

PCR 특이검출에 의한 국내 포도나무 흑병 (*Agrobacterium vitis*) 균주의 신속 분리 및 병원학적, 생화학적 특성 비교

김종군 · 임선화 · 이대성 · 최재율¹ · 윤해근² · 박상현³ · 강성수³ · 강희완*

한경대학교 생물환경·정보통신전문대학원, ¹충남대학교 농업생명과학대학

²농촌진흥청원예연구소, ³천안시농업기술센터

PCR based Rapid Isolation of *Agrobacterium vitis* Strains in Korea and Their Pathogenical and Biochemical Characteristics

Jong-Kun Kim, Sun-Hwa Lim, Dae-Sung Lee, Jae-Eul Choi¹, Hae-Keun Yun², Sang-Hun Park³,
Sung-Su Kang³ and Hee-Wan Kang*

Graduate School of Biotechnology and Information Technology, Hankyong National University,
Ansong 456-749, Korea

¹College of Agriculture, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea

²National Horticultural Research Institute, RDA, Suwon 440-706, Korea

³Agriculture Technology Center, Chonan 330-846, Korea

(Received on March 27, 2006)

Agrobacterium vitis is a causal agent of crown-gall disease on grapevine. Bacterial strains were isolated from crown galls of different grapevine varieties in grapevine farms of Kyungbuk (Kimcheon), Chungbuk (Okcheon), Chungnam (Daejeon, Cheonan) and Kyeonggi (Suwon, Ansong) areas in Korea from 2002 to 2005. Primer sets, Phe A and VirA, which were derived from *pectate lysase* gene and *virA* gene of Ti-plasmid in *A. vitis* were used to detect *A. vitis* strains from crown galls. PheA and VirA primers amplified DNA fragments of 0.25 kb and 0.5 kb from fifty-one bacterial strains. They formed crown galls on grapevine variety, Kyoho, or carrot disks with variable pathogenicity. It was confirmed that the biochemical characteristics of 10 bacterial strains that was strong pathogenicity on grapevine were mostly in agreement with type culture strains of *A. vitis*, showing growth in the presence of 2% NaCl, non-production of acid from melezitose and negative response in production of 3-Ketolactose.

Keywords : *Agrobacterium vitis*, Biochemical characteristics, Crown gall, Grapevine, Pathogenicity, Specific PCR detection

국내의 포도주산단지에는 옥천, 영동, 경산, 천안 순이고 거봉은 충남 입장, 경기안성이 주 산지로서 전국의 60% 이상을 차지하고 있다. 거봉은 당도가 높고, 육질이 연하며 과즙이 많아 재배면적이 증가하는 추세이나 내한성이 약해 중부이북지방에서는 대부분 땅에 묻어 월동한다. 거봉은 포도 흑병균에 대하여 극히 감수성 품종으로 최근 포도 흑병이 심하게 발생하여 7년생 이상의 거봉의 경우는 80% 이상의 감염증상을 보이고 있는 것으로 나타나

농가에서 매우 심한 피해를 보고 있다. 포도 흑병균 (*Agrobacterium vitis*)은 토양 미생물로서 묘목에 의하여 전파되고, 전정 및 줄기의 비틀림에 의한 상처부위로 침입하며 특히 월동을 위하여 포도나무를 땅에 묻을 때 뒤틀림으로 인한 상처를 통하여 침입하여 땅과 접촉된 줄기에서 포도흑병 발생이 많으며 거봉에 대한 심한 감염은 이러한 원인에 기인된다고 생각되고 있다(Park 등, 2000). 포도나무 흑 형성은 포도흑병균이 보유하는 Ti-plasmid에 존재하는 T-DNA가 포도나무 세포내로 전이, 유전체에 삽입되어 T-DNA에 내재한 식물호르몬 생성 유전자가 과 발현함으로써 조직이 비대성장 함으로 원인이

*Corresponding author

Phone) +82-31-670-5420, Fax) +82-31-670-5419

E-mail) kanghw2@hknu.ac.kr

된다(Kahl와 Schell, 1981). 따라서, 유전자 전이가 일어난 감염조직은 화학적, 생물학적 방법에 의한 방제가 불가능함에 따라 감염원의 미리 차단 및 저항성 대목 사용 등의 경종적 방제가 중요하다.

