한국농약과학회지 제5권 제3호(2001)
The Korean Journal of Pesticide Science
Vol. 5, No. 3, pp.50~53(2001)

〈단 보〉

Agrobacterium radiobacter K84에 의한 장미 뿌리혹병의 생물적 방제

박광훈 · 차재순*

충북대학교 농생물학과

요약 : 최근 우리 나라의 여러 작물에서 뿌리혹병(根頭癌腫病, crown gall)의 발생이 증가하고 있음이 보고되고 있으며, 특히 중요한 화훼작물인 장미를 재배하는 시설하우스에서 뿌리혹병의 발생은 매우 심한 피해를 가져오고 있다. 그럼에도 불구하고 이 병에 대한 방제는 거의 이루어지지 않고 있는 실정이다. 본 연구에서는 전 세계적으로 매우 성공적으로 뿌리혹병의 생물농약으로 개발된 *Agrobacterium radiobacter* K84의 장미 뿌리혹병 방제효과를 검정하여 국내에서 장미 뿌리혹병의 방제에 그 사용가능성을 확인하고자 하였다. 장미의 지상부에 인위적인 상처를 주고 병원균을 접종하기 전에 그리고 접종 후 *A. radiobacter* K84 균주 현탁액의 살포는 뿌리혹병의 발병률과 혹의 크기를 크게 감소시켰다. K84균주를 처리한 장미에서 뿌리혹병의 발병률은 5.0~6.7%로서 병원균을 단독 접종한 대조구에서의 발병률 85%에 비하여 크게 낮았다. K84 균주를 처리한 장미에서 형성된 혹의 크기와 생체중도 병원균만을 접종한 대조구 장미에 형성된 혹의 4~5%로서 K84 균주의 처리에 의해 크게 감소하였다. 장미의 뿌리에 인위적인 상처를 주고 병원균의 접종 전 및 후에 K84 현탁액에 침지 처리한 경우에도 혹의 크기, 생체중 그리고 병 발생률이 크게 감소하였다. 전체적으로 K84 균주 처리에 의한 지상부 혹의 생물적방제가는 92~94%이었고, 뿌리에서의 뿌리혹병 생물적방제가는 51~59%이었다. 이상의 결과는 *A. radiobacter* K84 균주의 처리가 매우 효과적으로 장미 뿌리혹병을 방제할 수 있음을 보여주고 있다.(2001년 6월 2일 접수, 2001년 9월 19일 수리)

Key words : Crown gall disease, Rose, *A. radiobacter* K84, Biological control, Biopesticide.

뿌리혹병(根頭癌腫病, Crown gall disease)은 60여 과(科, family), 140여 종(種, species)의 목본 및 초본식물에서 발생하는 병으로, 전 세계적으로 복숭아, 포도 등의 과수와 장미에 많은 경제적 피해를 주는 병이다(Webster 등, 1986; Agrios, 1997). 뿌리혹병은 뿌리 혹은 줄기에서 처음에 작은 비대부위로 시작하여 이 부분이 나중에 혹(gall)으로 발전한다. 혹이 커지면서 그 표면은 다소 둘둘 말린 모양으로 되며 주변세포가 죽어서 표면이 흑갈색으로 변한다. 이 병에 감염된 묘목은 상품가치가 없으며 지제부나 주근에 혹이 있는 식물은 생장이 저해되어 잎이 작고 노랗게 되며, 나쁜 환경에 민감하게되고, 심하면 식물체가 고사한다(Agrios, 1997; 조, 1999).

뿌리혹병은 1913년 사과나무를 통해 일본으로부터 우리나라로 도입된 병으로 보고되어 있으며(이, 1996), 최근까지 사과, 감, 포도나무 등의 과수 위주의 13종에서 발생하는 것으로 알려져 있다(한국식물병리학회, 1998). 그러나 뿌리혹병이 주로 토양 속의 뿌리에 혹을 만드는 경우가 많기 때문에 우리 나라에서 병의 발생실태가 정확하게 파악되지 않은 것으로 판단된다. 전 세계적으로 경제적인 피해를 주는 기주로 잘 알려진 장미에서도 병의 발생이 보고되어 있지 않는 점으로 미루어보아 우리 나라에서 뿌리혹병의 발생은 보고된 것보다 훨씬 많을 것으로 생각된다. 특히 최근에 채소인 고추와 멜론에서 이 병이 크게 발생했다는 보고가 있었으며(강 등, 1997; Lee 등, 2000), 보고되지는 않았지만 충북 진천의 장미재배단지의 일부 포장에서 본 병이 심하게 발생하였고, 경기 파주의 장미 양액재배 농장에서는 장미 삽목묘에 전면적으로 발생하여 장미 재배의 실패원인이 되기도 하였다.

