

## *Agrobacterium rubi*와 *A. tumefaciens*에 의한 국화 뿌리혹병

이영기\* · 박경석 · 황혜경 · 황태호 · 김진영<sup>1</sup> · 이재국<sup>2</sup> · 차재순<sup>3</sup>

농업과학기술원 농업생물부 식물병리과, <sup>1</sup>경기도농업기술원, <sup>2</sup>농업과학기술원 농업생물부 농업해충과,  
<sup>3</sup>충북대학교 농업생명환경대학 식물위학과

### Crown Gall of Chrysanthemum Caused by *Agrobacterium rubi* and *A. tumefaciens*

Young Kee Lee\*, Kyung Seok Park, Hye Kyung Hwang, Tae Ho Hwang,  
Jin Young Kim<sup>1</sup>, Jae Kook Lee<sup>2</sup> and Jae Soon Cha<sup>3</sup>

Plant Pathology Division, Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Science  
and Technology, RDA, Suwon 441-707, Korea

<sup>1</sup>Gyeonggi-do Agricultural Research and Extension Services, Hwasung 445-972, Korea

<sup>2</sup>Entomology Division, Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Science  
and Technology, RDA, Suwon 441-707, Korea

<sup>3</sup>Department of Plant Medicine, College of Agriculture, Life and Environment Sciences,  
Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea

(Received on September 18, 2006)

Crown gall on lower stem and root of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* Kitamura) was observed at Hwasung and Gumi in 2001 and 2004, respectively. Tumors were semi-round with rough surface texture of dark brown color. Nine isolates inducing gall formation on lower stem of chrysanthemum among twenty isolates from the tumor tissues were characterized. Their colonies were convex, glistening, circular with an entire edge and whitish or tannish cream in color on potato dextrose agar supplemented with 0.5% CaCO<sub>3</sub>. The virulent isolates were rod-shaped with peritrichous flagellae, gram negative, aerobic and growing on D1M agar. Among nine virulent isolates, one isolate was identified as *Agrobacterium rubi* and eight isolates were *A. tumefaciens* based on biochemical and physiological characteristics, fatty acid profiles and substrate utilization patterns. *A. tumefaciens* had strong pathogenicity and broad host range compared with *A. rubi*. This is the first report on crown gall of chrysanthemum in Korea. To our knowledge, crown gall of chrysanthemum caused by *A. rubi* is first report in this study worldwide.

**Keywords :** *Agrobacterium rubi*, *A. tumefaciens*, Chrysanthemum, Crown gall, *Dendranthema grandiflorum*

*Agrobacterium*속은 *Proteobacteria*강, alpha-2 subclass, *Rhizobiales*목, *Rhizobiaceae*과에 속하는 세균으로 식물체, 토양, 물 등 다양한 환경조건에서 분리된다. 이 속에 속하는 세균들은 분리되는 지역이나 환경조건에 따라 다양한 균학적 성질을 가지고 있으며 동일종이라도 병원균과 비병원균이 동시에 존재하여 분류학적으로 가장 논란이 많았던 세균의 일종이다. 세균의 학명이 제안된 초기

에는 식물체에 대한 병원성 유무와 병징에 따라 4종으로 분류되었는데 기주식물에 혹을 형성하는 균은 *A. tumefaciens*, 털뿌리를 형성하는 균은 *A. rhizogenes*, 비병원성균은 *A. radiobacter*, 주로 *Rubus* sp.에 혹을 형성하는 균은 *A. rubi*로 분류·명명하였다(Allen과 Holding, 1974; Skerman 등, 1980). 그러나 *A. rubi*를 제외한 3종은 종내 또는 종간에서 다른 특성을 가진 계통이 존재하여 인위분류체계에 대한 문제점이 지적되어왔다. 이후 병원성에 근거한 인위분류, 속수준의 계통분류 및 자연분류 방법을 병행하여 5종(*A. tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *A. vitis*, *A. rubi*, *A. larrymoorei*)으로 분류·명명하였으나 최근 분자생물학에

\*Corresponding author  
Phone) +82-31-290-0426, Fax) +82-31-290-0406  
E-mail) youngki@rda.go.kr

의한 분류학의 발달로 콩과식물에 근류혹을 형성하는 세균과 통합하여 *Rhizobium*속으로 재분류되고 있다(Kerstens와 De Ley, 1984; Sawada 등, 1993; Young 등, 2001).

