

포도나무 뿌리혹병 발생생태 및 포도 재배포장의 *Agrobacterium* 속의 밀도 조사최재을* · 강성수¹ · 박상현¹ · 박문규¹ · 박태진¹ · 강희완²충남대학교 농업생명과학대학, ¹천안시농업기술센터, ²한경대학교 생물환경정보통신전문대학원Ecology of Crown Gall Disease and Population of *Agrobacterium* spp. in Vineyard SoilsJae-Eul Choi*, Sung-Su Kang¹, Sang-Hun Park¹, Mun-Kyu, Park¹,
Tae-Jin, Park¹ and Hee-Wan Kang²

College of Agric. & Life Science, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

¹Agriculture Technology Center, Cheonan 330-846, Korea²Graduate School of Biotechnology and Information Technology, Hankyong National University,
Ansung 456-749, Korea

(Received on April 1, 2008)

To investigate the severity of crown gall disease on grapevine, the ratio of healthy vs. galled grapevines and the presence of the pathogen of the disease in soil were measured in Korean vineyards. In field and greenhouse cultivations, the crown gall incidence of the cv. Kyoho grapevines was 0.4~97.9% and 1.4~3.8% and those of cv. Campbell Early was 1.2~2.1% and 0~1.8%, respectively. The higher populations of *Agrobacterium* spp. were isolated from soils of grapevines with crown gall than from soils of noninfected vineyards. Based on the colony shapes and growth on plates, 480 isolates of *Agrobacterium* spp. from 21 soil samples were collected. Only 13 isolates out of 480 developed the gall on inoculated grapevines.

Keywords: *Agrobacterium* spp., Crown gall, Grapevine, Greenhouse cultivation

포도는 우리나라의 여름철의 중요한 과일로 ‘캠벨얼리’, ‘거봉’, ‘세리단’ 품종이 전체 포도나무 재배면적의 90% 이상을 차지하고 있다. 거봉은 당도가 높고, 과즙이 많으며 육질이 연한 고품질 품종으로 충남의 천안과 경기도의 안성이 주산지를 형성하고 있으나 내한성이 약하여 겨울에는 땅에 묻거나 별도의 월동대책이 필요하다.

포도나무 뿌리혹병은 *Agrobacterium vitis*에 의한 세균병(Holmes와 Roberts, 1981; Ophel과 Kerr, 1990)으로 토양에 매몰하여 월동하는 지역의 ‘거봉’ 포도나무에 막대한 피해를 주고 있는 병해이다. *A. vitis*는 감염된 묘목을 심거나 동해, 전정, 접목, 곤충의 식혼 등으로 병원균이 침입하여 혹을 형성한다(Chamberlain, 1962; Lehoczky, 1968).

*A. vitis*는 토양에서 오랫동안 생존할 수 있으며(Burr 등,

1995), 혹병이 발생한 포도밭에서는 감염된 포도나무를 제거하더라도 병원세균은 포도나무 뿌리의 잔재에서 수년간 생존하여(Burr와 Otten 등, 1998) 건전한 묘목을 심더라도 감염될 수 있다고 하였다(Pu와 Goodman, 1993). 포도나무 뿌리혹병으로 인한 피해는 포도의 품질 저하와 수량 감소, 묘목 갱신 주기가 약 2~3년 정도 단축되므로 농가의 생산비를 상승시키는 주요한 원인이 된다.

포도나무 뿌리혹병의 방제는 농약이 개발되지 않아 무병묘의 식재, 오염되지 않은 포장에서의 재배, 월동법의 개선 등의 경종적 방법이 주류를 이루고 있다.

