

포도나무 줄기 흑병의 생물학적 방제

정광진* · 심재섭¹ · 정봉구¹

동부한농화학 농업기술연구소, ¹충북대학교 농생물학과

요약 : 최근에 재배면적이 급격히 증가하고 있는 포도에 난방제 병해인 줄기흑병의 길항세균을 선발하여 생물학적 방제의 가능성을 조사한 결과 포도 줄기흑병 이병포장으로부터 채취한 토양에서 길항균 strain 27를 선발하여 *in vitro* 및 *in vivo* bioassay결과 biovar 1 병원균인 *A. tumefaciens* C58과 Ach5, biovar 2 병원균인 *A. rhizogenes* 13264 및 biovar 3 병원균인 *A. vitis* 등을 모두 억제시키는 효과를 보였으며, Strain 27의 세균학적 특성은 pAgK84와 비슷한 크기(46 Kb)의 plasmid를 갖고 있음을 확인하였다. (1998년 5월 31일 접수, 1998년 7월 30일 수리)

Key words : *A. tumefaciens* C58, *A. tumefaciens* Ach5, *A. rhizogene* 13264, *A. vitis*, crown gall, biocontrol, plasmid pAgK84.

서론

포도의 재배면적이 최근에 크게 증가하고 있는데 수량 및 상품성에 영향을 미치는 병은 잣빛곰팡이병, 탄저병등과 같이 주로 곰팡이에 의한 병이다. 그 외에도 화학적으로 방제가 곤란한 세균에 의하여 병이 발생하는 것은 주지의 사실이다. 세균병중에는 *Agrobacterium vitis*(Ophel과 Kerr, 1987; Chung 등, 1996)에 의한 뿌리혹병이 대표적인데, 이병은 한번 감염되면 화학약제에 의한 치료가 어렵고, 포도의 상품성을 떨어뜨리며, 나무를 죽이므로 농민들에게 큰 피해를 준다. 그러므로 이 병에 대한 생물학적 방제 연구가 활발히 진행되고 있는데 Cooksey와 Moore(1982) 및 Dhanvantri(1983) 등은 strain K84에 대하여 저항성인 포도나무 흑병에 대하여 strain K84 및 변이주를 상처부위에 처리하므로 방제가 가능하다고 하였다. Henderson 등(1983)은 nopaline, octopine 및 agropine Ti plasmid를 갖는 병원성 *A. tumefaciens*를 방제할 수 있는 biovar 1 길항균 strain D286을 Eucaryptus에서 분리하였다.

Webster 등(1986)은 *Prunus salicina*로부터 길항균 strain J73을 분리하였는데 3가지 형태의 Ti plasmid중 어떤 한 가지 종류를 갖는 병원균에 대하여 우수한 효과를 발휘한다고 하였다. 국내에서는 포도나무 줄기흑병에 대한 방제 연구가 매우 미미하므로 본 연구는 국내 대부분의 포도 과수원에 만연해 있는 뿌리혹병의 생물학적 방제

의 기초자료를 마련코자 실시하였다.

재료 및 방법

시험세균 및 길항균 분리

포도나무 줄기흑으로 부터 분리한 *A. vitis*(Chung 등, 1996), 농업과학기술원으로부터 분양받은 *Agrobacterium tumefaciens* C58, Ach5, *A. rhizogenes* 13264 및 Wait Agricultural Research Institute로부터 분양받은 *A. radiobacter* K84 등을 공시하였다.

토양으로부터 길항균의 분리는 Kerr와 Brisbane(1983), Burr와 Katz(1983) 등의 방법인 10배 희석 평판법에 의하여 실시하였다. 남양주에서 채취한 토양 1g과 살균수 9 ml를 넣고 잘 섞은 후 상정액을 취하여 10^{-7} 까지 희석하였고, 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} 의 희석액으로 부터 0.1 ml를 취하여 nutrient agar(NA) 평판배지에 도말, 건조시킨 후 28°C 항온기에서 48시간 배양하여 세균을 분리하였다. 분리한 세균들로부터 길항균의 분리는 Kerr와 Panagopolous(1977)의 방법에 의하여 분리한 세균들을 Stonier(1986)의 평판배지에 점적종하여 28°C 항온기에서 48시간 배양한 후 chloroform으로 2시간 혼중살균 후 chloroform을 휘산시켰다. *A. tumefaciens* C58 현탁액(10^8 cells/ml) 1 ml를 가온된 buffered soft agar 3 ml와 잘 혼합하여 chloroform으로 살균한 세균 평판배지 위에 도말하여 건조시킨 후 28°C 항온기에서 48시간 배양하여 형성되는 저지원에 의하여 길항균을 선발하였다. 공시균 및 선발된 길항균은 yeast mannitol agar(YM)사면배지에 이식하

* 연락처자

여 28°C에서 48시간 배양 후 4°C 저온항온기에 보관하면서 사용하였다.

