

최 종  
연구보고서

## 포도 뿌리혹병의 종합방제 시스템 개발

Development of Systemic Control for Crown Gall Disease  
on Grapevine

2005. 11

연 구 기 관  
충 남 대 학 교

농 립 부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “포도 뿌리혹병의 종합방제 시스템 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005 년 11 월 일

주관연구기관명 : 충남대학교  
총괄연구책임자 : 최 재 을  
세부연구책임자 : 최 재 을  
연 구 원 : 최 춘 환  
연 구 원 : 육 진 아  
연 구 원 : 임 태 교  
협동연구기관명 : 한경대학교  
협동연구책임자 : 강 희 완  
연 구 원 : 김 종 균  
연 구 원 : 임 선 화  
협동연구기관명 : 천안농업기술센터  
협동연구책임자 : 박 상 헌  
연 구 원 : 강 성 수  
연 구 원 : 박 문 균  
연 구 원 : 박 태 진

# 요 약 문

## I. 제 목

포도 뿌리혹병의 종합방제 시스템 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

우리나라의 포도의 재배 면적은 2만 2천ha (2002년)로 과수 재배면적 중에서 사과에 이어 두 번째로 재배면적이 많은 주요 과수이다. 포도의 주요 재배품종은 Campbell Early, Kyoho, sheridan이 90% 이상을 차지하고 있다. 그 중에서 거봉은 당도가 높고, 육질이 연하며 과즙이 많아 충남의 입장과 경기도의 안성을 중심으로 재배면적이 증가하는 추세이나 내한성이 약해 중부이북지방에서는 노지월동이 어려워 겨울에는 땅에 묻거나 별도의 월동대책이 필요하다.

고품질의 포도는 품종고유의 특성, 재배방법, 재배환경 등에 의해 크게 좌우되며 병해에 의해서도 많은 영향을 받는다. 땅에 묻어 월동시키는 거봉의 뿌리혹병의 증가로 품질 저하는 물론 수량감소로 심각한 경제적 손실을 주고 있다.

외국에서의 뿌리혹병의 방제는 주로 저항성 대목을 이용하고 있으나 국내에서는 저항성 대목의 이용이 거의 이루어지지 않고 있으며 방제법에 관한 연구도 거의 이루어지지 않고 있어 피해가 매년 증가할 뿐만 아니라 농민의 지도가 어려워 농업연구기관이나 지도기관에 대한 원망의 대상이 되고 있다.

따라서 본 연구는 뿌리혹병을 방제하기 위한 효과적인 방제법을 개발하기 위하여 병원세균의 특성과 발생생태 등으로 조사하고 이러한 특성을 기초로 한 경종적, 분자생물학적, 화학적 방제 등 종합방제법의 개발을 목적으로 한다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

#### 1. 무병주 생산 및 보급체계의 확립

##### 1) 무병주 선발 및 식물체 증식

무병주의 생산 및 보급체계를 확립하기 위하여 무병주의 선발 및 보존, 뿌리혹병 저항성 대목 선발 및 이용, 무병주의 대량 생산 및 보급체계 확립한다.

##### 2) 뿌리혹병균의 특성 검정 및 화학적 방제

토양, 식물체 및, 흙에서 분리한 세균의 특성 검정, 뿌리혹병균의 동정, 항생제에 대한 내성, 항생제를 이용한 방제법 등을 개발한다.

#### 2. DNA marker를 이용한 뿌리혹병균의 정밀검정법 확립

DNA marker를 이용한 뿌리혹병균의 정밀검정법 확립하기 위하여 국내 토착 포도혹병 균주의 DNA표준지표 제작에 의한 DNA 동정법 개발, 병원균 특이 PCR primer를 이용한 삽수의 잠재감염 검정법 확립 및 기술제공, 자연환경내의 포도혹병균의 DNA monitoring 방법 등을 개발한다.

#### 3. 뿌리혹병의 경종적 방제

뿌리혹병의 경종적 방제를 검토하기 위하여 도포제로부터 상처치료제 선발, 동해방지용 월동법 개발, 무병주 및 저항성 대목을 이용한 방제, 뿌리혹병의 발생생태 및 피해해석, 농가실증시험에 의한 종합방제 실용화 및 경제성 분석 등을 실시한다.

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구에서는 토양 및 포도나무의 오염을 정밀하게 측정할 수 있는 유전자 증폭법을 개발하여 무병묘를 생산할 수 있는 체계를 확립하였고, 토양이나 접수를 살균할 수 있는 약제를 선별하였으며, 월동 중에 병원균의 감염을 막을 수 있는 월동방법을 개발하였다. 이상과 같은 방법을 종합적으로 사용한다면 포도뿌리혹병의 방제에 효과적일 것으로 판단된다.

따라서 본 연구를 통하여 얻어진 결과를 종합하여 거봉포도 농가에 보급한다면 안정적 포도생산에 크게 기여할 것으로 생각되며 이러한 결과를 농업기술센터에 기술 이전하여 농가에 보급하기 위한 기술이전 지원이 필요하다.

## SUMMARY

*Agrobacterium vitis* is a causal agent of crown gall disease on grapevine. *A. vitis* has been classified as three biotype of *Agrobacterium* spp. Nomenclature of genus *Agrobacterium* is now revised as *Rhizobium*. During infection, the T-DNA region of Ti-Plasmid is transferred and integrated into the plant genome, where its expression results in the gall formation. This study was aimed to develop systemic control for crown gall disease of Grapevine. The three detail research subjects include propagation and selection of *A. vitis* free grapevines, establishment of detection method of *Agrobacterium vitis* using DNA markers, and cultural control of crown gall disease. We have isolated a variety of *A. vitis* strains from grapevine cultivars and investigated infection ratio on grapevine in farm fields of Cheonan and Ansong areas. In Korea, crown gall disease of grapevine has mainly been problematic on cultivar Kyoho since the stems of the cultivar were buried in soil for overwintering. High infection ratio of 78~85% was observed on 7~8 years old grapevine cultivar Kyoho in Ansong and Cheonan areas of Korea. While the symptom was not observed on cultivar Campbell Early that is being cultivated in farm fields. The cultivar Kyoho was introduced from Japan and its stem cuttings were planted in soil to select crown gall disease free grapevines. Crown gall disease was not found from tested 600 stem cuttings, suggesting stem cuttings of grapevines are infected by *A. vitis*. Rootstocks of grapevines were tested for pathogenicity to *A. vitis*. Rootstocks, 3309, 101~14, SO4 and 3306 were resistant to *A. vitis* strains, but Kyoho and LN33 were susceptible to the pathogen. Soil samples were collected from grapevine (Kyoho) farm fields of Ansong and Cheonan areas and were applied to isolate *Agrobacterium* spp. on rich medium King's B agar and selective medium RS medium. The cell density ( $10^{1-4}$  cells/g) of soil bacteria was formed on RS media, and the formed colonies induced crown gall on cultivar Kyoho. Primer sets derived

from sequences of PheA and VirA genes were used for specifically detecting *A. vitis* strains. PheA primer was problematic in reproducibility and non specific bands and VirA was limited to detect diverse *A. vitis* strains. Twenty two URP primers were used to reveal PCR polymorphism in *A. vitis* isolated from grapevines and crown-gall of them. The primers URP2R, URP2F, URP17R and URP4R were useful to produce polymorphic bands in the isolated. Two polymorphic bands that are shared in *A. vitis* strains were sequenced to design primers. The primer set, named AVS2 and ACV3 could reproducibly be used for specific detection of various *A. vitis* strains. Primers, URP2R, URP2F, and URP4R were used to fingerprint the 64 isolated bacterial strains and the PCR polymorphic bands amplified by the primers were analyzed to construct UPGMA dendrogram. UPGMA cluster analysis using URP polymorphic bands revealed 6 clustered groups, showed genetic diversity among strains. Cultural and chemical control methods were applied to control crown gall disease of grapevines.





# CONTENTS

Chapter 1. General introduce .....	17
Section 1. Background of this study .....	17
Section 2. Necessity of this study .....	21
Section 3. Problematic points and current situation of related Techniques in Korea and broad .....	23
Section 4. Objectives of this study .....	25
Chapter 2. Establishment of distribution system and production of disease free grapevine .....	26
Section 1. Introduction .....	26
Section 2. Materials and Methods .....	28
1. Propagation and selection of <i>A. vitis</i> free grapevines .....	28
1) Investigation of potential infection in grapevines .....	28
2) Pathogenicity test .....	28
3) Identification of biovars .....	28
4) Examination of potential infection on cuttings and rootstocks .....	29
2. Selection of resistant rootstock to <i>A. vitis</i> .....	30

1) Rootstock in this study .....	30
2) Resistant test for grapevine rootstocks .....	30
3) Preservation and selection of <i>A. vitis</i> free grapevines .....	30
4) Examination of pollution soil .....	31

**Section 3. Results and Discussion** ..... 31

**1. Establishment of production and popularization system  
of *A. vitis* free grapevines** ..... 31

1) Current situation of grapevines infected by <i>A. vitis</i> in Korea .....	31
2) Cell density of <i>A. vitis</i> in cultivated soils and materials of grapevines .....	35
3) Selection of <i>A. vitis</i> resistant rootstock .....	37
4) Selection of <i>A. vitis</i> free grapevines .....	40

**2. Examination of pollution soil** ..... 43

**Chapter 3. Establishment of detection method  
of *Agrobacterium vitis* using  
DNA markers** ..... 49

**Section 1. Introduction** ..... 49

**Section 2. Materials and Methods** ..... 51

1. <i>A. vitis</i> strains used in this study .....	51
2. Isolation and pathogenicity for <i>A. vitis</i> .....	51

3. Extraction of Genomic DNA .....	52
4. URP-PCR reaction conditions .....	52
5. Production and detection method of <i>A. vitis</i> -specific primers .....	53
6. Cloning and nucleotide sequencing of PCR products .....	53

### **Section 3. Results and Discussion** .....

1. Mass isolation of <i>A. vitis</i> strains by DNA detection technique and rapid pathogenicity test .....	54
2. Genetic diversity of <i>A. vitis</i> strains .....	59
3. Development of specific primers for detecting <i>A. vitis</i> from URP-PCR polymorphic bands .....	63
4. PCR sensitive detection of <i>A. vitis</i> from bacterial cells and soil .....	71

## **Chapter 3. Control of crown gall disease** .....

### **Section 1. Introduction** .....

### **Section 2. Materials and Methods** .....

1. Overwinter methods of grapevines .....	76
2. Germination ratio of grapevine cultivars to low temperature treatments .....	77
3. Selection of grapevine cultivars resistant to <i>A. vitis</i> .....	79
4. Frost damage of farm field .....	79
5. Control by vinyl coating on grapevine .....	80
6. Chemical control .....	80
7. Economic assesment .....	82

**Section 3. Results and Discussion** ..... 82

1. Variation of temperatures to overwinter materials of grapevines ..... 82

2. Effects to germination ratio of grapevines by low temperature treatment ..... 88

3. Selection of cultivars resistant to *A. vitis* ..... 90

4. Control by vinyl coating on grapevine ..... 92

5. Sensitivity of *A. vitis* to antibiotics ..... 93

6. Effectiveness of chemical control ..... 95

7. Economic assesment ..... 96

**Reference** ..... 103

# 목 차

제 1 장 서 언 .....	17
제 1 절 연구배경 .....	17
제 2 절 연구개발의 필요성 .....	21
제 3 절 국내·외 관련기술의 현황과 문제점 .....	23
제 4 절 연구개발의 목적 .....	25
제 2 장 무병주 생산 및 보급체계의 확립 .....	26
제 1 절 서 언 .....	26
제 2 절 재료 및 방법 .....	28
1. 무병주 선발 및 식물체 증식 .....	28
1) 포도나무의 잠재감염 조사 .....	28
2) 병원성 검정 .....	28
3) biovar 식별 .....	28
4) 삽수 및 대목으로부터의 잠재감염 검정 .....	29
2. 뿌리혹병 저항성 대목 선발 .....	30
1) 공시대목 .....	30
2) 저항성 검정 .....	30

3) 무병주의 선발 및 보존 .....	30
4) 인접토양의 오염도 조사 .....	31

**제 3 절 결과 및 고찰** ..... 31

**1. 무병주 생산 및 보급체계의 확립** ..... 31

1) 국내의 포도뿌리혹병 발생현황 .....	31
2) 포도재배토양 및 포도 식물체 부위별 세균 및 혹병유발 세균 밀도 .....	35
3) 뿌리혹병 저항성 대목 선발 .....	37
4) 무병주 선발 .....	40

**2. 토양의 오염도 조사** ..... 43

**제 3 장 DNA marker를 이용한 뿌리혹병균의 정밀  
검정법 확립** ..... 49

**제 1 절 서 언** ..... 49

**제 2 절 재료 및 방법** ..... 51

1. 공시균주 .....	51
2. 포도혹병균 분리 및 병원성검정 .....	51
3. Genomic DNA분리 .....	52
4. URP-PCR 반응조건 .....	52
5. <i>A. vitis</i> 특이검출 Primer제작 및 PCR 검출 방법 .....	53
6. PCR 산물의 cloning 및 염기서열 분석 .....	53

**제 3 절 결과 및 고찰** ..... 54

- 1. DNA 및 병원성 검정에 의한 포도혹병 균주의 대량분리 ..... 54
- 2. *A. vitis* 균주의 유전적 다양성 분석 ..... 59
- 3. URP-PCR 다형성 밴드로부터 *A.vitis* 특이검출 primer 개발 ..... 63
- 4. 세포와 토양으로부터 포도혹병균의 PCR 고감도 검출 ..... 71

**제 4 장 포도혹병 방제** ..... 74

**제 1 절 서 언** ..... 74

**제 2 절 재료 및 방법** ..... 76

- 1. 동해방지 월동법 개발 ..... 76
- 2. 저온처리별 포도 품종의 발아율 조사 ..... 77
- 3. 뿌리혹 저항성 품종 선발 ..... 79
- 4. 거봉포도 재배농가포장의 동해피해 조사 ..... 79
- 5. 비닐감기에 의한 혹병방제 ..... 80
- 6. 소독제의 예방 및 치료효과 검정 ..... 80
- 7. 경제성 평가 ..... 82

**제 3 절 결과 및 고찰** ..... 82

- 1. 동해방지 월동법 개발 ..... 82
- 2. 저온처리가 포도 품종별 발아에 미치는 영향 구명 ..... 88
- 3. 뿌리혹 저항성 품종 선발 ..... 90

4. 비닐감기에 의한 방제 .....	92
5. 포도혹에서 분리한 세균의 항생제 감수성 .....	93
6. 소독제에 의한 혹병 방제 효과 .....	95
7. 뿌리혹병균 방제의 경제성 평가 .....	96

<b>참 고 문 헌</b> .....	103
----------------------	-----



# 제 1 장 서 언

## 제 1 절 연구배경

포도는 우리나라의 국민이 선호하는 과수로 2002년도 포도 재배면적은 2만 2천ha로 과수 총 재배면적의 13.1% (농림부, 2002), 연간 생산량은 42만 4천 톤으로 16.1% (FAO, 2002)을 차지하고 있으며, 연간 1인당 소비량이 10kg 정도에 이르는 주요 과종 중의 하나이다.

최근 우리나라에서는 국민소득의 증가로 소비자들은 고품질의 포도를 선호하고 있으며 포도 재배방식도 생산량 증대의 생산방식에서 품질 향상의 생산 방식으로 바뀌고 있어 품질이 우수한 품종 재배가 요구되는 추세이다.

국내의 포도 주산단지에는 옥천, 영동, 경산, 천안 등이고 거봉은 충남의 입장과 경기도의 안성이 주산지이다(이 등, 1999). 거봉은 당도가 높고, 육질이 연하며 과즙이 많아 재배면적이 증가하는 추세이나 내한성이 약해 중부이북지방에서는 노지월동이 어려워 겨울에는 땅에 묻거나 별도의 월동대책이 필요하다.

포도의 병해로는 탄저병, 갈색무늬병, 이슬병, 흰가루병, 잿빛곰팡이병, 새눈무늬병, 뿌리혹병, 덩굴쪼김병, 모자이크병 등이 있으며, 뿌리혹병은 주로 지면과 접촉한 부위나 접목부에 많이 발생하며 월동을 위하여 나무를 땅에 묻을 때에는 덕에 유인한 월줄기나 덕위의 가지에도 발생하기도 한다. 따라서 국내에서는 땅에 묻어 월동을 시키는 천안, 진천 등지의 주요 포도재배 지역에서 뿌리혹병이 많이 발생하고 있음이 보고 되었다(Pack 등, 2000). 그러나 하우스재배를 한 거봉은 토양에 매립하지 않아도 월동이 가능하기 때문에 뿌리혹병의 발생이 거의 없다.

뿌리혹병의 병징은 유백색의 직경 5~10mm의 밤모양의 혹이 연달아 형성하며 격발하면 접목부의 혹은 이상 팽창하여 주간을 둘러싸고 양수분의 이동을 방해한다. 이와 같은 주간의 거친 껍질을 벗기면 많은 氣根이 발생한 것이 관찰되기도 한다(이 등, 1999).

포도 뿌리혹병이 발생하면 포도나무의 활력이 저하하고 포도 생산량도 감소하기 때문에(Schroth 등, 1988) 포도재배 농가의 경제적 손실이 심각한 실정이다(Burr 등, 1998). 뿌리혹병이 심하게 발생한 줄기의 신초는 생기가 없어지고 과방은 위축하고 조기에 잎이 붉어져 고사하는 경우도 있다. 또한 뿌리혹병에 발생한 포도는 22~43%가 발병 후 2~3년 내 고사(Dhanvantri, 1983)하므로 피해가 크고 새로운 묘목을 심어야 한다.

뿌리혹병균은 묘목에 의하여 전파되고(寺井), 전정 및 줄기의 비틀림으로 갈라진 상처부위로 침입하며(Chamberlain, 1962; Lehoczky, 1968), 침입한 병원균은 도관을 통하여 식물체 전체에 이동하기도 한다.