다른 토양세균에 의한 병과 마찬가지로 뿌리혹병의 방제는 매우 어려우나 병원균 *Agrobacterium tumefaciens*와 유사한 비병원성 균주인 *A. radiobacter* K84을 이용한 생물적 방제가 매우 성공하였다. K84 균주는 호주의 복숭아 혹(gall)의 주변 토양에서 분리된 비병원성균으로 복숭아의 뿌리에 침지처리하였을 때 뿌리혹병을 100% 방제하였으며(New & Kerr, 1972), 복숭아 종자에 처리하여 오염된 토양에 파종되었을 때도 뿌리혹병이 방제되었다는 보고(Kerr, 1972) 이후 지금까지 전 세계적으로 뿌리혹병의 생물적 방제에 사용되었다. K84 균주는 지금까지 세 종류의 항생물질 즉 agrocin 84, agrocin 434, 그리고 ALS84을 생산하는 것으로 알려져 있으며, 그들이 K84 균주가 매우 성공적으로 뿌리혹병을 방제할 수 있도록 하는 주요한 요인인 것으로 알려져 있다(Kerr and Htay, 1974; Moore and Warren, 1979; McClure 등, 1998). Agrocin 84는 가장 강력한 항생물질로 nopaline-agrocinopin type Ti plasmid을 가진 *Agrobacterium*을 특이적으로 억제하며, agrocin 434는 모든 *A. tumefaciens*에 효과적이고, ALS84는 *Agrobacterium* 외에 다른 식물병원세균도 억제하는 항생물질로 알려져 있다(McClure 등, 1998; Penyalver & Lopez, 1999).

K84 균주의 생물적방제 능력에 크게 기여하는 agrocin 84를 합성하는 유전자는 pAgK84에 존재하며 이 플라스미드는 agrocin 84를 합성하는 유전자를 가질 뿐만 아니라 기주세균이 agrocin 84에 억제를 당하지 않도록 하는 (immunity) 기능을 가지고 있는데, 이 플라스미드가 병원균으로 옮겨갈 경우 병원균이 agrocin 84에 대한 저항성을 획득하게 한다(Jones 등, 1988). 이러한 문제점을 해결하기

*연락저자

위하여 pAgK84의 *tra* 유전자를 결실시켜 그 플라스미드가 옮겨갈 수 없도록 한 K1026 균주가 개발되었으며(Jones 등, 1988), 이 균주는 생물적방제 능력에 있어서 K84 균주와 차이가 없는 것으로 보고되었다(Penyalver & Lopez, 1999; Vicedo 등, 1993). 이들 균주는 K84 균주가 도입된 이래 Nogall® 또는 Galltrol® 등으로 상업화되어 전 세계적으로 뿌리혹병의 방제에 사용되고 있다(Agrios, 1997).

본 연구에서는 뿌리혹병의 생물농약으로 잘 알려진 *A. radiobacter* K84 균주의 장미 뿌리혹병 방제능력을 검정하여 최근 우리 나라의 여러 가지 작물에서 발생하여 심각한 피해를 주고있는 뿌리혹병 방제에 그 사용가능성을 검토하였다.

본 연구에 사용한 장미는 테레사 품종 1년생 삽목묘를 구입하여 사용하였다. 뿌리혹병 병원균은 진천 장미재배단지의 병든 장미로부터 분리한 *A. tumefaciens* At156 균주를 사용하였으며, 길항균 *Agrobacterium radiobacter* K84는 미국 코넬대학으로부터 분양 받아 사용하였다. 병원균 At156와 길항균 K84는 -60°C 의 초저온냉동고에 보관하여 사용하였으며, Nutrient agar(NA, beef extract 3 g, peptone 5 g, yeast extract 2 g, agar 15 g/ 1L) 또는 감자한천배지(PDA, Becton Dikinson, MD, USA)에서 배양하였다. 본 실험에 사용한 세균현탁액은 감자한천배지에 streak하여 3일간 배양한 길항균 K84 또는 병원균 At156에 적당량의 멸균수를 부어 세균현탁액을 만들고, 그 현탁액의 탁도를 분광광도계를 이용하여 OD_{600}=0.1(약 10^8 cells/ml)로 조정하여 사용하였다.

