

***Agrobacterium larrymoorei*와 *A. tumefaciens*에 의한 벤자민고무나무 뿌리혹병**이영기\* · 황혜경 · 황태호 · 명인식 · 구한모<sup>1</sup> · 차재순<sup>2</sup>농업과학기술원 농업생물부 식물병리과, <sup>1</sup>공주대학교 산업과학대학 식물자원과,<sup>2</sup>충북대학교 농업생명환경대학 식물외과**Crown Gall of Weeping Fig Caused by *Agrobacterium larrymoorei* and *A. tumefaciens***Young Kee Lee\*, Hye Kyung Hwang, Tae Ho Hwang, Inn Shik Myung,  
Han Mo Koo<sup>1</sup> and Jae Soon Cha<sup>2</sup>Plant Pathology Division, Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Science  
and Technology, RDA, Suwon 441-707, Korea<sup>1</sup>Department of Plant Resources, College of Industrial Science, Kongju National University, Yesan 340-702, Korea<sup>2</sup>Department of Plant Medicine, College of Agriculture, Life and Environment Sciences,  
Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

(Received on September 18, 2006)

Crown gall on lower stem of weeping fig (*Ficus benjamina* Roxb.) was first observed at Daejeon in 2003. Tumors were about 15 cm in size and semi-round with rough surface texture of dark brown color. Two virulent isolates among ten bacteria isolated from the tumor tissues were characterized. Their colonies were convex, glistening, circular with an entire edge, and white or tannish cream in color on potato dextrose agar supplemented with 0.5% CaCO<sub>3</sub>. They were rod shape with peritrichous flagellae, gram-negative, aerobic growth, oxidase-positive, and grew on DIM agar. The isolates were identified as *Agrobacterium larrymoorei* and *A. tumefaciens* based on biochemical and physiological characteristics, fatty acid profiles and substrate utilization patterns. Seedlings of some host plants excepting grapevine produced typical galls two to three weeks after inoculation with cell suspensions of the virulent strains. This is the first report on crown gall of weeping fig in Korea.

**Keywords :** *Agrobacterium larrymoorei*, *A. tumefaciens*, Crown gall, *Ficus benjamina*, Weeping fig

*Rhizobiaceae*과에 속하는 *Agrobacterium*속은 병원성에 근거한 인위분류, 종과 속수준의 계통분류 및 자연분류를 병행하여 5종(*A. tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *A. vitis*, *A. rubi*, *A. larrymoorei*)으로 분류·명명되었으나 최근, *Rhizobium*속으로 재분류되고 있다(Kerstens와 De Ley, 1984; Sawada 등, 1993; Young 등, 2001). 이 세균은 전 세계적으로 분포하고 있으며 식물체, 토양, 물 등 다양한 환경에서 분리된다. 병원성 *Agrobacterium* 세균은 90과 이상의 쌍자엽식물을 가해(DeCleene과 De Ley, 1976)하여 식물체에

혹병이나 털뿌리병을 일으킨다. 고무나무속에서는 1919년 미국의 Florida Everglades 지역에서 *Ficus aurea*의 뿌리에 큰 혹이 형성되었다는 보고(Galloway, 1919)와 벤자민고무나무의 가지에 혹이 자연발생 되었다는 보고(Chase, 1987)가 있었지만 병원균에 대하여 정확하게 기록한 자료는 없었다. Bouzar 등(1995)은 1991년 미국의 Florida 지역의 육묘장에서 재배된 벤자민고무나무의 가지와 전정 상처부위에서 생장한 혹으로부터 *Agrobacterium* 세균을 분리하여 분류학적 근거를 처음 제시하였다. 비병원성 균주는 *A. tumefaciens*로 확인되었으나 병원성 균주는 기존에 보고된 종과 전혀 다른 새로운 계통임을 확인하였다. 이후 다양한 분류학적 검토를 거쳐 기존에 보고된 종과 다른 새로운 *A. larrymoorei* 세균으로 명명하였다

\*Corresponding author

Phone) +82-31-290-0426, Fax) +82-31-290-0406

E-mail) youngki@rda.go.kr

(Bouzar와 Jones, 2001). 유럽에서는 1991년 이탈리아 살레노에 있는 육묘장과 1996년 이탈리아 라티나에 있는 가정집, 1997년 네덜란드 아넘에서 벤자민고무나무의 뿌리혹병이 처음 발생되었으며 이들 발생지역에서 분리한 일부의 세균들은 *A. tumefaciens*로 확인되었으나 나머지 세균들은 Bouzar 등(1995)이 보고한 *A. larrymoorei*와는 특성이 전혀 다른 새로운 종이나 계통의 발생 가능성을 제시하였다(Zoina 등, 2001).

