

밤나무 幼臺接木苗의 뿌리혹병(根頭癌腫病)에 관한 研究

羅琯俊* · 任綱彬* · 李光然** · 李斗珩***

(서울大學校農科大學*, 嶺南大學校**, 서울産業大學***)

Studies on the crown gall disease of chestnut nurse seedling grafts

La, Yong-Joon*, Hyong-Bin Im*, Kwang-Yeun Lee** and Du-Hyung Lee***

* College of Agriculture, Seoul National University, Suweon, Korea.

** College of Agriculture, Young Nam University, Kyungsan, Korea.

*** The City University of Seoul, Korea

ABSTRACT

Pathological and anatomical studies on the cause of the crown gall like symptoms associated with the chestnut nurse grafts were undertaken. The crown gall bacterium, *Agrobacterium tumefaciens*, was isolated from the gall tissues of chestnut nurse grafts by using selective media developed by Schroth et al. and Kado and Heskett.

Typical crown gall symptoms appeared on tomato, castor bean and geranium plants 10~21 days following inoculation with the bacterium isolated from the gall tissues of chestnut nurse grafts. *Agrobacterium tumefaciens* was reisolated from crown gall tissues of tomato, castor bean and geranium. Anatomical studies on the origin, growth and differentiation of the gall tissues of the chestnut nurse grafts confirmed that the gall tissues are of crown gall origin.

Masses of *Agrobacterium tumefaciens* were observed from gall tissues of chestnut nurse grafts, so it could be confirmed that the crown gall symptoms prevalent on chestnut nurse grafts are caused by the crown gall bacterium, *Agrobacterium tumefaciens*.

施行한 研究結果를 보고하는 바이다.

緒 言

최근 政府의 적극적인 밤나무 栽植장려에 따라 全國의으로 밤나무 苗木이 大量生産되고 있다. 특히 1973 年度頃에는 苗木의 大量需要로 因하여 從來의 接木法에 依한 苗木 生産외에 새로운 接木法인 幼臺接木에 依한 速成苗木생산이 大의으로 實施되었다.

그런데 幼臺接木에 依한 苗木생산 과정에서 接木部인 地下部에 혹이 생겨 生長障害를 이키며 나아가서 苗木이 枯死되는 現象이 일어났고 甚한 경우 苗木의 80%가 혹병에 걸려있는 苗圃도 있었다. 그런데 이와같은 혹의 出現原因에 대하여 意見이 분분하여 그 防除 對策樹立에 困難을 가져왔다.

山林廳은 밤나무의 育林行政과 指導事業을 위하여 이 幼臺接木苗에 나타나는 뿌리혹의 正體를 把握코저 著者들에게 이의 發生原因究明을 위촉한바 있어 그 實

材料 및 方法

京畿道, 忠北, 全北 및 全南의 道林業試驗場 및 民營圃場에서 採取한 밤나무 幼臺接木에 形成된 新鮮한 뿌리혹(그림 1)을 材料로 하였다.

病原菌의 分離, 培養實驗은 Schroth 및 Kado의 選擇性培地(Schroth et al, 1965; Kado and Heskett, 1970)를 利用하였다. 1%次亞鹽素酸소다液으로 表面殺菌한 뿌리혹의 表面部位에서 깊이 0.3~0.5cm部分의 組織 1gr을 도려내어 殺菌蒸溜水 10ml가 들어있는 약절구에 뜯겨 갈아 1分 정도 放置한 다음 그 上液 0.1ml를 上記培地 表面에 부어 L型硝子棒으로 均一하게 퍼지게 하였다. 그리고 30±1°C에 48시간 培養하였다.

한편 Schroth 및 Kado培地上에서 純粹分離된 뿌리혹病菌의 病原性を 檢定하기 위하여 뿌리혹病菌의 指

標植物인 토마토와 피마자 그리고 제라늄에 分離菌을 接種하였다. 草長이 30~50cm에 達하는 供試指標植物의 節間에다 殺菌劑 針束으로 傷處를 낸 다음 分離菌의 浮遊液을 붓으로 바르고 殺菌水로 적신 脫脂棉으로 가볍게 감싸아 주었다. 그리고 水分이 증발되지 않도록 비닐끈으로 탈지면위를 동여매었다. 이와같이 接種이 完了된 供試植物은 23~27°C의 growth chamber에 놓아두고 2日後에 脫脂棉을 벗겨 주었다.