In Viro Bioassay

선발된 길항균의 효과 검정은 Stonier(1956)의 방법에 의하였다. 길항균을 YM 평판배지에 이식하여 전배양한 후 Stonier's 평판배지의 중앙에 점적중환 후 28°C 항온기에서 48시간 배양한 다음 chloroform으로 훈증살균 및 휘산시켰다. 병원균인 *A. tumefaciens* C58, Ach5, *A. vitis* 등은 YM사면배지에 이식하여 28°C 항온기에서 48시간 배양 후 10 ml의 살균 증류수를 부어 세균현탁액(10^8 cells/ml)을 만들었다. 세균 현탁액 1 ml와 가온된 buffered soft agar(0.2 M NaH_2PO_4 3.9 ml, 0.2 M Na_2HPO_4 6.1 ml, Agar 0.7 g, D.W. 100 ml) 3 ml를 잘 혼합하여 길항균위에 도말하여 건조시킨 후 28°C 항온기에서 48시간 배양 후 저지원의 크기를 조사하였다. 대조 길항균으로 *A. radiobacter* K84를 사용하였다.

In Vivo Bioassay

길항세균과 병원균인 *A. vitis*를 YM 사면배지에 이식하여 28°C 항온기에서 48시간 배양 후 10 ml의 살균 증류수를 부어 세균현탁액(10^8 cells/ml)을 만들었다. 길항세균과 병원균을 10:1, 1:1, 1:10, 0:10의 비율로 혼합된 현탁액을 3주간 생육시킨 토마토(품종:광명) 유묘의 줄기에 침적중환하여 14일 후에 형성된 흑의 크기를 조사하였다.

Plasmid의 분리

길항세균이 *A. radiobacter* K84와 같이 plasmid를 갖고 있어 폭넓은 길항효과를 발현하는 것인지를 확인하기 위하여 Farrand 등(1985)에 의하여 개량된 Alkaline miniprep method로 길항세균으로부터 plasmid를 분리하였다. 대조세균으로는 포도나무의 줄기흑에서 분리한 *A. vitis*(Chung 등, 1996) 및 *A. radiobacter* K84를 사용하였다. 시험세균들을 L-broth에 이식하여 28°C의 진탕배양기에서 24시간 배양한 다음 1 ml를 취하여 12,000 rpm으로 1분간 원심분리하였다. 상청액을 제거하고 1 ml의 TE buffer에 현탁한 후 12,000 rpm으로 1분간 재 원심분리하여 상청액을 다시 제거하였다. 100 μl 의 Ice-cold Solution I으로 세균을 현탁하여 10분간 상온에 정치시켰다. 200 μl 의 Ice-cold solution II를 첨가하여 혼합한 다음 5분간

상온에 정치시켰다. Ice-cold 5M Potassium acetate용액 150 μl 를 첨가 후 450 μl 의 재증류 phenol 용액을 첨가 후 12,000 rpm으로 5분간 원심분리하였다. 70% ethylalcohol로 5분간 12,000 rpm으로 원심분리하여 세척해 내고 진공건조하였다. 20 μl 의 살균수와 5 μl 의 gel-loading buffer(Type III)를 혼합하여 0.7% agarose gel에 loading하여 100 v/cm의 조건으로 4시간 전기영동하였다. 전기영동한 gel을 30분간 ethidium bromide(1.0 $\mu\text{g/ml}$) 용액으로 염색하여 UV하에서 plasmid를 확인하였다.