벤자민고무나무(*Ficus benjamina* L.)는 뽕나무과(*Moraceae*), 고무나무속(*Ficus* L.)에 속하는 식물로서 인도와 말레이시아가 원산지이다. 다양한 환경조건에서도 적응이 잘되며 증식과 재배가 용이할 뿐만 아니라 병해충에도 강한 식물로서 열대지방에서는 녹음수 또는 가로수로 이용되며 우리나라와 같은 온대지방에서는 온실 관엽식물로 많이 이용된다(윤, 1989). 국내에서도 일부지역의 농가에서 재배하고 있는 벤자민고무나무에서 뿌리혹병이 발생하였다는 소문은 있었지만 발병에 직접 관련된 병원균에 대한 연구보고는 없었다. 2003년 저자들은 대전광역시 유성구에 소재하는 화훼판매점의 벤자민고무나무에서 뿌리혹병의 발생을 확인하였다. 따라서 본 연구는 벤자민고무나무에서 분리된 병원성 *Agrobacterium* 종들의 분류학적 위치를 결정하고 균학적 특성을 조사하여 방제의 기초자료로 활용하고자 하였다. 현재 *Agrobacterium* 속의 분류·명명에 다양한 논란이 있지만 본 연구에서는 병원성에 기초한 인위분류(Kerstens와 De Ley, 1984)와 Young 등(2001)에 의해 사용된 자연·계통분류 방식을 부분적으로 적용하였다.

## 재료 및 방법

**세균분리 및 병원성검정.** 벤자민고무나무의 줄기에 발생한 2개의 혹을 채집하여 세균을 분리하였다. 채집한 혹은 수돗물로 표면을 깨끗이 씻어내고 70% 에틸알콜과 1% 차아염소산나트륨( $\text{NaOCl}$ )으로 표면 소독 후 멸균증류수로 3회 씻고 건조시켰다. 소독된 혹 조직의 표면을 메스로 잘라내고 내부에 있는 유조직을 5 mm 정도의 크기로 잘라 0.5 ml의 멸균증류수가 들어 있는 Eppendorf tube에 넣고 살균된 메스를 이용하여 마쇄 후 실온에서 30분 정도 두었다. 전처리된 현탁액은 0.5%  $\text{CaCO}_3$ 가 첨가된 potato dextrose agar(PDA, Difco) 배지와 DIM agar 배지(Perry와 Kado, 1982)에 각각 도말하였으며 28°C에서 2~5일간 배양하면서 콜로니의 형태, 색상, 생육속도, 발생빈도 등을 고려하여 *Agrobacterium*과 유사한 콜로니를 선별하여 순수분리 과정을 거쳤다. 분리된 세균은 10% 글

리세룰에 현탁하여 -70°C 초저온 냉동고에 장기 보존하였으며, 실험에 사용된 균주들은 0.5%  $\text{CaCO}_3$ 가 첨가된 PDA 사면배지에 배양 후 4°C 냉장고에 유지하였다.

분리한 세균의 병원성은 벤자민고무나무(*Ficus benjamina*) 유묘를 이용하여 확인하였다. 모래에 삼목하여 뿌리가 발생한 유묘를 원예용상토(바로커, 서울바이오(주))가 담긴 포트(직경 10.5 cm, 높이 8.5 cm)에 이식하여 본엽이 4~5매 완전히 전개되었을 때 접종용으로 사용하였다. 분리균은 0.5%  $\text{CaCO}_3$ 가 첨가된 PDA 배지에 도말하여 28°C에서 24시간 배양 후 멸균증류수에 현탁하여 농도( $\text{OD}_{600\text{nm}} \approx 0.1$ )를 조절하였으며 유묘의 줄기하부에 상처를 내고 10  $\mu\text{l}$ 씩 접종하였다. 접종부위를 비닐로 감싸고 25°C로 조절된 습실상(상대습도, 100%)에 24시간 둔 후 온실에 유지하면서 혹 형성 정도를 조사하였다.

**병원세균의 동정.** 분리한 10개 균주 중 벤자민고무나무의 줄기에 접종하여 병원성이 확인된 3계통(YK6109, YK6110, YK6112)의 균주 중에서 2계통(YK6110, YK6112)의 균주를 실험에 사용하였다. 표준균주로 사용한 *A. tumefaciens* KACC10736은 한국농용미생물보존센터(KACC, Korean Agricultural Culture Collection)에서 분양 받아 사용하였다. 병원균의 형태는 0.1% uranyl acetate로 염색하여 투과전자현미경으로 관찰하였으며 배양적, 생리·생화학적 특성은 Schaad 등(2001)의 방법에 따라 조사하였다. 세균의 속명을 결정하기 위하여 그람반응, 호기적생장, DIM agar 배지와 40°C에서 생장유무를 조사하였다. 또한 종명을 결정하기 위하여 ketolactose 생산, pH 7.0에서 운동성, 2% NaCl과 35°C 생장, litmus milk 반응, 산과 알칼리 생성, ferric ammonium citrate 반응, oxidase 반응, citrate 이용유무를 조사하였다. 부가적으로 PDA- $\text{CaCO}_3$  (Bouzar와 Jones, 1992)와 mannitol- $\text{CaCO}_3$  배지(Bouzar 등, 1995) 상에서 산 생산 유무를 조사하였다.