解剖學의 研究는 接木의 接合部位와 뿌리혹 組織片의 여러 部分을 FAA에 固定, 脫水, 파라핀 包埋를 거쳐 Safranin과 Fast green의 二重染色 또는 Hematoxylin의 單一染色을 하여 檢鏡하였다.



Fig. 1. Chestnut nurse seedling grafts infected with crown gall.

結果 및 考察

(1) 病原菌의 分離와 培養

Schroth 培地 上에는 培養 48時間 後에 微少한 菌叢이 나타나기 시작하여 4日後에는 菌叢 直徑이 1~2mm에 이르렀다. 이 菌叢은 둥글고 불투명한 糊液狀으로 眞珠 빛 光澤을 띄우고 있었다(그림 2-A). Kado培地 上에서는 培養 48時間後에 역시 微少한 菌叢이 나타나기 시작하여 4日後에는 菌叢直徑이 1.5~2.5mm에 이르렀다. 이들 菌叢은 發育初期에는 淡靑色이었다가 점차 黃

靑色으로 變하였다(그림 2-B). Schroth 및 Kado 培地 上에 分離된 單一菌叢을 각각 Lactose-yeast寒天培地 (Bernaerts and De Lay, 1963)上에 移植하여 30°±1°C에 48時間 培養한 다음 Benedict's reagent를 이들 菌叢上에 處理하였다. 그 結果 處理한지 1時間後에 菌叢周邊에 黃色帶의 3-ketoglycoside反應이 나타났다(그림 3). 또한 Gram染色 結果는 陰性이었다.

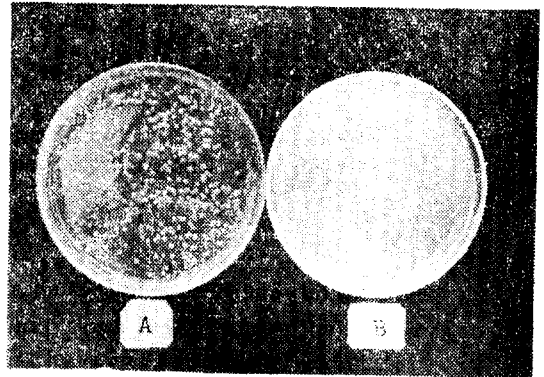


Fig. 2. Colony growth of *Agrobacterium tumefaciens* on selective medium developed by Kado and Heskett (A), and Schroth et al. (B).

한편 이들 分離된 細菌을 2% PTA(phosphotungstic acid) 水溶液으로 negative染色을하여 電子顯微鏡으로 觀察한 結果 모양은 桿狀이었다. 이들 細菌은 1~數個의 鞭毛를 가지고 있었고, 크기는 0.4~0.8×1.0~3.0 μ 이었다(그림 4). 以上과 같은 結果는 밤나무 幼臺接木의 뿌리혹組織에서 純粹分離된 細菌이 根頭癌腫病菌인 *Agrobacterium tumefaciens*의 形態學的 乃至 生化學的 特性을 가지고 있음을 立證해주고 있다.

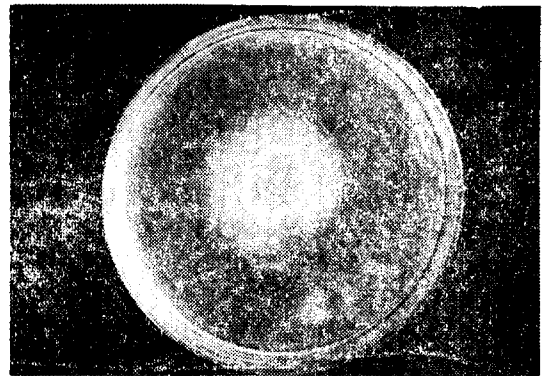


Fig. 3. The Bernaerts-De Lay test for 3-ketoglycoside reaction on lactose-yeast agar. The formation of a yellow ring around the bacterial colony is indicative of *Agrobacterium tumefaciens*.