우리나라에서 포도나무 뿌리혹병에 관한 연구는 병원세균의 분리·동정(Chung과 Shim, 1996), 저항성 검정(Rho 등, 2006; Yun 등, 2003), 월동법(Kang 등, 2007; Nam 등, 1998), PCR에 의한 *A. vitis*의 검출(Kim 등, 2006), *A. vitis*의 유전적 다양성(Kim 등, 2007) 등이 보고되었으며, 발생생태에 관한 연구는 Park 등(2000)이 뿌리혹병 발병과 품종, 재배지역 및 수령과의 관계 등을 보고한 것이 유일

*Corresponding author

Phone) +82-42-821-5729, Fax) +82-42-822-2631

E-mail) choije@cnu.ac.kr

하다. 따라서 본 연구는 우리나라의 포도나무 뿌리혹병의 발생과 품종, 재배지역, 재배방법과 관계를 밝히고 포도 재배 토양의 뿌리혹병균의 오염정도 등을 조사하여 경제적 방제법 등으로 활용하기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

포도나무 뿌리혹병 발생생태 조사. 포도나무 뿌리혹병의 발생 조사는 2002년부터 2004년까지 포도 주산지인 천안, 옥천, 영동, 김천, 안성에서 실시하였다. 노지와 하우스재배 포장은 무작위로 선정하고, 포도나무에 흑의 발생 유무는 포도나무 줄기에 육안으로 확인할 수 있는 크기의 흑을 갖고 있는 것은 발병한 것으로 조사하였다.

포도나무 재배 토양으로부터 세균 분리. 토양의 수집은 2003년 10월 말부터 11월말까지 포도나무 재배 포장의 토양 표면을 약 3 cm 제거하고 약 200 g씩 3곳에서 시료를 채취하여 냉장고에 보관하고, 세균을 분리하기 전에

3개의 토양을 잘 혼합한 후에 사용하였다. 총세균의 분리는 King's B 배지, *Agrobacterium* 속은 RS선택배지(Roy와 Sasser, 1983)를 Burr 등(1987)이 개량한 배지를 사용하였다. 100 ml의 멸균수에 10 g의 토양을 섞어 125 rpm으로 20 min 진탕한 후 멸균수를 가하여 단계적으로 희석하였다. 희석한 용액 20 μ l를 RS개량배지에 도달한 다음 28°C의 항온기에서 4~6일간 배양하였다.

***Agrobacterium vitis* 유사 균주의 선발 및 병원성 검정.** RS개량배지에서 *A. vitis*와 같이 중앙이 진한 붉은색이고 주변이 흰색인 colony(Moore 등, 1988)를 King's B 배지에 이식하여 28°C의 항온기에서 배양하고, 재차 순수 분리하여 4°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다. 접종원은 King's 배지에 이식하여 28°C에서 4일간 배양한 다음 멸균수로 10⁸ cfu/ml가 되도록 희석하여 사용하였다. 접종시험은 '거봉'의 줄기를 25~30 cm 정도로 잘라 상치(2×2 mm)를 내고 100 μ l씩 접종하여 토양에 묻은 다음, 온실 내에서 4주 후에 흑의 형성 유무를 조사하였다.

Table 1. Occurrence rate of crown gall according to cultivation type and variety on grape vines in main cultivation area

Culture method	Variety	No. of plants	No. of galled plants	Occurrence rate (%)	Grapevine age (yr)	Area
Field	Kyoho	528	330	62.5	4~5	Anseong
	Kyoho	576	276	47.9	4~5	Anseong
	Kyoho	315	294	93.3	6	Anseong
	Kyoho	480	366	76.3	6~8	Anseong
	Kyoho	400	85	21.3	6~8	Anseong
	Kyoho	400	43	10.8	6~8	Anseong
	Kyoho	600	365	60.8	6~8	Anseong
	Kyoho	240	235	97.9	8	Anseong
	Kyoho	493	7	1.4	6~8	Anseong
	Kyoho	925	198	21.4	3	Cheonan
	Kyoho	1,252	813	64.9	4~5	Cheonan
	Kyoho	1,139	913	80.1	6~7	Cheonan
	Kyoho	480	470	97.9	6~8	Cheonan
	Kyoho	468	52	11.1	6~8	Cheonan
	Kyoho	372	8	2.2	6~8	Cheonan
	Kyoho	1,247	1,073	86.0	8~10	Cheonan
	Kyoho	550	2	0.4	6~8	Yongdong
	Campbell Early	1,044	12	1.2	10~12	Gimcheon
	Campbell Early	286	6	2.1	10~12	Gimcheon
	House	Kyoho	209	7	3.3	6~8
Kyoho		550	21	3.8	6~8	Okcheon
Kyoho		488	7	1.4	6~8	Okcheon
Campbell Early		630	11	1.8	10~12	Gimcheon
Campbell Early		220	0	0	10~12	Gimcheon
Campbell Early		455	0	0	10~12	Gimcheon
Campbell Early		336	0	0	6~8	Gimcheon