**탄소원 이용성 분석.** Tryptic soy agar(TSA) 배지에 도말하여 28°C에서 24시간 배양한 세균을 채취하여 0.85% 생리식염수 용액에 넣고 현탁하여  $3 \times 10^8$  CFU/ml 농도로 조절하였다. 세균 현탁액을 각각 GN2 MicroPlate™ (Biolog, Inc., Hayward, Calif.)의 96 well에 150  $\mu\text{l}$ 씩 분주하였으며 28°C에서 24시간 배양 후 MicroLog™ 3-Automated Microstation system을 이용하여 탄소원 산화여부를 조사하였으며 MicroLog Gram-negative database(ver. 4.02)와 연결하여 동정하였다.

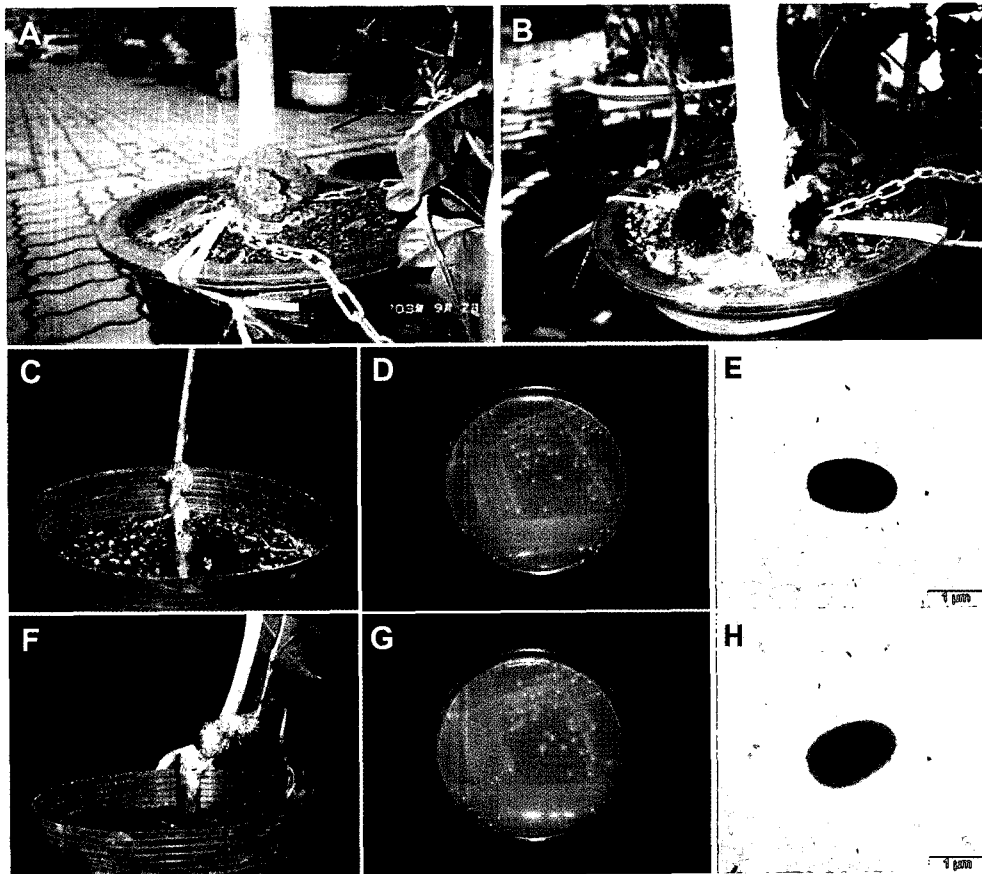
**지방산함량 분석.** 병원성이 확인된 세균을 TSA 배지에 도말하여 28°C에서 24시간 배양된 균을 4 루프 정도 취하여 시험관(직경 1.3 cm, 높이 10 cm)에 옮긴 후 Miller(1982)의 방법에 따라 지방산을 추출하였으며 MIDI

(Microbial ID, Inc., Newark, DE) GC system을 이용하여 분석하였다. 각 균주의 동정과 지방산 조성은 MIDI Library ver. TSBA 3.90과 Library Generation system software(ver. 3.90)을 이용하여 분석하였다.

**기주범위 조사.** 병원균의 기주범위는 *Agrobacterium*속의 병원성검정에 흔히 이용되거나 국내 발생이 많은 기주식물인 국화(*Dendranthema grandiflorum* cv. 'Lerbin'), 담배(*Nicotiana tabacum* cv. 'Samson'), 당근(*Daucus carota* cv. 'Sunhongbom 5 chon'), 장미(*Rosa hybrida* cv. 'Red Sandra'), 토마토(*Lycopersicon esculentum* cv. 'Seogwang'), 포도나무(*Vitis vinifera* cv. 'Kyoho'), 호박(*Cucurbita moschata* cv. 'Jangsootozwa')을 이용하여 조사하였다. 담배, 당근, 토마토, 호박은 원예용 상토(바로커, 서울바이오(주))가 담긴 포트(직경 10.5 cm, 높이 8.5 cm)에 종자를 직접 파종하였고 국화, 장미, 포도나무는 삼목하였으며 모든 식물체는 본엽이 4~5매 완전히 전개된 유묘를 사용하였다. 접종은 병원성 검정방법에 준하여 실시하였다.