뿌리혹병균의 잠복기간은 품종의 종류, 감염위치, 기주의 영양 및 정도에 따라 다르나 일반적으로 5일~수 주간이며, 기주에서 증식된 세균은 토양으로 오염되거나 오래된 흙이 파괴되어 조직과 함께 토양으로 들어간다. 이와 같이 들어간 세균이 토양에 남아 증식하며 전염원으로 된다. 뿌리혹병균으로 한번 오염된 토양은 기주식물의 존재의 유무와 관계없이 토양 중에 장기간 생존한다.

혹의 발달은 기주의 생장이 활발한 시기는 왕성하나 기주가 휴면기에는 거의 발달하지 않는다. 그러므로 늦가을에 감염한 묘는 잠재감염이 되어 다음해 포도의 생장과 함께 발병한다. 발생하기 쉬운 조건은 오염된 토양에서 육묘하였거나 오염된 토양에 심으면 발병하기 쉽다. 또한 접목부에 융합이 늦거나 뿌리의 뿌리를 가해하는 해충이 많으면 발생하기 쉽다.

포도뿌리혹병 발생률은 거봉의 수령이 오래될수록 증가하며, 수령이 적은 자가 발병된 것은 어린 유목에서 잠재 감염되었거나 토양으로부터 감염된 것으로 추측되며, 자연월동이 가능한 거봉이외의 품종에서 뿌리혹병이 발생하는 것은 발견이 매우 적다.

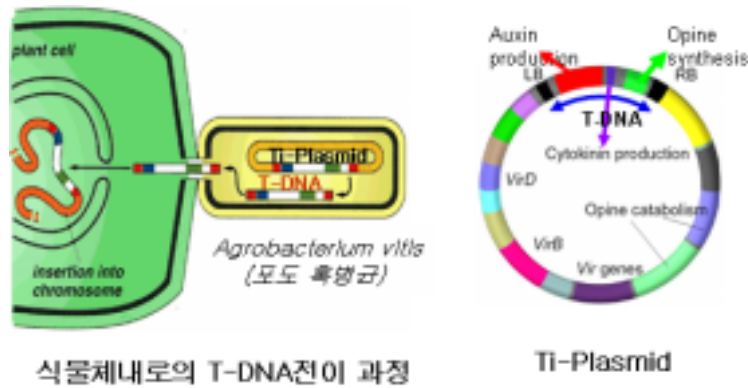
포도나무혹병을 일으키는 병원균은 *Agrobacterium raictor* pv. *tumefaciens* biotype 3 또는 *A. tumefaciens* biovar(biotype) 3으로 분류하였으며(Burr and Hurwitz, 1981; Burr and Katz, 1982; Loubser, 1978; Panagopoulos, 1978), Holmes와 Roberts(1978)는 *A. tumefaciens* biovar(biotype) 3의 strain들을 *A. rubi* 집단에 포함시켰으며, Ophel과 Kerr(1990)는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

*A. vitis*의 병원세균은 막대(Rod) 모양으로 균체의 크기가 0.6~1.0×1.5~3.0um 이며, 그람음성 세균이다. 1~6개의 주생모를 가진 토양서식균(土壤棲息菌 : Soil inhabitant)으로 토양 내에서 기주식물 없이도 부생적(腐生的)으로 오랫동안 생존한다.

국내에서는 정과 심(1996)이 뿌리혹병으로부터 *Agrobacterium*과 유사한 균주를 분리하여 병원성을 검정한 결과 7균주가 포도나무에 줄기 혹을 형성하였으며, 우리나라에서는 포천, 남양주 및 나주지역에서 3~80%의 이병률 보여 지역에 따라 심하게 발생한다고 하였다.

뿌리혹병의 발병 기작은 식물체의 접목, 삽목, 곤충의 식흔, 농작업 등에 의해 생긴 감수성 식물의 상처로부터 여러 가지 페놀 화합물들이 흘러나오게 되는데, 이 물질에 유인된 병원세균이 상처를 통해 뿌리나 줄기로 침입한다. 상처로부터 흘러나온 물질(대표물질 acetosyringone)은 병원세균을 상처 부위로 유인할 뿐만 아니라 그 세균의 Ti-plasmid 내의 vir(virulence)유전자의 발현을 유도한다. vir 유전자 산물은 같은 plasmid내에 있는 T(tumor)-DNA의 한 가닥을 잘라내어 식물세포 내의 핵 속으로 옮겨 T-DNA가 식물의 염색체(Chromosome)에 끼어들게 된다. T-DNA로 형질 전환된 세포는 T-DNA내 Auxin 및 Cytokinin 합성 유전자 발현에 의해 Auxin 및 Cytokinin을 다량 생성하게 하고 그 결과 세포 분열을 무제한적으로 계속하게 되어 세포의 과잉 성장과 분열로 이상비대 하여 혹을 형성한다.

식물에서 혹(Gall)이 유기되어 발현하는 데는 다음 세 가지의 필연적인 과정을 수반한다. 첫째는 기주식물 조직의 상처를 통한 세균세포의 특이결합(Specific binding)과정[Wounding and specific binding in crown gall inducing]을 가져야 하며, 두 번째는 세균 DNA의 기주 식물세포로의 전이과정 및 이에 수반된 여러 과정[**Transfer** of bacterial DNA to the host cell and its subsequent processing-(1) **Entrans** of plasmid DNA into the plant cell, (2)**Replication** of plasmid DNA in the tumor cell, (3) **Expression** of plasmid DNA in the tumor cell]을 거친 후, 세 번째는 형질전환 된 식물세포의 제어 할 수 없는 성장, 즉 혹세포의 무한성장[**Uncontrolled growth** of transformed plant cell] 이다.



위와 같이 *A. vitis* 발병형태는 1907년 Erwin Smith와 Charles Townsend를 시초로 발병기작이 많이 알려져 있다. 그러나 그 분류기준은 종전까지 학자에 따라 다소 차이가 있었다. 종전까지의 분류기준은 세균의 기주 특이성과 그 세균이 어떤 plasmid를 가지고 있는지의 유무 즉, 병원성의 유무를 가지고 분류하였다. 이 분류법은 Ti-plasmid가 균주의 접합에 의해 쉽게 이동하는 것을 배제해 불합리해 보이기도 하다. 또한 *A. vitis*의 생리, 생화학적 특성(3-Ketolactate생성, erythritol이용성, 2% NaCl 성장)등에 따라 생물형(biovar 1~3)으로 분류하기도 하였는데 이러한 분류는 병원성을 고려하지 않는 문제점이 있다. 또한 세균 세포가 식물체에서 만든 혹에서 생성되는 opine의 종류에 따라 octopine, nopaline, agropine-type 균주로 불리기도 하였다.

최근에 분자생물학의 발달로 1980년대부터 DNA를 이용한 미생물의 검정기술이 개발되어 종 다양성 검정 및 종의 분류, 미생물의 신속한 검출 등, 획기적인 전기를 마련하며 급속히 발전하고 있다. 이 분자생물학적 기법은 위의 생리적, 형태적 방법에 비해 환경적 영향을 배제할 수 있으며, 적은 밀도의 미생물에서 신속, 정확하게 고도의 민감성으로 검출 할 수 있다.

최근에는 DNA 교배(交配 : habridization)와 DNA probe에 의한 PCR방법이 개발돼 미생물의 특정종의 검출, 자연환경내의 검출, 유전적 유연관계분석에 널리 사용되고 있다. 특히 PCR기법은 1983년 미국의 Cetus Mulis에 의하여 고안되어 DNA중합효소로서 Klenow fragment 을 이용하여 실시해 오다가, 1988년 Saiki에 의해 온천지역과

같은 고온에서 생육하는 세균인 *Thermus aquaticus*로 부터 열에 안정한 Taq DNA polymerase 을 분리, 이용 하면서부터 PCR법을 비약적으로 보급 시키는 요인이 되었다. PCR 법의 개발로 DNA 염기서열결정, 유전병진단, 특히 세균 및 바이러스검출, 핵산지문에 의한 개체간 DNA band다형성확인, 병원균의 존재유무 확인 등에 이용하고 있다.

세균병인 흑병은 아직까지 약제방제가 곤란하여 뿌리혹-free묘목의 공급 및 정식, 동해방지, 내병성 대목을 이용한다면 피해를 줄일 수 있는 방법으로 뿌리혹병 저항성 품종으로는 Gloire de Montpellier (Süule 등, 1994), 3309C, T5C, Riparia gloire, 101-14 (Stover 등, 1997) 등, 저항성 대목으로는 테레키, 5 BB, ü8 B, SO4 등이 보고되었다.

## 제 2 절 연구개발의 필요성

거봉은 당도가 높고, 육질이 연하며 과즙이 많아 재배면적이 증가하는 추세이나 내한성이 약해 중부이북지방에서는 노지월동이 어려워 겨울에는 땅에 묻거나 별도의 월동대책이 필요하다.

뿌리혹병이 심하게 발생한 나무는 신초의 생기가 없어지고 과방은 위축하고 조기에 잎이 붉어져 고사하며, 이병주의 22~43%가 발병 후 2~3년 내 고사(Dhanvantri, 1983) 되므로 피해가 크므로 방제대책이 필요하다.

뿌리혹병균은 묘목에 의하여 전파되고 (寺井), 전정 및 줄기의 비틀림에 의한 상처부위로 침입하며(Chamberlain, 1962; Lehoczky, 1968), 침입한 병원균은 도관을 통하여 식물체 전체에 분포한다. 무병반의 줄기를 삽목 할 경우에도 잠재 감염된 줄기는 뿌리혹이 발생하여 피해를 주기 때문에 무병주를 생산하기 위해서는 삽수가 *A. vitis*의 오염 여부를 신속, 정확하게 검정할 수 있는 시스템을 구축하는 것이 중요하다.

분자생물학적 검정방법은 16S-23S intergenic region (IGS)의 염기서열분석 또는 IGS 증폭산물을 이용한 PCR-RFLP분석 및 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)를 이용하고 있다. 또한 IS element 및 Ti-plasmid 병원성 관련 유전자인 vir 유전자영역과 T-DNA영역의 유전자 virG 등이 PCR 특이 primer 제작에 이용된 바

있으나 이들 대부분은 *Agrobacterium* spp.에 보존적인 유전자를 이용 함으로서 특이성 없이 다른 종 또는 비 병원성 *A. vitis*를 검출하는 것이 문제점으로 지적되고 있다. 따라서 병원성 *A. vitis*만을 특이적으로 검출 할 수 있는 *A. vitis*-DNA 마커의 개발이 요구된다.

그러나 국내에서는 아직까지 뿌리혹병의 방제에 관한 연구가 이루어지지 않고 있어 피해가 매년 증가할 뿐만 아니라 농민의 지도가 어려워 농업연구기관이나 지도기관에 대한 원망의 대상이 되고 있다.

### 1. 기술적 측면

가. 국내에서는 대부분이 뿌리혹병 감수성 품종인 캄베럴리나 거봉을 재배하고 있어 뿌리혹병의 피해가 매년 증가하고 있어 무병묘 및 내병성 대목의 도입 육성이 시급한 실정이다.

나. 뿌리혹병 방제 및 치료용 농약이 개발되지 않아 한번 발생하면 포도나무를 제거해야하므로 이에 대한 대책이 절실히 요구된다.

### 2. 경제·산업적 측면

가. 포도나무를 재식하면 수년이 지나야 경제적인 효과가 있으나 뿌리혹병에 걸리면 수확최성기에 나무가 죽거나 수량이 감소하여 경제적인 피해가 크다.

나. 뿌리혹병 피해주는 다시 재식해야하므로 묘목대금 및 인건비 증가로 경제적 손실이 크다.

다. 병균의 잠재감염 여부를 위한 DNA검정법도입은 노력, 시간, 비용을 줄이면서 조기 진단을 함으로서 무병묘 생산에 효율을 증대 시킬 수 있다.

### 3. 사회·문화적 측면

가. 일부농가에서는 뿌리혹병의 치료방법이 개발되지 않아 농업연구 및 지도기관에 불신이 증가하고 있으며 농림부까지 원망의 대상이 되고 있다.

나. 국내에 분포하는 비 병원성 및 병원성 포도나무 흑병균의 계통의 체계적인 연구가 이루어지지 않고 있어 길항성 균주선발 등 병 방제를 위한 대책 마련에 매우 어려운 실정에 있다.

다. 최근 병원세균의 유전적다양성 연구 및 무병묘 검정에 있어 DNA 검정법이 필수화 되고 있으나 국내에서 포도나무 흑병균에 대한 연구가 전무한 상태이다.

#### 4. 앞으로 전망

가. 내병성 대목과 무병종묘가 육성 보급되면 재배면적이 증가하고, 생산비용이 저하하여 농가소득이 증대될 것이다.

나. 무병종묘의 생산은 관련분야의 기술과 산업발전에 기여할 것이다..

다. 외국산 포도와외 국제경쟁력이 가능하여 농가소득 증대에 크게 기여할 것이다.

라. DNA수준에서 무병종묘 여부를 신속, 정확하게 판별함으로써 무병종묘 선발의 효율을 극대화 할 것이다.

마. 국내 포도흑병균들의 유전적 다양성을 DNA마커로 표준지표화 시킴으로서 신속 정확한 균주 동정이 가능하여 농산물 수입에 의한 외국 균주의 도입 및 새로운 계통의 출현검정에 유용하게 이용 가능 할 것이다.

### 제 3 절 국내·외 관련기술의 현황과 문제점

*Agrobacterium*속에 의한 뿌리혹병은 100년이상 동안 세계전역에서 다양한 쌍자엽 식물에 피해를 주고 있다. 1948년 Braun이 암종을 유도하는 세균으로부터 어떠한 물질이 식물세포내로 전달된다는 “tumor inducing principle” 개념이 도입한 이래로 감염기작에 관한 분자생물학적 연구가 활발히 진행되어 마침내 1974년 Zaenen 등.에 의하여 거대분자의 plasmid가 암종을 유도 하는데 필수적이라고 보고하게 되었고 이 plasmid를 tumor inducing-plasmid (Ti-Plasmid)로 부르고 있다.

포도나무 뿌리혹병을 일으키는 병균은 *Agrobacterium raicter* pv. *tumefaciens* biotype 3 또는 *A. tumefaciens* biovar (biotype) 3으로 분류하였으며(Burr and

Hurwitz, 1981; Burr and 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.

포도나무뿌리혹병균은 묘목에 의하여 전파되고(寺井), 묘목의 이식시나 정식시에 생기는 상처, 동해, 전정, 접목, 곤충의 식흔 등의 상처부위로만 침입하고(Chamberlain, 1962; Lehoczky, 1968), 침입한 병원균은 도관을 통하여 식물체 전체에 분포하고 있다. 상처받은 조직이 생기면 감염되어 식물세포에 Ti plasmid가 삽입되어 혹을 형성한다(Lehoczky, 1971, 1978). 이 plasmid를 갖고 있는 식물세포는 병원세균이 없어도 혹을 형성할 수 있어 계속 커진다. 잠복기간은 기주식물의 종류, 감염장소 영양 및 생장의 양부에 의해 다르나 일반적으로 5일~수주간이다.

기주에서 증식된 세균은 토양으로 들어가거나 오래된 혹이 파괴되어 조직과 함께 토양으로 들어간다. 이와 같이 들어간 세균이 토양에 남아 증식하며 전염원으로 된다. 뿌리혹병균으로 한번 오염되면 기주식물의 존재의 유무와 관계없이 토양 중에 장기간 생존한다.

혹의 발달은 기주의 생장이 활발한 시기는 왕성하나 기주가 휴면기에는 거의 발달하지 않는다. 그러므로 늦가을에 감염한 묘는 잠재감염이 되어 다음해 봄 성장과 함께 발병한다. 발생하기 쉬운 조건은 오염된 토양에서 육묘하였거나 오염토양에 심으면 발병하기 쉽다. 또한 접목부에 융합이 늦거나 뿌리의 뿌리를 가해하는 해충이 많으면 발생하기 쉽다.

포도뿌리혹병 발생률은 수령이 오래될수록 증가였으며, 수령이 적은 자가 발병된 것은 어린 유목에서도 잠재 감염되었거나 토양의 감염에 의한 것으로 추측되며, 무피복한 묘목에서는 월동을 위해 피복처리한 곳에서 보다 뿌리혹병의 발현율이 낮았다. 수령 및 과원별 차이는 있으나 포도뿌리혹병 감염에 의한 품질저하 및 수량저하로 농가 수입이 15~20% 감소될 것으로 사료된다.

세균병인 혹병은 아직까지 약제방제가 곤란하여 뿌리혹-free묘목의 공급 및 정식, 동해 방지, 내병성 대목을 이용한다면 피해를 줄일 수 있는 방법이다. 뿌리혹병 저항성품종으로는 Gloire de Montpellier (Süule 등, 1994), 3309C, T5C, Riparia gloire, 101-14 (Stover 등, 1997) 등, 저항성 대목으로는 테레키, 5BB, ü8B, SO4 등이 보고 되었다.



뿌리혹병 저항성 대목인 *Vitis vinifera* cv. Gloire에 감수성품종을 접목하였을 경우에 감수성 대목에 접종했을 경우보다 혹의 형성이나 죽는 비율이 현저히 감소하였다 (Süüle and Burr 1998). 추운 지방에서는 내한성이 강한 3306, 3309, 188-08 등을 이용하면 더욱 효과적으로 피해를 줄일 수 있다.

Lehoczky(1968)는 뿌리혹이 발병된 줄기의 물관부 삼출액, 혹이 없는 줄기로부터 (Lehoczky, 1978), 뿌리로부터(Lehoczky, 1971) *Agrobacterium vitis*를 분리하였다. 뿌리혹병은 화학적 방제나 생물학적방제가 곤란하여 병원균 free 번식이 본 병의 피해를 줄이는 방법이라고 한다.