길항균 K84균주에 의한 혹 형성억제실험은 지상부인 줄기에서의 혹 형성억제와 지하부인 뿌리에서의 혹 형성억제 검정으로 나누어 실시하였다. 줄기에서 혹 형성억제 실험은 장미의 줄기 기부 4~5곳에 면도칼을 사용하여 줄기의 표피로부터 내부로 사각으로 1~2 mm 깊이의 상처를 주었다. 이 장미에 감자한천배지에서 배양하여 만든 K84 또는 At156 균주의 세균현탁액을 장미의 지상부가 충분히 젖도록 살포하여 음건하고, 1시간 후에 동일한 농도의 길항균 또는 병원균 현탁액을 살포하였다. 대조처리로서는 위와 같은 방법으로 상처를 준 후 길항균 K84 현탁액은 살포하지 않고 병원균만 살포하였다. 길항균의 처리방법은 병원균 접종 1시간 전에 살포한 처리(길항균 전처리)와 병원균 살포 1시간 후에 살포한(길항균 후처리) 두 가지로 하였다. 각 처리 당 30주씩 4반복으로 실험하였다.

뿌리에서의 혹 형성억제는 줄기에서의 혹 형성억제실험과 동일한 방법으로 장미의 지제부와 굵은 뿌리의 4~5곳에 면도칼로 상처를 주었고, 작은 뿌리의 일부는 망치로 으깨 상처를 준 후 줄기의 혹 형성억제 실험에 사용한 동일한 농도의 길항균 K84 또는 병원균 At156 현탁액에 장미의 뿌리를 약 5분간 담근 후 1시간 동안 그늘에 두었다가 다시 동일한 농도의 길항균 또는 병원균 현탁액에 침지하였다. 이렇게 처리한 장미는 직경 20 cm 플라스틱 폿트에 원예용 상토를 이용하여 심고 야외에서 관리하였다. 각 처리 당 30주씩 3반복으로 실험하였다. 처리 90일 후에 혹이 형성된 장미의 비율(이병주률), 형성된 혹의 크기, 그리고 줄기의 혹 형성 억제실험의 경우 형성된 혹의 생체중을 각각 조사하였다.

길항균 *A. radiobacter* K84 처리는 줄기에서 혹 형성을 크게 억제하였다(표 1). 길항균 K84 현탁액을 병원균 At156 처리 전에 처리한 경우나 병원균 At156 균주 현탁액을 처리한 후에 처리한 경우 모두에서 길항균 K84 균주의 처리는 병원균 At156 단독 접종보다 장미에 혹을 형성하는 비율을 현저히 감소시켰다(Table 1). 병원균 At156만 처리한 경우에는 전체의 85%의 장미에 혹이 형성되었으나, K84균주를 병원균 접종 전이나 후에 처리한 경우는 각각 6.7%와 5%의 장미에만 혹이 형성되었다. 장미에서 형성된 혹의 크기와 혹의 생체중에 있어서도 길항균을 처리하지 않은 장미에서 형성된 혹에 비해 길항균 K84를 처리한 장미에서 현저히 감소하였다(표 1). 즉 K84를 처리한 장미에서 형성된 혹의 크기는 대조구에서 형성된 혹의 3~4%, 그리고 생체중은 2~8% 이었다. 길항균 K84에 의한 줄기에서 혹 형성 억제의 정도는 길항균 처리시기, 즉 병원균 접종 1 시간 전처리나 1 시간 후처리에 차이가 없었다. 이 병주율을 가지고 계산한 K84처리의 장미 뿌리혹병 방제가는 92~94%로 계산되었다.