## 결과 및 고찰

**세균분리 및 병원성검정.** 2003년 9월 대전광역시 유성구에 소재하는 화훼판매점의 화분에 심겨진 벤자민고무나무의 줄기에서 뿌리혹병의 발생을 확인하였다. 혹의 크기가 15 cm 정도로 크고 균열되어 있었으며 표면이 거칠고 갈변된 타원형이었다(Fig. 1A). 혹을 절단하였을 때 내부는 부분적으로 부패되고 썩어 있었으며 일부의 조직은 유백색으로 건전조직과 유사하였다(Fig. 1B). 혹으로부터 분리된 세균들 중에서 YK6110 균주는  $\text{CaCO}_3$ 가 첨가된 PDA 배지에서 생장이 양호하였으며 둥글면서 볼록하고 반짝이면서 다소 푹고 진한 크림색이었다(Fig. 1D). 반면 YK6112 균주는 YK6110 균주에 비해 다소 옅은 크림색이었다(Fig. 1G). 분리된 10개의 균주를 벤자민고무나무의 줄기에 상처접종하였을 때 5개 균주(YK6109, YK6110, YK6111, YK6112, YK6114)는 2~4주 내에 접종부위에서 유백색의 혹을 형성하였으며 시간이 지남에 따라 혹의 표



**Fig. 1.** Symptoms of crown gall naturally formed on lower stem of weeping fig (A, B), and galls developed 4 weeks after artificial inoculation with *Agrobacterium tumefaciens* YK6110 (C) and *A. larrymoorei* YK6112 (F) on lower stem of weeping fig. Colonies of *A. tumefaciens* YK6110 (D) and *A. larrymoorei* YK6112 (G) on PDA supplemented with 0.5%  $\text{CaCO}_3$ . Transmission electron micrographs of *A. tumefaciens* YK6110 (E) and *A. larrymoorei* YK6112 (H).

면이 갈변되었으며 종이나 계통에 따른 형태적 차이는 없었다(Fig. 1C, F). 병원성이 확인된 5개 균주는 3가지 계통(YK6109, YK6110, YK6112)이었으며 비병원성으로 확인된 균주는 *A. tumefaciens*로 확인되었다. 본 연구에서 확인된 벤자민고무나무의 혹은 3가지 계통의 병원균에 의하여 발생된 것으로 확인하였으며 비병원성균이 공존하고 있는 것으로 생각되었다.

**병원세균의 동정.** 3가지 계통의 병원균 중 현재까지 보고된 *Agrobacterium*종과 일치하지 않는 YK6109균주를 제외한 2가지 계통(YK6110, YK6112)의 병원균에 대하여 분류학적 특성을 조사하였다. 병원균의 형태를 투과전자현미경으로 조사한 결과, 2종류의 세균은 다수의 편모를 가진 간균이었으나 형태적으로 차이가 있었다(Fig. 1E, H). 모든 세균은 그람 음성이며 호기적으로 성장하였으며 DIM agar에서도 성장하였다. King's medium B(KB)에서 형광색소나 yeast extract-dextrose-CaCO<sub>3</sub>(YDC) 또는 nutrient-broth yeast extract agar(NBY)에서 노란색이나 옐렌지색의 콜로니도 생성하지 않았으며, 40°C에서 성장하

지 않았다(Table 1). 뿌리혹병균의 계통간 특성을 비교하기 위하여 3-ketolactose 생산 등 15가지의 생리·생화학적 반응을 조사한 결과, 2 균주 모두 운동성이 있었으며, 2% NaCl과 35°C에서 생장이 가능하였고, litmus milk에서 알칼리 활성을 나타냈으며, oxidase 반응이 양성인 반면, CaCO<sub>3</sub>가 첨가된 배지에서 산을 생성하지 않았으며, erythritol 첨가배지에서 산생성, malonic acid, tartaric acid와 mucic acid 첨가배지에서 알칼리 생성은 음성이었으며 citrate를 이용하지 못하였다. YK6110과 YK6112 균주의 가장 큰 차이는 3가지 반응에서 나타났다. YK6110 균주는 3-ketolactose와 melezitose가 첨가된 배지에서 산을 생성하였으며 ferric ammonium citrate 반응이 양성인 반면, YK6112 균주는 3가지 반응이 모두 음성이었다(Table 1).

배양적, 생리·생화학적 반응과 같은 표현형적 특성들은 세균의 속이나 종을 분류하는 중요한 특성이다. 본 연구에서 동정된 병원성 세균들은 Schaad 등(2001)이 분류한 병원성 *Agrobacterium*속과 모든 특성이 일치하였다.