포도나무 뿌리혹병을 일으키는 병원균은 *Agrobacterium radiobacter* pv. *tumefaciens* biotype 3 또는 *A. tumefaciens* biovar(biotype) 3으로 분류하였으며(Burr와 Hurwitz, 1981; Burr와 Katz, 1982; Loubser, 1978; Panagopoulos, 1978), Holmes와 Roberts(1978)는 *A. tumefaciens* biovar(biotype) 3의 strain들을 *A. rubi* 집단에 포함시켰으며, Ophel과 Kerr (1990)는 포도나무에서 분리된 *Agrobacterium* biovar 3의 균주들이 *A. rubi*와는 유전적으로 달라 *A. vitis*로 명명하였다.

국내에서 포도나무 혹병에 관한 연구는 정과 심(1996)이 줄기혹병에 이병된 포도의 혹으로부터 *Agrobacterium* 과 유사한 균주를 분리하여 병원성을 조사한 바 있으나 *A. vitis* 균주의 분포와 포도 대목간의 병원성에 관한 연구는 매우 미흡한 실정이다. *Agrobacterium* 종의 분류는 생화학적, 병원학적 특성에 따라 분류해 왔으나, 최근 분자생물학적 기법이 미생물 분류에 도입되기 시작하였으며 다양한 기법이 미생물의 속, 종, 아종 및 strain type 동정에 이용 분자생물학적 지표가 분류에 있어 중요한 단

서를 제공하고 있다(Louw 등, 1999).

Eastwell 등(1995)은 PCR 특이 primer를 이용한 *A. vitis*의 신속, 고감도 동정법을 개발하여 적용된 바 있다.

본 연구에서는 2002년부터 2005년까지 3년동안 경북, 충북, 충남, 경기지역의 포도재배지로부터 포도혹병반을 채집하였으며 *A. vitis* 특이 검출 PCR primer를 이용, 혹 병원균을 신속, 대량 분리하고 분리균의 병원학적 이화학적 특성을 조사한 결과를 보고한다.

재료 및 방법

공시균주 및 배양

본 실험에 사용된 공시균주는 Table 1과 같다. Type culture로 사용된 LMG *A. vitis* 균주와 다른 종의 *Agrobacterium*은 The Belgian Coordinated Collections of Microorganisms, Laboratory of Microbiology, University of Ghent, Belgium (BCCM/LMG)로부터 분양받아 사용하였으며 YK 균주는 농촌진흥청 식물병리과로부터 분양받아 사용하였다. 세균의 배양은 nutrient agar(NA) 또는 *Agrobacterium* 선택 배지인 AB 배지(Chilton 등, 1974)가 사용되었다.

포도혹병원균 분리 및 병원성검정. 김천, 옥천, 천안입장, 안성, 수원지역의 포도 재배단지로부터 2002년부터

Table 1. Pathological characteristics and PCR based detection of bacterial strains isolated from crown galls of various grapevine varieties in Korea

<i>Agrobacterium</i> strains	Source/Host	Year Isolated	Pathogenicity		Specific primer	
			Grapevine	Carrot	PehA	VirA
1. YK 2800	Korea, RDA		+	+++	+	-
2. YK 2823	Korea, RDA		+++	++	+	-
3. YK 2828	Korea, RDA		++	+	+	+
4. YK 3312	Korea, RDA		++	++	+	-
5. 451	Chungbuck Uni.		+	±	+	-
6. LMG 256	<i>A. vitis</i> Type culture		+++	+	+	+
7. LMG 259	<i>A. vitis</i> Type culture		++	++	+	+
8. LMG262	<i>A. vitis</i> Type culture		++	++	+	+
9. LMG 8750	<i>A. vitis</i> Type culture		+	++	+	+
10. CNU-10	Teajon, Korea/Kyoho	2002	+	+	+	+
11. CNU-12	Teajon, Korea/Kyoho	2002	+	+	+	-
12. CNU-13	Cheonan, Korea/Kyoho	2002	-	++	+	-
13. CNU-15	Cheonan, Korea/Kyoho	2002	++	++	+	-
14. CNU-25	Cheonan, Korea/Kyoho	2002	+	++	+	-
15. HKA-1	Ansung, Korea/Kyoho	2002	+++	++	+	-
16. HKA-2	Ansung, Korea/Kyoho	2002	+	++	+	+
17. HKA-3	Ansung, Korea/Kyoho	2002	+	++	+	-
18. HKA-4	Ansung, Korea/Kyoho	2002	±	++	+	-
19. HKA-5	Ansung, Korea/Kyoho	2002	±	+	+	-
20. HKA-7	Ansung, Korea/Kyoho	2002	+	++	+	+