국화에서 뿌리혹병과 관련하여 1907년 Smith와 Townsend가 처음으로 국화의 혹 형성은 세균과 관련된 것으로 확인하였으나 자연적으로 발생하는 병원균에 대한 자료는 알려지지 않았다. 이후 국화에 자연발생한 혹은 *A. tumefaciens*에 의한 것이라는 보고가 남아프리카공화국(van Zyl 등, 1986), 뉴질랜드(New와 Milne, 1976), 미국(Bush와 Pueppke, 1991; Miller, 1975), 이탈리아(Bazzi 등, 1989), 일본(Ohta와 Nishiyama, 1984) 등에서 보고되었다. 또한 *A. vitis*도 국화에서 분리되었다는 보고가 있다(Bazzi와 Rosciglione, 1982).

국내에서 국화는 전체 절화류 재배면적(2,597 ha)의 31%와 분화류 재배면적(1,288 ha)의 4%로서 전국적으로 재배되고 있으며 연생산액이 1,130억원에 달하고 있는 가장 중요한 화훼작물 중의 하나다(농림부, 2006). 저자들은 2001년 경기도 화성시에 소재하는 농가에서 재배된 국화의 줄기에서 뿌리혹병의 발생을 처음 확인하였다(Lee 등, 2003). 그 후 2004년 경상북도 구미시에서 생육이 불량한 국화의 뿌리에서 뿌리혹병의 발생을 재확인하였으며 현재까지 국화재배지에서 산발적으로 뿌리혹병의 발생이 확인되고 있다. 본 연구는 화성시와 구미시에서 국화의 뿌리혹병을 일으킨 병원성 *Agrobacterium*종들의 분류학적 위치를 결정하고 세균학적 특성을 조사하여 방제의 기초 자료로 활용코자 하였다. 현재 *Agrobacterium*속의 분류·명명에 다양한 논란이 있지만 본 연구에서는 병원성에 기초한 인위분류(Kerstens와 De Ley, 1984)와 Young 등(2001)에 의해 제안된 자연·계통분류 방식을 부분적으로 적용하였다.

## 재료 및 방법

**세균분리 및 병원성검정.** 국화의 줄기와 뿌리에 발생한 10개의 신선한 혹을 채집하여 세균을 분리하였다. 채집한 혹은 수돗물로 표면을 깨끗이 씻어내고 70% 에틸알콜과 1% 차아염소산나트륨(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 마쇄한 후 실온에서 30분 정도 두었다. 전처리된 현탁액을 0.5% CaCO<sub>3</sub>가 첨가된 potato dextrose agar(PDA, Difco) 배지와 D1M agar 배지(Perry와 Kado, 1982)에 각각 도말하였으며 28°C에서

2~5일간 배양하면서 콜로니의 형태, 색상, 생육속도, 발생 빈도 등을 기준으로 *Agrobacterium*과 유사한 콜로니를 선별하여 순수분리 과정을 거쳤다. 분리된 세균은 10% 글리세롤에 현탁하여 -70°C 초저온 냉동고에 장기 보존하였으며, 실험에 사용한 균주들은 0.5% CaCO<sub>3</sub>가 첨가된 PDA 사면배지에 배양 후 4°C 냉장고에 유지하였다.

분리세균의 병원성은 국화(*Dendranthema grandiflorum* cv. Lerbin) 유묘를 이용하였다. 원예용상토(바로커, 서울바이오(주))가 담긴 포트(직경 10.5 cm, 높이 8.5 cm)에 5 cm 정도의 삼수를 삼목하여 본엽이 4~5매 완전히 전개되었을 때 접종용으로 사용하였다. 병원균은 0.5% CaCO<sub>3</sub>가 첨가된 PDA 배지에 도말하여 28°C에서 24시간 배양 후 멸균증류수에 현탁하여 농도(OD<sub>600nm</sub> ≈ 0.1)를 조절하였으며 유묘의 줄기하부에 상처를 내고 10 μl씩 접종하였다. 접종부위를 비닐로 감싸고 25°C로 조절된 습실상(상대습도, 100%)에 24시간 둔 후 온실에 유지하면서 혹 형성 정도를 조사하였다.

**병원세균의 동정.** 분리한 20개 균주 중에서 국화의 줄기에 접종하여 병원성이 확인된 9개의 병원성 균주를 실험에 사용하였다. Type A(YK3505, YK3508, YK3510, YK3512, YK3524, YK3536)와 type C(YK3529)에 속하는 7개의 균주는 국화의 줄기혹에서 분리한 균주이며, type B(YK6136, YK6138)에 속하는 2개의 균주는 국화의 뿌리에서 분리한 것이다. 표준균주로 사용한 *A. tumefaciens* KACC10736과 *A. rubi* KACC10739는 한국농용미생물보존센터(KACC, Korean Agricultural Culture Collection)에서 분양 받아 사용하였다. 병원성 균주의 형태는 0.1% uranyl acetate로 염색하여 투과전자현미경으로 관찰하였다. 배양적, 생리·생화학적 특성은 Schaad 등(2001)의 방법에 따라 조사하였으며 부가적으로 PDA-CaCO<sub>3</sub>(Bouzar와 Jones, 1992)와 mannitol-CaCO<sub>3</sub> 배지(Bouzar 등, 1995) 상에서 산 생산 유무를 조사하였다.