**Table 1.** Reaction of present weeping fig isolates and reference strains to biochemical and physiological tests

Characteristics	Present isolates		<i>A. tumefaciens</i> KACC10736	<i>A. larrymoorei</i> <sup>a</sup>
	YK6110	YK6112		
Gram positive	- <sup>b</sup>	-	-	-
Grows aerobically	+	+	+	+
Colonies yellow or orange on YDC or NBY	-	-	-	ND
Fluorescent pigment on KB	-	-	-	ND
Growth on DIM agar	+	+	+	ND
Growth at 40°C	-	-	-	ND
3-Ketolactose production	+	-	+	-
Acid-clearing on:				
PDA-CaCO <sub>3</sub>	-	-	-	v
Mannitol-CaCO <sub>3</sub>	-	-	-	+
Motility at pH 7.0	+	+	+	ND
Growth in 2% NaCl	+	+	+	+
Growth at 35°C	+	+	+	-
Action on litmus milk	ALK	ALK	ALK	ALK
Acid from:				
Erythritol	-	-	-	ND
Melezitose	+	-	+	ND
Alkali from:				
Malonic acid	-	-	-	-
Tartaric acid	-	-	-	+
Mucic acid	-	-	-	ND
Ferric ammonium citrate	+	-	+	-
Oxidase reaction	+	+	+	+
Citrate utilization	-	-	-	-

<sup>a</sup>Data from Bouzar *et al.* (1995) and Bouzar & Jones (2001).

<sup>b</sup>+, positive; -, negative; v, variable; ALK, alkaline; ND, not determined.

주요 생리·생화학적 특성에 있어서 YK6110 균주는 Schaad 등(2001)이 분류한 *A. tumefaciens* 및 대조균주로 사용한 *A. tumefaciens* KACC10736와 동일한 반응을 나타내었으므로 *A. tumefaciens*로 분류함에 무리가 없었다. YK6112 균주는 기존에 보고된 전형적인 *A. larrymoorei*(Bouzar

등, 1995; Bouzar와 Jones, 2001)와 몇 가지 반응에서 차이가 있었지만 3-ketolactose를 생산하지 못한다는 점, melezitose로부터 산이 생성되지 않는다는 점과 ferric ammonium citrate 반응이 음성이었다는 점에서 *A. larrymoorei*로 동정하는 것이 타당할 것으로 생각되었다.

**Table 2.** Differential oxidation of substrates by present isolates and reference strains in Biolog GN MicroPlate

Substrate	Present isolates		<i>A. tumefaciens</i> KACC10736	<i>A. larrymoorei</i> <sup>a</sup>
	YK6110	YK6112		
Glycogen	+ <sup>b</sup>	+	+	+
Tween 40/80	+	+	+	-
<i>N</i> -Acetyl- <i>D</i> -galactosamine	+	-	-	-
<i>N</i> -Acetyl- <i>D</i> -glucosamine	+	+	+	+
<i>i</i> -Erythritol	-	-	+	-
$\alpha$ - <i>D</i> -Lactose	+	+	+	-
Lactulose	+	+	+	+
<i>D</i> -Melibiose	+	+	+	+
$\beta$ -Methyl- <i>D</i> -glucoside	+	+	+	-
<i>D</i> -Raffinose	+	+	+	-
Xylitol	+	+	+	+
Acetic acid	+	+	+	-
<i>cis</i> -Aconitic acid	+	+	+	-
Citric acid	+	+	-	-
Formic acid	-	+	+	-
<i>D</i> -Galactonic acid lactone	+	+	+	-
<i>D</i> -Gluconic acid	+	+	+	-
<i>D</i> -Glucosaminic acid	-	-	-	-
<i>D</i> -Glucuronic acid	+	-	+	-
$\alpha$ -Hydroxybutyric acid	+	+	+	v
$\beta$ -Hydroxybutyric acid	+	-	+	-
$\alpha$ -Ketobutyric acid	+	+	+	v
$\alpha$ -Ketoglutaric acid	-	+	+	-
Malonic acid	-	-	-	-
Propionic acid	+	-	+	v
<i>D</i> -Saccharic acid	-	+	-	+
Succinamic acid	-	+	+	-
<i>D</i> -Alanine	+	+	-	-
Glycyl- <i>L</i> -aspartic acid	+	+	+	-
Hydroxy- <i>L</i> -proline	+	-	+	-
<i>L</i> -Leucine	+	-	+	-
<i>L</i> -Pyroglutamic acid	+	-	+	-
<i>L</i> -Threonine	+	+	+	+
<i>D,L</i> -Carnitine	-	-	+	-
$\gamma$ -Aminobutyric acid	+	-	+	-
Uronic acid	+	+	+	-
Inosine	+	+	-	-
Glycerol	+	+	+	+
$\alpha$ - <i>D</i> -Glucose-1-phosphate	+	+	+	+
<i>D</i> -Glucose-6-phosphate	+	+	+	+

<sup>a</sup>Data from Bouzar *et al.* (1995).

<sup>b</sup>+, positive; -, negative; v, variable.