## 제 4 절 연구개발의 목적

우리나라의 거봉포도 안정적 재배의 걸림돌이 되고 있는 뿌리혹병의 종합적인 방제법을 개발하기 위하여 병원세균의 특성과 발생생태를 조사하고 이러한 특성을 기초로 한 경종적, 분자생물학적, 화학적 방제 등 종합방제법의 개발을 목적으로 한다.

## 제 2 장 무병주 생산 및 보급체계의 확립

### 제 1 절 서 언

포도 뿌리혹병을 방제를 위해서는 *Agrobacterium vitis*에 감염되지 않은 건전한 묘목 재식이 우선적으로 선행되어야 하는데 *A. vitis*-free 묘를 생산하기 위해서 주로 열탕 처리하여 병원균을 제거하는 방법을 사용하였다. 그러나 30~60분 동안의 50℃ 열탕처리가 *A. vitis* 수를 크게 감소시켰지만 완전히 제거할 수는 없었다고 하였다(Burr 등, 1996). Wample(1993)은 50℃ 보다 더 높은 온도에서 열탕처리가 가능하다고 하였으나 Burr 등(1998)은 50℃ 이상의 고온 열탕 처리는 눈에 상해를 유발시킬 수 있다고 하였다.

Burr 등(1987)은 *A. vitis*는 포도원에서는 검출되었지만 포도나무를 재배하지 않았던 곳에서는 검출되지 않았으며, Burr 등(1998)은 *A. vitis*에 이병된 토양에는 포도나무 재식을 하지 말 것을 제안 하였다.

포도 뿌리혹병 대해 저항성인 품종이나 대목을 재식하므로써 포도 뿌리혹병에 대해 저항성인 품종이나 대목을 재식하므로써 포도 뿌리혹병을 방제하는 방법들이 논의되어 왔다. Sule와 Burr(1998)는 포장 조건하에서 포도 뿌리혹병에 저항성 대목에 접목하였을 때 포도 뿌리혹병에 현저하게 감소하였음을 보고하였다. Belanger 등(1995)은 이와 같이 감수성 접수 품종의 저항성 증가는 저항성 대목에서 생성된 화합물이 접수 품종으로 전류하여 *A. vitis*의 세포수를 감소시킨 것으로 설명하고 있다.

*A. vitis*는 건전한 나무에서도 전신적으로 생존하므로(Burr와 Katz, 1983; Lehoczky, 1968; Lehoczky, 1971) 감염된 포도나무에서 채취한 삽수 또는 접수 등의 번식 시 포도 뿌리혹병이 전반 또는 전염될 수 있다(Bazzi 등, 1987; Burr와 Katz, 1984)고 하였다.

뿌리혹병은 생물학적 방제기술로 방제효과가 좋은 것으로 보고 되고 있어 여러 나라에서 비병원성인 *A. rhizogenes* strain K84를 이용하여 뿌리혹병 방제에 이용하고 있다(Kerr, 1972). 그러나 *A. rhizogenes* K84는 모든 *Agrobacterium* 속 균에 대하여 길항효과를 나타내지는 않으며, *A. vitis* 감염을 억제하지 못한다(Burr 등, 1998). 이러한 이유로 포도 뿌리혹병을 방제할 수 있는 새로운 strain을 선발하려는 연구가 활발하였다.

*A. vitis*는 줄기의 뒤틀림 등의 상처를 통해서 침입하므로 포도를 재배하는 동안 지체 부에 상처가 나지 않도록 주의하여야 한다(Lehoczky, 1968; Braun, 1983; Burr 등, 1998). 포도 뿌리혹병은 추운지역에서 많이 발생하는 동결 상해에 의한 상처를 통해서도 식물체 내로 침입하는데(Person과 Goheen, 1988), 특히 기상조건이 동결상해를 일으키기 쉬운 곳이 감수성인 포도품종의 포도나무에 병이 발생할 가능성이 높다(Schroth 등, 1988).

또한 내한성이 약한 품종재배 시 동해를 막기 위한 수단으로 포도 줄기를 땅속에 매몰하는데, 이 과정에서도 줄기에 상처가 생기기 쉬우므로(Person과 Goheen, 1988) 가능한 동결 상해가 발생하지 않는 곳을 선택하여 재식하여야 한다(Burr 등, 1998)고 하였다.

생물학적 방제기술도 포도 뿌리혹병 방제에 매우 효과적인 방법으로 보고 되고 있다. 세계 여러 나라에서 비병원성인 *A. rhizogenes* strain K84를 이용하여 포도 뿌리혹병에 대해 생물학적 방제를 하고 있다(Kerr, 1972).

그러나 *A. rhizogenes* K84는 모든 *Agrobacterium* 속 균에 대하여 길항 효과를 나타내지는 않으며, *A. vitis* 감염을 억제하지 못한다(Burr 등, 1998). 이러한 이유로 포도 뿌리혹병을 방제할 수 있는 새로운 strain을 선발하려는 연구가 활발하였다. Belle 등 (1995)은 포도나무의 내생세균이 *Agrobacterium* 의 균체를 감소시켜 포도 뿌리혹병 현저한 감소 효과를 나타냈다고 보고하였다. 또한 중국에서는 비병원성 *A. tumefaciens* biovar 1 strain MI 15 (Xie 등, 1993)와 HLB-2 (Xiaoying과 Wangnian, 1986), 비병원성 *A. vitis* strain E26 (yajie 등, 1990) 등의 포도 뿌리혹병 방제에 효과적인 길항세균을 분리하였다.

Pu와 Goodman (1993)은 HLB-2을 발암성 strain과 동시접종 또는 접종 전에 처리하였을 때, 그리고 병원성 strain의 농도보다 더 높은 농도로 처리하였을 때 혹 형성 억제에 효과적이었다고 보고하였다. Staphorst 등(1985)은 비병원성 *A. vitis* strain F2/5가 기내에서 *A. vitis* strain의 성장을 크게 억제함은 물론 포도나무의 혹 형성도 억제 시켰다고 보고하였다. 또한 Burr와 Reid (1993)도 F2/5를 병원균과 동시접종하거나 전 접종했을 때 가장 효과가 좋았다고 보고하였다.

## 제 2 절 재 료 및 방 법

### 1. 무병주 선발 및 식물체 증식

#### 1) 포도나무의 잠재감염 조사

포도나무 줄기 혹 병반과 토양으로부터 세균의 분리는 희석평판법으로 실시하였다. 토양, 이병줄기 및 혹으로부터 1g를 채취하여 토양은 그대로, 이병줄기 및 혹은 잘게 마쇄하여 5ml의 살균수에 넣고 혼합하였다. 혼합액을 단계적으로 희석하여 20 $\mu$ l를 nutrient agar (NA) 평판배지에 도말한 다음 28 $^{\circ}$ C의 항온기에서 48시간 배양하였다. 배지에 나타난 colony중에 색깔과 모양이 *Agrobacterium* 속과 유사한 colony를 떼어 yeast mannitol agar (YM) 사면배지에 이식하여 28 $^{\circ}$ C의 항온기에서 48시간 배양하고 재차 순수 분리하여 4 $^{\circ}$ C에서 보관하고 실험에 사용한다.

#### 2) 병원성 검정

병원성 검정은 TSA medium (Yeast extract 5g, tryptone 5g, sucrose 5g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2g, agar 15g, 증류수100ml, pH6.6)에 접종하여 28 $^{\circ}$ C에서 2일, 5일간 배양한 후에 사용하였다. 병원성 검정은 당근, 토마토 줄기 및 포도 줄기로 검정하였다. 당근은 건전한 것을 시장에서 구입하여 약 1cm 두께로 절단한 후 절단면에 10<sup>8</sup>cfu/ml농도의 세균을 접종한 다음 28 $^{\circ}$ C에서 2주간동안 혹의 형성유무를 조사하였다. 또한 표면 살균한 토마토 줄기에 칩 접종하여 온실에서 3주간 혹의 형성유무를 조사하였다. 포도는 거봉의 줄기를 25~30cm 정도로 잘라 상처(2 $\times$ 2 $\times$ 2mm)를 준 다음에 10<sup>8</sup>cfu/ml농도의 세균을 10 $\mu$ l씩 접종하여 온실에서 7~14일 후에 혹의 형성 유무를 조사하였다.

#### 3) biovar 식별

포도나무에 병원성이 확인된 균주를 10<sup>6</sup>cells/ml농도로 희석하여 biovar 검정배지에 접종하여 28 $^{\circ}$ C의 항온기에서 4일간 배양 후 선택배지에서 성장유무에 따라 biovar를

검색하였다. 선택배지의 조성은 아래와 같다.

Medium 3 DG (for biovar 3 strains with selectivity based on D-glutamic acid and tartrate).

Solution A: water, 500 ml; sodium tartrate. 2H<sub>2</sub>O (25mmol/l), 5.75g; D-glutamic acid (4% aqueous, pH 7 with NaOH), 15ml; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. 2H<sub>2</sub>O (40 mmol/l), 6.24g; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (30mmol/l), 4.26g; NaCl (100 mmol/l), 5.84g; MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O (1.0 ml; Congo red (1% aqueous), 2.5 ml.

Solution B: water, 500 ml; MnSO<sub>4</sub>. 4H<sub>2</sub>O (5 mmol/l), 1.12 g ; Davis Agar, 15 g. Dispense solutions A and B separately in 50 ml lots and autoclave at 120°C for 15 min. Before pouring, add, per 50 ml solution B, actidione (2% aqueous), 1.0 ml; Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>. 5H<sub>2</sub>O (1% aqueous), 0.5 ml; solution A(at 50°C), 50 ml. A precipitate forms and is redistributed by recapping the bottle and inverting several times. (Brisbang and Kerr, 1983.)

#### 4) 삽수 및 대목으로부터의 잠재감염 검정

줄기를 상부, 중부, 하부로 나누어 12~15cm씩 자른 다음 95% ethanol에 담근 다음에 줄기표면을 불로 태워 멸균하였다. 치환수는 0.1 MPa에서 강제로 줄기단편을 통과시켜 끝에서 멸균된 피펫으로 모았다. 잠재 감염된 세균의 측정은 첫 번째 1.5~2.0ml의 액을 모아 멸균튜브에 넣고 선택배지를 넣은 Petridish에 0.1ml씩 도말 배양하였다. 또한 포도 줄기 70% ethanol로 표면 살균하고 줄기를 잘라 30초 동안 즙액을 받아 측정하였다.

분리한 세균의 병원성 검정은 토마토종자를 0.5% 차염소산나트륨으로 5분간 소독하여 시험관배지(0.01% 하이포넥스를 가용한 0.1% 소한천 배지를 입구 2cm까지 넣고 멸균)에 파종하여 28~30°C에서 3-4일간 두고 발아 후는 25~25°C의 광조건에서 육성하였고 필요시에는 0.1%의 하이포넥스 용액을 가했다. 파종후 약 10일 후 분얼이 발생한 시기에 접종하였다. 접종은 자엽 바로 밑의 줄기를 세균이 묻은 침(5개 묶음)으로 수회 연속적으로 찔러주었다. 보통 7~14일 후에 흑의 유무가 판정되었다.

## 2. 뿌리혹병 저항성 대목 선발

### 1) 공시대목

천안농업기술센터에서 보유한 SO4 등 뿌리혹 저항성품종으로 알려진 Gloire de Montpellier (Suule 등, 1994), 3309C, T5C, Riparia gloire, 101-14 (Stover 등, 1997), 5BB, 8B, 내한성이 강한 3306, 3309, 188-08 등을 국내외에서 수집하였다.

### 2) 저항성 검정

병원성이 확인된 세균을 King's B 배지에 이식하여 28℃의 항온기에서 48시간 배양한 후 살균수로 세균현탁액(약  $10^8$  cells/ml)을 만들어 포도 줄기에 침 접종하여 온실에서 14일 후에 혹의 형성 유무를 조사하였다.

### 3) 무병주의 선발 및 보존

삽수의 채취는 저장양분이 많은 1년생의 무병 가지의 중간부위를 사용하였으며 가지는 전정시에 채취하였다. 삽수의 저장을 위해 채취한 삽수를 30~40cm 정도의 길이로 잘라 습기가 있는 모래톱밥으로 덮어 5℃ 정도의 저온 저장고에 저장하였다.

껌꽃이 토양은 살균한 무병토양 사용하였으며 꺾꽂이는 3월 하순~4월 상순경에 실시하였다. *Agrobacterium vitis*에 대한 무병주 선발을 위해 주별로 3개씩을 무작위로 채취하여 조직을 마쇄한 후에 세균을 순수분리하고 당근에 접종하여 혹의 형성유무를 조사하였다. 또한 새로 개발한 primer를 사용하여 병원균의 존재유무를 검정하였다. 무병묘목의 생산을 위하여 무병주로부터 1년생 가지의 중간부위를 30~40cm 정도의 길이로 잘라 습기가 있는 모래톱 밥으로 덮어 5℃ 정도의 저온 저장고에 저장하였다. 삽목은 3월 하순~4월 상순경에 실시하였으며 묘목의 혹 형성유무를 다시 확인하였다.

#### 4) 인접토양의 오염도 조사

토양으로부터 뿌리혹병의 분리는 건진 뿌리 및 줄기에 흙이 있는 부위의 흙을 채취하여 사용할 때까지 냉장고에 보관하였다. 100ml의 멸균수에 10g의 흙을 섞어 진탕한 후에 0.1ml를 취하여 28℃에서 5일간 평판 배양하였다. 병원세균과 유사한 colony는 병원성을 검정하였다.

PCR 법에 의한 병원세균의 검출은 100ml의 멸균수에 10g의 흙을 섞어 1시간 진탕시킨 후 상층액을 5 $\mu$ ml membrane filter로 거른다. 걸러진 여액을 0.45 membrane filter로 회수하여 선택배지를 넣은 튜브에 넣고 진탕 배양한 후 원심분리한 후 PCR을 실시하였다.

### 제 3 절 결과 및 고찰

#### 1. 무병주 생산 및 보급체계의 확립

##### 1) 국내의 포도뿌리혹병 발생현황

우리나라 포도 주산지 중의 하나인 천안의 거봉포도의 뿌리혹 발생현황을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 거봉포도 주산지인 천안지역의 거봉포도 뿌리혹병의 발생주율은 2년생에서 21~29%, 평균발생율은 21.4%, 4~5년생은 56.6~70.1%, 평균발생율은 64.9%, 6~7년생은 78.8~84.0%, 평균발생율은 81.1%, 8년 이상은 79.5~92.3%, 평균발생율은 86.0%로 수령이 증가할수록 발생율도 증가하였다.

수령이 증가할 뿌리혹병율이 증가하는 것은 매년 월동을 시키기 위하여 토양에 묻기 때문에 토양으로부터 병원세균이 감염되는 횟수가 증가하기 때문으로 생각된다. 지역이나 포장별로 발병율이 차이가 나는 것은 묘목의 감염유무, 토양의 오염 등에 따라 차이에 기인된다고 추정된다.

Table 1. Incidence of crown gall on Kyoho in Cheoan area

Plant age	Area	No. of field	No. of plants	No of plants with gall	Palnt with gall/Total plants (%)
3	Ibjang	1	2,500	518	21.0
	Seongger	1	132	34	25.0
	Gigsan	1	145	43	29.0
	Average		925	198	21.4
4~5	Ibjang	2	1,350	938	69.4
	Seongger	2	1,376	780	56.6
	Gigsan	3	1,029	722	70.1
	Average		1,252	813	64.9
6~7	Ibjang	1	500	418	84.0
	Seongger	3	1,728	1,384	80.0
	Gigsan	3	1,190	938	78.8
	Average		1,139	913	80.1
Over 8	Ibjang	3	1,480	1,271	85.8
	Seongger	2	1,168	1,079	92.3
	Gigsan	3	1,094	870	79.5
	Average		1,247	1,073	86.0
Average	-				65.6

조사기간 : 2002. 4. 22~23

포도 주산지의 뿌리혹병 발생주율 및 발생정도를 조사한 결과는 Table 2와 같다. 안성지역의 노지재배한 거봉은 발병주율이 1.4~100%로 재배포장에 따라 크게 차이가 있었다. 천안지역 거봉포도의 노지재배에서도 2.3~97.9%로 재배포장에 따라 발병율의 변이가 매우 다양하였다. 그러나 영동지역의 노지재배에서는 거봉이 0.4%, 자옥이



11.9%로 매우 낮은 발병주율을 나타냈다.

하우스 재배한 거봉은 3.3%의 발병율을 나타내었다. 김천지역의 하우스재배용 캠벨은 0~3.9%로 매우 낮았으며 많은 포장에서 뿌리혹을 발견하지 못하였다.

영동지역의 거봉에서 흑병이 적게 발생한 것은 이 지역에서는 토양에 묻어 월동을 하지 않을 뿐만 아니라 이 지역은 병원균이 토양에 오염되지 않았기 때문이라고 생각된다. 또한 하우스 재배에서 발병이 적은 것도 토양 내에서 월동시키지 않아도 월동이 가능한데 기인된다. 따라서 하우스재배도 포도의 뿌리혹병을 억제시키는 방법으로 판단된다.