**탄소원 이용성 분석.** Tryptic soy agar(TSA) 배지에 도말하여 28°C에서 24시간 배양 후 면봉을 이용하여 채취한 균을 0.85% 생리식염수 용액에 넣고 현탁하여 3×10<sup>8</sup> CFU/ml 농도로 조절하였다. 세균 현탁액을 각각 GN2 MicroPlate™(Biolog, Inc., Hayward, Calif.)의 96 well에 150 μl씩 분주하였으며 28°C에서 24시간 배양 후 MicroLog™ 3-Automated Microstation system을 이용하여 탄소원 산화 여부를 조사하였으며 MicroLog Gram-negative database (ver. 4.02)와 연결하여 동정하였다.

**지방산함량 분석.** 병원성이 확인된 세균을 TSA 배지에 도말 후 28°C에서 24시간 배양한 다음 4 루프 정도의량을 시험관(직경 1.3 cm, 높이 10 cm)에 옮긴 후 Miller

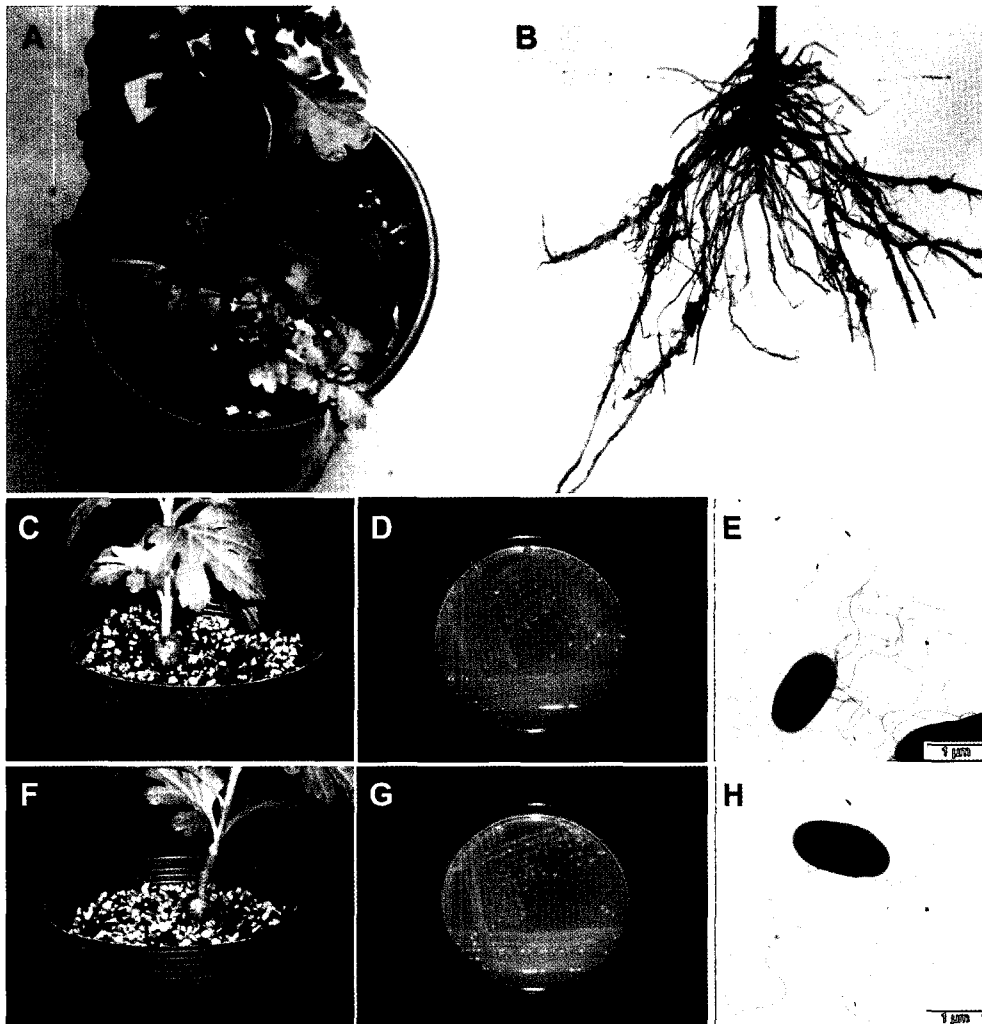
(1982)의 방법에 따라 지방산을 추출하였으며 MIDI (Microbial ID, Inc., Newark, DE) GC system을 이용하여 분석하였다. 각 균주의 지방산 조성은 MIDI Library ver. TSBA 3.90과 Library Generation system software(ver. 3.90)를 이용하여 분석하였다.