**탄소원 이용 양상.** 병원성 균주의 탄소원 이용 양상은 GN2 MicroPlate™을 이용하여 조사하였으며 95가지 기질 중에서 41가지 기질에 대한 반응을 비교하였다. Biolog 동정 시스템에서 YK6110 균주는 배양 24시간 후 *A. tumefaciens*와 100%의 확률로 61.6%의 유사도를 나타낸 반면 YK6112 균주는 38.8%의 낮은 유사도를 나타냈다. 모든 균주는 glycogen, *N*-acetyl-D-glucosamine, lactulose, D-melibiose, xylitol, L-threonine, glycerol,  $\alpha$ -D-glucose-1-phosphate, D-glucose-6-phosphate를 이용하였으나 D-glucosaminic acid와 malonic acid는 이용하지 못했다. YK6110 균주와 YK6112 균주는 대조균으로 사용한 *A. tumefaciens* KACC10736와 탄소원 이용양상이 유사하였다. 그러나 YK6110 균주는 YK6112 균주에 비해 대조균 주로 사용한 *A. tumefaciens* KACC10736과 탄소원 이용양상이 아주 유사하였으며 *A. larrymoorei*와는 차이가 많았다. YK6112 균주는 비록 YK6110 및 *A. tumefaciens* KACC10736과 탄소원 이용양상이 유사하였지만 *A. larrymoorei*와도 유사한 점이 많았다(Table 2).

Biolog 시스템은 탄소원 이용양상을 비교하여 세균을 신속하고 편리하게 동정할 수 있다. *Agrobacterium*속 세균에 있어서도 이 기기를 이용하여 중간 또는 새로운 종을 유용하게 분류한 보고들이 있다(Bouzar 등, 1993, 1995). 탄소원 대사반응은 종간에 뚜렷이 구별되는데 *A. rubi* 계통을 제외할 경우, hydroxy-L-proline은 *A. tumefaciens*만 이용하고, *i*-erythritol은 *A. rhizogenes*만 이용한다는 점이 가장 큰 특징이다. 또한 대부분의 *A. tumefaciens*는 propionic acid, D-glucuronic acid, glucose-1-phosphate, glucose-6-

phosphate, glycyl-L-aspartic acid, acetic acid를 이용하는 반면, *A. larrymoorei*는 타 *Agrobacterium* 종이 이용하는 탄소원도 산화시키지만 *cis*-aconitic acid를 산화시키지 못한다는 점이 가장 큰 특징이며 다른 몇 가지 탄소원 이용양상도 다른 점이 있다(Bouzar 등, 1993, 1995). 본 연구에서 YK6110 균주는 hydroxy-L-proline을 이용하였을 뿐만 아니라 propionic acid, D-glucuronic acid, glucose-1-phosphate, glucose-6-phosphate, glycyl-L-aspartic acid, acetic acid를 이용하였다는 점에서 *A. tumefaciens*로 동정하는 것이 타당하다. YK6112 균주는 비록 *cis*-aconitic acid, glucose-1-phosphate, glucose-6-phosphate, glycyl-L-aspartic acid, acetic acid를 이용하였지만 hydroxy-L-proline, propionic acid, D-glucuronic acid를 이용하지 못하였으므로 *A. larrymoorei*로 동정하는 것이 타당할 것으로 사료되었다.

**지방산 조성.** 병원성 균주간의 지방산 조성비교는 MIDI 시스템의 분석 결과를 이용하여 비교하였다. YK6110 균주는 *A. tumefaciens*와 84.8%의 유사도를 나타냈으며 *A. rubi*와도 66.6%의 유사도를 나타냈다. 반면 YK6112 균주는 *A. tumefaciens*와 74.3%의 유사도를 나타냈으며 *A. rubi*와도 42.8%의 유사도를 나타냈다. 2계통의 병원균은 지방산 조성비율에서 상당한 차이가 있었지만 *A. larrymoorei* (Bouzar 등, 1995)와 유사하였다. YK6110은 YK6112 균주에 비해 cyclopropane 계통의 lactobacillic(19:0 cyclo<sub>ω8</sub>cis), hydroxy acid 계통의 3-hydroxypalmitic acid(16:0 3OH)와 unsaturated acid 계통의 palmitoleic acid(16:1<sub>ω7</sub>cis) 함량비율이 상대적으로 높았다. YK6112 균주는 타 균주들에 비해 saturated acid 계통의 palmitic acid(16:0)와 unsaturated

**Table 3.** Fatty acid composition of present isolates and reference strains

Fatty acid <sup>a</sup>	Present isolates		<i>A. tumefaciens</i> KACC10736	<i>A. larrymoorei</i> <sup>b</sup>
	YK6110	YK6112		
Saturated acid				
14:0	tr <sup>c</sup>	tr	tr	ND
16:0	8.9 ± 0.1	10.8 ± 0.2	7.8 ± 0.1	8.1 ± 0.6
Unsaturated acid				
16:1 <sub>ω7</sub> cis	3.3 ± 0.1	2.8 ± 0.2	2.1 ± 0.1	6.2 ± 0.2
18:1 <sub>ω7</sub> cis	70.4 ± 2.5	74.0 ± 0.9	73.0 ± 0.6	71.0 ± 1.4
Branched acid				
19:0 10 methyl	tr	tr	tr	tr
Cyclopropane				
19:0 cyclo <sub>ω8</sub> cis	3.0 ± 0.6	tr	4.6 ± 0.5	2.5 ± 0.6
Hydroxy acid				
16:0 3OH	4.0 ± 0.5	2.9 ± 0.2	3.6 ± 0.2	4.1 ± 0.2

<sup>a</sup>Fatty acid data were mean percent of three replications.