Table 2. Incidence of crown gall on grape veins in main culture area

Area	Plant age	Variety	Total plants	Plant with gall	Plant with gall/ Total plants(%)
Anseon(Field)	6~8	Kyoho	480	366	76.3
Anseon(Field)	6~8	Kyoho	400	85	21.3
Anseon(Field)	6~8	Kyoho	400	43	10.8
Anseon(Field)	6~8	Kyoho	600	365	60.8
Anseon(Field)	4~5	Kyoho	528	330	62.5
Anseong(house)	4~5	Kyoho	576	576	100
Anseong(field)	6	Kyoho	315	294	93.3
Anseong(field)	8	Kyoho	240	235	97.9
Anseong(house)	6~8	Kyoho	209	7	3.3
Anseon(field)	"	Kyoho	493	7	1.4
Cheonan(field)	"	Kyoho	480	470	97.9
Cheonan(field)	"	Kyoho	468	52	11.1
Cheonan(field)	"	Kyoho	372	8	2.2

Table 2. Continued

Area	Plant age	Variety	Total plants	Plant with gall	Plant with gall/ Total plants(%)
Okcheon(house)	"	Kyoho	550	51	9.3
Okcheon(house)	"	Kyoho	488	7	1.4
Gimcheon(house)	10~12	Campbell Early	630	11	1.8
Gimcheon(house)	"	Campbell Early	1,044	12	1.2
Gimcheon(house)	"	Campbell Early	286	11	3.9
Gimcheon(house)	"	Campbell Early	220	0	0
Gimcheon(house)	"	Campbell Early	455	0	0
Gimcheon(house)	6~8	Campbell Early	336	0	0
Yongdong(field)	"	Kyoho	550	2	0.4
Yongdong(field)	"	Jaok	252	30	11.9

2002년 11월 4-5일 조사



Fig. 1. Crown galls of grapevines

2) 포도재배토양 및 포도 식물체 부위별 세균 및 흑병유발 세균 밀도

포도 재배토양 및 포도조직의 일반세균 밀도와 흑병균의 세균 밀도를 조사한 결과 Table 3과 같다. 토양의 일반세균수는  $10^4 \sim 10^6$  cells/g 비율로 분포하였고, *Agrobacterium* 선택배지에서는  $10^2 \sim 10^4$  cells/g 비율로 분리되었다. 포도 줄기의 일반세균수는  $10^2 \sim 10^5$  cells/g 비율이고, *Agrobacterium* 선택배지에서는  $0 \sim 10^3$  cells/g 비율로 분리되어 토양보다 일반적으로 낮은 비율로 분리되었고 14개체의 *Agrobacterium* 선택배지에서는 세균이 분리되지 않았다. 뿌리혹에서는 일반세균수가  $10^2 \sim 10^4$  cells/g 밀도가  $10^7$  cells/g 이상인 줄기가 다수 있었다. *Agrobacterium* 선택배지는  $10^2 \sim 10^4$  cells/g로 분리되었다.

이상과 같이 *Agrobacterium* 선택배지에서 높은 농도의 세균이 분리되었으며, 특히 뿌리혹의 병반에서 높은 농도로 분리되었다.

Table 3. Bacterial concentration of soils, grape plants and galls

	Soil		Grape plant		Gall	
	King's medium	RS medium	King's medium	RS medium	King's medium	RS medium
1	$2.0 \times 10^5$	-	$1.2 \times 10^5$	-	$10^7$ 이상	$1.4 \times 10^3$
2	$1.5 \times 10^5$	$6.0 \times 10^2$	$7.2 \times 10^5$	$4.5 \times 10^3$	$10^7$ 이상	$9.6 \times 10^4$
3	$4.0 \times 10^5$	$1.0 \times 10^3$	$1.8 \times 10^4$	$5.6 \times 10^3$	$4.0 \times 10^5$	$2.4 \times 10^3$
4	$3.5 \times 10^5$	$6.5 \times 10^2$	$3.4 \times 10^4$	$8.4 \times 10^3$	$2.0 \times 10^5$	$1.4 \times 10^3$
5	$5.0 \times 10^5$	$6.0 \times 10^2$	$7.5 \times 10^3$	$3.0 \times 10^2$	$10^7$ 이상	$3.2 \times 10^4$
6	$1.5 \times 10^6$	$2.0 \times 10^3$	$4.3 \times 10^5$	$1.2 \times 10^3$	$1.6 \times 10^5$	$1.4 \times 10^3$
7	$5.0 \times 10^5$	$9.0 \times 10^2$	$4.0 \times 10^5$	$4.5 \times 10^3$	$10^7$ 이상	$9.0 \times 10^2$
8	$1.1 \times 10^6$	$2.0 \times 10^2$	$2.3 \times 10^5$	$1.3 \times 10^4$	$4.0 \times 10^5$	$1.3 \times 10^4$
9	$5.5 \times 10^5$	$3.0 \times 10^2$	$1.1 \times 10^5$	-	$10^7$ 이상	$7.0 \times 10^2$
10	$7.0 \times 10^5$	$2.5 \times 10^2$	$1.3 \times 10^6$	-	$10^7$ 이상	$4.8 \times 10^3$
11	$7.0 \times 10^5$	$1.7 \times 10^3$	$1.1 \times 10^5$	-	$4.7 \times 10^5$	$2.4 \times 10^3$

Table 3. Continued

	Soil		Grape plant		Gall	
	King's medium	RS medium	King's medium	RS medium	King's medium	RS medium
12	$2.4 \times 10^5$	$3.0 \times 10^2$	$7.0 \times 10^4$	-	$10^7$ 이상	$3.2 \times 10^3$
13	$3.0 \times 10^5$	$2.4 \times 10^2$	$1.1 \times 10^5$	-	$10^7$ 이상	$1.6 \times 10^3$
14	$9.1 \times 10^6$	$1.0 \times 10^4$	$1.7 \times 10^5$	-	$4.8 \times 10^5$	$3.4 \times 10^3$
15	$1.9 \times 10^5$	$6.0 \times 10^2$	$6.6 \times 10^4$	-	$3.0 \times 10^5$	$1.4 \times 10^3$
16	$2.8 \times 10^6$	$2.0 \times 10^3$	$7.5 \times 10^3$	$3.5 \times 10^3$	$10^7$ 이상	$1.8 \times 10^4$
17	$3.5 \times 10^5$	$7.0 \times 10^2$	$5.4 \times 10^5$	-	$1.5 \times 10^6$	$4.3 \times 10^3$
18	$2.0 \times 10^5$	$2.5 \times 10^2$	$8.3 \times 10^4$	-	$4.4 \times 10^5$	$3.4 \times 10^3$
19	$3.0 \times 10^4$	$7.5 \times 10^2$	$4.3 \times 10^5$	-	$6.0 \times 10^5$	$1.6 \times 10^3$
20	$7.5 \times 10^4$	$5.0 \times 10$	$3.3 \times 10^5$	-	$4.0 \times 10^5$	$4.4 \times 10^3$
21	$1.5 \times 10^5$	$1.1 \times 10^4$	$5.8 \times 10^4$	-	$2.0 \times 10^5$	$1.4 \times 10^3$
22	$1.5 \times 10^5$	$1.0 \times 10^2$	$3.5 \times 10^3$	$1.3 \times 10^3$	$4.0 \times 10^5$	$1.7 \times 10^3$
23	$1.5 \times 10^5$	$3.6 \times 10^3$	$2.6 \times 10^5$	-	$10^7$ 이상	$1.2 \times 10^4$

토양, 포도 줄기 및 흑으로부터 *Agrobacterium* 선택배지로 분리한 세균은 토마토나 칼랑코에 등에 흑을 형성하는 균주가 극소수로 나타났다(Table 4). 토양으로부터 분리한 430 균주 중에서 흑을 형성하는 것은 3균주였고, 포도나무 줄기에서 분리한 4,994 균주 중에서는 흑을 형성하는 균주는 전혀 없었으며, 흑으로부터 분리한 1,128균주 중에서는 5균주만이 흑을 형성하였다. 이와 같이 자연 상태에서의 뿌리흑균의 분리비율은 높지 않았다.

Lehoczky(1968)는 뿌리흑이 발병된 줄기의 물관부 삼출액, 흑이 없는 줄기로부터 (Lehoczky, 1978), 뿌리로부터 (Lehoczky, 1971) *Agrobacterium vitis*를 분리하였다고 하였으나 본 실험에서는 매우 낮은 밀도로 분리되어 새로운 분리방법을 개발해야 할 것으로 판단된다.

이상과 같이 *Agrobacterium* 선택배지는 분리된 세균 중에서 대부분이 흑을 형성하

지 않은 것은 자연 상태에서는 선택배지에서 증식할 수 있는 세균이 많다는 것을 의미하고 *Agrobacterium* 속 균주는 많이 존재하지 않았음을 의미한다. 따라서 선택배지만으로 균주의 밀도를 검정한다는 것은 곤란할 것으로 판단된다.

Table 4. Tumor formation of bacteria isolated from soils, grape plants and galls

	Soil		Grape plant		Gall	
	No. of isolate	No. of gall formed isolate	No. of isolate	No. of gall formed isolate	No. of isolate	No. of gall formed isolate
1	4	0	233	0	27	0
2	3	0	126	0	192	2
3	8	0	36	0	-	-
4	7	0	61	0	-	-
5	10	0	2	0	10	0
6	30	1	856	0	-	-
7	10	0	808	0	18	0
8	22	0	90	0	-	-
9	11	0	256	0	14	0
10	14	0	166	0	95	0

### 3) 뿌리혹병 저항성 대목 선발

외국으로부터 수입한 저항성 대목에 *Agrobacterium vitis*를 인공 접종하여 혹의 발생유무를 조사한 결과는 Table 5 및 6과 같다. SO4-1대목은 CNU 51과 CNU 64균주의 배양액을  $10^{2-4}$  cells/ml로 희석하여 접종한 경우는 혹이 전혀 형성되지 않았으며  $10^6$  cells/ml 이상에서는 혹이 발생하였으나 발병빈도가 낮았으며 혹의 크기도 거봉에 비하여 작았다. SO4-2 대목은 SO4-1보다 낮은 세균농도인  $10^2$  cells/ml에서 발병하였으며 크기도 약간 크게 발생하였다. 5BB-2 대목은 5BB-1보다 낮은 농도인  $10^4$

cells/ml의 농도에서 발병하였다. 5C 대목은  $10^4$  cells/ml에서 흑이 발생하지 않았으나  $10^6$  cells/ml에서는 약간 발생하였다. 저항성대목이 인공 접종 시에 흑이 발생하였으나 자연 상태에서의 흑병균의 농도가  $10^2$  cells/ml인 경우는 거의 없을 것으로 생각된다. 자연 상태에서 *A. vitis*의 밀도는 매우 낮기 때문에 인공 접종한 결과보다 흑의 발생 가능성은 낮을 것으로 생각된다.

포도 뿌리흑병 대해 저항성인 품종이나 대목을 재식하므로써 포도 뿌리흑병에 대해 저항성인 대목을 재식하므로써 포도 뿌리흑병을 방제하는 방법들이 논의되어 왔다. Sule와 Burr(1998)는 포장 조건하에서 포도 뿌리흑병에 저항성 대목에 접목하였을 때 포도 뿌리흑병에 현저하게 감소하였음을 보고하였다. 따라서 본 시험을 통하여 얻어진 저항성 대목의 이용은 뿌리흑병 방제에 도움이 될 것으로 판단된다.

Table 5. Evaluation of resistance to crown gall in grape rootstocks

Variety	Isolate			
	YK2823	YK3312	LMG259	HKA234
Kyoho	+++	+++	++	+++
Campwell Early	++	+	-	+
5CC	++	+	-	+
3309	+	+	-	+
5BB	-	-	-	-
LN33	+++	+++	+	+++
1201	++	+	-	++
188-08	+	+	-	+
3306	-	-	-	-
CF	++	+	-	+
101-14	+	-	-	+
SO4	-	-	-	-



Fig. 2. Comparison of tumors formed on two grape cultivars and three rootstocks after inoculation with *A. vitis*.

Table 6. Development of tumors on rootstocks by different concentrations of *A. vitis* one month after inoculation

Rootstock	Bacterial inoculum (cells/ml)	Tumor size	
		CNU 51	CNU 64
SO4-1	$10^2$	-	-
	$10^4$	-	-
	$10^6$	++	++
	$10^8$	++	++
SO4-2	$10^2$	-	-
	$10^4$	-	-
	$10^6$	++	++
	$10^8$	++	++
5BB-1	$10^2$	-	-
	$10^4$	-	-
	$10^6$	+	-
	$10^8$	++	+
5BB-2	$10^2$	-	-
	$10^4$	+	+
	$10^6$	++	+
	$10^8$	+++	++

Table 6. Continued

Rootstock	Bacterial inoculum (cells/ml)	Tumor size	
		CNU 51	CNU 64
5C	10 <sup>2</sup>	-	-
	10 <sup>4</sup>	-	-
	10 <sup>6</sup>	++	++
	10 <sup>8</sup>	++	++
거봉	10 <sup>2</sup>	++	++
	10 <sup>4</sup>	+++	+++
	10 <sup>6</sup>	+++	+++
	10 <sup>8</sup>	+++	+++

- : No formed. + : Tumor size 1~2mm, ++ : 2~5mm, +++ : over 5mm.

#### 4) 무병주 선발

1990년대 일본으로부터 바이러스 및 흑병 무병주인 거봉포도를 구입하여 충남대학교 부속농장에 재배하는 동안 바이러스나 흑병이 한번도 발생한 적이 없는 거봉포도의 줄기를 개체별로 뿌리혹의 발생유무를 조사한 결과 Table 7에서와 같이 뿌리혹병이 전혀 발생하지 않았으며, 이 모주로부터 2003년에 삽수를 대량 채취하여 삼목한 결과 삼목수 600 개체 중에서 1개체도 흑병이 발병하지 않았다.

1차 삼목하여 무병주로 확인된 삼목 주에서 2차 삼목 하여 뿌리혹의 발생유무를 조사한 결과 Table 8과 같다. 총 1800 개의 삽수를 삼목한 결과 삼목주에서 전혀 흑이 발생하지 않았다.

이러한 결과는 무병주를 선발하고 무병토양에서 증식한다면 무병묘의 대량생산이 가능하다는 것을 의미한다. 완전 무병주를 선발하여 삽수로 사용하면 DNA marker를 이용한 검정법이나 토마토 등을 이용한 병원성의 검정이 필요하지 않았다. 앞으로 뿌리혹병이 발생하는 지역에서 삽수를 취하고 이를 이용하여 대량증식이 필요할 때는 DNA marker를 이용한 무병주의 선발 및 삼목주의 흑병균 유무를 검정할 필요가 있을 것으로 생각된다. 그러나 안정적인 무병주를 생산하기 위해서는 흑병이 발생하지 않는 지역에서 무병주를 선발하고 무병지역에서 삼목을 실시한다면 가장 안전한 무병



주의 공급 방법이 될 것으로 판단된다.

Table 7. Test of crown gall bacteria free plants

No.	No. of plants gall formed	No. of stem cutting	No. of plants gall formed	No.	No. of plants gall formed	No. of stem cutting	No. of plants gall formed
1	0	40	0	9	0	40	0
2	0	40	0	10	0	40	0
3	0	40	0	11	0	40	0
4	0	40	0	12	0	40	0
5	0	40	0	13	0	40	0
6	0	40	0	14	0	40	0
7	0	40	0	15	0	40	0
8	0	40	0	계	0	600	0

Table 8. Test of crown gall bacteria free plants on grape clones

Clones No.	Plant	No. of stem cutting	No. of plants gall formed	Growth condition
CNG 1-	1	40	0	good
	2	40	0	"
	3	40	0	"
CNG 2-	1	40	0	"
	2	40	0	"
	3	40	0	"
CNG 3-	1	40	0	"
	2	40	0	"
	3	40	0	"

Table 8. Continued

Clones No.	Plant	No. of stem cutting	No. of plants gall formed	Growth condition
CNG 4-	1	40	0	good
	2	40	0	"
	3	40	0	"
CNG 5-	1	40	0	"
	2	40	0	"
	3	40	0	"
CNG 6-	1	40	0	"
	2	40	0	"
	3	40	0	"
CNG 7-	1	40	0	"
	2	40	0	"
	3	40	0	"
CNG 8-	1	40	0	"
	2	40	0	"
	3	40	0	"
CNG 9-	1	40	0	"
	2	40	0	"
	3	40	0	"
CNG 10-	1	40	0	"
	2	40	0	"
	3	40	0	"
CNG 11-	1	40	0	"
	2	40	0	"
	3	40	0	"
CNG 12-	1	40	0	"
	2	40	0	"
	3	40	0	"
CNG 13-	1	40	0	"
	2	40	0	"
	3	40	0	"

Table 8. Continued

Clones No.	Plant	No. of stem cutting	No. of plants gall formed	Growth condition
CNG 14-	1	40	0	good
	2	40	0	"
	3	40	0	"
CNG 15-	1	40	0	"
	2	40	0	"
	3	40	0	"

## 2. 토양의 오염도 조사

천안과 안성의 거봉재배농가에서 토양을 채취하여 King's B agar 배지와 RS선택배지(*Agrobacterium*)를 사용하여 세균밀도를 조사한 결과는 Table 9와 같다. 토양의 세균 밀도는  $10^5$  cells/g 내외였으며 RS선택배지에서는  $10^{1-4}$  cells/g의 밀도로 분리되었다. 그러나 선택배지에서 각 sample 당 50균주씩을 선발하여 혹의 발생을 조사한 결과 0~2 균주만이 혹을 형성하였으며 대부분의 균주는 혹을 형성하지 않았다. 이러한 결과는 토양에 존재하는 *Agrobacterium*의 혹 형성력이 낮은 것으로 판단된다.

따라서 토양에서 분리한 균주의 혹 형성능력만으로 토양의 오염 유무를 결정하기는 곤란하였다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 분자 marker의 사용이 효율을 높일 것으로 생각된다.