**기주범위 조사.** 기주범위 결정은 *Agrobacterium* 세균의 발병에 용이한 국화(*Dendranthema grandiflorum* cv. 'Lerbin'), 담배(*Nicotiana tabacum* cv. 'Samson'), 당근(*Daucus carota* cv. 'Sunhongbom 5 chon'), 장미(*Rosa hybrida* cv. 'Redsandra'), 토마토(*Lycopersicon esculentum* cv. 'Seogwang'), 포도나무(*Vitis vinifera* cv. 'Kyoho'), 호박(*Cucurbita moschata* cv. 'Jangsootozwa')을 이용하였다. 담배, 당근, 토마토, 호박은 원예용 상토(바로키, 서울바이

오(주))가 담긴 포트에 종자를 직접 파종하였고 국화, 장미, 포도나무는 삽목 하였으며 모든 식물체는 본엽이 4~5매 전개되었을 때 접종용으로 이용하였다. 병원성검정과 동일한 방법으로 접종 후 혹 형성 정도를 조사하였다.

### 결과 및 고찰

**세균분리 및 병원성검정.** 2001년 4월 경기도 화성시에서 포트재배된 국화의 줄기에 0.1% 정도 뿌리혹병이 발생하였으며 혹의 크기는 2 cm 정도였다(Fig. 1A). 2004년 3월에는 경상북도 구미시에서 재배된 국화의 뿌리에 뿌리혹병이 5% 정도 발생하였으며 혹의 크기는 0.5 cm 정도였다(Fig. 1B). 뿌리와 줄기에 형성된 혹의 모양과 색



**Fig. 1.** Symptoms of crown gall naturally formed on stem (A) and root (B) of chrysanthemum, and galls developed 4 weeks after artificial inoculation with *Agrobacterium tumefaciens* YK3505 (C) and *A. rubi* YK3529 (F). Colonies of *A. tumefaciens* YK3505 (D) and *A. rubi* YK3529 (G) on PDA supplemented with 0.5% CaCO<sub>3</sub>. Transmission electron micrographs of *A. tumefaciens* YK3505 (E) and *A. rubi* YK3529 (H).

은 상이하였으나 표면이 거칠고 갈변된 타원형이었다. 이들 흑으로부터 분리된 세균들 중에서 *A. tumefaciens*에 속하는 균들은  $\text{CaCO}_3$ 가 첨가된 PDA 배지에서 생장이 양호하였으며 둥글면서 볼록하고 반짝이면서 다소 뭉고 진한 크림색이었다(Fig. 1D). 반면 *A. rubi*에 속하는 균주는 생장이 다소 느렸으며 점질성이 강하면서 윤기가 나는 열은 크림색이었다(Fig. 1G). 분리된 20개의 균주를 국화의 줄기에 상처 접종하였을 때 9개 균주는 2~4주내에 접종 부위에서 유백색의 전형적인 흑을 형성하였으며 시간이 지남에 따라 흑의 표면이 갈변되었으며 형성된 흑은 균주계통이나 종류에 관계없이 유사하였다(Fig. 1C, 1F).

**병원세균의 동정.** 16시간 정도 배양된 병원성 세균들을 투과전자현미경으로 관찰하였을 때, 모든 세균은 다수의 편모를 가진 간균이었으며 type A와 B에 속하는 균들은 type C 균주보다 편모가 많았다(Fig. 1E, 1H). 모든 세균들은 그람 음성이면서 호기적으로 성장하였으며 DIM agar에서도 성장하였다. King's medium B(KB)에서 형광

색소를 생성하지 않았으며 yeast extract-dextrose- $\text{CaCO}_3$  (YDC) 또는 nutrient-broth yeast extract agar(NBY)에서 노란색이나 오렌지색의 콜로니도 생성하지 않았다. Type B에 속하는 2개 균주는  $40^\circ\text{C}$ 에서도 성장하였다(Table 1). 뿌리혹병균의 종명을 결정하기위하여 3-ketolactose 생산 등 15가지의 생리·생화학적 특성을 조사한 결과, 모든 균주는 2% NaCl에서 성장하였고 litmus milk에서 알칼리 활성을 나타냈으며 oxidase 반응이 양성인 반면,  $\text{CaCO}_3$ 와 erythritol이 첨가된 배지에서는 산을 생성하지 않았으며, tartaric acid와 mucic acid가 첨가된 배지에서는 알칼리를 생성하지 않았다. Type A와 type B에 속하는 8개 균주는 3-ketolactose 생산, pH 7.0에서 운동성,  $35^\circ\text{C}$  성장, melezitose로부터 산 생성, ferric ammonium citrate 반응이 양성으로 대조균주로 사용한 *A. tumefaciens* KACC10736과 동일한 반응을 보였으며 type A에 속하는 4개 균주(YK3505, YK3510, YK3524, YK3536)는 citrate를 이용하였다. Type C에 속하는 1개의 균주는 malonic acid가 첨