결과 및 고찰

남양주의 포도 줄기흑병 이병포장에서 채취한 토양 시료로부터 분리한 세균들 중에서 biovar 1의 nopaline계 병원균인 *A. tumefaciens* C58를 억제시키는 길항세균 strain 27을 Stonier(1956)의 방법에 의하여 *in vitro* bioassay를 실시한 결과 strain 27은 biovar 1 병원균인 *A. tumefaciens* C58(nopaline type)를 67 mm 크기의 저지원을 형성시켰을 뿐만 아니라 실용화되어 사용되고 있는 길항세균인 *A. radiobacter* K84가 억제 시키지 못하는 biovar 1의 octopine계 병원균인 *A. tumefaciens* Ach5에 대하여 57 mm 크기의 저지원을 형성시켰다. 또한 biovar 2 병원균인 *A. rhizogenes* 13264 (Hairy root 유발) 및 포도나무 줄기흑으로부터 분리한 Biovar 3 병원균인 *A. vitis*를 각각 63, 34~67 mm 크기의 저지원을 형성시켰다(표 1, 그림 1, 그림 2). 이상의 결과들로부터 길항세균 strain 27은 nopaline 및 octopine type의 병원성 *Agrobacterium* biovar 1은 물론 biovar 2와 biovar 3의 병원성 *Agrobacterium*도 동시에 생육 억제 효과가 높은 길항세균으로 확인되었다. 길항균에 대한 *in vivo* bioassay결과는 그림 3과 같다. 이 실험에서 사용한 토마토는 지표식물로서 전 세계적으로 많이 사용되며, 흑을 쉽게 형성시킬 수 있으므로 사용하였다. 포도나무 줄기 흑으로부터 분리한 병원균(*A. vitis*)과 길항세균strain 27을 1:10, 1:1, 10:1의 비율로 혼합하여 토마토 유묘에 침적중환할 경우 1:1로 혼합하였을 때는 작은 흑을, 1:10일 때는 병원균만을 접종하였을때와 비슷한 크기의 흑을 형성시켰으나, 길항세균과 병원세균을 10:1로 혼합하였을 때 토마토 줄기에 흑을 형성 시키지 못하여 길항세균의 효과가 높은 결과를 보여 주었다.

Table 1. Suppression of some biovar 1, 2 and 3 of *Agrobacterium* sp. by biocontrol agent Strain 27. Suppression is expressed as diameter^{a)}(mm) of inhibition

	Diameter of inhibition zone(mm)									
	Biovar 1		Biovar 2	Biovar 3 ^{b)}						
	C58 ^{c)}	Ach5 ^{d)}	1326 ^{e)}	G11	G13	G14	G16	G17	G18	G19
Strain 27	67	57	63	54	63	34	63	65	67	67
Untreatment	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

^{a)}Based on 5 plates of each isolate, ^{b)}Biovar 3 was isolated from grapevine stem gall, ^{c)}Biovar 1 : nopaline type of *A. tumefaciens*, ^{d)}Biovar 1 : octopine type of *A. tumefaciens*, ^{e)}Biovar 2 : *A. rhizogenes* induced hairy roots.

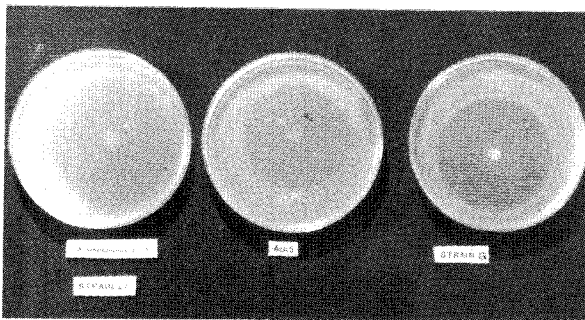


Fig 1. Inhibition zone(mm) of some biovar 1 and 3 strains of *Agrobacterium* by biocontrol agent strain 27. *A. tumefaciens* C58 : biovar 1 of nopaline type, Ach5 : biovar 1 of octopine type of *A. tumefaciens*, Strain G : biovar 3 of *A. vitis* isolated from a grapevine stem gall.

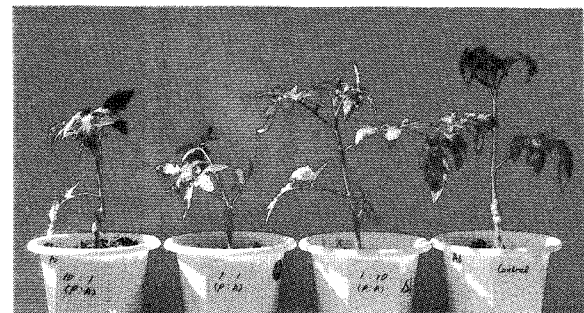


Fig 3. *In Vitro* Biological control efficacy of biocontrol agent Strain 27 on tomato 'kwangmyoung' seedling. Gall formation was caused by inoculating mixtures(1:1, 10:1, and 1:10) of biocontrol agent and pathogen on tomato seedling with needle and investigated 14 days after inoculating bacterial suspension. P : Pathogenic *Agrobacterium* Strain G isolated from grapevine stem gall, A : Biocontrol agent Strain 27.