Table 1. Continued

<i>Agrobacterium</i> strains	Source/Host	Year Isolated	Pathogenicity		Specific primer	
			Grapevine	Carrot	PehA	VirA
21. HKA-8	Ansung, Korea/Kyoho	2002	+	+	+	+
22. HKA-12	Ansung, Korea/Kyoho	2002	++	+	+	+
23. HKA-13	Ansung, Korea/Kyoho	2002	+++	++	+	+
24. HKA-25	Ansung, Korea/Kyoho	2002	++	++	+	+
25. HKA-26	Ansung, Korea/Kyoho	2002	±	±	+	+
26. HKA-27	Ansung, Korea/Kyoho	2002	++	++	+	+
27. HKA-28	Ansung, Korea/Kyoho	2002	+	++	+	-
28. HKA-31	Ansung, Korea/Kyoho	2003	++	++	+	+
29. HKA-36	Ansung, Korea/Kyoho	2003	-	±	+	+
30. HKA-37	Ansung, Korea/Kyoho	2003	ND	S+++	+	+
31. HKA-38	Ansung, Korea/Kyoho	2003	ND	++	+	+
32. HKA-39	Ansung, Korea/Kyoho	2003	ND	S+++	+	-
33. HKA-41	Ansung, Korea/Kyoho	2003	++	S+++	+	-
34. HKA-42	Ansung, Korea/Kyoho	2004	++	S+++	+	-
35. HKA-43	Ansung, Korea/Kyoho	2004	++	++	+	+
36. HKA-44	Cheonan, Korea/Kyoho	2004	+	+	+	+
37. HKA-45	Cheonan, Korea/Kyoho	2004	++	+++	+	+
38. HKA-46	Cheonan, Korea/Kyoho	2004	++	++	+	+
39. HKA-50	Cheonan, Korea/Kyoho	2004	++	-	+	+
40. HKA-51	Cheonan, Korea/Kyoho	2004	-	++	+	+
41. HKA-52	Cheonan, Korea/Kyoho	2004	-	+++	+	+
42. HKA-53	Cheonan, Korea/Kyoho	2004	+	+	+	+
43. HKA-54	Cheonan, Korea/Kyoho	2004	+	++	+	+
44. HKA-55	Cheonan, Korea/Kyoho	2004	ND	+	+	+
45. HKA-59	Cheonan, Korea/Kyoho	2004	ND	+++	+	+
46. HKA-61	Cheonan, Korea/Kyoho	2004	ND	+	+	+
47. HKA-62	Cheonan, Korea/Kyoho	2004	++	+++	+	+
48. HKA-63	Cheonan, Korea/Kyoho	2004	-	+	+	+
49. HKA-64	Cheonan, Korea/Kyoho	2004	-	+	+	+
50. HKS 1-4	Suwon, Korea /1-6	2003	++	S+++	+	+
51. HKS 2-2	Suwon, Korea /1-3	2003	++	S+++	+	+
52. HKS 3-1	Suwon, Korea/Hongbusa	2003	ND	+++	+	+
53. HKS 4-3	Suwon, Korea/ Kitsaki Red	2003	ND	+	+	-
54. HKS 6-1	Suwon, Korea /Yangock	2003	ND	++	+	+
55. HKS 7-2	Suwon, Korea/Rube muscat	2003	+++	+	+	+
56. HKS 8-4	Suwon, Korea /T-Seedress	2003	++	+	+	-
57. HKS 10-2	Suwon, Korea/Honey Red	2003	++	+	+	+
58. HKS 11-1	Suwon, Korea/ R-Biance	2003	++	++	+	+
59. HKS 12-3	Suwon, Korea/4-3	2003	++	++	+	+
60. HKS 14-2	Suwon, Korea/ 5-12	2003	+++	±	+	+
61. HKS 15-3	Suwon, Korea /Fuen	2003	+++	++	+	+
62. HKS 16-1	Suwon, Korea /Big Unicon	2003	+++	+	+	+
63. HKS 17-3	Suwon, Korea /3-1	2003	+++	+	+	+
64. HKS 19-2	Suwon Korea/Deabong	2003	++	+	+	+
65. LMG 14	<i>A. radiobacter</i> /Type culture		-	-	-	-
66. LMG 152	<i>A. rhizogenes</i> /Type culture		-	-	+	-
67. LMG 157	<i>A. rubi</i> /Type culture		-	-	+	-
68. A208	<i>A. tumefaciens</i> /Type culture		-	+++	-	-