Table 9. Concentration of total bacteria and gall formed bacteria isolated from grape cultivated soil and grape plants

Field No.	Bacteria (cells/soil g)		No. of gall formed isolate	
	King's medium	RS medium	No. of isolate	No. of gall formed isolates
1	$2.0 \times 10^5$	$2.3 \times 10^1$	50	1
2	$1.5 \times 10^5$	$2.9 \times 10^2$	50	2
3	$4.0 \times 10^5$	$1.0 \times 10^3$	50	1
4	$3.5 \times 10^5$	$6.5 \times 10^2$	50	0
5	$5.0 \times 10^5$	$6.0 \times 10^2$	50	0
6	$1.5 \times 10^6$	$2.0 \times 10^3$	50	1
7	$5.0 \times 10^5$	$9.0 \times 10^2$	50	0
8	$1.1 \times 10^6$	$2.0 \times 10^2$	50	2
9	$5.5 \times 10^5$	$3.0 \times 10^2$	50	2
10	$7.0 \times 10^5$	$2.5 \times 10^2$	50	1
11	$7.0 \times 10^5$	$1.7 \times 10^3$	50	0
12	$2.4 \times 10^5$	$3.0 \times 10^2$	50	1
13	$3.0 \times 10^5$	$2.4 \times 10^2$	50	2
14	$9.1 \times 10^6$	$1.0 \times 10^4$	50	1
15	$1.9 \times 10^5$	$6.0 \times 10^2$	50	0
16	$2.8 \times 10^6$	$2.0 \times 10^3$	50	2
17	$3.5 \times 10^5$	$7.0 \times 10^2$	50	1
18	$2.0 \times 10^5$	$2.5 \times 10^2$	50	2
19	$3.0 \times 10^4$	$7.5 \times 10^2$	50	1
20	$7.5 \times 10^4$	$5.0 \times 10$	50	0

혹의 발생 유무는 당근 뿌리 사용

뿌리혹으로부터 분리한 세균의 세균학적 특성은 Table 10과 같다. 대부분의 균주는 호기적으로 증식하였고, D-1배지에서 증식하였으며, 내생포자를 형성하지 않았다. 또한 그람 음성세균이고 형광색소를 형성하지 않는 균이 대부분이었다. 혹을 형성하는 균도 극소수였다.

Table 10. Bacteriological characteristics and gall formed of isolates from grape galls

Isolate	Ga	D1	Sp	Gr	Fp	3K	Na	Nu	Su	Er	Me	Ma
CNB1	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+
CNB2	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
CNB3	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
CNB4	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
CNB5	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+
CNB6	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
CNB7	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+
CNB8	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
CNB9	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+
CNB10	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+
CNB11	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+
CNB12	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
CNB13	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
CNB14	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
CNB15	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+
CNB16	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
CNB17	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
CNB18	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+
CNB19	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+
CNB20	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+
CNB21	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+
CNB22	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+
CNB23	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+
CNB24	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
CNB25	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
CNB26	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
CNB27	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
CNB28	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+
CNB29	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+
CNB30	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+

Table 10. Continued

Isolate	Ga	D1	Sp	Gr	Fp	3K	Na	Nu	Su	Er	Me	Ma
CNB31	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
CNB32	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
CNB33	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+
CNB34	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+
CNB35	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+
CNB36	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
CNB37	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+
CNB38	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
CNB39	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+
CNB40	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+
CNB41	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
CNB42	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
CNB43	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+
CNB44	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+
CNB45	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
CNB46	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+
CNB47	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
CNB48	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+
CNB49	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
CNB50	+	-+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
CNB51	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
CNB52	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+
CNB53	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
CNB54	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+
CNB55	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
CNB56	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
CNB57	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-
CNB58	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+
CNB59	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
CNB60	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
CNB61	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+
<i>A. vitis</i>	+	+	-	-	V	+	V	V	-	-	+	

Table 10. Continued

Isolate	Ta	Pr	Mu	Fe	Lt	Ox	Ci	Ne	Sc	Gall formation	
						+				Carrot	Grape
CNB1	+	+/-	+	+	+	-	+	-	-	-	+
CNB2	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
CNB3	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
CNB4	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
CNB5	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
CNB6	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
CNB7	+	+/-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
CNB8	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
CNB9	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
CNB10	+	+	+	+	-	V	+	-	-	-	-
CNB11	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
CNB12	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
CNB13	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
CNB14	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
CNB15	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
CNB16	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
CNB17	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
CNB18	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
CNB19	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
CNB20	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
CNB21	+	+	+	+	+	+/-	+	-	-	-	-
CNB22	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
CNB23	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
CNB24	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
CNB25	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
CNB26	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-
CNB27	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
CNB28	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-
CNB29	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
CNB30	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
CNB31	+	+	+	-	+	+/-	+	-	-	-	-
CNB32	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
CNB33	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
CNB34	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
CNB35	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
CNB36	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
CNB37	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-
CNB38	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
CNB39	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-

Table 10. Continued

Isolate	Ta	Pr	Mu	Fe	Lt	Ox	Ci	Ne	Sc	Gall formation	
						+				Carrot	Grape
CNB40	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
CNB41	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
CNB42	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-
CNB43	+	+	+	-	-	+/-	+	+	+	-	-
CNB44	+	+	-	-	+	+/-	+	+	-	-	-
CNB45	+	-	+	+	+	+/-	+	-	-	-	-
CNB46	+	+	+	-	-	+/-	+	-	-	-	-
CNB47	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
CNB48	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-
CNB49	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
CNB50	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-
CNB51	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
CNB52	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
CNB53	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
CNB54	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
CNB55	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
CNB56	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
CNB57	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
CNB58	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
CNB59	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
CNB60	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
CNB61	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-

3K : 3-Ketolactose production, Na : Growth in 2% NaCl, Nu : Growth at 35°C, Su : Acid from Sucrose, Er : Acid from Erythritol, Me : Acid from Melezitose, Ma : Alkali from Malonic acid, Ta : Alkali from L-tartaric acid, Pr : Alkali from propionic acid, Mu : Alkali from Mucic acid, Fe: Ferric ammonium citrate, Lt : L-tyrosine utilization, Ox : Oxidase reaction, Ci : Citrate utilization, Ga : Growth aerobically, D1 : Growth on D-1 agar, Sp : Spores formed, Gr : Gram positive, Fp : Fluorescent on KB, Ne : New and kerr medium, Sc: Scroth medium



## 제 3 장 DNA marker를 이용한 뿌리혹병균의 정밀 검정법 확립

### 제 1 절 서 언

최근에 분자생물학의 발달로 1980년대부터 DNA를 이용한 미생물의 검정기술이 개발되어 종 다양성 검정 및 종의 분류 미생물의 신속한 검출 등, 획기적인 전기를 마련하며 급속히 발전하고 있다. 이 분자생물학적 기법은 위의 생리적, 형태적 방법에 비해 환경적 영향을 배제할 수 있으며, 적은 밀도의 미생물에서 신속, 정확하게 고도의 민감성으로 검출 할 수 있다.

최근에는 DAN 교배(交配 : habridization)와 DNA probe에 의한 PCR방법이 개발되어 미생물의 특정종의 검출, 자연환경내의 검출, 유전적 유연관계분석에 널리 사용되고 있다. 특히 PCR기법은 1983년 미국의 Cetus Mulis에 의하여 고안되어 DNA중합 효소로서 Klenow fragment 을 이용하여 실시해 오다가, 1988년 Saiki에 의해 온천지역과 같은 고온에서 생육하는 세균인 *Thermus aquatus*로 부터 열에 안정한 Taq DNA polymerase 를 분리, 이용 하면서부터 PCR법을 비약적으로 보급 시키는 요인이 되었다. PCR 법의 개발로 DNA 염기서열결정, 유전병진단, 특히 세균 및 바이러스검출, 핵산지문에 의한 개체간 DNA band 다형성 확인, 병원균의 존재유무 확인 등에 이용하고 있다.

분자생물학적 방법을 이용한 자연 상태에서 *A.vitis*의 검출과 유전적 다양성 확인방법으로는 Specific primer에 의한 PCR 분석, rDNA의 ITS 및 IGR영역 분석, Rep-PCR법, AFLP, RAPD, AP (Arbitrary Primer)-PCR법 등이 있다. Specific primer에 의한 분석법은 T-DNA 영역에 존재하는 병원성 관련 유전자 인 vir 유전자 virC1, virG, virC2, 등으로부터 특이 primer를 만들어 이용된 바 있다. 그러나, 이 DNA 마커들은 *Agrobacterium. spp.*에 보존적인 유전자를 이용함으로써 특이성 없이 다른 종 또는 비병원성 *A. vitis*를 검출하는 것이 문제점이다. rDNA분석법은 5.8S

rDNA영역을 가운데 두고 18S 와 23S rDNA영역 양쪽에 변이가 많은 ITS와 IGR영역을 특이적으로 PCR 증폭하여 염기배열을 비교분석 또는 PCR산물을 제한효소로 절단 전기영동 하여 DNA다형성을 분석하는 방법이다. ITS영역을 증폭할 수 있는 PCR primer가 개발되어 있어 시료가 확보된다면 쉽게 접근할 수 있는 방법이며 재현성이 높은 장점이 있으나 근연종에 있어 분석에 한계점이 있다.

AFLP 방법의 원리는 genomic DNA를 제한효소로 이중절단한 후 그 DNA 단편들의 양끝을 adaptor로 표지하고, 표지부위의 DNA 염기서열을 바탕으로 작성한 primer를 사용하여 특정 제한효소 조합에 의해 생성된 DNA 단편을 증폭시킨 후 이 증폭산물의 차이 유무를 비교하는 것이다. AFLP는 높은 DNA 다형성을 검출 할 수 있으나 제한효소 처리, 접합, PCR증폭 등 분석과정이 복잡하고, DNA 순도 시약의 상태 등 일정한 처리가 어려워 재현성이 떨어지는 단점이 있다. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)법은 짧은 primer를 무작위로 이용 genomic DNA를 증폭시키는 방법으로 PCR산물을 agarose gel상에서 전기영동 한 후 분석 할 수 있다. RAPD법은 낮은 annealing온도 조건 등으로 인하여 비 특이적 밴드의 검출 등 재현성이 떨어지는 단점이 있다.

위의 연구법들과 함께 최근에 URP-PCR법에 의한 미생물 종의 핵산지문 분석법이 널리 이용되고 있다. 우리나라 재래적미 계통에서 반복배열 특성을 가진 염색체 DNA 단편인 pKRD 염기배열로부터 12종류의 URP (Universal Rice Primer)가 개발되어 사용되고 있다. URP primer는 다양한 동, 식물 및 미생물 종에 모두 이용 가능한 다범위 primer로 판명되었다. URP primer의 가장 큰 특징은 RAPD방법과 분석법이 유사하나 20개의 핵산으로 구성된 Oligomer로서, URP와 주형 DNA간의 접촉(annealing) 온도를 55°C 이상에서 실시 할 수 있어 재현성이 뛰어나다는 것이 장점이다.

본 연구는 국내외에 분포하는 포도나무 줄기혹병(*Agrobacterium vitis*)균주의 유전적 다양성을 URP-PCR법을 이용하여 구명 하며 포도혹병균을 특이적으로 신속검출 진단할 수 있는 PCR primer 개발과 적용방법을 개발 하고자 실시하였다.

## 제 2 절 재료 및 방법

### 1. 공시균주

본 실험에 이용된 *Agrobacterium* 균주는 Table 11에서 볼 수 있다. 대조균으로 사용한 Standard *A.vitis* 균주는 농촌진흥청 농업과학기술원 식물병리과에서 분양받은 균주(YK2794, YK2800, YK2801, YK2823, YK2827, YK2828, YK3312, YK5050, YK5052)와 BCCM (Belgium Culture Collection Microorganism)에서 도입한 균주(LMG 256, LMG 259, LMG 262, LMG 8750)를 사용하였다, 나머지 균주는 안성, 천안, 수원, 대전 일대의 포도재배 단지에서 분리한 균주를 공시한 것이다. 다른 *Agrobacterium* 종으로는 *A. tumefaciens* (A-208, A-348), *A. rhizogenes* (LMG 63, LMG 152), *Agrobacterium rubi* (LMG 157, LMG 159)를 사용하였다.

### 2. 포도흑병균 분리 및 병원성검정

천안, 안성지역의 거봉포도 농원을 대상으로 7월 초순경 줄기로부터 형성된 흑을 절단하여 흑병균을 분리 하기위한 시료로 이용 하였다. 직경 7mm×7mm의 절단 흑을 멸균수 20ml에 30분씩 2회 세척하여 Petridish에 놓고 걸쭉질을 살짝 벗겨 내고 벗겨진 부위를 두께 2mm의 표면을 절단하여 살균수 0.5 ml가 들어 있는 test tube에 넣고 조직을 분쇄하고 1시간 동안 실온에 방치하였다. 백금선으로 분쇄된 액을 NA (Nutrient Agar or AB 배지)에 streaking 하여 주위에 형성된 colony를 분리하고 포도흑병 특이 primer에 의한 PCR검정을 실시하고 검출된 균주를 토마토, 당근 및 포도에 접종하여 병원성을 확인 하였다.

토마토 병원성검정은 약 20일정도의 토마토 묘목을 기저부위에 상처를 주고  $1 \times 10^8$ 의 농도 접종 한 후 2주 후에 병원성 정도를 조사하였다. 당근접종을 위하여 슈퍼마켓에서 싱싱한 당근을 구입하고 약 1cm 정도의 두께로 절단 한 후 절단 부위에 같은 농도의 접종원을 조정 하여 도말 하여 gall 형성 여부를 2주 후에 병원성을 조사하였다. 포도접종은 포트에 묘목을 이식하고 새 줄기가 나오고 새 잎이 형성된 후 기저부위의 새줄기에 이쑤시개로 상처를 주고 상처 부위에 위와 같은 농도의 접종원을 접

중 하여 1달 후에 gall 형성 유무를 관찰하였다.

### 3. Genomic DNA분리

*A. vitis* 균주를 포함하는 *Agrobacterium* 종의 genomic DNA를 분리하기 위하여 배양 균주중 Single Clony를 취하여 5ml NB(Nutrient broth) 든 Test tube에서 2~3일간 배양하였다. 배양액을 1.5ml Test tube에 수확하여 추출용 완충액 (200mM Tris-HCL PH 8.0, 200mM NaCl, 25mM EDTA, 10% SDS) 567 $\mu$ l와 Proteinase K(20mg/ml) 3 $\mu$ l를 첨가하여 잘 섞어준 다음 37 $^{\circ}$ C 항온기 에서 1시간 동안 Incubation한다. 이 혼합액에 5M NaCl 100 $\mu$ l를 첨가하여 완전히 섞어주고 여기에 2 $\times$ CTAB 【2% CTAB(w/v), 100mM Tris-HCl (pH 8.0), 20mM EDTA (pH 8.0), 1.4M NaCl, 1% PVP(polyvinylpyrrolidoneMr 40,000)】 80 $\mu$ l를 첨가하여 65 $^{\circ}$ C에서 10분간 방치하고 700 $\mu$ l Phenol:Choroform:Isoamylalcohol(25:24:1)을 넣어 잘 섞어준 다음 12,000 rpm에서 원심분리 하였다.

상정액을 새 tube 로 옮기고 0.6 volume Isopropanol을 첨가하고 실온에서 5분간 방치한 후 12,000rpm에서 5분간 원심 분리하여 DNA를 침전하였다. 70%의 ethanol로 DNA침전물을 washing 하여 진공건조 한 후 TE buffer (10 mM Tris-HCl PH8.0, 1mM EDTA) 50 $\mu$ l에 용해하였다. 10mg/ml RNase 2 $\mu$ l를 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 방치하여 그 용액속에 함유된 RNA를 제거 하였다. DNA 함량을 측정(測定)하기 위하여 DNA를 100배 희석하여 Spectrophotometer의 260nm의 파장에서 실시하였다.

### 4. URP-PCR 반응조건

PCR을 위한 반응조건은 Total 50 $\mu$ l로 하였고 반응용액은 10mM Tris-HCl (pH 8.0), 50mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% gelatin, 100ng primer, 50ng Template DNA, 200um dNTP (dATP,dCTP,dGTP,dTTP), 및 2.5unit Taq polymerase (Promega)를 넣어 실시하였다. DNA 증폭을 위해 PTC-200 (MJ. Reasearch)사의 PCR기기를 사용하였다. PCR program은 처음 94 $^{\circ}$ C에서 4분간 pre denaturation 시킨 후 94 $^{\circ}$ C에서 1분간 denaturation, 55 $^{\circ}$ C에서 1분간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 2분 extension 하여 총 35Cycle

실시하였으며 최종 DNA 합성은 72°C에서 10분으로 하였다. 증폭산물은 1.8% Agarose gel에서 5vol/cm 로 전기영동 하였다. Agarose 상에서의 DNA 검출은 ethidium bromide 용액에 염색하여 UV lamp 상에서 DNA 밴드를 촬영하여 분석하였다.

## 5. *A. vitis* 특이검출 Primer제작 및 PCR 검출 방법

*Agrobacterium vitis*의 특이 primer를 제작하기 위하여 병원성 관련 Ti-Plasmid 내의 vir A 영역에서 유래된 Vir A primer set (F:5'-TTCAGTCGCGCAAGCA GTT-3', 5'-CGGCAATTCGTATCACGG-3')와 염색체 상에 존재 하는 Pectin 분해 효소로 알려진 Pectin enzyme hydrolase (*pehA*) 유전자 염기서열로부터 제작한 Peh A primer set (F:5'-CGATGGCGGCGAGGATTT-3', R:5'-ATCGGGCGTGAAACA AGT-3')가 적용 되었다. 또한 *A. tumefaciens*가 아니라는 것을 증명하기 위하여 Ti-Plasmid 내의 virC 영역의 염기서열로 부터 제작한 VCFR primer (5'-ATCATT TCTAGCGACT-3', 5'-AGCTCAAACCTGCTTC-3'A)를 제작 하였다.

Specific primer를 이용한 PCR 반응조건은 10mM Tris-HCl (pH 8.0), 50mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% gelatin, 100ng primer, 50ng Template DNA, 200um dNTP(dATP,dCTP,dGTP,dTTP), 및 PCR buffer 2.5unit Taq polymerase (Promega) 를 넣고 Total Volume 50μl로 실시하였다. PCR 반응은 PTC-200 (MJ. Reasearch) 의 PCR기기를 이용하여 94°C에서 4분간 pre denaturation 시킨후 94°C에서 1분간 denaturation, 60°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분 extension 하여 총 35Cycle 실시하였으며 최종 DNA 합성은 72°C에서 5분으로 하였다. 증폭산물은 1.5% Agarose gel에서 5vol/cm 로 전기영동 하였다. Agarose 상에서의 DNA 검출은 ethidium bromide 용액에 염색하여 UV lamp 상에서 확인하였다.