뿌리에서 *A. radiobacter* K84에 의한 혹 형성 억제는 줄기에서보다 억제정도는 낮았지만 모두 통계적으로 유의차가 인정되는 억제능력을 보여 주었다(표 2). 병원균인

Table 1. Suppression of gall formation on shoots of rose by *Agrobacterium radiobacter* K84[a)]

Treatment	Gall size (mm)	Fresh weight of gall (g)	% of plants with galls	Index of crown gall biocontrol (%)[b)]
Control (At156)[c)]	15.1 ± 1.91 a[f)]	1.94 ± 0.28 a	85 ± 5 a	-
K84 + At156[d)]	0.63 ± 0.29 b	0.05 ± 0.06 b	6.7 ± 2.9 b	92.1
At156 + K84[e)]	0.57 ± 0.06 b	0.16 ± 0.03 b	5 ± 0 b	94.1

[a)]The galls on plants were determined 3 months after inoculation.

[b)]100%-[(% of plants with galls in treatment x 100)/(% of plants with galls in control)].

[c)]Bacterial suspension of *A. tumefaciens* At156 was sprayed on shoots of rose on which 4~5 wounds were made by razor blade.

[d)]Bacterial suspension of At156 was sprayed one hour after *A. radiobacter* K84 spray.

[e)]Bacterial suspension of K84 was sprayed one hour after At156 spray.

[f)]mean ± standard deviation. Different letters mean that treatments are significantly different by Duncan's multiple range test.

Table 2. Suppression of gall formation on roots of rose by *Agrobacterium radiobacter* K84[a]

Treatment	Gall size (mm)	% of plants with galls	Index of crown gall biocontrol (%)[b]
Control (At156)[c]	9.54 ± 1.33 a[f]	93.0 ± 6.7 a	-
K84 + At156[d]	3.36 ± 1.8 b	45.0 ± 15.4 b	51.6
At156 + K84[e]	2.12 ± 0.72 b	37.8 ± 11.6 b	59.4

[a]The galls on plants were determined 3 months after inoculation.
[b]100%-[(% of plants with galls in treatment×100)/(% of plants with galls in control)].
[c]Roots of rose were dipped in bacterial suspension of *A. tumefaciens* At156 for 5 min. after 4~5 wounds were made by razor blade on roots of rose.
[d]Roots of rose were dipped in bacterial suspension of At156 one hour after treatment of *A. radiobacter* K84.
[e]Roots of rose were dipped in bacterial suspension of K84 one hour after treatment of At156.
[f]mean ± standard deviation. Different letters mean that treatments are significantly different by Duncan's multiple range test.

At156 균주만 접종한 장미의 경우 전체의 93%의 장미의 뿌리에 혹이 형성되었으나, 길항균 K84를 병원균 접종 1시간 전이나 후에 처리한 경우 각각 전체의 45% 그리고 37%의 장미의 뿌리에 혹이 형성되었다. 형성된 혹의 크기도 길항균 K84를 처리한 장미에서 형성된 혹의 크기가 병원균만 접종한 뿌리에 형성된 혹의 3분의 1 정도이었다(표 2). 줄기에서 혹 형성억제 실험에서와 마찬가지로 K84 처리시기와 혹 형성억제정도와는 상관관계가 없었다. 즉 길항균 K84의 병원균 At156 접종 1시간 전처리와 1시간 후처리 사이에 혹 형성억제 정도에 차이가 없었다. 혹 형성비율을 가지고 계산한 K84처리의 뿌리에서 장미 뿌리혹병 방제가는 51~59%로 계산되었다.