Fig. 4. Electronmicrograph of negatively stained *Agrobacterium tumefaciens*. Bar represents 1 μ .

(2) 病原성에 關하여

토마토와 제라늄에는 接種한지 3週日後에 接種部位에 혹이 發生하였고 피마자에는 接種한지 10日後에 혹이 發生하였다(그림 5).

한편 殺菌針束으로 傷處를 낸다음 殺菌증류수를 붓으로 바르고 살균탈지던으로 감싸아둔 無處理區에서는 혹이 形成되지 않았다.

토마토와 피마자에 形成된 혹에서 Schroth 및 Kado 培地를 利用하여 病原菌을 分離한 結果 밤나무 뿌리혹에서 分離된 것과 같은 細菌이 再分離 되었다.

以上的 結果로 보아 Koch의 4原則이 充足되므로 밤나무 幼臺苗木에 形成된 뿌리혹은 根頭癌腫菌인 *Agrobacterium tumefaciens*에 依한 것임에 틀림없다.

二期木部の 部分으로부터 突出하였다(그림 6). 그리고 뿌리혹의 皮層部와 完全히 連結되어 있다.



Fig. 6. Crown gall of chestnut tree is combined firmly with the secondary xylem and cortex of scion.

Klein(1954)은 癌腫의 生長을 Transformation period. Duplication period 및 Differentiation

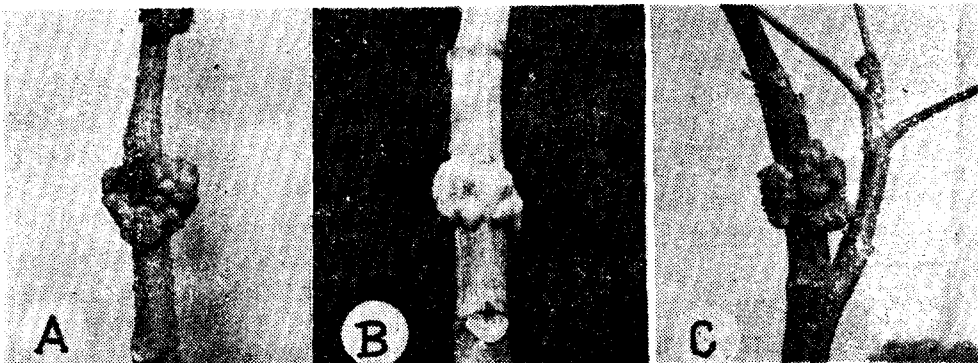


Fig. 5. Development of crown galls on bioassay plants. (A) Tomato, (B) castor bean, (C) geranium..

(3) 뿌리혹의 發生과 生長

뿌리혹의 突出한 部位를 그림 5에서 보던 臺木과 接穗의 接觸部位에서 혹이 發生하기 시작하며, 接穗의

period로 區分하였다. Transformation period에서는 癌腫細胞가 생기는 段階이며, 우리가 癌腫으로 認識하고 혹이 커가는 段階는 Duplication period이다. 細胞分裂이 活潑한 後에는 類似組織으로 多少 分化되며 초가을에 이르면 혹은 萎縮하게 된다.

癌腫에는 表皮 또는 cork層이 없는 것이 特徵이다

(그림 7). 그리고 表皮가 있을 부분의 組織은 秩序없이 脫落됨을 볼 수 있다(그림 9). 癌腫組織은 柔組織으로만 되어 있으나 細胞의 크기와 形狀에서 大形細胞 또는 紡錘形細胞들은 全然 秩序없이 排列되어 있다. 그림 7에서 보면 어린 혹의 表面近處에 分裂組織帶가 나타나 있다. 이와같은 分裂組織이 旺盛히 分裂함으로써 癌腫은 急進的으로 커진다(그림 10). 그림 9는 뿌리혹 表面直下를 擴大한 것인데 分裂組織帶는 꼭 草本植物 줄기의 形成層環과 비슷하며 大型의 核을 갖고 있다.

뿌리혹은 表層部位의 分裂組織帶에 의하여 規則 바른 生長도 하나 이와같은 分裂組織이 파도狀 또는 獨立된 分裂芽로(그림 11) 癌腫組織內에 散在함으로 不規則的인 突起를 내면서 生長한다. 그리고 分裂速度도 癌腫의 場所에 따라 달라지므로 隆起가 複雜한 혹으로 자라게 된다.