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

Characteristics	Present isolates			<i>A. tumefaciens</i> KACC10736	<i>A. rubi</i> KACC10739
	Type A (n=6) <sup>a</sup>	Type B (n=2)	Type C (n=1)		
Gram positive	- <sup>b</sup>	-	-	-	-
Grows aerobically	+	+	+	+	+
Colonies yellow or orange on YDC or NBY	-	-	-	-	-
Fluorescent pigment on KB	-	-	-	-	-
Growth on DIM agar	+	+	+	+	+
Growth at $40^\circ\text{C}$	-	+	-	-	-
3-Ketolactose production	+	+	-	+	-
Acid-clearing on:					
PDA- $\text{CaCO}_3$	-	-	-	-	-
Mannitol- $\text{CaCO}_3$	-	-	-	-	-
Motility at pH 7.0	+	+	+	+	-
Growth in 2% NaCl	+	+	+	+	+
Growth at $35^\circ\text{C}$	+	+	-	+	-
Action on litmus milk	ALK	ALK	ALK	ALK	ALK
Acid from:					
Erythritol	-	-	-	-	-
Melezitose	+	+	-	+	-
Alkali from:					
Malonic acid	-	-	+	-	+
Tartaric acid	-	-	-	-	-
Mucic acid	-	-	-	-	-
Ferric ammonium citrate	+	+	-	+	-
Oxidase reaction	+	+	+	+	+
Citrate utilization	v	-	-	-	-

<sup>a</sup>No. of bacterial isolates tested.

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

가된 배지에서 알칼리를 생성하였으나 3-ketolactose 생산과 35°C 성장, melezitose로부터 산생성, ferric ammonium citrate 반응이 음성으로서 대조균주로 사용한 *A. rubi* KACC10739와 동일한 반응을 보였으나 pH 7.0에서 운동성이 있었다(Table 1).

배양적, 생리·생화학적 특성과 같은 표현형적 반응들

은 세균의 속이나 종을 분류하는 중요한 특성이다. 본 연구에서 동정된 병원성 세균들은 Schaad 등(2001)이 분류한 병원성 *Agrobacterium*속과 특성이 일치하였다. *Agrobacterium*속에 속하는 대부분의 세균은 40°C에서 생장이 불가능한데 type B에 속하는 2개의 균주는 40°C에서도 생장이 가능하였다. 이러한 특성은 분리된 지역이나

**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. rubi</i> KACC10739
	Type A (n=6) <sup>a</sup>	Type B (n=2)	Type C (n=1)		
Glycogen	v <sup>b</sup>	+	+	+	-
Tween 40	v	v	+	+	+
Tween 80	+	+	+	+	+
<i>N</i> -Acetyl-D-galactosamine	v	+	-	-	-
<i>N</i> -Acetyl-D-glucosamine	+	+	-	+	-
<i>i</i> -Erythritol	-	-	-	+	-
D-Melibiose	+	+	-	+	+
D-Raffinose	+	+	-	+	-
Xylitol	+	+	+	+	+
Acetic acid	+	+	+	+	+
<i>cis</i> -Aconitic acid	+	+	+	+	-
Citric acid	-	-	-	-	-
Formic acid	+	+	+	+	-
D-Galactonic acid lactone	+	+	-	+	+
D-Gluconic acid	+	+	-	+	+
D-Glucosaminic acid	v	-	-	-	+
D-Glucuronic acid	-	+	-	+	-
$\alpha$ -Hydroxybutyric acid	+	v	-	+	-
$\beta$ -Hydroxybutyric acid	+	+	+	+	-
$\alpha$ -Ketobutyric acid	+	+	-	+	-
$\alpha$ -Ketoglutaric acid	-	-	-	+	-
Malonic acid	-	-	+	-	+
Propionic acid	+	+	-	+	-
D-Saccharic acid	-	-	-	-	+
Succinamic acid	v	-	-	+	-
D-Alanine	-	-	+	-	+
Glycyl-L-aspartic acid	+	+	+	+	-
Hydroxy-L-proline	+	+	-	+	-
L-Leucine	-	v	-	+	-
L-Pyroglutamic acid	+	+	+	+	-
L-Threonine	+	+	+	+	+
D,L-Carnitine	-	-	-	+	-
$\gamma$ -Aminobutyric acid	v	+	-	+	-
Uronic acid	+	+	+	+	+
Inosine	+	+	+	-	-
$\alpha$ -D-Glucose-1-phosphate	+	+	-	+	-
D-Glucose-6-phosphate	+	+	-	+	-

<sup>a</sup>No. of bacterial isolates tested.