## 6. PCR 산물의 cloning 및 염기서열 분석

URP2F primer에 의하여 증폭한 특정의 PCR 다형성 밴드를 Agarose gel로부터 도려낸 후 Gel extraction Kit (Q.BIO 사)에 의하여 DNA를 추출 하였다. 추출된 DNA

절편을 pGEM-T vector (Promega 사 제공)에 14 °C에서 overnight하여 ligation 용액 2 $\mu$ l를 *E. coli* (DH5) cell에 형질전환 하였다. Ampicillium (50 ppm)과 X-gal 이 함유하는 LB plate에 형질전환 균을 도말하여 37°C에서 16시간 방치한 후 재조합체라고 생각되는 흰색의 colony를 선발 하여 5ml의 LB broth에 overnight 배양하고 Wizard PCR Preps DNA purification system (Promega)으로 plasmid를 정제하고 DNA절편이 삽입 되었는지 여부를 EcoRI 제한효소를 처리하여 조사하였다.

Sequencing 반응은 BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reation kit (Perkin-Elmer Co.)를 이용하였다. 염기서열 결정은 ABI 3700 automatic sequencer (Perkin-Elmer Co.)로 명지대학교의 그린진바이오텍에 의뢰하여 수행 되었다.

### 제 3 절 결과 및 고찰

#### 1. DNA 및 병원성 검정에 의한 포도혹병 균주의 대량분리

2002년에서 2004년의 3년에 걸쳐 김천, 천안, 안성, 대전, 수원 등지에서 다수의 혹병반을 포도품종으로부터 채집하여 “재료 및 방법”의 기술한 방법으로 병반부위로부터 NA배지에 세균을 배양하여 형성된 *A. vitis* 의 전형적인 흰 배지색을 띠는 세균 colony를 위주로 하여 분리하고 NA 배지에 재 streaking 하여 2일 동안 재 배양 하였다.

Pectate lysase 유전자의 염기서열 부위로부터 제작한 PheA primer와 *A. vitis*의 Ti-plasmid 영역의 virA 유전자 의 특정 영역의 염기서열로부터 *Agrobacterium vitis* 특이 primer인 PheA와 VirA가 보고 된 바 있다. 따라서 다수의 *A. vitis* 균주를 신속, 정확히 분리하기 위하여 배지에 형성된 colony들을 무작위로 Yellow-tip으로 소량의 세균세포를 묻힌 다음에 10  $\mu$ l의 멸균 증류수가 들어 있는 PCR 튜브에서 현탁하고 PCR 반응용액을 첨가하여 PheA와 VirA primer를 첨가해 PCR 증폭을 실시하였다.

500균주를 스크린 한 것 중에서 약 300 균주가 위의 특이 primer로 증폭 되었으며 이들 균주를 당근과 거봉포도 품종에 접종하여 병원성을 확인 한 결과 최종적으로

Table 11의 64균주를 선발 할 수 있었다. Fig 3은 *A. vitis* 균주를 거봉포도 품종과 당근절편에 접종한 후 형성된 병징을 나타낸 것이다. 포도와 당근에 Crown gall이 형성되고 있음을 알 수 있다. 특히 당근은 다수 균주를 접종 할 수 있고 포도의 2달에 비하면 10일정도면 병징을 확인할 수 있어 매우 효율적인 방법으로 사료 된다.



Fig 3. Crown gall on grapevine and carrot disks formed by inoculation of *A. vitis*

Fig 4는 PheA와 VirA primer로 PCR 증폭한 사진으로 PheA primer는 *A. vitis* 균주에서 각각 0.25 kb와 0.5kb의 PCR밴드를 증폭 하였다. 양 primer는 국외 BCCM으로부터 분양받아 대조구로 사용하였던 *A. vitis* 균주인 LMG 256, LMG 259, LMG 262, LMG 8750균에 대하여 모두 특이적 PCR 밴드를 검출 하였으나 *A. radiobactor*, *A. tumefaciens*에서는 동 밴드가 검출 되지 않았다. PheA primer는 다른 *Agrobacterium* 종인 *A. rubi* (LMG 157), *A. rhizogenes* (LMG 152) 에서 *A. vitis*에서 검출한 동일한 PCR밴드를 증폭하여 특이성이 떨어지는 것을 확인 하였다.

국내에서 타 기관에서 분양받은 *A. vitis* 균주를 PheA primer로 PCR 증폭 하였을 때 농촌진흥청 병리과에서 분양받은 YK 균주중 5균주만이 특이적인 PCR밴드를 형성 하였으며 충북대에서 분양받은 441, 448, 451 중에서 451만 PCR증폭 되었다(Table 11). Ti-Plasmid 영역에 존재하는 VirA 유전자 염기서열 부위로부터 제작한 VirA primer

는 국외 *A. vitis* 균주인 LMG 256, LMG 259, LMG 262, LMG 8750에서는 모두 0.5kb의 특이적인 밴드를 증폭 하였으나, 다른 *Agrobacterium* 종에서는 PCR밴드가 검출되지 않아 PheA primer보다는 높은 특이성을 보였다. 반면에 VirA primer를 국내균주에 적용 하였을 때, YK균주 중 YK2828, YK5050, YK5052에서만 PCR증폭 되었으나 다른 균주에서는 PCR 특이밴드가 검출 되지 않았다. 실제적으로 식물병원세균은 Pectate lysase 유전자가 거의 보유 하고 있으며 *Agrobacterium* 종간 또는 균주 간에 매우 유사한 유전자 염기서열로 구성됨으로서 특이성이 결여 된 것으로 사료 되었다.

virA primer는 N과 O/C type의 Ti-plasmid의 vir A영역을 증폭하는 것으로 알려져 있다. 따라서 virA에 검출 되지 않는 *A. vitis* 균주들은 다른 type의 Ti-plasmid를 보유하여 PCR증폭이 불가능하게 되었을 가능성이 있다. 따라서 기 개발된 *A. vitis* PCR특이 primer를 적용 할 경우에 특이성 결여와 특정 Ti-plasmid만을 보유하는 *A. vitis* 균주만의 검출 등이 문제점으로 파악 되었으며 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 *A. vitis* 유전체내의 특이적으로 보유한 DNA 절편이용이 필요할 것으로 사료 되었다.

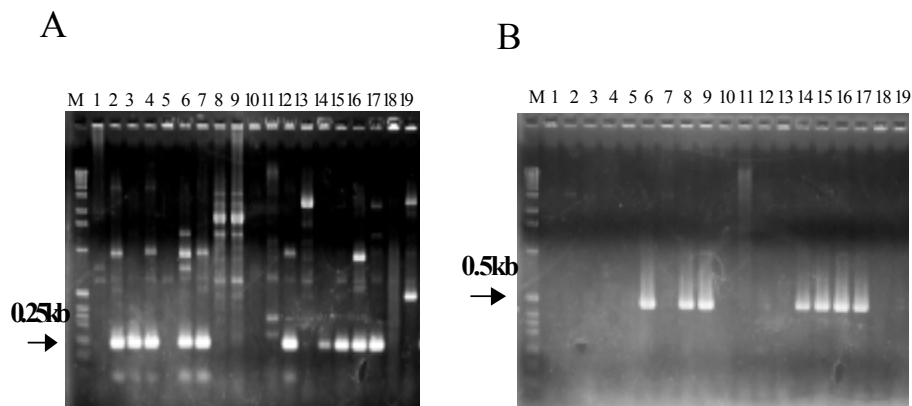


Fig. 4. PCR amplification of *Agrobacterium* spp. by specific primers, pehA primer (A), virA primer (B). Lanes 1. YK2794 2:YK2800, 3:YK2801, 4:YK2823, 5:YK2827, 6:YK2828, 7:YK3312, 8:YK5050, 9:YK5052, 10:441, 11:448, 12:451, 13:LMG, 14:LMG256, 15:LMG259, 16:LMG8750, 17:LMG262, 18:*A. tumefaciens*, A-208, 19:*A. tumefaciens* :A-348



Table 11. *Agrobacterium vitis* strains isolated from grapevines in Korea

<i>Agrobacterium vitis</i>			Pathogenicity		Specific primer			
strains	Geographic region/Host		Grapevine	Carrot	PehA	virA	AVS2	AVS3
(URP-PCR groups)								
1 YK 2800 (1)	Kimcheon, Korea/Kyoho		+	+++	+	-	+	+
2 YK 2823 (1)	Ansung, Korea/Kyoho		+++	++	+	-	+	+
3. YK 2828 (2)	Ansung, Korea/Kyoho		ND	+	+	+	+	+
4. YK 3312 (1)	Ansung, Korea/Kyoho		ND	++	+	-	+	+
5. 451 (1)	Cheonan, Korea/Kyoho		+	±	+	-	+	+
6. LMG 256 (4)	<i>A. vitis</i> , Greece		+	+	+	+	+	+
7. LMG 259 (5)	<i>A. vitis</i> , Yugoslavia		+	++	+	+	+	+
8. LMG262 (4)	<i>A. vitis</i> , U.S.S.R		ND	++	+	+	+	+
9. LMG 8750 (5)	<i>A. vitis</i> Austria		ND	++	+	+	+	+
10. CNU-10 (6)	Teajon, Korea/Kyoho		++	+	+	+	+	-
11. CNU-12 (1)	Teajon, Korea/Kyoho		++	+	+	-	+	+
12. CNU-13 (1)	Cheonan, Korea/Kyoho		-	++	+	-	+	+
13. CNU-15 (3)	Cheonan, Korea/Kyoho		++	++	+	-	+	+
14. CNU-25 (3)	Cheonan, Korea/Kyoho		+	++	+	-	+	+
15. HKA-1 (3)	Ansung, Korea/Kyoho		+++	++	+	-	+	+
16. HKA-2 (2)	Ansung, Korea/Kyoho		+	++	+	+	+	+
17. HKA-3 (1)	Ansung, Korea/Kyoho		+	++	+	-	+	+
18. HKA-4 (2)	Ansung, Korea/Kyoho		±	++	+	-	+	+
19. HKA-5 (3)	Ansung, Korea/Kyoho		±	+	+	-	+	+
20. HKA-7 (2)	Ansung, Korea/Kyoho		+	++	+	+	+	+
21. HKA-8 (2)	Ansung, Korea/Kyoho		+	+	+	+	+	+
22. HKA-12 (2)	Ansung, Korea/Kyoho		++	+	+	+	+	+
23. HKA-13 (2)	Ansung, Korea/Kyoho		+++	++	+	+	+	+
24. HKA-25 (2)	Ansung, Korea/Kyoho		++	++	+	+	+	+
25. HKA-26 (6)	Ansung, Korea/Kyoho		±	±	+	+	+	+
26. HKA-27 (2)	Ansung, Korea/Kyoho		++	++	+	+	+	+
27. HKA-28 (4)	Ansung, Korea/Kyoho		+	++	+	-	-	-
28. HKA-31 (2)	Ansung, Korea/Kyoho		++	++	+	+	+	+
29. HKA-36 (2)	Ansung, Korea/Kyoho		-	±	+	+	+	+
30. HKA-37 (2)	Ansung, Korea/Kyoho		ND	S+++	+	+	+	+
31. HKA-38 (2)	Ansung, Korea/Kyoho		ND	++	+	+	+	+

Table 11. Continued

<i>Agrobacterium vitis</i>			Pathogenicity		Specific primer			
strains	Geographic region/Host		Grapevine	Carrot	PehA	virA	AVS2	AVS3
(URP-PCR groups)								
32. HKA-39 (6)	Ansung, Korea/Kyoho		ND	S+++	+	-	+	-
33. HKA-41 (3)	Ansung, Korea/Kyoho		++	S+++	+	-	+	+
34. HKA-42 (3)	Ansung, Korea/Kyoho		++	S+++	+	-	+	+
35. HKA-43 (2)	Ansung, Korea/Kyoho		++	++	+	+	+	+
36. HKA-44 (4)	Cheonan, Korea/Kyoho		+	+	+	+	+	+
37. HKA-45 (2)	Cheonan, Korea/Kyoho		++	+++	+	+	+	+
38. HKA-46 (2)	Cheonan, Korea/Kyoho		++	++	+	+	+	+
39. HKA-50 (2)	Cheonan, Korea/Kyoho		++	-	+	+	+	+
40. HKA-51 (2)	Cheonan, Korea/Kyoho		-	++	+	+	+	+
41. HKA-52 (2)	Cheonan, Korea/Kyoho		-	+++	+	+	+	+
42. HKA-53 (2)	Cheonan, Korea/Kyoho		+	+	+	+	+	+
43. HKA-54 (2)	Cheonan, Korea/Kyoho		+	++	+	+	+	+
44. HKA-55 (2)	Cheonan, Korea/Kyoho		ND	+	+	+	+	+
45. HKA-59 (2)	Cheonan, Korea/Kyoho		ND	+++	+	+	+	+
46. HKA-61 (2)	Cheonan, Korea/Kyoho		ND	+	+	+	+	+
47. HKA-62 (2)	Cheonan, Korea/Kyoho		++	+++	+	+	+	+
48. HKA-63 (2)	Cheonan, Korea/Kyoho		-	+	+	+	+	+
49. HKA-64 (6)	Cheonan, Korea/Kyoho		-	+	+	+	+	+
50. HKS 1-4 (4)	Suwon, Korea /1-6		++	S+++	+	+	+	+
51. HKS 2-2 (2)	Suwon, Korea /1-3		++	S+++	+	+	+	+
52. HKS 3-1 (2)	Suwon, Korea/Hongbusa		ND	+++	+	+	+	+
53. HKS 4-3 (2)	Suwon, Korea/ Kitsaki Red		ND	+	+	-	+	+
54. HKS 6-1 (4)	Suwon, Korea /Yangock		ND	++	+	+	+	+
55. HKS 7-2 (2)	Suwon, Korea/Rube muscat		+++	+	+	+	+	+
56. HKS 8-4 (2)	Suwon, Korea/T-Seedress		++	+	+	-	+	+
57. HKS 10-2 (4)	Suwon, Korea/Honey Red		++	+	+	+	+	+
58. HKS 11-1 (4)	Suwon, Korea/R-Biance		++	++	+	+	+	+
59. HKS 12-3 (4)	Suwon, Korea/4-3		++	++	+	+	+	+
60. HKS 14-2 (2)	Suwon, Korea/5-12		+++	±	+	+	+	+
61. HKS 15-3 (4)	Suwon, Korea/Fuen		+++	++	+		+	+
62. HKS 16-1 (4)	Suwon, Korea/Big Unicon		+++	+	+	+	+	+
63. HKS 17-3 (2)	Suwon, Korea/3-1		+++	+	+	+	+	+
64. HKS 19-2 (4)	Suwon Korea/Deabong		++	+	+	+	+	+

Table 11. Continued

<i>Agrobacterium vitis</i> strains (URP-PCR groups)	Geographic region/Host	Pathogenicity		Specific primer		
		Grapevine	Carrot	PehA	virA	AVS2
65. <i>A. radiobacter</i> LMG 14	Belgium/UN	-	-	-	-	-
66. <i>A. rhizogenes</i> , LMG 152	Belgium/UN	-	+	-	-	-
67. <i>A. rubi</i> , LMG 157	Belgium/UN	-	+	-	-	-
68. <i>A. tumefaciens</i> , A208	<i>A. tumefaciens</i> Belgium	-	-	-	-	-

## 2. *A. vitis* 균주의 유전적 다양성 분석

포도 흑병균의 PCR DNA다형성 검출에 적용할 수 있는 URP primer를 선발 하기 위하여 Table 12와 같이 12종류의 URP primer를 흑병균의 genomic DNA를 template DNA로 하여 재료 및 방법에서 제시한 조건에 준하여 PCR 증폭을 실시하였던 결과 URP2F, URP2R, URP4R, URP17R primer가 PCR 다형성 밴드를 형성하여 유용한 primer로서 이용 될 수 있었다.

2002년부터 2004년간 천안, 안성, 대전, 수원 포도재배 농가로부터 포도흑병 병반을 다양한 포도품종으로부터 채집하여 선택배지 및 DNA검정 및 병원성검정을 통하여 얻어진 Table 2의 64 균주의 *A. vitis*를 이용하여 유전적 URP-PCR방법에 의한 유전적 다양성을 조사 하였다.

Table 12. Nucleotide sequences of URP primers used in this study

Primers	Sequences (5-3)	GC (%) /T <sub>m</sub> (°C)	PCR polymorphism
URP1F	ATCCAAGGTCCGAGACAACC	50/65	Yes
URP2F	GTGTGCGATCAGTTGCTGGG	50/67	Yes
URP2R	CCCAGCAACTGATCGCACAC	50/65	Yes
URP4R	AGGACTCGATAACAGGCTCC	50/66	Yes
URP6R	GGCAAGCTGGTGGGAGGTAC	50/65	No
URP9F	ATGTGTGCGATCAGTTGCTG	50/68	No
URP17R	AATGTGGGCAAGCTGGTGGT	55/74	Yes
URP25F	GATGTGTTCTTGGAGCCTGT	50/65	No
URP30F	GGACAAGAAGAGGATGTGGA	50/65	No
URP32F	TACACGTCTCGATCTACAGG	50/65	No
URP38F	AAGAGGCATTCTACCACCAC	50/65	No

Fig 5는 URP2F primer로 하여 PCR증폭을 실시하여 Ethidium bromide에 염색시켜 UV로 사진을 촬영한 것이다. 균주에 따라 PCR다형성을 보이고 있으며 균주간 평균 6.5개의 multiple 밴드를 형성 하고 있었다.