(4) 뿌리혹의 分化

뿌리혹은 어느 程度 容積의 증가가 있으면 그림 12에서처럼 大形細胞가 나타나며 또한 維管束이 形成되는데 이 維管束은 서로 連結되어 있지 않고 흩어져 있다. 그리고 그림 13에서 보는 바와같이 파도狀의 分裂組織도 2層, 3層으로 나타난다. 細胞群에 따라서는 細胞內容이 豊富하며 破生의 세포잔극이 보이는데 간극에는 *Agrobacterium*의 集塊가 보인다. 細胞內에도 細菌集塊가 보이는데(그림 14) 細菌들은 Safranin에 赤紫色으로 染色되었다.

以上과 같은 뿌리혹의 組織學의 特徵으로 보아도 所謂 뿌리혹은 根頭癌腫病 임이 틀림없다. 그리고 소위 接木部位 附近에 突出한 肉狀體(Callus)는 高等植物의 柔組織 모양을 하되 表面에 콜크層 그리고 콜크形成層이 보이며 組織의 異常分化는 전혀 볼수없다(그림 9). 外觀上으로 Callus는 木本에 있어서는 콜크組織에 덮여 健全한 樹皮와 같이 보이나 根頭癌腫은 콜크에 덮여 있지 않고 적당에는 乳黃白色의 큰 혹으로 보인다. 가을이 되면 多少萎縮하며 黃褐色을 하고 떨어지기도 한다

(5) 幼莖接과 一般接木苗의 癒合比較

幼莖接木苗에서 이와같은 根頭癌腫이 多數出現하는 때에는 接穂와 臺木에서 어떤 生理的 轉流阻害가 있는 것이 아닌하는 생각으로 接木癒合面을 解剖檢鏡하였다.

그림 15는 幼莖接木苗의 癒合部縱斷面이며 그림 16은 一般接木苗의 癒合部를 본 것이다. 그림 15에서 左半部는 臺木이고 右半部는 接穂이다. 이 두 그림에서 보는바와 같이 木部柔組織과 假導管들이 中央의 癒合部에서 각기 連結되어 있는데 幼莖接木(그림 15)에서는 接合部에 木部柔細胞群이 發達하여 있어 兩者의 물질통도를 阻害하는 것 같았다.

Proebsting(1928)에 依하면 이와같이 維管束의 連結을 柔組織이 妨害하는 形式의 接合은 一種의 接穂와 臺木間의 不和合性이 나타난 結果라고 말하고있다. 勿論 品種에 따르는 接穂, 臺木間의 不和合性도 있겠으나 幼莖接木의 경우에는 臺木이 너무 어린데 比하여 接穂는 若い에서 오는 生理的 不和現象인 것으로 생각된다.

그것에 比하면 一般接木의 癒合部(그림 16)에서는 接合線에서 雙方的 維管束들이 잘 連結되어 있어 물질통도가 잘 되도록 되어있다. 그림 17과 18은 一般接木의 癒合部를 나타낸 것이다. 그림 17에서는 中間의 柔組織들이 放射組織化하여 雙方的 放射組織이 妨害柔組織의 媒介없이 連結되어있고 切線斷面인 그림 18에서는 維管束이 中央의 接穂로부터 兩쪽(어둡게 보이는部分)臺木의 維管束에 까지 잘 連結되고 있다.

그림 19는 一般接木의 癒合部 橫斷面인데 放射組織에 의하여 接合部들이 放射組織에 잘 連結되어 단단히 癒合되어 있다.