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

기주식물에 따른 균주의 특성으로 봐야 할 것이다. 주요 생리·생화학적 특성에 있어서도 type A와 type B는 Schaad 등(2001)이 분류한 *A. tumefaciens*와 대조균주로 사용한 *A. tumefaciens* KACC10736과 동일한 반응을 나타내었으므로 *A. tumefaciens*로 분류함에 무리가 없었다. Type C에 속하는 1개의 균주는 pH 7.0에서 운동성이 있었다는 점을 제외하고는 기존에 보고된 문헌의 결과들(Bouzar 등, 1995; Sawada와 Ieki, 1992)과 대조균주로 사용한 *A. rubi* KACC10739와 모든 특성이 유사하였으므로 *A. rubi*로 동정하는 것이 타당하다.

**탄소원 이용 양상.** Biolog 동정 시스템에서 type A에 속하는 6개 균주는 배양 24시간 후 *A. tumefaciens*와 74~100%의 확률로 51.3~78.4%의 유사도를 나타냈으며, type B에 속하는 2개 균주는 *A. tumefaciens*와 87~100%의 확률로 63.1~82.0%의 유사도를 나타낸 반면 type C에 속하는 1개 균주는 *A. tumefaciens*와 32.3%의 낮은 유사도를 나타냈다. Type A와 B는 대조균주로 사용한 *A. tumefaciens* KACC10736과 type C는 *A. rubi* KACC10739와 기질의 산화반응이 유사하였다. Type A와 B 균주간에는 glycogen, *N*-acetyl-D-galactosamine, D-glucosaminic acid, D-glucuronic acid,  $\alpha$ -hydroxybutyric acid, succinamic acid, L-leucine,  $\gamma$ -aminobutyric acid 이용면에서 type A와 *A. tumefaciens* KACC10736 사이에는 glycogen, tween 40, *N*-acetyl-D-galactosamine, *i*-erythritol, D-glucosaminic acid, D-glucuronic acid,  $\alpha$ -ketoglutaric acid, succinamic acid, L-leucine, D,L-carnitine,  $\gamma$ -aminobutyric acid, inosine 이용면에서 type B와 *A. tumefaciens* KACC10736 균주간에는 tween 40, *N*-acetyl-D-galactosamine, *i*-erythritol,  $\alpha$ -hydroxybutyric acid,  $\alpha$ -ketoglutaric acid, succinamic acid, L-leucine, D,L-carnitine, inosine 이용면에서 서로 다른 반응을 나타냈다. Type C와 *A. rubi* KACC10739는 glycogen, D-melibiose, *cis*-aconitic acid, formic acid, D-galactonic acid lactone, D-gluconic acid, D-glucosaminic acid,  $\beta$ -hydroxybutyric acid, D-saccharic acid, glycyl-L-aspartic acid, L-pyroglutamic acid, inosine 이용에서 차이가 있었다(Table 2).

*Agrobacterium*속 세균에 있어서 Biolog 시스템을 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. rubi*는 D-glucuronic

acid, glucose-1-phosphate, glucose-6-phosphate를 이용하지 않는다(Bouzar 등, 1993). 본 연구에서도 type A, B, *A. tumefaciens* KACC10736은 *A. tumefaciens*와 type C, *A. rubi* KACC10739는 *A. rubi*와 유사한 반응을 나타내었으므로 종을 분류함에 특별한 문제는 없다고 본다.

**지방산 조성.** 병원성 균주간의 지방산 조성비교는 MIDI 시스템을 이용하여 비교하였다. Type A에 속하는 6개의 균주는 *A. tumefaciens*와 54.0~90.9%의 유사도를 type B에 속하는 2개의 균주는 *A. tumefaciens*와 84.7~89.0%의 유사도를 나타낸 반면 type C에 속하는 1개 균주는 *A. tumefaciens*와 71.3%의 유사도를 나타냈으며 *A. rubi*와도 64.1%의 유사도를 나타냈다. Type A와 B는 대조균으로 사용한 *A. tumefaciens*와 type C는 *A. rubi*와 지방산조성이 유사하였다. Type A와 B 사이에는 아주 유사한 지방산 조성 비율을 가지고 있었으며, 대조균주로 사용한 *A. tumefaciens*에 비해 hydroxy acid 계통의 3-hydroxypalmitic acid(16:0 3OH) 함량비율이 상대적으로 높은 반면, unsaturated acid 계통의 *cis*-vaccenic acid(18:1<sub>7</sub>*cis*) 함량이 낮았으며 cyclopropane 계통의 lactobacillic(19:0 cyclo<sub>8</sub>*cis*) 함량이 절대적으로 낮았다. Type C에 속하는 균주는 타 균주들에 비해 saturated acid 계통의 palmitic acid(16:0)의 조성비율이 높았으며 *A. rubi*에 비해 unsaturated acid 계통의 *cis*-vaccenic acid(18:1<sub>7</sub>*cis*)의 함량은 높았으나 hydroxy acid 계통의 3-hydroxypalmitic acid(16:0 3OH) 함량비율이 상대적으로 낮았다(Table 3).

