrence of aerial crown gall of grapevines in the Niagara peninsular of Ontario. *Can. Plant Dis. Surv.* 42 : 208-211.
6. Dhanvantri, B. N. 1983. Etiology of grape crown gall in Ontario. *Can. J. Bot.* 61 : 2641-2646.
7. Holmes, B. and Roberts, P. 1981. The classification, identification and nomenclature of *Agrobacterium tumefaciens* (Smith & Townsend) Conn 1942, *Agrobacterium rhizogenes* (Riker *et al.*) Conn 1942, and *Agrobacterium rubi* (Hilderbrand) Starr & Weiss 1943. *J. Appl. Bacteriol.* 50 : 443-467.
8. Kahl, G. and Schell, J. S. 1982. *Molecular Biology of Plant Tumors*. Academic Press, N. Y.
9. Kean, P. J., Kerr, A., New, P. B. 1970. Crown gall of stone fruit. II. Identification and nomenclature of *Agrobacterium* isolates. *Aust. J. Biol. Sci.* 23 : 585-595.
10. Kerr, A. and Brisbane, P. G. 1983. *Agrobacterium*. In: *Plant Bacterial Diseases-A Diagnostic Guide*, ed. by P. C. Fahy and G. J. Persley, pp. 28-43. Academic Press, NY.
11. Kerr, A. and Panagopoulos, C. G. 1977. Biotypes of *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens* and their biological control. *Phytopathology Z.* 90 : 172-179.
12. Kersters, K. and De Ley, J. 1984. Genus III. *Agrobacterium* Conn 1942, 359^{AL}. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., Vol. 1, ed. by R. G. E. Murray *et al.*, pp. 244-254. Williams & Wilkins, Baltimore, U.S.A.
13. Kovacs, N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature* (London) 178 : 703.
14. Lehoczky, J. 1968. Spread of *Agrobacterium tumefaciens* in the vessel of grapevine after natural infection. *Phytopathol. Z.* 63 : 239-246.
15. Lehoczky, J. 1971. Further evidences concerning the systemic spreading of *Agrobacterium tumefaciens* in the vascular system of grapevines. *Vitis* 10 : 215-221.
16. Lehoczky, J. 1978. Root system of the grapevines as a reservoir of *Agrobacterium tumefaciens* cells. *Proc. 4th Int. Conf. Plant Pathogenic Bacteria*, pp. 239-243.
17. Loubser, J. T. 1978. Identification of *Agrobacterium tumefaciens* biotype 3 on grapevine in South Africa. *Plant Dis. Rep.* 62 : 630-631.
18. Ophel, K. and Kerr, A. 1990. *Agrobacterium vitis* sp. nov. for strains of *Agrobacterium* biovar 3 from grapevines. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40 : 236-241.
19. Panagopoulos, C. G., Psallidas, P. B. and Alivizatos, A. S. 1978. Studies on biotype 3 of *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens*. *Proc. 4th Int. Conf. Plant Pathogenic Bacteria*, pp. 221-228.
20. Roy, M. and Sasser, M. 1983. A medium selective for *Agrobacterium tumefaciens* biotype 3. *Phytopathology* 73 : 810.
21. 寺井康夫. 1988. アメリカ ミズ-リ 州立大で のブドウ根頭がんしゅ病の研修. 今月の農業 11 : 36-39.
22. Young, J. M., Takikawa, Y., Gardan, L. and Stead, D. E. 1992. Changing concepts in the taxonomy of plant pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30 : 67-105.