一般的으로 接木은 極性を 끼우로 하지 않는 것인데(Vyvan, 1937) 幼根逆位接은 極을 逆位로 함으로써 물과 無機 및 有機養分의 轉流가 順調롭지 않을뿐더러 向基的으로 흐르는 Auxin과 Thiamine等 ฮอร์โมน의 轉流도 阻害됨으로써 苗의 生長이 抑制되고 劣性을 나타내며 結果的으로 癒合後에 생긴 正常極性의 二期組織이 兩者結合하여 通導를 맡아보게 되는것 같다. 따라서 이와같이 極性이 逆位일때는 癌腫被害가 없더라도 接合部 근처에 異常組織이 形成되어 膨大하여 지게될 것이다. 그리고 幼莖接木은 接木傷處가 地下部에 묻임으로써 토양에 살고 있는 根頭癌腫病菌의 侵害를 크게 받을 것이 分明하다. 또한 幼根逆位接木은 勿論 幼莖接木의 경우 일지라도 接穂와 臺木의 接合境界線에 木部柔組織이 出現함으로(그림 15) 轉流阻害가 있을 것이며, 이것은 臺木과 接穂組織의 不和合性에서 오는 一種의 生理的 現象인것이다.

臺木이 弱하면 水分 및 養分의 供給이 적어질 뿐 아니라 幼莖接木의 경우에는 接穂가 극히 어린 臺木뿌리에게 큰 影響을 줄 것이다. 다시말하면 一般接木에서는 臺木의 높은 곳에 接하였기 때문에 接穂는 臺木에게 큰 影響을 미치지 않아 元來 臺木의 뿌리 形態와 機能을 하고 있으나 幼莖接木에 있어서는 뿌리들이 接穂의 強力한 影響을 받아 一種의 挿木의 形式이라고 생각되며 主根系가 없는 不定根의 形式으로 뿌리가 자라므로 이와 같은 받나무는 뿌리가 퍼인 畸形의 形狀을 하게 된다.

Rogers and Backbone(1957)에 依하면 接木에서는 臺木과 接穂의 品種이 同一 할때는 恒常 莖部對根部的

比率이 一定值를 取하여야 한다는 것이다. 즉 接穗와 臺木의 生長率이 樹齡이나 樹體 크기에 相關없이 거의 같아야 한다는 것이다. 만일 生長率이 다른 接穗와 臺木이 接木되던 한쪽에 다른 한쪽이 맞추어져야 하는데 幼臺接木에 있어서의 이와같은 不均衡이 더욱 많은 가 느다란 不定根의 발달을 招來하였을 것이고 따라서 이와같은 不均衡이 癒合初期에 高率의 根頭癌腫病을 일으켰을 것으로 생각된다.

摘 要

밤나무 幼臺接木苗의 接木部位에 發生하는 뿌리혹병의 原因을 究明할 目的으로 病理學的 및 解剖學的研究을 遂行하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 밤나무 幼臺接木苗의 뿌리혹에서 分離하여 選擇性培地上에 純粹培養된 細菌은 形態學的 및 生理學的方法에 의해 根頭癌腫病菌인 *Agrobacterium tumefaciens*로 同定되었다.

2. 위의 分離菌을 *Agrobacterium tumefaciens*의 指標植物인 토마토, 피마자, 그리고 제라늄에 接種한 結果, 接種한지 10~21日後에 癌腫이 形成되었고 이들 癌腫에서 *Agrobacterium tumefaciens*가 再分離되었다.

3. 밤나무 幼臺接木苗의 뿌리혹의 發生, 生長, 分化 過程들을 組織學的으로 觀察하였던 바, 根頭癌腫病組織임을 確認하였다.

4. 뿌리혹의 組織內에서 *Agrobacterium tumefaciens*의 集塊가 多數 觀察되었다.

5. 幼臺接木과 一般接木의 癒合部位를 檢鏡하였던 바 一般接木이 接穗와 臺木의 癒合에서 生理的 親和性이 더 큰 것으로 보였다.

以上과 같은 結果를 綜合해볼때 밤나무幼臺接木苗의 接木部位에 發生하는 뿌리혹은 根頭癌腫病菌인 *Agrobacterium tumefaciens*에 依한것임이 틀림없다.