전형적인 *Agrobacterium*속 세균은 *cis*-vaccenic acid(18:1<sub>7</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>8</sub>*cis*) 등의 지방산도 가지고 있다(Bouzar 등, 1993). 본 실험에서도 국화에서 분리된 병원성 *Agrobacterium* 세균들은 전체 지방산 함량의 약 72%가 *cis*-vaccenic acid(18:1<sub>7</sub>*cis*)로 타 지방산에 비해 월등히 높았으며 3-hydroxypalmitic acid(16:0 3OH)와 palmitic acid(16:0) 함량은 종이나 type별로 차이가 있었지만 type A와 B는 *A. tumefaciens*, type C는 *A. rubi*와 유사한 지방산 조성을 가지고 있었다.

**기주범위.** 국화에서 분리한 병원성 균주들을 6가지 식물의 줄기와 당근의 뿌리에 상처 접종하여 병원성 차이를 비교하였다. 균주별로 혹 형성 정도에 차이가 있었는데 type A에 속하는 균주들은 포도를 제외한 대부분의 식물체에서 강한 병원성을 나타낸 반면, type B에 속하는 균주들은 type A에 비해 국화, 장미, 호박에서 병원성이

**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. rubi</i> KACC10739
	Type A (n=6) <sup>b</sup>	Type B (n=2)	Type C (n=1)		
Saturated acid					
14:0	tr <sup>c</sup>	tr	tr	tr	tr
16:0	7.9 ± 0.5	7.4 ± 0.2	10.9 ± 0.7	7.8 ± 0.1	9.0 ± 1.1
Unsaturated acid					
18:1 <sub>ω7</sub> cis	72.2 ± 2.1	72.0 ± 4.0	71.5 ± 0.4	73.0 ± 0.6	68.6 ± 1.5
Branched acid					
19:0 10 methyl	tr	tr	tr	tr	tr
Cyclopropane					
19:0 cyclo <sub>ω8</sub> cis	tr	tr	tr	4.6 ± 0.5	tr
Hydroxy acid					
16:0 3OH	4.3 ± 0.7	4.8 ± 0.7	2.4 ± 0.2	3.6 ± 0.2	3.0 ± 0.5

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

<sup>b</sup>No. of bacterial isolates tested.

<sup>c</sup>tr, trace amounts (<2.0%) detected.

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

Plant	Present isolates			<i>A. tumefaciens</i> KACC10736	<i>A. rubi</i> KACC10739
	Type A (n=6) <sup>b</sup>	Type B (n=2)	Type C (n=1)		
Carrot	+++ <sup>c</sup>	+++	+++	++	++
Chrysanthemum	+++~++++	+	++	++	+
Grapevine	+	+	-	++	++
Rose	+++~++++	+~+++	-	+	+++
Squash	+++~++++	+~+++	+	+++	++
Tabacco	+++	+++	+++	+++	++
Tomato	+++	+++	+++	+++	+++

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

<sup>b</sup>No. of bacterial isolates tested.

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

약했다. Type C에 속하는 균주는 당근, 담배, 토마토에 병원성이 강한 반면, 호박에서는 병원성이 약했으며, 장미와 포도나무에서는 병원성이 없었다. 대조균주로 사용한 *A. tumefaciens*와 *A. rubi*는 모든 식물에 병원성이 있었으며 식물종류에 따라 혹 형성정도에 차이가 있었다 (Table 4). 본 연구에서 type C 균주의 병원성은 일부 식물에 제한되어 있었지만 기주식물에 대한 병원성으로 계통이나 종을 구별할 수는 없었다.