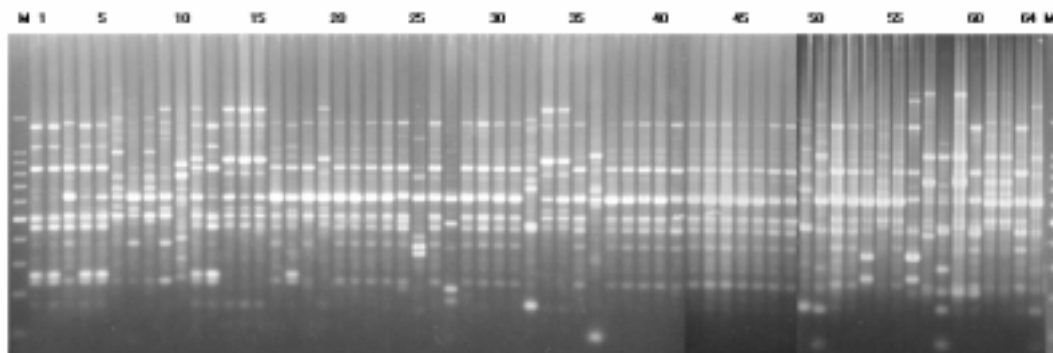


Fig 5. PCR polymorphism amplified by URP2F.

Fig 6은 URP17R primer를 이용하여 형성된 PCR다형성 밴드로서 균주간 매우 다양한 PCR 다형성을 보이고 있다. 외국에서 type culture로 분양받은 LMG균주는 국내 균종과 다른 독특한 PCR다형성을 보이고 있었으며 국내에서 육성되고 있는 외국 포도품종에서 분리된 *A. vitis* 균주도 URP-PCR양상이 국내 포도품종에서 분리한 것과는 특이하게 다른 것으로 나타나 지역 균주간 또는 품종별 분리원에 따라 균주간 유전적 다양성이 나타남을 시사 하고 있다.

국내의 거봉포도로부터 분리한 균주 중에서 특이한 PCR밴드 양상을 보이면서 특이 primer에 검출되지 않았던 HKA-10, HKA-28, HKA-39균주는 당근에 병원성이 있었으나 포도에는 병원성이 없거나 미약하여 다른 *Agrobacterium* 종일 가능성을 배제 할 수 없었다.

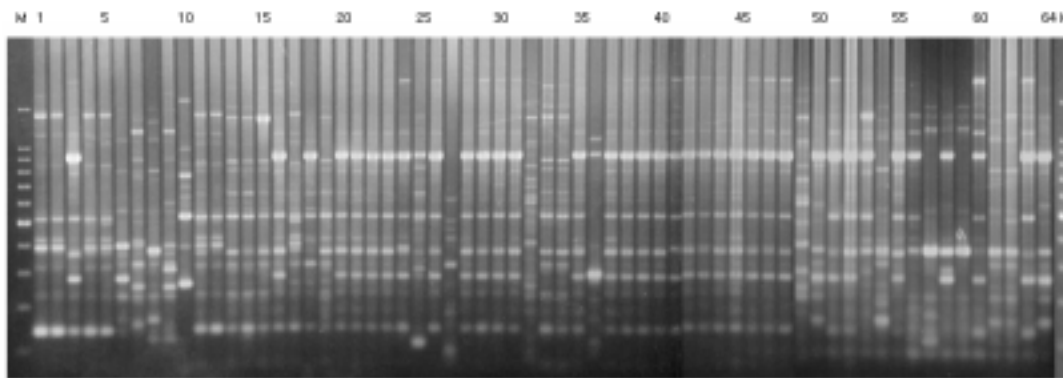


Fig 6. PCR polymorphism amplified by URP17R.

URP-PCR방법은 기존에 개발된 RAPD나 AP-PCR과 유사한 원리로서 적용될 수 있으나, primer가 20개의 염기로 구성되어 있고 PCR 조건은 최초 주형 DNA의 열변성 (denaturation) : 94°C에서 4분으로 하고 denaturing : 94°C 1분, annealing : 55°C 1분, DNA합성 : 72°C 2분을 35 반복 cycle로 하는 것이 기본조건으로 하고 있다. 이러한 PCR조건은 primer와 Template DNA간의 특이적 결합을 유도하는 반응 조건으로서 상기의 RAPD와 AP-PCR 방법과는 다르다고 볼 수 있다.

Annealing 온도를 초기부터 55°C로 함으로서 특이적인 PCR산물을 증폭 할 수 있어 RAPD와 AP-PCR에서 제기 되었던 낮은 재현성 문제를 극복 하였다는 점에서 특징

을 볼 수 있다. 또한 PCR 다형성 밴드를 Agarose gel 상에서 검출 가능하기 때문에 간단, 신속하게 이용이 가능 하다. URP primer는 미생물에 매우 유용하게 적용 할 수 있는 것으로 생각 되고 있다.

세균에 대한 적용 식물병원세균인 *Erwinia* spp, *Xanthomonas* spp, *Pseudomonas* spp. 등에 널리 사용 될 수 있으며 인체 관련 세균으로서는 대장균 (*Escherichia coli*), 식중독균 (*Salmonella* spp.), 결핵균인 *Mycobacterium*와 가축병 세균인 *Blucella* spp.에 적용 된 바 있고, 산업 미생물인 *Bacillus*계통과 *Lactobacillus*계통에 이용될 수 있어 그람양성, 음성균 할것없이 그 적용성이 넓은 것으로 밝혀졌다. 특히, 종간 뿐만아니라 종내 세균의 계통간 DNA다형성을 검출 하는데 매우 유용하다.

Fig. 7은 URP primer에 의해 생성된 64균주의 DNA 다형성밴드를 NTSYS-pc의 UPGMA program에 입력하고 균주간 유연관계를 dendrogram으로 작성한 것이다. 그 결과 6개의 대 groupe으로 분류 되었다. 국내 거봉포도에서 분리한 *A. vitis* 균주는 대부분 그룹 1, 2, 3에 분포하고 있었으며 그룹간 80%에서 90%의 유전적 유사성이 있었다. 특히 Group 2는 가장 많은 균주가 속한 그룹으로서 국내 거봉포도에서 분리한 *A. vitis* 균주 45균주 중 29균주를 포함하고 있었으며 균주간 90%이상의 근연적 유연관계를 이루고 있었다.

BCCM으로부터 도입한 LMG 균주들은 각각 Group 4와 Group 5에 편입되어 거봉으로부터의 국내균주와는 80%이하의 원연관계를 이루고 있었다. Group 6은 Outgroup으로서 특이 primer에 검출되지 않았던가, 포도 등에 병원성이 없는 특성을 보였으며 PCR밴드 양상이 거봉균주와는 상이하어 이들 균주의 *A. vitis* 동정을 위한 정밀검정이 요구 되었다.

거봉포도 품종이외의 다른 품종에서 분리한 균주들은 거봉균주에 비하여 매우 다양한 PCR다형성을 보였으며 15균주 중에서 7균주가 Group 4에 속하였으며 나머지 8균주는 모두 Group 2에 속하고 있어 국내균주간의 근연적 유연관계를 이루고 있었다. URP-PCR primer로 분석한 PCR다형성으로 국내외 *A. vitis* 균주간의 유전적 다양성을 확인 할 수 있었으며 이러한 data를 이용하여 국외균주의 유입을 위한 자료로서 이용할 수 있을 것으로 사료 되었다.

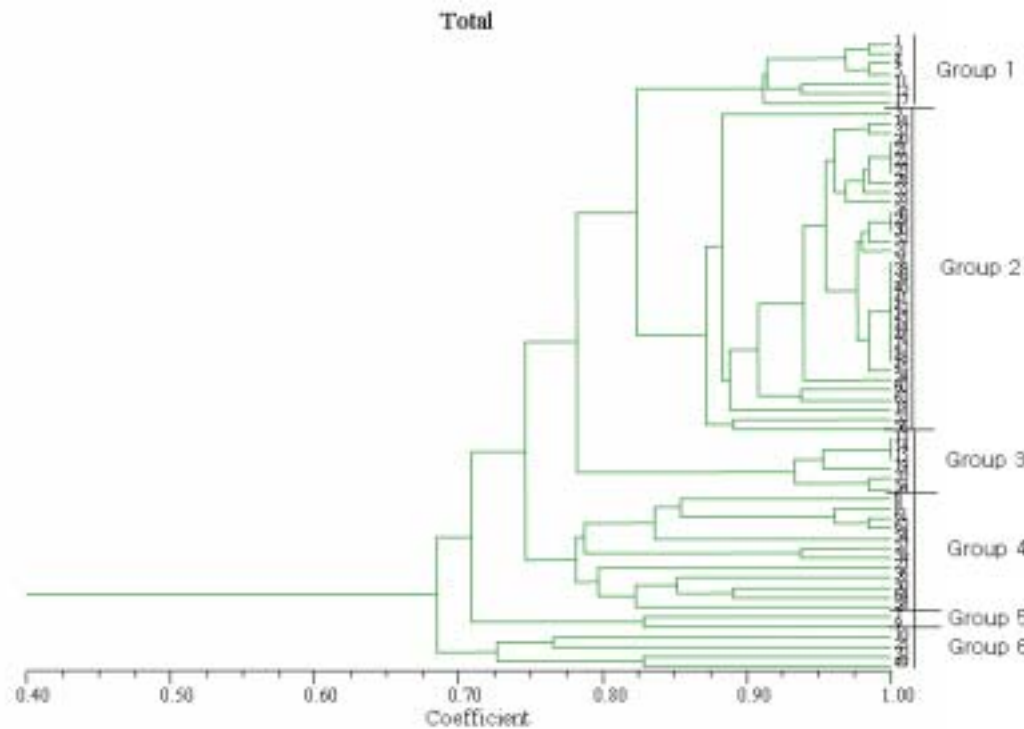


Fig. 7. Construction of UPGMA dendrogram using URP polymorphic bands of *Agrobacterium* strains

### 3. URP-PCR 다형성 밴드로부터 *A.vitis* 특이검출 primer 개발

기존의 보고에 의하면 *A. vitis* 특이검출 primer로서 위의 VirA와 PheA 영역으로 만든 primer가 대부분 사용되고 있다. 그러나 본 실험에서 적용한 결과 PheA의 경우는 너무 낮은 분자량으로 PCR산물이 검출됨으로 시료에 따라 결과가 일정치 못하고 잡밴드가 검출밴드보다 큰 분자량으로 다수 검출 되었다. 또한, VirA영역의 primer의 경우는 Ti-Plasmid type이 다를 경우에 *A. vitis* 균주임에도 불구하고 검출이 되지 않을 수 있는 위험성이 있다.

따라서 안정되게 *A. vitis* 균주를 검출 할 수 있는 primer를 개발 할 필요가 있었다. URP- PCR 다형성 밴드는 종간, 계통간 특이성이 있어 세균의 검출에 있어서는 종

특이 밴드를 분리하여 종 특이 primer를 제작하는데 다시 이용 할 수 있다. URP-PCR산물을 이용하여 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* 계통의 특이적 검출에 성공적으로 이용 된 바 있다 (Kang, 2003). 따라서 본 연구는 *A. vitis* 균주에 특징적으로 존재하는 URP-PCR 다형성 밴드를 분리, 이용하는 실험을 실시하였다.

URP2F primer로 증폭한 PCR 다형성 밴드 중에서 화살표 표시의 1.0kb의 밴드와 URP2R primer로 증폭한 0.8kb의 PCR 밴드를 pGEM-T vector에 cloning하고 각각 pAVS2와 pAVS3으로 명명하고 각각의 clone의 plasmid를 추출하고 염기서열을 분석하였다. pAVS2와 pAVS3의 삽입 DNA를 probe로 하여 *A. vitis* 균주와 다른 종의 세균으로부터 DNA와 Southern hybridization을 실시하였다. ACV2 probe는 *A. vitis* 균주 뿐만 아니라 *A. rhizogenes* 와 *A. tumefaciens*에도 상동성 밴드가 검출 되었으나 다른 세균류에서는 상동성 밴드가 검출 되지 않았다(Fig. 8).

ACV3 probe의 경우는 *A. vitis* 균주에만 특이적으로 상동성 밴드를 검출 하였으며 다른 *Agrobacterium* 종과 세균 속의 유전체와 상동성 결합을 하지 않아 *A. vitis*에만 존재하는 특이적인 DNA절편으로 사료 되었다.

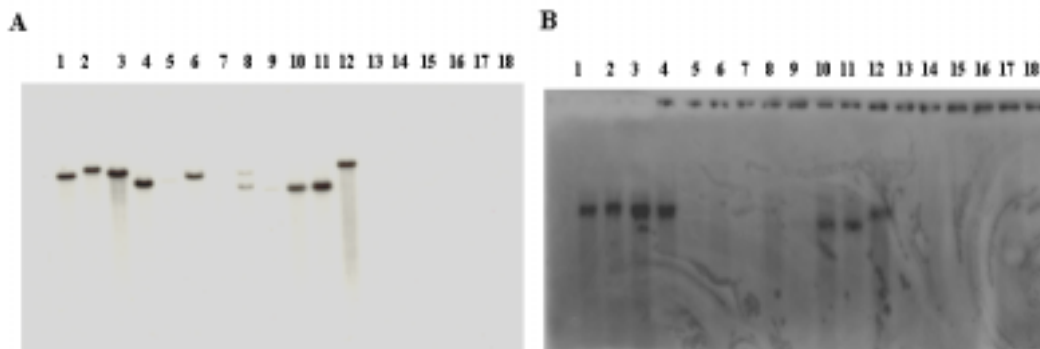


Fig. 8. Southern blot hybridization of various bacterial species using probes AVS2 (A) and AVS3 (B) AlkPhos Direct labelling and Detection system (Amersham) was used in this experiment. Lanes 1-4:*A. vitis* strains LMG256, LMG259, LMG262, LMG8750, lane 5:*A. radiobactor* LMG 14, lane 6:*A. rhizogenes*, lane 7:*A. rubi* LMG 157, lane 8:*A. tumefaciens* A 208, lanes 9-12:Korean strains of *A. vitis*, lane 13:*Xanthomonas campestris* pv.*glycin*, Lane 14:*Bacillus subtilis* KACC10372, lane 15:*E. rhapontici* ATCC29281, lane 16:*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, 17:*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , lane 18:*X. oryzae* pv.*oryzae* KACC10314



pAVS2는 1.137 bp의 염기를 구성 하였으며 염기서열로부터 유추된 amino acid로 상동성 검색을 실시 한 결과 그림 9와 같이 *Sinorhizobium meliloti*의 Putative dihydropyrimidinase protein과 77%의 상동성을 보여 주었다.

```

GTGTGGGATCAGTTGCTGGGGCTCGGCTTCGGCTTTGCCGAAAGTGGAAACACTGACGCCAAAGCCGCAGGGCGGTAAATGCCAAGCCC CGGATTTT
URP2F primer
CCGGTTGGTCCGCATGAAGCCCTCATCAATCGTCTCGGATTTAATAATGAAGGGCATCAGCCGGCCTTTGCCAGGCTGAAAGCCGCATCAGGCA
5'-gaagccctcatcaatcgactcg-3' (AVSP2F-1)
AGCCGGGCGTGGTCCGCATCAATATCGGCGCCATAAGGATGCCGAGGACC GGATTGCCGATTATGTACGGGCATTCGGCGCTTTTATCCGCTG
5'-gccataaggatgccgaggacc-3' (ASV2FN)
GCCAGCTATTTACC GCCAATATTTCCTCGCCAACACGCCGGGCTGCGCGATTTCAGGCAAAAGGACAGTCTCGCCATCTGCTGGACCGGT
GCTGGCCGC CCGTGC CGATGAGGAGGC CAAAAGCAGGTGCGCCGGGTGCCGGTCTTCCTGAGGATCGCTCCTGACTGACCAGGAAGGCATGGATGA
CATTGCCGAGGTGGTTCTGGCCCGGATCTGGACGGGTTGATCGTCTCCAAACACCAC GCTGTGCGCGATGGCCTGACGGATACAAGGCAGGC GG
GCGAGGCGGGGATTGTCGGGCAAGC CCTTGTTCGAGAAATCGACGGCGGTGCTGGCCCGTATGCGCCACCGGGTTGGAGCGACCTGCCGATC
ATTGGCGTTGGTGGTGTTCCTCGGCGCAGACGCCGCTGGAGAAAATCAAGGCCGGT GCCGATCTGGTACAGCTCTATTCCATGATGTATGA
3'-agaccatgtcgagataaggagc-5' (ASVP2RN)
AGGGCCGGGCTGCCCGCCGCATCGTCAAGGGCCTGTCACAGGC GCTGGACCGCATGGCATTGCCTC GATTGC GCAACTGCCGTGACAGCTGCA
GGTTGATTACTGGCGGGCGCTGAAGGTCTGATCGTGGCGCTTTGAGCCGCAGCA GAAGGAAAAGGC CGCGAAACGCCA GAAACAGGTTGAGC
3'-ttccagactagcgacgccgaa-5' ( AVSP2F-1 )
GCCAGCCATAGTC CGTGATTGCCAGCAACTGATCGCACAC
URP2F primer

```

Fig. 9. Nucleotide sequences of pAVS2 derived from URP2F-PCR polymorphic band. Undelined sequences indicate sequences of URP2F and the boxed sequences indicates specific primers for detecting *A. vitis* strains

```

pSVA2: 16 LGLSGVPREAEI IFLERDLRIAGLTRAKYHAAKISVPGSVEAIKILARARGATVTOGISIN 195
LGL GVPREAEI IFLERDLRIAGLTRA YHAA+ISVP S E I++AR RG VTOGISIN
Sbjct: 207 LGLPGVPREAEI IFLERDLRIAGLTRAAYHAAEISVPESAETIRIARERGTNVTGISIN 266

pSVA2: 196 NLSLNENDIGEYRITFFKLA PPLRAEDDRVAMVEALASGDIDIIVSAHDPOQVDVTKRLPFA 375
+L+LNENDIGEYRITFFKLA PPLR EDDRVAMVEALA G IDIIVS+HDPOQVDVTKRLPFA
Sbjct: 267 HLTLNENDIGEYRITFFKLS PPLRTEDDRVAMVEALADGTIDIIVSSHDPQVDVTKRLPFA 326

pSVA2: 376 DAADGAVGLETXXXXXXXXXXGQVPLMRLIDAMSTRPAEFSG 504
DAADGA+GLET G+VPLMRLIDA+STRP+ G
Sbjct: 327 DAADGAI GLETLAAAALRLYHSGEVPLMRLIDALSTRPSAIFG 369

```

Fig 10. Comparison of proteins between *A. tumefaciens* GenBank (B) and pAVS2 sequence (A)

pAVS2 염기서열내에서의 *A. vitis* 특이검출 Primer를 제작하기 위하여 URP2F primer sequence 안쪽으로 약 120 bp 떨어진 염기서열에서 20 mer의 primer를 디자인 하여 합성 하였다. Foreward Primer인 AVS2F(5'-GATCAGGCAAGCCGGGCGTG-3')와 Reverse primer인 AVS2R(5'-CCTTCAGCGCCCGCCAGTAA-3')를 동시에 사용 하였다. 이를 AVS2로 명명하여 Table 11의 균주를 대상으로 하여 primer의 특이성 여부를 조사 하였던 바 *A. vitis* 균주에만 특이적인 밴드가 검출 되었다.