<sup>b</sup>Data from Bouzar *et al.* (1995).

<sup>c</sup>tr, trace amounts (<2.0%) detected; ND, not determined.

acid 계통의 *cis*-vaccenic acid(18:1<sub>ω7</sub>*cis*) 함량이 높았으며 cyclopropane 계통의 lactobacillic(19:0 cyclo<sub>ω8</sub>*cis*)과 hydroxy acid 계통의 3-hydroxypalmitic acid(16:0 3OH) 함량비율이 상대적으로 낮았다(Table 3).

전형적인 *Agrobacterium* 세균은 *cis*-vaccenic acid(18:1<sub>ω7</sub>*cis*)의 함량이 매우 높게 나타나는 것이 특징이며 3-hydroxypalmitic acid(16:0 3OH)와 15:0 iso 3OH 함량비율은 종을 구분하는 주요 성분이다. 또한 종에 따라 3-hydroxymyristic acid(14:0 3OH), palmitic acid(16:0)와 lactobacillic(19:0 cyclo<sub>ω8</sub>*cis*) 등의 지방산도 가지고 있다(Bouzar 등, 1993). 일부의 *A. tumefaciens*에서 유사한 경향이 있지만(Bouzar 등, 1993) 표준 *A. larrymoorei*는 타 *Agrobacterium* 계통에 비해 palmitoleic acid(16:1<sub>ω7</sub>*cis*) 함량이 상대적으로 높다. 본 실험에서도 벤자민고무나무에서 분리된 병원성 *Agrobacterium* 세균들은 전체 지방산 함량의 약 70~74%가 *cis*-vaccenic acid(18:1<sub>ω7</sub>*cis*)로 타 지방산에 비해 월등히 높았으며 3-hydroxypalmitic acid(16:0 3OH)나 palmitic acid(16:0) 함량은 종이나 계통별로 차이가 있었지만 *Agrobacterium* 속으로 분류함에 문제가 없었다. 그러나 YK6112 균주는 표준 *A. larrymoorei*와는 특성이 상당히 다른 계통으로 생각되었다.

**기주범위.** 2계통의 병원성 균주를 6가지 식물의 줄기와 당근의 뿌리에 상처접종하여 병원성 차이를 비교하였다. 2개 균주의 병원성 반응은 유사하였으며 포도나무에서는 혹이 형성되지 않았다. YK6110 균주는 대체로 병원성이 약했으나 호박에는 병원성이 강했다. YK6112 균주는 당근과 토마토에 병원성이 강했으며 대조균주로 사용한 *A. tumefaciens*는 모든 식물에 병원성이 있었으며 식물종류에 따라 혹 형성정도에 차이가 있었다(Table 4).

병원성 *Agrobacterium*속 세균은 90과 이상의 쌍자엽식물을 가해(DeCleene과 De Ley, 1976) 하여 식물체에 혹

이나 털뿌리를 형성할 수 있다. *A. tumefaciens*는 다양한 기주식물에서 분리되며 기주범위가 넓은 반면 *A. larrymoorei*는 주로 벤자민고무나무에서 분리된다. 식물체에 털뿌리를 형성하는 *A. rhizogenes*를 제외한 나머지 *Agrobacterium* 종들은 분리된 기주뿐만 아니라 다른 식물에서도 동일한 병징을 일으킬 수 있으므로 병원성에 근거하여 종을 분류하기는 어렵다. 본 연구에서도 2개 균주 모두 포도나무에는 병원성이 없었지만 다양한 식물에서 혹을 형성하였으므로 기주식물에 대한 병원성반응으로는 종을 구별할 수 없었다.

결론적으로 벤자민고무나무의 혹에서 분리된 YK6110 균주는 배양적, 생리·생화학적특성, 탄소원 이용양상, 지방산 조성 및 함량비율, 기주범위 등의 표현형적 특성에 근거하였을 때 *A. tumefaciens*로 동정되어야 한다. YK6112 균주는 표현형적 특성에서 전형적인 *A. larrymoorei*(Bouzar 등, 1995; Bouzar와 Jones, 2001)와 차이가 있었으며 *A. tumefaciens*와도 유사한 특성이 많아 정확한 종명을 결정할 수는 없었다. 그러나 추가적으로 실시한 16S rDNA 유전자 염기서열분석 결과를 표준균주들과 비교하였을 때 YK6112 균주는 *A. larrymoorei* 3-10<sup>T</sup>(Z30542)와 99.8%의 염기서열 상동성으로 유연관계가 높았다. 동일 속내 다른 종들과는 94.2~98.2%로 유연관계가 상대적으로 낮았다(자료 미제시). 따라서 YK6112 균주는 *A. larrymoorei*로 동정되어야 한다. 이상의 결과로 벤자민고무나무의 혹 조직에서 분리된 2가지 계통의 병원균은 *A. larrymoorei*와 *A. tumefaciens*로 동정되었다. *Agrobacterium*속에 의한 벤자민고무나무 뿌리혹병은 국내에서 처음 보고되는 것이며, *A. larrymoorei* 또한 처음 보고되는 종이다.