이상의 결과로 국화의 혹에서 분리된 병원성 *Agrobacterium* 세균들 중 type A와 B에 속하는 8개 균주는 *A. tumefaciens*로 동정되었다. Type C에 속하는 YK3529 균주는 대조균주로 사용한 *A. rubi* KACC10739와 표현형적 특성이 유사하였다. 또한 추가적으로 실시한 16S rDNA 유전자 염기서열분석에서 YK3529 균주는 표준균주인 *A.*

*rubi* IFO13261<sup>T</sup>(D01259)와 99.4%의 염기서열 상동성으로 유연관계가 높았다. 동일 속내 다른 종들과는 94.4~98.4%로 유연관계가 상대적으로 낮았다(자료 미제시). 따라서 YK3529 균주는 *A. rubi*로 동정되어야 한다. 이상의 결과로 국화에서 분리된 3가지 계통의 병원균은 *A. rubi*와 *A. tumefaciens*로 동정되었다. *Agrobacterium*속에 의한 국화 뿌리혹병은 국내에서 처음 보고되는 것이며, *A. rubi* 또한 처음 보고되는 종이다. 저자들이 조사한 바에 따르면 현재까지 *A. rubi*의 자연발생 기주로 국화는 본 연구에서 처음 보고된다.

## 요 약

2001년 경기도 화성시와 2004년 경상북도 구미시에서

국화의 줄기와 뿌리에 뿌리혹병이 발생하였다. 혹의 모양과 색은 상이하였으나 표면이 거칠고 갈변된 타원형이었다. 혹 조직으로부터 분리한 20개 균주 중 국화의 유묘에 접종하여 혹을 형성한 9개 균주에 대하여 분류학적 특성을 조사하였다. 0.5% CaCO<sub>3</sub>가 첨가된 PDA 배지에서 생장된 콜로니들은 등글고 불록하면서 광택이 나는 크림색이었다. 모든 균주는 다수의 편모를 가진 간상의 세균으로 그람음성이며 호기적으로 생장하였으며 DIM agar에서도 생장하였다. 병원성 세균들은 대조균주와 상이한 특성을 가지고 있었으나 주요 생리·생화학적특성, 탄소원 이용양상, 지방산조성 비교 결과에 근거하여 8개 균주는 *Agrobacterium tumefaciens*로 1개 균주는 *A. rubi*로 동정되었다. *A. tumefaciens* 계통들은 *A. rubi* 계통보다 병원성이 강하였으며 기주범위가 넓었다. 국내에서 *A. tumefaciens*와 *A. rubi*에 의한 국화의 뿌리혹병은 본 연구에서 처음 보고되는 것이며 자연상태에서 *A. rubi*에 의해 국화의 뿌리혹병이 발생한 사례는 전 세계적으로 처음이다.

## 참고문헌

- Allen, O. N. and Holding, A. J. 1974. Genus II. *Agrobacterium* Conn 1942. In: Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed. by Buchannan, R. E. and Gibbons, N. E., eds., pp. 264-267. The Williams and Wilkins, Baltimore.
- Anderson, A. R. and Moore, L. W. 1979. Host specificity in the genus *Agrobacterium*. *Phytopathology* 69: 153-158.
- Bazzi, C. and Rosciglione, B. 1982. *Agrobacterium tumefaciens* biotype 3, causal agent of crown gall in *Chrysanthemum* in Italy. *Phytopathol. Z.* 103: 280-284.
- Bazzi, C., Gozzi, R. and Mazzucchi, V. 1989. Translocation of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 1 in stems of *Chrysanthemum frutescens* L. *Phytopathol. Mediterr.* 28: 28-32.
- 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., 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.
- Bush, A. and Pueppke, S. G. 1991. Characterization of an unusual new strain of *Agrobacterium tumefaciens* from *Chrysanthemum morifolium* Ram. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2468-2472.
- 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.
- Lee, Y. K., Lee, J. H., Kim, J. Y., Cho, W. D. and Cha, J. S. 2003. Occurrence of crown gall of chrysanthemum caused by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Pathol. J.* 19: 332.
- Miller, H. N. 1975. Leaf, stem, crown and root galls induced in chrysanthemum by *Agrobacterium tumefaciens*. *Phytopathology* 65: 805-811.
- 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.
- 농림부. 2006. 2005년 화훼재배현황. 143 pp.
- New, P. B. and Milne, K. S. 1976. Etiology and control of crown gall on potted chrysanthemums. *N. Z. J. Exp. Agric.* 4: 109-115.
- Ohta, K. and Nishiyama, K. 1984. Studies on the crown gall diseases of flower crops. I. Occurrence of the Disease and the characterization of the causal bacterium. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 50: 197-204.
- 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. and Ieki, H. 1992. Phenotypic characteristics of genus *Agrobacterium*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 58: 37-45.
- 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.
- Skerman, V. B. D., McGowan, V. and Sneath, P. H. A. 1980. Approved lists of bacterial names. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30: 225-420.
- Smith, E. F. and Townsend, C. 1907. A plant tumor of bacterial origin. *Science* 25: 671-673.
- van Zyl, F. G. H., Strijdom, B. W. and Staphorst, J. L. 1986. Susceptibility of *Agrobacterium tumefaciens* strains to two agrocin-producing *Agrobacterium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 234-238.
- 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.