본 연구의 결과는 길항균 K84 현탁액 처리가 장미의 줄기와 뿌리에서 병원균에 의한 혹 형성을 크게 억제함을 보여 주었다. 혹 형성 억제 정도는 뿌리에서보다 줄기에서 우수함을 보여주었다. 즉 줄기에서의 뿌리혹병 방제가는 90% 이상이었으나 뿌리에서는 50% 정도로 뿌리에서의 방제가가 상대적으로 낮게 나타났다. Penyalver와 Lopez (1999)는 복숭아와 아몬드의 hybrid를 가지고 수행한 실험에서 *A. radiobacter* K84가 뿌리에서 혹 형성이 100% 방제됨을 보여주었다. 본 연구의 결과 뿌리에서의 50% 방제가는 Penyalver와 Lopez(1999)의 결과보다 현저히 낮은데, 이 차이는 Penyalver와 Lopez의 실험의 경우에는 병원균을 뿌리에 직접 접종하지 않고 토양에 접종하고, 오염된 토양에서 뿌리혹병의 발생주율로 계산한 반면 본 연구에서는 병원균 현탁액에 뿌리를 직접 침지하여 접종하였으므로 본 연구에서 사용한 접종법이 훨씬 더 강력한 접종법으로 방제가가 낮게 나타난 원인으로 판단된다. 또한 본 실험에서 사용한 병원균의 농도는 10^8 cells/ml로서 Penyalver와 Lopez(1999)의 실험의 경우 토양 1 g당 10^6 CFU의 병원세균을 접종하고, K84는 10^9 CFU/ml로 처리하였다. 이러한 점을 감안한다면 본 연구에서 뿌리에서의 혹병 방제가가 낮은 것이 아니며, 특히 줄기에서 90% 이상의 방제가를 보인 것은 K84균주가 뿌리혹병의 방제에 매우 효과적임을 알 수 있다.

본 연구에서 길항균의 처리시기 즉 줄기와 뿌리에서 모두 병원균을 접종하기 1시간 전에 길항균을 처리한 경우와 1시간 후에 길항균을 처리한 경우사이에 혹 형성억제 능력의 차이는 나타나지 않았다. 이 결과는 병원균 접종과 길항균 처리사이에 시간 간격이 한 시간이므로 접종된 병원균이 상처의 접종부위에서 감염이 완전히 이루어지기 전에 길항균이 처리되어 병원균 접종 후 처리된 길항균이 효과적으로 혹 형성을 억제 한 것으로 생각된다.

뿌리혹병은 넓은 범위의 기주를 가지며 일부 기주에서는 그 피해가 매우 심한 병이다. 미국에서는 세균에 의한 병 중에서 그 피해가 두 번째로 많은 병으로 보고되어있다 (Kennedy & Alcorn, 1980). 우리 나라의 경우에도 뿌리혹병의 발생이 점차 증가하는 추세이지만, 이 병에 대한 방제가 거의 이루어지지 않고 있다. 뿌리혹병은 화학물질에 의한 방제가 효과가 없으며 *A. radiobacter* K84 또는 개선된 균주인 K1026에 의한 생물적 방제가 가장 효과적인 방제법으로 잘 알려져 있으며, 이 균주들이 세계 여러 나라에서 생물농약으로 사용되고 있다. 우리 나라에서도 최근 미생물농약의 등록이 가능하게되었고 다양한 미생물 농약이 개발되고 있다. 뿌리혹병의 방제를 위해서 우리 나라에서 자체적으로 K84와 같은 길항균을 분리하고자 하는 시도는 계속되어야하지만 뿌리혹병 자체가 외국으로부터 도입된 병으로 보고되어있으므로 미생물 생태적인 관점에서 뿌리혹병 병원균인 *A. tumefaciens*에 대한 *A. radiobacter* K84와 같은 강력한 길항균이 우리 나라에 존재하지 않을 가능성을 배제할 수 없다. 이러한 점과 함께 최근 뿌리혹병의 발생이 증가하는 추세이고 이 병에 대한 실용적인 방제대책이 없는 점을 감안한다면 앞으로 뿌리혹병의 방제에 K84 균주 또는 개선된 K1026 균주의 사용을 적극 검토하여야 할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 소속 충북대학교 첨단원예기술개발센타(RRC)의 연구비 지원에 의해 수행되었다.

인용문헌

Agrious, G.N. (1997) Plant Pathology, 4th ed., Acade-

mic press, San Diego, U. S. A. pp.438~441.

Jones, D., M.H. Ryder, B.G. Clare, S.K. Farrand and A. Kerr (1988) Construction of a Tra-deletion mutant of pAgK84 to safeguard the biological control of crown gall. Mol. Gen. Genet. 212:207~214.

Kennedy, B.W. and S.M. Alcorn (1980) Estimates of USA crop losses to prokaryotic plant pathogens. Plant Dis. 64:674~676.

Kerr, A. (1972) Biological control of crown gall: seed inoculation. J. Appl. Bact. 35:493~497.