결과 및 고찰

재배법 및 포도 품종에 따른 뿌리혹병 발병주율. 포도 나무의 재배방법 및 품종에 따른 뿌리혹병의 발병주율은 Table 1과 같다. 노지재배 '거봉'의 발병주율은 안성지역에서 최저 1.4%, 최고 97.9%, 천안지역에서 최저 0.4%, 최고 97.9로 나타났다. 그러나 안성과 옥천지역의 비닐하우스 재배하는 '거봉'의 흑병 발병주율은 각각 1.4, 3.3, 3.8%로 매우 낮았다. Park 등(2000)에 의하면 '거봉'의 뿌리혹병 평균 발병주율은 93.4%, '캠벨얼리'는 평균 0.2%로 거봉포도의 발병주율이 높다고 하였다.

대부분의 노지 재배의 '거봉' 발병주율이 하우스 재배 거봉보다 높게 나타난 것은 노지 재배에서는 묘목의 감염이 없더라도 토양이 오염되면 매물 월동하는 과정에서 감염되어 발병주율이 계속 증가하지만 하우스 재배에서는 토양에 매물하지 않고 월동하므로 묘목에 의해 감염된 것만 발병하고 2차적인 발병은 거의 나타나지 않기 때문으로 생각된다.

김천지역에서 노지재배 '캠벨얼리'의 뿌리혹병 발병주율은 1.2~2.1%이었고, 4농가의 비닐하우스 재배의 '캠벨얼리'의 발병주율은 1개 하우스에서 1.8%, 3개의 비닐하우스에서는 발병하지 않았다. 이상과 같이 '캠벨얼리'는 노지나 하우스 재배에서 발병하지 않거나 모두 매우 낮은 발병주율을 나타냈다. 이러한 결과는 '캠벨얼리'는 별도의 월동 대책이 필요 없기 때문에 묘목에서 감염되지 않으면 2차 감염이 거의 일어나지 않았기 때문으로 생각된다.

'거봉'이 '캠벨얼리'보다 발생주율이 높은 것은 '거봉'

이 흑병에 대한 저항성이 약하고(Yun 등, 2003), 토양매물에 의한 월동이 주요한 원인으로 생각된다. 따라서 뿌리혹병이 많이 발생하는 지역, 특히 토양이 병원균으로 오염된 포장에서는 하우스 재배 또는 매물월동 대신에 Kang 등(2007)이 보고한 피복월동법 등을 이용하는 것이 뿌리혹병의 피해를 줄이는 방법으로 판단된다.

안성과 천안지역에서 '거봉'의 수령별 흑병 발병주율은 수령이 많을수록 발병율이 많은 포장이 증가하는 경향이 있으나 수령과 발병주율 간에는 정비례하지 않았다. 이러한 결과는 오염된 토양에서는 매년 매물 월동으로 감염이 증가되지만 건전포장에서는 매물 월동을 하더라도 감염이 되지 않기 때문이라고 생각된다.

뿌리혹병 발생토양의 *Agrobacterium* spp. 밀도. 뿌리혹병이 발생하는 포도나무 재배 토양의 총 세균과 *Agrobacterium* spp.의 밀도를 조사한 결과는 Table 2와 같다. 토양의 총세균수를 King's B 배지에서 측정된 결과 최저 1.5×10^4 cfu/g, 최고 9.1×10^6 cfu/g로 조사한 포장에 따라 세균의 밀도가 다양하게 나타났다. RS개량선택배지로 *Agrobacterium* spp.을 분리한 결과 흑병이 발생한 포장에서는 최저 1.1×10^2 cfu/g, 최고 3.6×10^3 cfu/g이 분리되었으나 발생하지 않은 포장에서는 4개 토양 중 1개의 포장에서만 2.0×10^1 cfu/g가 분리되었고, 3개의 토양에서는 분리되지 않았다.