References

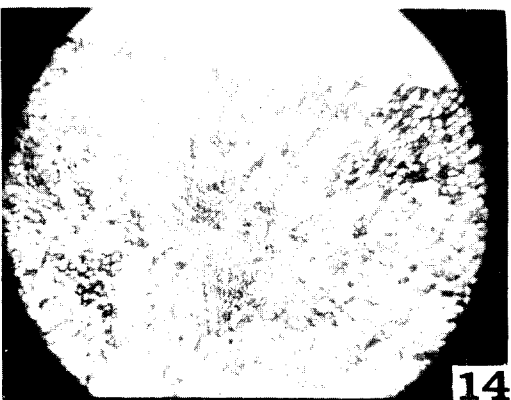
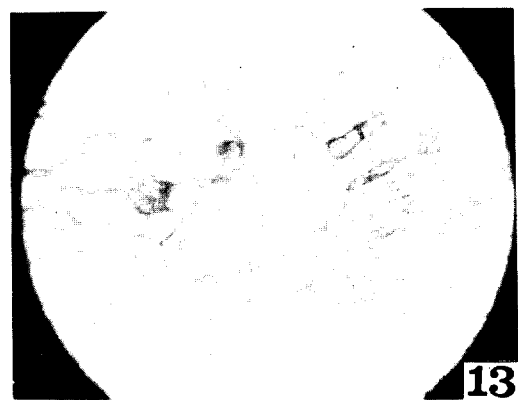
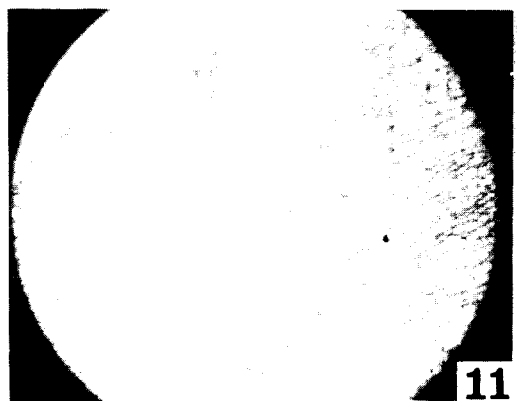
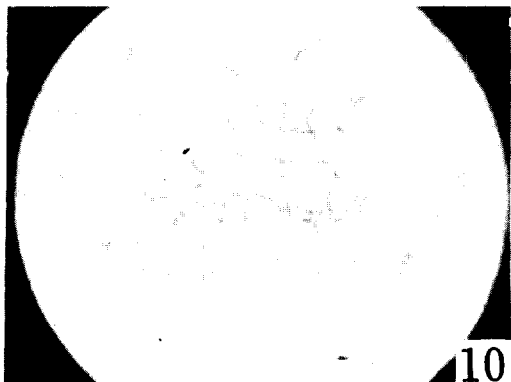
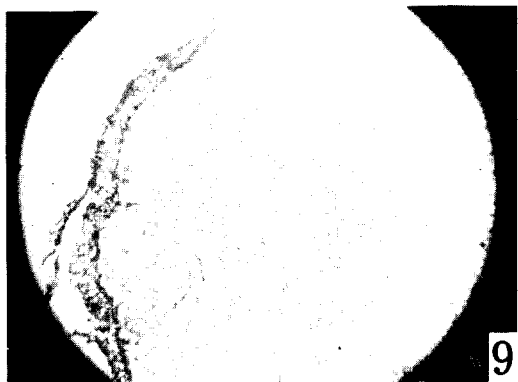
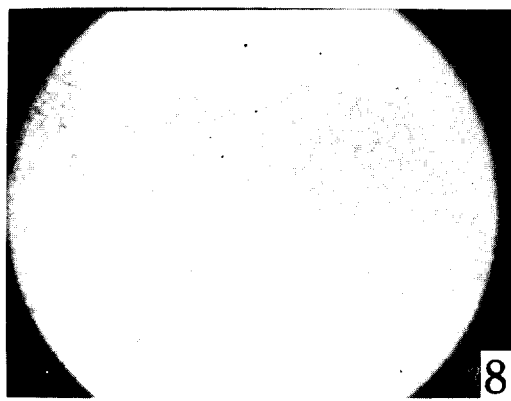
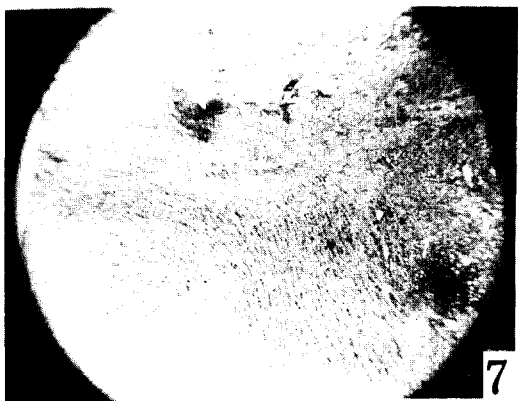
1. Bergey, D.H. et al. 1957. Manual of determinative bacteriology. 7th ed. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
2. Bernaerts, M., and J. De Ley, 1963. A biochemical test for crown gall bacteria. Nature 197 : 406~407.
3. Braun, A.C. 1954. Studies on the origin of