2005년까지 포도나무에 형성된 흑병 병반으로부터 병원균을 분리하였다. 줄기에 형성된 흑을 7 mm×7 mm로 절단하고 흑을 멸균수 2회 세척하여 Petridish에 놓고 겹겹질을 살짝 벗겨 내고 벗겨진 부위를 두께 2 mm의 표면을 절단하여 살균수 0.5 ml가 들어 있는 test tube에 넣고 조직을 마쇄하고 1시간동안 실온에 방치하였다. 마쇄액을 *Agrobacterium* 선택배지인 AB 고체 배지(Chilton 등, 1974)에 도말하여 colony를 분리하였다. *Agrobacterium* 균주의 병원성검정은 당근, 토마토 유묘 및 포도유묘를 이용하였다. 토마토 병원성검정은 약 20일 정도의 토마토 유묘를 기저부위에 상처를 주고 1×10^6 의 농도로 접종한 후 2주 후에 병원성 정도를 조사하였다. 당근접종은 약 1 cm 정도의 두께로 당근을 절단한 후 절단 부위에 같은 농도의 접종원을 도말하여 밀폐된 플라스틱 상자에 포화습도를 유지하여 2주 후에 흑 형성 여부를 관찰하였다. 포도접종은 40일 성장된 유묘줄기에 이쑤시게로 상처를 주고 상처 부위에 위와 같은 농도의 접종원을 접종하여 약 7주 후에 흑 형성 유무를 관찰하였다.

***Agrobacterium vitis*의 PCR 특이검출.** *A. vitis*의 특이검출 PCR primer는 Eastwell 등(1995)에 의하여 개발된 Ti-Plasmid 내의 virulence(*vir*) A에서 유래된 VirA primer set (F:5'-TTCAGTCGCGCAAGCAGTT-3', 5'-CGGCAATTCGTATCACGG-3')와 염색체 상에 존재하는 Pectin 분해효소로 알려진 Pectin enzyme hydrolase(*pehA*) 유전자 염기서열로부터 제작한 Phe A primer set(F:5'-CGATGGCGGCGAGGATTT-3', R:5'-ATCGGGCGTGAAACAAGT-3')가 적용되었다. PCR을 위한 반응조건은 전체 PCR 반응액을 50 μ l로 하였고 반응조성은 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.01% gelatin, 100 ng primer, 50 ng Template DNA, 200 μ M dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 및 2.5 unit Taq polymerase (Promega)를 넣어 실시하였다. DNA 증폭을 위해 PTC-200(MJ. Research)사의 PCR 기기를 사용하였다. PCR program은 처음 94°C에서 4분간 pre denaturation시킨 후 94°C에서 1분간 denaturation, 55°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 2분 extension하여 총 35 Cycle 실시하였으며 최종 DNA 합성은 72°C에서 10분으로 하였다. 증폭산물은 1.8% Agarose gel에서 5 vol/cm로 전기영동하였다. Agarose 상에서의 DNA 검출은 ethidium bromide 용액에 염색하여 UV lamp 상에서 DNA 밴드를 촬영하여 분석하였다.

분리균의 세균학적 특성조사. 포도나무 흑병반으로부터 분리한 세균균주의 이화학적 방법에 의한 세균학적 특성 검정은 Schaad(1988)와 Moore 등(1988)에 의한 방법에 준하여 실시하였다.

결과 및 고찰

포장에서의 포도나무 흑병의 분포 및 병원성. 김천, 옥천, 천안입장, 안성, 수원지역의 포도 재배단지로부터 2002년부터 2005년까지 포도재배 농가에서 흑병의 분포를 관찰한 결과 'Campbell Early' 품종에는 거의 흑병을 관찰할 수 없었으나, 거봉의 경우는 안성, 천안지역에서 70%에서 80%의 심한 발병율을 보이고 있어 심각한 병해를 보이고 있었다. Fig. 1은 천안입장에 위치한 거봉포도 농가에서 관찰한 포도흑병균의 대표적인 병징을 나타내고 있다. 포도재배단지에서 포도나무 흑병은 기저부위 또는 줄기에서 심하게 병징이 발생하는 것으로 관찰되었으며, 감염초기에는 회백색의 작은 흑이 줄기에 형성되다가 병이 진전됨에 따라 줄기내부에서 흑이 확대되어 피목 밖으로 갈색 흑이 노출되고 심하면 검게 조직이 죽고 결국 포도나무 줄기가 검게 고사되는 현상을 보이고 있다. 이는 거봉 품종이 흑병균에 대해 매우 감수성 품종으로 생각되며 월동시 줄기를 매립할 때 뒤뜰림으로 인하여 상처가 발생하고 토양중에 있던 흑병균이 상처부위를 통하여 감염될 것으로 사료되었다. 발생율은 수령이 5년 이상 지난 포도나무는 60% 이상의 발병률을 보였으며 7, 8년 수령의 나무에서는 80% 이상의 심한 감염율을 보였다. 따라서, 수령이 오래될수록 발병 증상이 현저하게 증가였으며, 수령이 적은 주에서는 발병율이 저조하였다. 이러한 감염현상은 어린 유목에서 잠재 감염되었거나 토양 매립에 의하여 월동하는 거봉의 경우는 토양으로부터의



Fig. 1. Crown gall formed on a grapevine variety, 'Kyoho'.