Burr 등(1987)은 포도나무 뿌리혹병이 발생한 포장의 토양과 포도나무 뿌리에서 *Agrobacterium* spp.은 $10^2 \sim 10^5$ cfu/g 및 $10^5 \sim 10^7$ cfu/g, 무발병 포장의 토양과 뿌리에서는 $10^2 \sim 10^5$ cfu/g 및 $10^4 \sim 10^7$ cfu/g로 분리되었다고 하였다.

Table 2. Population of bacteria and *Agrobacterium* spp. from vineyard soils

Vineyard	Conditions ^a	Bacteria ^b (cfu/g)	Ag. spp. ^c (cfu/g)	Vineyard	Vineyard	Bacteria (cfu/g)	Ag. spp. (cfu/g)
1	Healthy	2.0×10^5	ND ^d	13	Galled	3.0×10^5	2.4×10^2
2	Healthy	1.1×10^6	2.0×10^1	14	Galled	4.0×10^5	1.02×10^3
3	Healthy	1.9×10^5	ND	15	Galled	9.1×10^6	1.2×10^2
4	Healthy	7.5×10^4	ND	16	Galled	1.5×10^5	6.0×10^2
5	Galled	3.5×10^5	6.5×10^2	17	Galled	2.8×10^6	2.0×10^3
6	Galled	5.0×10^5	6.0×10^2	18	Galled	3.5×10^5	7.0×10^2
7	Galled	1.5×10^6	2.0×10^3	19	Galled	2.0×10^5	2.5×10^2
8	Galled	5.0×10^5	9.0×10^2	20	Galled	3.0×10^4	7.5×10^2
9	Galled	5.5×10^5	3.0×10^2	21	Galled	1.5×10^4	1.1×10^2
10	Galled	7.0×10^5	2.5×10^2	22	Galled	1.7×10^5	1.0×10^2
11	Galled	6.5×10^5	1.7×10^3	23	Galled	1.9×10^5	3.6×10^3
12	Galled	2.4×10^5	3.8×10^2	24	Galled	4.3×10^6	1.2×10^2

^aSoils were collected from vineyards that had high incidences of crown gall or were apparently healthy.

^bSerial dilutions of soil solution were plated on King's B medium.

^c*Agrobacterium* spp., Serial dilutions of soil solution were plated on RS medium.

^dND : not detected.

Table 3. Tumor formation of grapevines by *Agrobacterium* spp. isolated from vineyard soils

Vineyard	No. of isolate	No. of gall formed isolate ^a	Vineyard	No. of isolate	No of gall formed isolate
2	20	0	15	20	0
5	20	1	16	20	2
6	20	0	17	20	0
7	20	2	18	20	2
8	20	0	19	20	0
9	20	0	20	20	1
10	20	2	21	20	0
11	20	1	22	20	0
12	20	0	23	20	1
13	20	0	24	20	0
14	20	1			

^aGall forming tests were conducted on grapevines 'Kohyo'.

Agrobacterium spp. 균주의 흑 형성. RS개량선택배지에서 증식한 세균 중에서 증식 속도가 빠르고, 콜로니의 중앙이 진한 붉은색이고 불투명하며 주위는 흰색을 띄며, 약간 mucoid 등의 특성이 *A. vitis*(Burr 등, 1987)로 추정되는 콜로니를 포장당 각각 20균주씩 선발하여 거봉포도 줄기에 접종한 결과는 Table 3과 같다. 검정한 480균주 중에서 '거봉' 줄기에 흑을 형성한 균주는 13개로 검정 균주의 2.7%만이 흑을 형성하였다. 이상과 같이 포도나무 뿌리혹병균의 발병율이 낮은 것은 토양 채취를 근권 토양에서 분리하지 않았기 때문이라고 생각된다.