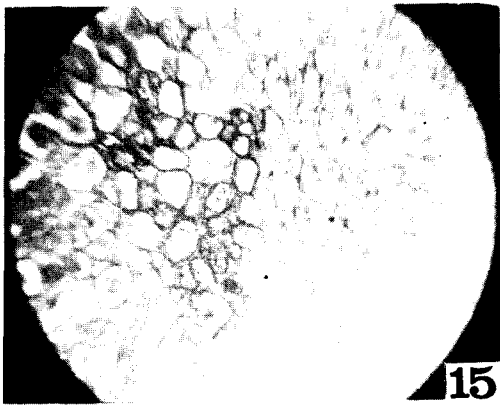
- the crown gall tumor cell. Brookhaven Symposia in Biology No. 6, 115~127.
4. Buck, G.J. 1953. The histological development of the bud graft union in roses. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 62, 497~502.
5. Difco Laboratories. 1967. Difco manual of dehydrated culture media and reagents for microbiological and chemical laboratory procedures. 9th ed. Detroit, Michigan.
6. Dowson, W.J. 1957. Plant diseases due to bacteria. Cambridge Univ. Press. 2nd ed.
7. Kado, C.I. and M.G. Heskett. 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. Phytopathology 60 : 969~976.
8. Klein, R.M. 1954. Mechanism of crown-gall induction. Brookhaven Symposia in Biology No. 6, 97~114.
9. Proebsting, E.L. 1928. Further observation on structural defects of the graft union. Bot. Gaz. 86, 82~92.
10. Rogers, W.S. and A.B. Baekbane. 1957. Stock and scion relation. Ann. Rev. Plant Physiol. Vol. 8, 217~236.
11. Sax, K. 1954. The control of tree growth by phloem blocks. Jour. Am. Arb., 35, 251~258.
12. Schroth, M.N., J.P. Thompson, and D.C. Hildebrand. 1965. Isolation of *Agrobacterium tumefaciens*-*A. radiobacter* group from soil. Phytopathology 55 : 645~647.
13. Schroth, M.N., A.R. Weinhold, A.H., McCain, D.C. Hildebrand, and N. Ross. 1971. Biology and control of *Agrobacterium tumefaciens*. Hilgardia Vol. 40, No. 15, 537~552.
14. Society of American Bacteriologists. 1957. Manual of microbiological methods. M.J. Pelczar, (ed). McGraw-Hill Book Co., Inc., New York, 315 pp.
15. Vyvyan, M.C. 1937. The relative influence of rootstock and of an intermediate piece of stock stem in some double grafted apple trees. Jour. Pom. and Hort. Sci., 16, 251~273.

(1978年 11月 30日 接受)