혹병균이 전반되어 수령이 더함에 따라 감염부위의 흑이 동시에 확대됨으로 인한 것으로 사료된다. *A. vitis*는 식물성호르몬 합성과 관련된 유전자들이 encoding된 T-DNA가 식물체에 전달되면 식물조직이 비대하게 되며 이러한 비대현상이 빠르게 진전되는 것이 아니라 서서히 증가되게 된다(Burr와 Katz, 1999). 흑이 확대됨과 동시에 흑 주변에 octopine(Tempe와 Petit, 1982)과 같은 아미노산 치환기가 분비되고 이것을 흑병균은 질소 및 탄소원으로 이용하여 계속적으로 세균밀도가 증식하여 나감으로 수령이 증가됨과 동시에 건전조직으로 병반이 확대되는 것으로 생각된다.

PCR 특이검출에 의한 포도나무 흑병균주의 대량분리.

2002년 10월에서 2005년 9월까지 3년동안 김천, 천안, 안성, 대전, 수원 등지에서 다양한 포도품종으로부터 300여 점의 포도흑병반을 채집하였다. “재료 및 방법”의 기술한 방법으로 병반부위로부터 AB 선택 배지에 세균을 배양하여 형성된 *A. vitis*의 전형적인 흰 배지색을 띠는 세균 colony를 위주로 하여 분리하고 AB 배지에 재 streaking 하여 2일 동안 재배양하였다. 다수의 *A. vitis* 균주를 신속, 정확히 분리하기 위하여 배지에 형성된 colony들을 무작위로 Yellow-tip으로 소량의 세균세포를 묻힌 다음에 10 µl의 멸균 증류수가 들어 있는 PCR 튜브에서 현탁하고 PCR 반응용액과 PheA primer를 첨가해 PCR 증폭을 실시하였다. Fig. 2는 PheA와 VirA primer set로 PCR 증폭한 사진으로 *A. vitis* 균주에서 각각 0.25 kb와 0.5 kb의 DNA 절편을 증폭하였다. 양 primer는 국외 BCCM으로부터 분양받아 *A. vitis* 비교균주로 사용하였던 LMG 256, LMG 259, LMG 262, LMG 8750균에 대하여 모두 특이적 PCR 밴드를 검출하였으며 농촌진흥청 병리과에서 분양받은 포도흑병반으로 분리한 YK 균주 중 5균주만이 특

이적인 DNA 절편을 형성하였으며 충북대에서 분양받은 441, 448, 451 중에서 451만 DNA 절편이 증폭되었다. Ti-Plasmid 영역에 존재하는 *virA* 유전자 염기서열 부위로부터 제작한 VirA primer는 국외 *A. vitis* 균주인 LMG 256, LMG 259, LMG 262, LMG 8750에서는 모두 0.5 kb의 특이적인 DNA 절편을 증폭하였으나, 다른 *Agrobacterium* 종에서는 PCR 밴드가 검출되지 않아 PheA primer보다는 높은 특이성을 보였다. 반면에 VirA primer를 국내균주에 적용하였을 때, YK 균주 중 YK2828, YK5050, YK5052에서만 PCR 증폭되었으나 다른 균주에서는 PCR 특이밴드가 검출되지 않았다. 위 결과에서 본 연구에서 적용된 특이 primer는 다른 나라의 지역원으로 분리된 균주임에도 불구하고 Type culture의 *A. vitis*에 밴드를 형성함에 따라 *A. vitis* 동정을 위한 primer로서의 사용이 가능하였다.

PheA primer set는 비교적 다양한 균주에 적용 가능한 것으로 나타나 국내 균주의 대량 분리를 실시하였다, 약 600여개의 colony로부터 114개의 균주가 PCR 특이 primer로 검출 되었으며 분리원별 중복 균주를 정리하여 최종 Table 1과 같이 4개의 CNU 균주와 47개의 HK 균주를 선별하였다. 그러나, PheA primer는 *A. rhizogenes*와 *A. rubi*에 동밴드가 검출함으로서 *A. vitis*에 특이성이 떨어지는 것으로 나타났다. 실제적으로 식물병원세균은 Pectate lysase 유전자를 거의 보유하고 있으며 *Agrobacterium* 종간 또는 균주간에 매우 유사한 유전자 염기서열로 구성됨으로서 특이성이 결여된 것으로 사료되었다. VirA primer를 사용하여 PCR 검출을 실시한 결과 다른 *Agrobacterium* 종에서는 특이밴드를 형성하지 않아 *A. vitis*에 높은 특이성을 보였다. 그러나, PheA primer set에 검출된 균주내에서 VirA primer에 의하여 검출되지 않은 균주가 존재하였다. VirA primer는 N과 O/C type의 Ti-plasmid의 *vir*