Burr 등(1987)에 의하면 토양에서 분리한 73균주의 3.1%(3균주), 포도나무 뿌리에서 분리한 120균주의 14.2%(17균주)가 뿌리혹을 형성하였다. Schroth 등(1971)과 Spiers(1979)도 *Agrobacterium* spp.는 토양에서 생존하지만 병원성균은 비병원성균에 비하여 비율이 낮다고 하였으며, Burr 등(1983)은 NKS선택배지로 토양에서 분리한 *Agrobacterium* spp. 244균주 중에 2.5%인 5개 균주가 병원성이 확인되어 병원성균의 분리비율이 낮았다고 하였다. 그러나 포도나무 줄기의 즙액에서 분리한 *Agrobacterium* spp.는 120균주 중에 10%가 포도나무에 병원성이 있어 토양보다 분리비율이 높았다고 하였다. 이상과 같이 토양에서 포도나무 흑을 형성하는 병원균의 분리비율이 낮은 것은 본 연구 결과와 일치하였다.

Bishop(1988)에 의하면 포도나무에서 흑을 채취하여 토양에 접종한 결과 70일까지 *A. vitis*의 밀도가 포도나무와 귀리의 근권과 작물을 재배하지 않은 토양에서 차이가 거의 없었으나 *A. vitis* 균액을 접종한 경우에는 포도나무 근권에서는 *A. vitis*가 감소되지 않았으나 작물을 재배하

지 않은 토양에서는 급격히 감소하여 70일 후에는 거의 분리되지 않았다. 그러나 *A. vitis* 균액을 접종한 귀리의 근권에서는 균주에 따라 높은 밀도로 유지하거나 급감하여 균주에 따라 반응이 달랐다고 하였다.

Dickey(1962)는 포도나무 줄기를 제거하더라도 토양에 남는 뿌리는 전염원으로 작용할 것이고 하였다. 이들의 보고는 포도나무의 뿌리나 뿌리혹은 *A. vitis*의 증식과 생존에 주요한 역할을 하며 오랫동안 생존하면서 연작 포장에서 전염원으로 작용할 것으로 판단된다. 따라서 포도나무를 재작하거나 보식할 경우에는 잔해뿌리를 완전히 제거를 해야 흑병의 2차 감염을 피할 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 2002년부터 2005년까지 농림부 농림기술개발사업의 지원에 의하여 수행되었음.

적 요

한국 포도나무의 뿌리혹병에 의한 발생생태를 조사하기 위하여 뿌리혹병이 발병주율 및 포도나무 재배포장에서 병원균을 측정하였다. 노지와 하우스재배 '거봉'의 뿌리혹병 발병주율은 각각 0.4~97.9% 및 1.4~3.8%, '캠벨얼리'의 발병주율은 각각 1.2~2.1% 및 0~1.8%이었다. *Agrobacterium* 속의 밀도는 뿌리혹병이 발생한포장의 토양이 뿌리혹병이 발생하지 않은 토양보다 많이 분리되었다. 플레이트상에서 콜로니 형태와 크기로 21개의 포도나무 토양 샘플로부터 *Agrobacterium* spp. 480균주를 선발하였다. 이들 중 포도나무에 접종하였을 때 13균주만이 뿌리혹을 형성하였다.

참고문헌

- Bishop, A. L., Katz, B. H. and Burr, T. J. 1988. Infection of grapevines by soilborne *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 and population dynamics in host and nonhost rhizospheres. *Phytopathology* 78: 945-948.
- Burr, T. J. and Katz, B. H. 1983. Isolation of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 from grapevine galls and sap, and from vineyard soil. *Phytopathology* 73: 173-175.
- Burr, T. J. and Otten, L. 1998. Crown gall of grape: Biology and disease management. *Ann. Rev. Phytopathology* 37: 53-80.
- Burr, T. J., Katz, B. H. and Bishop, L. M. 1987. Populations of *Agrobacterium* in vineyard and nonvineyard soils and grape roots in vineyards and nurseries. *Plant Dis.* 71: 617-620.
- Burr, T. J., Reid, C. L. Yoshimura, M., Momol, E. A. and Bazzi,