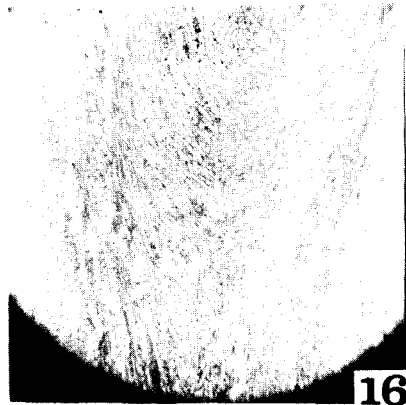
PLATE

- Fig. 7. Vascular bundle of scion in mass protrusion penetrates into crown gall.
- Fig. 8. Crown gall has no epidermis and its portion easily falls off. Meristematic zone is seen under the surface.
- Fig. 9. Callus tissue showing cork layer and cork cambium. The shape of cells is also identical commonly to that parenchyma.
- Fig. 10. Expanded meristematic zone under the surface of crown gall. The cells of meristem are arranged systematically and have a large nucleus. Cells fall off due to necrosis on the upper surface.
- Fig. 11. Cell division takes place rapidly in meristematic zone under the surface of crown gall and the cells are arranged in a row. Thus the size of crown gall increases rapidly.
- Fig. 12. Wave-like meristematic zone and independent meristematic bud are seen in gall tissue.
- Fig. 13. Vascular bundle is scattered in crown gall and large cells are also seen.
- Fig. 14. Meristematic zone of 2 or 3 layer appears in crown gall and accordingly crown gall grows rapidly. Some cell groups of abundant cell contents are also seen.
- Fig. 15. Mass of *Agrobacterium tumefaciens* are seen in and between cells of gall tissue.
- Fig. 16. Left half of sature of young stalk graft is stalk part and the right half is scion part. Parenchyma appears on the boundary of fusion.
- Fig. 17. No Parenchyma layer is observed in sature and fusion of ordinary graft.
- Fig. 18. Radial section of fusion of ordinary graft. Ray tissue of scion(right half) which represents ray tissue is well connected to ray tissue of stalk(left half).
- Fig. 19. Radial section of fusion of ordinary graft. The central scion and stalk on both sides are well connected by vascular bundle.
- Fig. 20. Cross section of fusion of ordinary graft. Scion(right side), stalk(lower left) and wedge in covered part(upper side) are well connected by ray tissue.

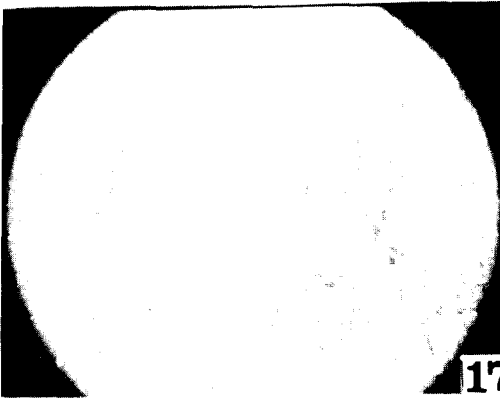




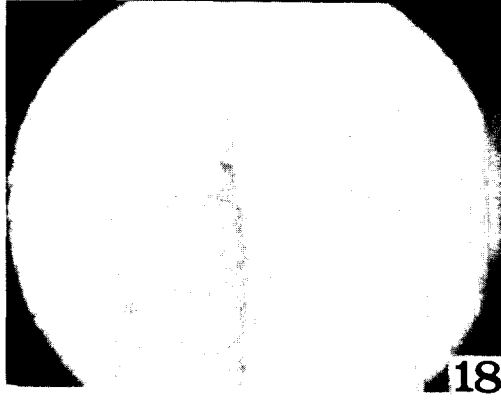
15



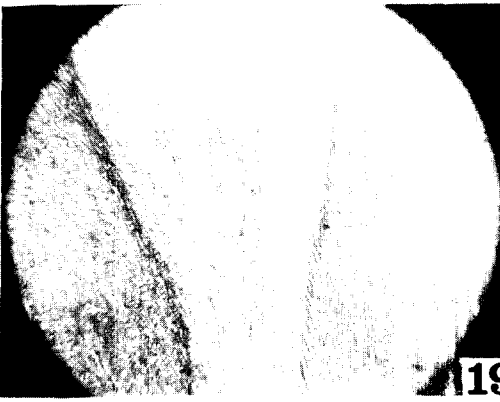
16



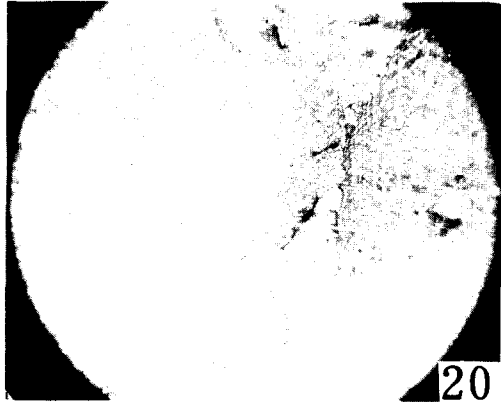
17



18



19



20