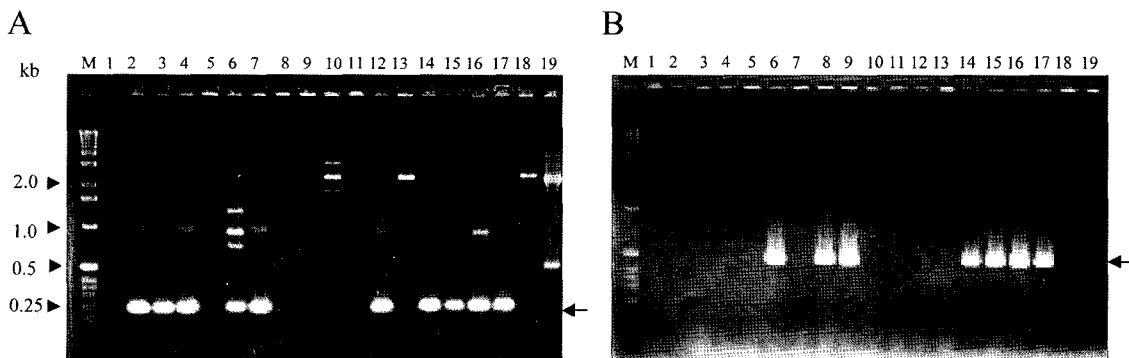


Fig. 2. PCR amplification of *Agrobacterium* spp. by specific primers, *pehA* primer set (A), *virA* primer set (B). Bacterial strains from crown galls on grapevines in Korea (Lanes 1, YK2794, 2. YK2800, 3. YK2801, 4. YK2823, 5. YK2827, 6. YK2828, 7. YK3312, 8. YK5050, 9. YK5052, 10. 441, 11. 448, 12. 451); lane 13. *A. radiobacter* (LMG14); Type cultures of *A. vitis* strains (lanes 14. LMG256, 15. LMG259, 16. LMG262, 17. LMG8750); *A. tumefaciens* (lanes 18. A-208, 19. A-348).

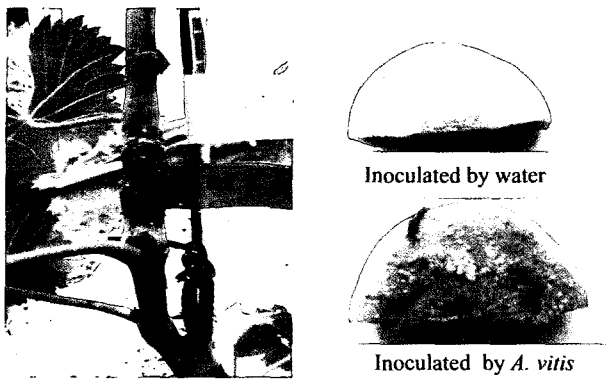


Fig. 3. Grapevine cultivar Kyoho and carrot disks inoculated by *Agrobacterium vitis* strain HK-1 of this study.

A 유전자 영역을 증폭하는 것으로 제작 되었으며(Eastwell 등, 1995). *A. vitis*는 균주에 따라 O/C type중에서도 다양한 Ti-Plasmid를 보유하며 추가적으로 N, V형 등이 존재하는 것으로 알려져 있어(Burr와 Katz, 1999; Otten 등, 1994), *virA* primer에 검출되지 않는 포도 흑병균주들은 다른 type의 Ti-plasmid를 보유하고 있을 가능성이 있을 것으로 사료되었다.