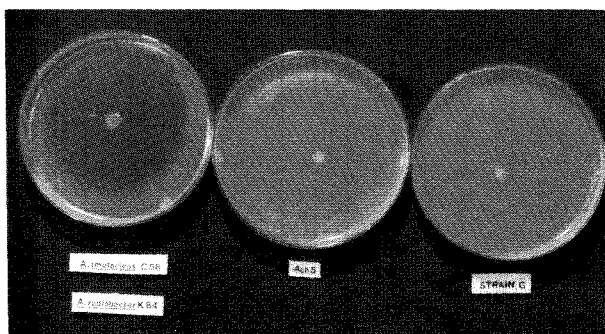


Fig 2. Inhibition zone(mm) of some biovar 1 and 3 strains of *Agrobacterium* by biocontrol agent *A. radiobacter* K84. *A. tumefaciens* C58 : biovar 1 of nopaline type, Ach5 : biovar 1 of octopine type of *A. tumefaciens*, Strain G : biovar 3 of *A. vitis* isolated from grapevine stem gall.

길항세균 strain 27로부터 plasmid를 분리한 결과는 그림 4와 같다. 그림에서 Lane A는 길항세균인 strain 27이며, 1개의 plasmid를 갖고 있는 것으로 확인되었다. Size marker인 Lane C의 strain K84와 비교해보면 strain 27이 소유하고 있는 plasmid는 Strain K84의 c인 agrocin K84 plasmid와 비슷한 크기인 약 46Kb이며, 이 plasmid가 길항물질을 분비하는 plasmid로 추정되나, 이 plasmid에 대한 유전자 지도 작성 및 특성 연구등을 추후 세밀히 검토해 볼 필요가 인정되었다. 포도나무의 뿌리혹병은 다른 식물의 뿌리혹병과 달리 병원세균이 biovar 3 병원균인 *A. vitis*가 기주의 도관내로 침입하여 수액을 따라 전

신적으로 전파하는 특성이 있다(Lehoczky, 1978).

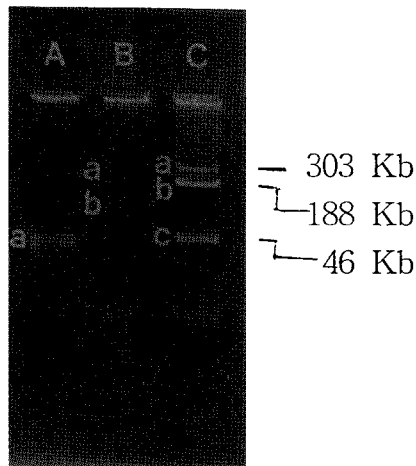


Fig 4. Comparison of band patterns of plasmids isolated from an antagonistic bacterium Strain 27, *A. vitis* and *A. radiobacter* K84. Lane A : Strain 27, Lane B : *A. vitis* isolated from grapevine gall, Lane C : Strain K84 (size marker). a, b and c of Lane C means crytic plasmid, pNoc and pAgK84, respectively.

포도나무 줄기흑병은 현재 Galltrol이란 상품으로 실용화되어 있는 길항세균 *A. radiobacter* K84에 의하여 방제가 불가능한 것으로 알려져 있다. 길항세균 strain 27을 이용한 *in vitro* bioassay 결과 strain 27은 병원성 *Agrobacterium* 이 갖고 있는 Ti plasmid의 종류(nopaline, octopine, agrpine)에 관계없이 nopaline type의 병원균인 *Agrobacterium tumefaciens* C58 및 octopine type의 병원균인 *Agrobacterium tumefaciens* Ach5를 저지함과 동시에 포도나무 줄기흑에서 분리한 biovar 3의 병원균인 *A. vitis*도 억제시켰다(표 1, 그림 1, 2). 이는 현재 미국, 일본등지에서 실용화되어 있는 biovar 2의 길항세균인 *Agrobacterium radiobacter* strain K84 및 Henderson 등(1983)이 Eucaryptus에서 분리한 biovar 1의 길항세균인 strain D286 보다 광범위한 길항효과를 보이며, Webster 등(1986)이 *Prunus salicinia*로부터 분리한 biovar 2의 길항세균인 strain J73과 매우 흡사하게 폭 넓은 길항효과를 갖고 있다. 그러나 strain 27은 strain D286 및 strain J73과는 달리 *Agrobacterium* spp가 아니라는 것이 다르다(자료 미제시). *In vivo* bioassay결과 길항세균과 병원균을 10 : 1로 혼합하여 접종하였을 때 흑의 형성을 완전히 억제