## 요 약

2003년 대전광역시 유성구에서 벤자민고무나무의 줄기에 뿌리혹병이 발생하였다. 혹은 15 cm 정도의 크기로 표면이 거칠고 갈변된 타원형이었다. 혹 조직으로부터 *Agrobacterium*과 유사한 세균을 분리하였으며 벤자민고무나무의 유묘에 접종하여 혹을 형성한 5개 균주 중에서 2가지 계통에 대하여 분류학적 특성을 조사하였다. 0.5% CaCO<sub>3</sub>가 첨가된 PDA 배지에서 성장된 병원성 세균들은 등굴고 볼록하면서 광택이 나는 크림색 계통이었다. 모든 균주는 다수의 편모를 가진 간상의 세균으로 그람음성이었으며 호기적으로 성장하면서 DIM agar에서도 성장하였다. 병원성 세균들은 대조균주와 상이한 특성을 가지고 있었으나 주요 생리·생화학적특성, 탄소원 이용양상, 지방산조성 분석 결과에 근거하여 *A. larrymoorei*와 *A.*

**Table 4.** Pathogenicity of present isolates and reference strain to seven plants<sup>a</sup>

Plant	Present isolates		<i>A. tumefaciens</i> KACC10736
	YK6110	YK6112	
Carrot	++ <sup>b</sup>	+++	++
Chrysanthemum	+	+	++
Grapevine	-	-	++
Rose	++	++	+
Squash	+++	++	+++
Tabacco	+	+	+++
Tomato	++	+++	+++

<sup>a</sup>Pathogenicity was investigated 4 weeks after artificial inoculation.

<sup>b</sup>Gall size: -, 0 mm; +, <5 mm; ++, 5~10 mm; +++, >10 mm.

*tumefaciens*로 동정되었다. *A. larrymoorei*와 *A. tumefaciens*는 포도를 제외한 타 기주식물에서도 병원성이 있었다. 국내에서 *A. larrymoorei*와 *A. tumefaciens*에 의한 벤자민 고무나무의 뿌리혹병은 본 연구에서 처음 보고된다.

## 참고문헌

- Bouzar, H. and Jones, J. B. 1992. Distinction of biovar 2 strains of *Agrobacterium* from other chromosomal groups by differential acid production. *Lett. Appl. Microbiol.* 15: 83-85.
- Bouzar, H. and Jones, J. B. 2001. *Agrobacterium larrymoorei* sp. nov., a pathogen isolated from aerial tumours of *Ficus benjamina*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1023-1026.
- Bouzar, H., Chilton, W. S., Nesme, X., Dessaux, Y., Vaudequin, V., Petit, A., Jones, J. B. and Hodge, N. C. 1995. A new *Agrobacterium* strain isolated from aerial tumors on *Ficus benjamina* L. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 65-73.
- Bouzar, H., Jones, J. B. and Hodge, N. C. 1993. Differential characterization of *Agrobacterium* species using carbon-source utilization patterns and fatty acid profiles. *Phytopathology* 83: 733-739.
- Chase, A. R. 1987. *Compendium of ornamental foliage plant diseases*. APS Press, St. Paul, Minn.
- DeCleene, M. and De Ley, J. 1976. The host range of crown gall. *Bot. Rev.* 41: 389-466.
- Galloway, B. T. 1919. Giant crown galls from the Florida Everglades. *Phytopathology* 9: 207-208.
- Kerstens, K. and De Ley, J. 1984. Genus *Agrobacterium*. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 1. by Krieg, N. R. and Holt, J. G., eds., pp. 244-254. The Williams and Wilkins, Baltimore.
- Miller, L. T. 1982. Single derivatization method for routine analysis of bacterial whole-cell fatty acid methyl esters, including hydroxy acids. *J. Clin. Microbiol.* 16: 584-586.
- Perry, K. L. and Kado, C. I. 1982. Characteristics of Ti plasmids from broad-host-range and ecologically specific biotype 2 and 3 strains for *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 151: 343-350.
- Sawada, H., Ieki, H., Oyaizu, H. and Matsumoto, S. 1993. Proposal for rejection of *Agrobacterium tumefaciens* and revised descriptions for the genus *Agrobacterium* and for *Agrobacterium radiobacter* and *Agrobacterium rhizogenes*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43: 694-702.
- Schaad, N. W., Jones, J. B. and Chun, W. 2001. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*, 3rd ed. APS Press, St. Paul, Minn. 373 pp.
- Young, J. M., Kuykendall, L. D., Martinez-Romero, E., Kerr, A. and Sawada, H. 2001. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 89-103.
- 윤평섭. 1989. 한국원예식물도감. 지식산업사. pp. 658-659.
- Zoina, A., Raio, A., Peluso, R. and Spasiano, A. 2001. Characterization of agrobacteria from weeping fig (*Ficus benjamina*). *Plant Pathology* 50: 620-627.