본 연구에서 포도나무 흑병반으로 부터 분리한 51균주를 당근과 거봉포도에 접종하여 병원성을 조사하였다. Fig. 3은 *A. vitis* 균주(HKA-1)를 거봉포도 품종과 당근절편에 접종한 후 형성된 흑의 형태를 나타낸 것으로서 거봉포도에 접종 후 약 7주 후에 줄기에서 흑이 형성되었으며 당근절편은 접종 후 10일 후에 당근표면에 작은 흑이 절편 부위에 형성되었다. Table 2는 본 연구에서 포도흑병반으로부터 분리한 51균주와 타 기관에서 분양받은 *A. vitis* 비교균주와 다른 *Agrobacterium* 종의 당근과 거봉포도에서의 병원성 정도를 나타낸 것이다. 거봉포도에 접종한 본 연구에서 분리한 42균주 중에서 25균주가 거봉포도에 뚜렷한 포도흑을 형성하는 강한 병원성을 보였으며 그 외의 균주는 약하거나 비병원성의 특성을 보였다. 또한, 균주에 따라서 당근과 포도에 병원성 정도가 다르게 나타났다. 예를 들면 HKS 14-2균주는 거봉포도에는 강한 병원성을 나타내었으나 당근 절편에는 병원성이 거의 없는 것으로 나타났으며 HKA-52균주의 경우에는 당근절편에는 강한 병원성을 나타내었으나 거봉포도에는 병원성이 없는 것으로 나타나 기주에 따른 병원성 정도의 차이를 시사하였다.

Table 2. Biochemical characteristics of bacterial strains isolated from crown galls of various grapevine varieties in Korea

Characteristics	Strains										<i>A. vitis</i> Type culture		At ^a	Ar	Av	
	YK	YK	HKA	HKA	HKS	HKS	HKS	HKS	HKS	HKS	LMG	LMG				
	2800	2823	1	37	1-4	2-2	7-2	8-4	14-2	15-3	256	259				
Gram positive	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grows anaerobically	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Drowth D-I medium	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Spores forms	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Production of 3-Ketolactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	V ^b
Growth in 2% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth in 35°C	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	V	V
Acid from sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	V
Erythritol	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-
Melezitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Alkali from mallonic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
L-tartaric acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Propionic acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	-	-
Mucic acid	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
Ferric ammonium citrate	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
L-tyrosine utilization	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-
Oxidase reaction	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	V	V
Citrate oxidation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	+	+
Pathogenicity on grapevine	+	+++	+++	++	++	++	+++	++	+++	+++	+++	++	++			

^aAt, *Agrobacterium tumefaciens*; Ar, *A. rhizogenes*; Av, *A. vitis*: Data from Schaad (1988) and Moore (1988).

^bV, Variable.

위 결과를 종합하면 본 연구에서 PheA와 VirA primer를 이용한 포도 흑병 균주의 분리 방법은 병원균의 신속 대량 분리 방법으로 매우 효과적이었으며, 균주 별 병원성 정도가 다양한 양상을 나타내어 국내의 포도 흑병 균주간에 유전적 다양성이 있을 것으로 사료되었다.

포도나무 흑병균주의 이화학적 특성비교. PCR 특이검출과 병원성검정에 의한 포도나무 흑병균주의 동정이 기존의 세균분류 방법의 이화학적 생리 특성과의 비교함으로써 본 방법의 PCR 특이 primer에 의하여 분리된 포도 흑병균 동정의 타당성 여부를 조사하였다. 본 연구에서 분리한 10 균주와 농촌진흥청 균주 2균주를 공시하고 대비 균주로는 *A. vitis*의 Type culture인 LMG 256, LMG 259를 사용 하였다. Table 3는 그 결과로서 모든 균주는 대비 균주와 같이 3-Ketolactase를 생산하지 못하였으며 2%의 NaCl에서는 모두 성장을 하였으며 35°C에서의 성장능은 YK2800, HKS 1-4를 제외하고는 모두 성장되지 않았다. HKS1-4, HKS2-2, HKS7-2는 국외 포도 품종에서 분리한 병원성이 강했던 균주로 Ferric ammonium citrate, L-tyrosine을 특징적으로 이용하였으나 그밖의 균주들의 세균학적 특성은 Type culture의 비교균주와 거의 일치하였다. 따라서, 본 연구에서 PCR 검출로 분리된 균주들은 균주에 따라 약간의 차이를 보였으나 이화학적 특성검정에서도 *A. vitis* 균주로 동정할 수 있어 PCR 검출법이 *A. vitis* 균주의 동정에 효율적으로 적용할 수 있음을 확인할 수 있었다. PCR 검정법은 자연병반에서의 직접적인 신속 동정과 저 밀도하에서의 고감도 검출이 가능함에 따라, 검정조건만 확립된다면 자연병반 또는 토양내에서의 포도흑병균의 존재여부를 조기 진단하는 기술로 확대 적용할 수 있을 것이다.