- C. 1995. Survival and tumorigenicity of *Agrobacterium vitis* in living and decaying grape roots and canes in soil. *Plant Dis.* 79: 677-682.
- Chamberlain, G. C. 1962. The occurrence of aerial crown gall of grapevines in the Niagara peninsular of Ontario. *Can. Plant Dis. Surv.* 42: 208-211.
- Chung, K. J. and Shim, J. S. 1996. Isolation and identification of pathogenic bacteria of grapevine crown gall in Korea. *Korean J. Plant Pathol.* 12: 197-201.
- Dickey, R. S. 1962. Efficacy of five fumigants for the control of *Agrobacterium tumefaciens* at various depths in soil. *Plant Dis. Rep.* 46: 73-76.
- Holmes, B. and Roberts, P. 1981. The classification 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.
- Kang, S. S., Park, S. H., Park, M. K., Park, T. J., Kang, H. W. and Choi, J. E. 2007. Selection of resistant rootstock and development of overwintering methods for control of crown gall disease on grapevine. *Res. Plant Dis.* 13: 98-103.
- Kim, J. K., Choi, J. E. and Kang, H. W. 2007. Genetic diversity of *Agrobacterium vitis* strains in Korea. *Res. Plant Dis.* 13: 137-1344.
- Kim, J. K., Lim, S. H., Lee, D. S., Choi, J. E., Yun, H. K., Park, S. H., Kang, S. S. and Kang, H. W. 2006. PCR based rapid isolation of *Agrobacterium vitis* strains in Korea and their pathogenical and biochemical characteristics. *Res. Plant Dis.* 12: 205-212.
- Lehoczky, J. 1968 Spread of *Agrobacterium tumefaciens* in the vessels of the grapevine after nature infection. *Phytopathology* 63: 239-246.
- Moore, L. W., Kato, C. I. and Bouzar, H. 1988. *Agrobacterium*. pp.16-36. In: *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. ed. Schaad, N. W. The American Phytopathogocal Society, St. Paul, Minesota.
- Nam, S. Y., Kim, S. K., Kim, K. M., Jung, Jsota, H. and Choi, K. S. 1998. The differences of temperatures, growth and crown gall dccurrence in young 'Kyoho' grapevine according to heat conservation meterials during winter. *Kor. J. Hort. Sci. & Tech.* 16: 517-519.
- 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.
- Park, K. H., Jeong, K. S. and Cha, J. S. 2000. Incidence of severe crown gall disease on tetraploid cultivar of grape in Korea. *Plant Pathol. J.* 16: 290-293.
- Pu, X. A. and Goodman, R. N. 1993. Tumor formation by *Agrobacterium tumefaciens* is suppressed by *Agrobacterium radiobacter* HLB-2 on grape plants. *Amer. J. Enol. Vitic.* 44: 249-254.
- Roh, J. H., Yun, H. K., Park, K. S. and Choi, C. 2006. Evaluating resistance of grapevine cultivars against crown gall by inoculating *Agrobacterium vitis*. *Hort. Environ. Biotechnol.* 47: 188-191.
- Roy, M. A. and Sasser, M. 1983. A medium selective of *Agrobacterium tumefaciens* biotype 3. *Phytopathology* 73: 810.
- Schroth, M. N., Weinhold, A. R., McCain, A. H., Hildebrand, D. C. and Ross, N. 1971. Biology and control of *Agrobacterium tumefaciens*. *Hilgardia* 40: 537-552.
- Spiers, A. G. 1979. Isolation and characterization of *Agrobacterium* species. *N. Z. J. Agric. Res.* 22: 631-636.
- Yun, H. K., Roh, J. H., Park, K. S., Cha, J. S. and Jeong, S. B. 2003. Screening system for crown gall resistance by pathogen inoculation in grapes. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 21: 325-328.