Kerr, A. and K. Htay (1974) Biological control of crown gall through bacteriocin production. Physiological Plant Pathology 4:37~44.

Lee, Y.K., D.K. Kim, S.H. Choi and J.S. Cha (2000) First report on crown gall of oriental melon caused by *Agrobacterium tumefaciens* in Korea. The Plant Pathology Journal 16:352.

McClure, N.C., A.-R. Ahmadi and B.G. Clare (1998) Construction of a range of derivatives of the biological control strain *Agrobacterium rhizogenes* K84: a study of factors involved in biological control of crown gall disease. Appl. and Environ. Microbiol. 64:3977~3982.

Moore, L.W., and G. Warren (1979) *Agrobacterium radiobacter* strain 84 and biological control of crown gall. Annu. Rev. Phytopathol. 17:163~179.

New, P.B. and A. Kerr (1972) Biological control of crown gall: field measurements and glasshouse experiments. J. Appl. Bacteriol. 35:279~287.

Panagopoulos, C.G., P.G. Psallidas and A.S. Alivizatos (1979) Evidense of a breakdown in the effectiveness of biological control of crown gall. In: Schippers, B., and W. Gams (eds) Soil-borne plant pathogens. Academic Press, London, pp.569~578.

Penyalver, R. and M.M. Lopez (1999) Cocolonization of the rhizosphere by pathogenic *Agrobacterium* strains and nonpathogenic strains K84 and K1026, used for crown gall biocontrol. Appl. and Environ. Microbiol. 65:1936~1940.

Vicedo, B., R. Penalver, M.J. Asins and M.M. Lopez (1993) Biological control of *Agrobacterium tumefaciens*, colonization, and pAgK84 transfer with *Agrobacterium radiobacter* K84 and tra⁻ mutant strain K1026. Appl. and Eiviron. Microbiol. 59:309~315.

Webster, J., M.D. Santos and J.A. Thomson (1986) Agrocin-producing *Agrobacterium tumefaciens* strain active against grapevine isolates. Appl. and Environ. Microbiol. 52:217~219.

강수웅, 권진혁, 김동길, 김희규 (1997) 시설재배 단고추 (*Capsicum annuum* L. var. grossum Bailey)에서 뿌리혹병(根頭癌腫病)의 발생. 한국식물병리학회지 13:367~369.

이영희 (1996) 우리 나라의 외래 식물병 현황과 대책. 농산물수출입과 식물검역, pp.87~99. 서울대학교 농업개발연구소.

조용섭 (1999) 식물세균병학. 서울대학교출판부, pp.323~327.

한국식물병리학회 (1998) 한국식물병목록.

Biological control of crown gall disease on rose by *Agrobacterium radiobacter* K84

Kwang-Hoon Park and Jae-Soon Cha*(*Department of Agricultural Biology, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea*)

Abstract : Severe crown gall disease was occurred in green house cultivating rose in Jinchen, Chungbuk recently. Although it causes problem on rose cultivation, the growers do not have many choices of control measures for the disease now. *Agrobacterium radiobacter* K84 has been known as a strong antagonist against *A. tumefaciens*, a pathogen causing crown gall disease, and used as a biopesticide for crown gall in many countries since it had been introduced in 1972. We tested control activity of *A. radiobacter* K84 for the crown gall disease on rose. Spray of *A. radiobacter* K84 suspension on above ground of rose either before or after pathogen spray reduced size and fresh weight of galls significantly. Size and fresh weight of galls on roses inoculated with pathogen either before *A. radiobacter* K84 spray (pathogen-K84 treatment) or after *A. radiobacter* K84 spray (K84-pathogen treatment) were 4 to 5% of those of galls on roses inoculated pathogen only. Disease incidence of plants inoculated pathogen only was 85% whereas disease incidence of pathogen-K84 or K84-pathogen treatments were 6.7% and 5.0% respectively. Dipping of roots of rose in suspension of *A. radiobacter* K84 was also reduced size of galls and diseased rate significantly. These results indicate that *A. radiobacter* K84 is effective in the prevention of gall formation by *A. tumefaciens* and it can be used to control of crown gall disease of rose.

---

*Corresponding author (Fax : +82-43-271-4414, E-mail : jscha@chungbuk.ac.kr)