할 수 있었다(그림 3). 길항세균 strain 27에 대한 plasmid의 존재 유무를 확인한 결과 strain 27은 pAgK84와 비슷한 크기의 plasmid를 갖고 있음을 확인 할 수 있었다(그림 4). 그러나 이 plasmid가 길항물질을 생성하는지 여부는 추후 검토가 필요하다.

인용문헌

- Burr, T. J. and P. G. Brisbane (1983) Isolation of *Agrobacterium tumefaciens* biovar3 from grapevines in New York state. *Phytopathology* 73:163~165.
- Cooksey, D. A. and L. W. Moore (1982) Biological control of crown gall with an agrocin mutant of *A. radiobacter*. *Phytopathology* 72:919~921.
- Dhanvantri, B. N. (1983) Etiology of grape crown gall in Ontario. *Can. J. Bot.* 61:2641~2646.
- Farrand, S. K., J. E. Slota, J. S. Shim and A. Kerr (1985) Tn5 insertion in the agrocin 84 plasmid : the conjugal nature of pAgK84 and the locations of determinants for transfer and agrocin 84 production. *Plasmid* 13:106~117.
- Henderson, M., L. Askjaer, J. A. Thomson and Mar van Montagu (1983) Broad-Host-Range agrocin of *A. tumefaciens*. *Appl. and Env. Microbiology* 45:1526~1532.
- Kerr, A. and P. G. Brisbane (1983) *Agrobacterium* pp.28~43, In *Plant Bacterial Disease - A Diagnostic Guide* (ed. P.C. Fahy and G. J. Persley) Academic Press, NY, U.S.A.
- Kerr, A. and C. G. Panagopoulos (1977) Biotype of *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens* and their biological control. *Phytopathology Z.* 90:172~179.
- Lehoczky, J. (1978) Root system of the grapevines as a reservoir of *Agrobacterium tumefaciens* cells. *Pro. Int. Conf. Plant Pathog. Bact.* 4:239~243.
- Ophel, K. and A. Kerr (1990) *Agrobacterium vitis* sp. nov. for strains of *Agrobacterium* biovar 3 from grapevines. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40:236~241.
- Stonier, T. (1956) Labeling crown gall bacteria with ^{32}P for radiography. *J. Bacteriology* 72:259~268.
- Webster, J., M. D. Santos, and J. A. Thomson (1986)

Agrocin-producing *A. tumefaciens* Strain active against grapevine isolates. *Appl. and Env. Microbiology* 52:217~219.

정광진, 심재섭 (1996) 우리나라 포도나무 줄기혹병 병원세균의 분리 및 동정. *한국식물병리학회지* 12 (2): 197~201.

Biological control of grapevine crown gall

Kwang-Jin Chung*, Jae-Seop Shim¹, and Bong-Koo Chung¹

(*Agricultural Technology Research Institute of Dongbuhannong Chemicals, Jeongnam-myun, Hwasung-gun, Kyungki-Do 445-960, Korea, and ¹Department of Agricultural Biology, Chungbuk National University, Cheongju, 361-763, Korea*)

ABSTRACT : *Agrobacterium vitis* causes a crown gall disease in grapevine and that is one of the major hindrances for the wide cultivation and production of grapevine. We studied the possibility of biological control using selected biological control agent. One isolate from the infected soil, named as strain 27, was able to inhibit the biovar 1; *A. tumefaciens* C58 and Ach5, biovar 2; *A. rhizogenes* 13264, and biovar 3; *A. vitis*, *in vitro* and *in vivo* test. The putative biological control agent, *A. radiobacter* strain 27 was carrying the plasmid and the size of isolated plasmid was very similar to that of pAgK84 of *A. radiobacter* K84.

*Corresponding author