요 약

2002년에서 2005년 동안 경북김천, 천안, 경기지역의 포도재배지로부터 채집한 300여점의 포도 흑병반으로부터 *A. vitis*의 PCR 특이검출 Phe A primer를 이용하여 포도흑병균의 대량분리를 실시하여 0.25 kb의 PCR 특이밴드가 증폭된 51균주가 포도 흑병균으로 선발되었다. 이 균주들을 Ti-Plasmid 유래의 Vir A primer로 적용한 결과 40균주에서 0.5 kb의 특이밴드가 검출되었다. 거봉포도와 당근절편에서 다양한 양상의 병원성을 보였으며 25균주가 거봉포도에 강한 병원성을 나타내었으며, 다른 균주는 약하거나 비 병원성을 보였다. 본 연구에서 분리한 10개 균주를 대상으로한 세균의 이화학적 특성은 균주간에 약간의 달랐으나, 3-Ketolactose의 비생성, 2%NaC 첨가 배

지에서의 성장, Melezitose로부터의 산을 생성하지 못하는 등 비교균주와 대체적으로 일치하는 경향을 보였다. 따라서, PheA and Vir A primer를 이용하여 *Agrobacterium vitis* 균주를 대량 분리할 수 있으며 신속, 정확하게 동정할 수 있을 것으로 생각되었다.

감사의 글

본 연구는 2002년부터 2005년까지 농림부 농림기술개발사업의 지원에 의해서 수행되었으며, 포도흑병균을 분양해 주신 농촌진흥청 농업과학기술원의 이영기 선생님께 감사드립니다.

참고문헌

- Burr, T. J. and Hurwitz, B. 1981. Occurrence of *Agrobacterium radiobacter* pv. *tumefaciens* (Smith and Townsend) Conn biotype 3 on grapevines in New York State. *Phytopathology* 71: 206.
- Burr, T. J. and Katz, B. H. 1982. Isolation of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 from grapevion gall and sap, and from vineyard soil. *Phytopathology* 73: 163-165.
- Burr, T. J. and Otten, L. 1999. Crown gall of grape: Biology and disease management. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 37: 53-80.
- Chilton, M. D., Currier, T. C., Farrand, S. K., Bendich, A. J., Gordon, M. P. and Nester, E. W. 1974. *Agrobacterium* DNA and PS 8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 3672-3676.
- 정광진, 심재섭. 1996. 우리나라 포도나무 줄기흑병 병원세균의 분리 및 동정. *식물병리학회지* 12: 197-201.
- Eastwell, K. C., Willis, L. G. and Cavileer, T. D. 1995. A rapid and sensitive method to detect *Agrobacterium vitis* in grapevine cuttings using the polymerase chain reaction. *Plant Dis.* 79: 882-827.
- Holmes, B. and Roberts, P. 1981. The classification, identification and nomenclature of *Agrobacterium tumefaciens* (Smith & Townsend) Conn 1942, *Agrobacterium rhizogenes* (Riker et al.) Conn 1942, and *Agrobacterium rubi* (Hilderbrand) Starr & Weiss 1943. *J. Appl. Bacteriol.* 50: 443-467.
- Kahl, G. and Schell, J. S. 1982. *Molecular Biology of Plant Tumors*. Academic Press, N. Y.
- Kerr, A. and Panagopoulos, C. G. 1977. Biotypes of *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens* and their biological control. *Phytopathology* Z. 90: 172-179.
- Louws, F. J., Rademaker and de Bruijn, F. J. 1999. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phyto bacteria: diversity, detection, and disease diagnosis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37: 81-125.
- Moore, L. W., Kato, C. I. and Bouzar, H. 1988. *Agrobacterium*.

- 16-36. in Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria ed. Schaad, N. W. The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota. 169 pp.
- Ophel, K. and Kerr, A. 1990. *Agrobacterium vitis* sp. nov. for strains of *Agrobacterium* biovar 3 from grapevines. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40: 236-241.
- Otten, L., Ruffray, P. de and De Ruffary, P. 1994. *Agrobacterium vitis* nopaline Ti plamid pTiAB4:relationship to other Ti plamids and T-DNA structure. *Molecular Genreal Genetics* 245: 495-505.
- Panagopoulos, C. G., Psallidas, P. B. and Alivizatos, A. S. 1978. Studies on biotype 3 of *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens*. *Proc. 4th Int. Conf. Plant Pathogenic Bacteria.* 221-228 pp.
- Park, K. H., Jeong, K. S. and Cha, J. S. 2000. Incidence of severe crown gall disease on tetraploid cultivars of grape in Korea. *Plant Pathol. J.* 16: 290-293.
- Schaad, N. W. 1988. Initial identification of common genera. 1-15. in Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria ed. Schaad, N. W. The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota. 169 pp.
- Tempe, J. and Petit, A. 1982. Opine utilization by *Agrobacterium*, p. 451-459. *Molecular biology of plant tumors.* Academic Press, Inc., New York.