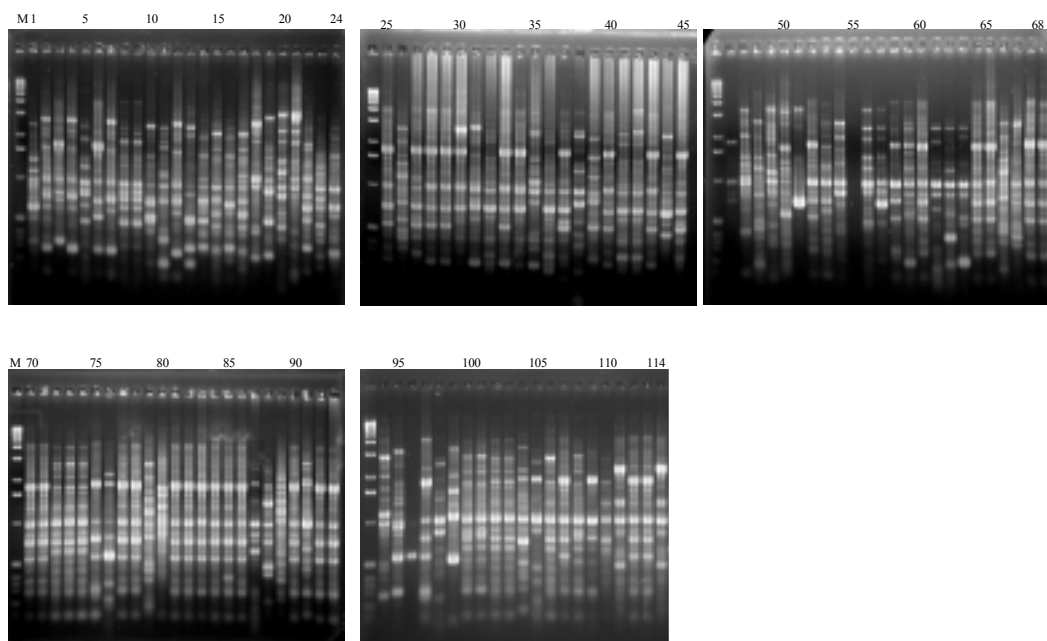


Fig 11. PCR polymorphism of *Agrobacterium vitis* strains produced by URP2F

Fig 11는 *A. vitis* 균주에 기대되는 0.7kb의 특이적인 밴드검출을 보여 주고 있다. 지금까지 *A. vitis* 특이검출 primer로서 PheA primer가 가장 유용하다고 알려져 있다. 그러나 본 실험에서는 많은 비 특이적 밴드의 검출과, 불안정한 검출결과 등으로 재현성면에서 신뢰도가 떨어지는 경향이 있었다.

그러나, AVS2 primer는 잡밴드가 없이 안정적으로 높은 재현성으로 특이적으로 *A. vitis* 균주를 검출함으로써 그 효율을 개선시킬 수 있었다. Fig 12는 DNA분리 없이 *A. vitis* cell을 PCR반응에 직접 농도별로 반응시켜 몇 개의 Cell까지 검출할 수 있는지를 조사한 것이다. 4개의 cell까지 검출할 수 있어 적은 밀도의 병원균이 존재 하더라도 매우 민감하게 PCR검출이 가능하다는 것을 시사하여 주었다.

pAVS3 염기서열결과로서 총 673 bp가 결정 되었다. 본 염기서열을 인터넷 유전자은행 정보 상동성 검색 시스템(Blast)에 입력하여 기존의 등록된 유전자 염기서열과 비교 분석한 결과 세계적으로 보고 되지 않은 새로운 DNA염기서열로 밝혀졌다. 따라서 본 염기서열은 *Rhizobium vitis* 특이적 염기서열로 사료 되었다. 이러한 염기서열의 특이성은 특이적 primer 제작에 매우 유용할 것으로 생각되어 "Primer Designer V. 1.01 (Scientific and educational software IBM 사 제품)" 이라고 컴퓨터 프로그램을 이용하여 24mer 내지 20mer의 primer를 제작 하였다. 5-말단에서 59번째에서 82번째 염기서열을 포함하는 AVS3-1F와 3-말단으로부터 553에서 530을 포함하는 RVSP3-1R을 제작하였다.

Nested PCR방법에 이용할 수 있는 primer를 제작하기 위하여 AVS3-1F로부터 하류영역으로부터 18번째 염기부터 시작된 100번째 염기부터 120염기까지를 포함하는 AVS3-1F primer와 AVS3-1R의 20 bp의 상류영역부터 시작되는 511bp에서 492 bp의 염기서열을 포함하는 AVS-3R을 디자인 하였다 (Fig 12). 결과적으로 RVSP3-1F/RVSP3-1R의 primer쌍으로 PCR증폭을 행할 경우 495bp의 PCR산물이 증폭됨을 예상 할 수 있으며 RVSP3-3F/RVSP-3R의 primer 쌍을 적용할 경우는 32bp가 적은 463 bp의 PCR 산물을 증폭 할 수 있을 것으로 예상 된다.

GTGTGCGATCAGTTGCTGGGGCTTGATTGCGCGGCGGGAATGGTTGCGGTGATCTCCCG 60  
 5'-cg  
CTGGCCTGGTTCTACGAAGATAACCAGAGCCACATCGCCGCATAGATCATGGCCGCTAC 120  
 ctggcctggttctacgaagata-3' (AVS3-1F) 5'-gcatagatcatggccgctac  
 (AVS3-3F)  
 GGTGGCGATGACGAACAGGAAGCGGAATAAGGTGGGCATGATGACGGCCTCCTGCCTTAA 180  
 AAGGCATGGTGTACAGTGCCGTGCCTCCCAGAAGAAGCAGTCGAGGTTACTGTAACACTT 240  
 TGGGTTCTCTGGATGTCGTTTATCTCTTCGGGAAAGATCAGTTCTGCTTTTCCCTCATTG 300  
 CAACACACATCAGCAATATCGGCTGGAGCCGTTCTGTTTCAAGATCGAACATGGCAGGT 360  
 TTTGCTTGATAACACCCTAAACCCTGGCACTTAAGGGAGGTCACGGGGCATGCAGGTGA 420  
 TTGTTTCTTGTGCGGCATGTGCGGCAAGTGCTTGACGTGGCCCCGGCATTGTCAATAGGG 480  
 TTGGTAAACCTGTTGCGAAAAGGCTGATGACCCACTCGATGCCCATGCTGTTCTACCTC 540  
 3'-caacgcttttccgactactg-5' (AVS3-3R) 3'-acaagatggag  
TTGCTGAGCGGACCCGCTCGGTGCTCGGGCGTCGAAACCTGATTTTCGTCGGTCTGATGG 600  
 aacgactcgctg-5' (AVS3-1R)  
 GGGCTGGAATAATCCGCGATCGGGCGTCTCGTGGCCCACAACTGATCGCACACA 653

Fig 12. Nucleotide sequences of pAVS3 derived from URP2F-PCR polymorphic band. Undelined sequences indicate indicates specific primers for detecting *A. vitis* strains.

Fig 13은 ACV2F/ACV2R primer 쌍과 AVS3-1F/AVS3-1R primer 쌍으로 PCR 증폭하여 전기영동 하여 사진촬영한 것으로서 ACV2F/ACV2R primer는 *A. vitis*의 외국균주 LMG259, LMG262, LMG87504 와 국내 3균주인 YK2823, YK2828, YK33129에서 약한 0.7 kb의 PCR 밴드를 증폭 하였으며. AVS3-1F/AVS3-1R primer 쌍은 국외에서 도입한 4균주 모두와 국내 4균주에서 모두 균주 0.5 kb의 PCR밴드를 증폭 하였으나 다른 세균 종에서는 동 밴드를 증폭 하지 않았다. 그러나 다른 *Rhizobium* 종과 다른 속의 세균류에서는 밴드가 검출 되지 않았다.

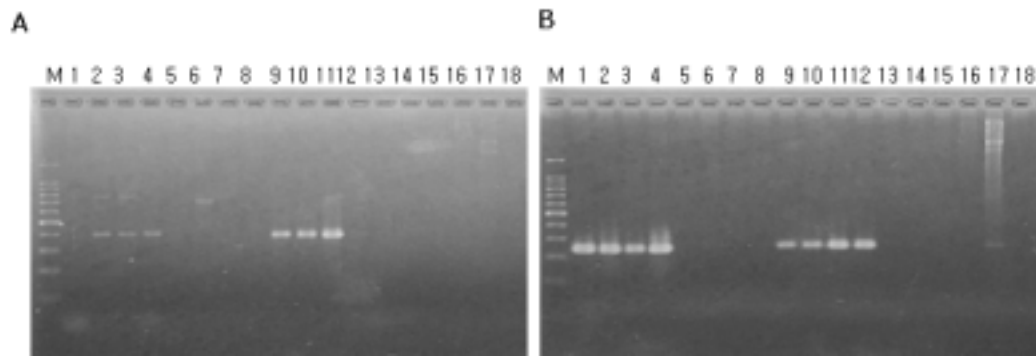


Fig 13. PCR based specific detection of *A. vitis* strains using ACV primer sets AVS2F/AVS2R and AVS3-1F/ AVS3-1F(B). Lanes 1-4:*A. vitis* strains LMG256, LMG259, LMG262, LMG8750, lane 5:*A. radiobactor* LMG 14, lane 6:*A. rhizogenees*, lane 7:*A. rubi* LMG 157, lane 8:*A. tumefaciens* A 208, lanes 9-12:YK2800, YK280, YK2823, YK2828, YK33129 (Korean strains of *A. vitis*) ,lane 13:*Xanthomonas campestris* pv. *glycines*, Lane 14:*Bacillus subtilis* KACC10372, lane 15:*E. rhapontici* ATCC29281,lane 16:*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, 17:*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , lane 18:*X. oryzae* pv. *oryzae* KACC10314. PCR amplification was carried out in a PTC-200 (MJ Research, Inc) using the following profile: one cycle of 4 min at 94 $^{\circ}$ C 30 cycles of 15 sec at 94 $^{\circ}$ C, 15 sec at 60 $^{\circ}$ C, 30 sec at 72 $^{\circ}$ C one cycle of a final extension for 7 min at 72 $^{\circ}$ C. PCR products were separated on a 1.5 % agarose gel in TAE buffer and visualized by staining them with ethidium bromide (1mg/ L)

Southern hybridization과 PCR 결과에서 AVS3 primer set가 AVS 2 primer set보다 특이성이 높은 것으로 나타났다. Table 13은 *A. vitis*를 포함한 다양한 *Agrobacterium* 속과 다른 세균속을 확대하여 조사한 것으로 본 연구에서 개발한 AVS3-1F/AVS3-1R의 primer 쌍은 포도혹병균 (*A. vitis*)을 특이하게 PCR밴드로 검출하여 신속, 정확한 *A. vitis*균주의 진위를 판별 하기위하여 이용 가능하다는 것을 다시 확인 할 수 있었다.

또한, AVS3-1F/AVS3-1R primer는 기 보고 된 *A. vitis* 특이 primer인 PheA의 비 특이적 검출과 VirA primer의 특정 Ti-plasmid를 보유한 *A. vitis* 균주 특이적 검출의 문제점들을 보완한 매우 유용한 primer라고 사료 된다.

Table 13. Bacterial strains used in PCR amplification of AVS primer sets

Strains		Geographic region	Specific primers	
			AVS2	AVS3
<i>Agrobacterium vitis</i>	YK2800	Kimcheon, Korea	-	+
	YK2801	Kimcheon, Korea	+	+
	YK2823	Ansung, Korea	+	+
	K2828	Ansung, Korea	+	+
	YK3312	Ansung, Korea	+	+
	451	Cheonan, Korea		
	LMG256	Greece	-	+
	LMG259	Yugoslavia	+	+
	LMG262	U.S.S.R	+	+
	LMG8750	Austria	+	+
<i>A.tumefaciens</i>	A-208	U.S.A	-	-
	A-348	U.S.A	-	-
<i>A. radiobactor</i>	LMG14		-	-
<i>A. rubi</i>	LMG157		-	-
	LMG159		-	-
<i>A. rhizogenes</i>	LMG63		-	-
	LMG152		-	-
<i>Rhizobium leguminosarum</i> KACC 10428		USDA	-	-
<i>Sinorhizobium melioli</i> KACC 10025			-	-
<i>P. c.</i> subsp. <i>carotovorum</i> KACC10458		U.S.A	-	-
<i>P. c.</i> subsp. <i>atrosepticum</i> ATCC33260		U.S.A	-	-
<i>P. chrysanthemi</i> ATCC11663			-	-
<i>Erwinia herbicola</i> ATCC33243			-	-
<i>X. oryzae</i> pv. <i>.oryzae</i> KACC10331			-	-
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> KACC10377			-	-
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> KACC10134			-	-
<i>P.marginalis</i> pv. <i>pastinacae</i> KACC10469			-	-
<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i> KACC10388			-	-
<i>Ralstoniasolanacearum</i> KACC10149			-	-
<i>Escherichia coli</i> DH5			-	-
<i>Serratia marcescens</i> KACC10002			-	-
<i>Bacillus subtilis</i> KACC10372			-	-
<i>Enterobacter sp.</i> KACC105263			-	-

#### 4. 세포와 토양으로부터 포도혹병균의 PCR 고감도 검출

본 연구에서 개발한 Nested PCR에 이용할 수 있는 PCR primer 쌍 (AVS3-3F/AVS-3R)을 적용하여 고감도 PCR 검출을 시도하였다. 이를 위하여, AVS3-1F/AVS3-1R primer 쌍으로 1차 PCR을 수행한 PCR반응액 1 $\mu$ l를 새로운 PCR 반응용액에 수형 DNA로 이용하여 동등한 조건으로 AVS3-3F/AVS-3R로된 PCR primer 쌍을 이용하여 재 PCR을 수행 하였다. Fig 14는 다양한 세포수의 *A. vitis* 을 1, 2차 PCR하여 세포수에 따른 PCR검출여부를 조사한 사진이다.

Fig 14의 A는 AVS3-1F/AVS3-1R primer 쌍으로 1차 PCR을 실시한 것으로 1:1 $\times 10^6$  에서 1 $\times 10^4$  사이의 세포 수에서 강한 PCR산물이 검출 되었으나 1 $\times 10^3$ 부터 PCR밴드의 강도가 약해지는 경향이 있는 것으로 나타났다. AVS3-3F/AVS-3R primer 쌍으로 Nested PCR로 2차 PCR을 수행 하였을 경우는 1-2개의 세포 수까지 1차 PCR산물의 0.49kb보다 작은 크기의 0.46kb의 강한 PCR밴드가 검출 되었다. 이와 같이 양 PCR밴드의 차이는 Fig 9 에서 보여준 것같이 primer의 위치에 따른 결과 이다.

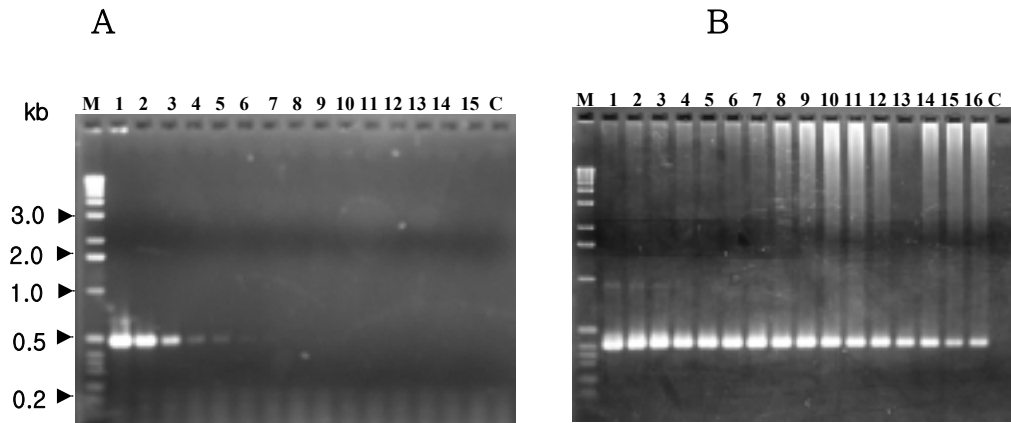


Fig 14. PCR detection limit of *A. vitis* cells with specific primer pairs. Primer sets (AVSP3-1F / AVSP3-1R ) was used for and AVSP3-FN/AVSP3-1RN were used for standard PCR (A) and nested PCR (B). Aliquots of 15  $\mu\text{l}$  from each amplified PCR mixture were separated by electrophoresis on 1.5 % agarose gel. Lane M: 1 kb DNA ladder (Gibco BRL). Number of cfus/ml: lanes 1: $2 \times 10^7$ , 2: $2 \times 10^6$ , 3: $2 \times 10^5$ , 4: $2 \times 10^4$ , 5: $2 \times 10^3$ , 6: $1 \times 10^3$ , 7: $8 \times 10^2$ , 8: $4 \times 10^2$ , 9: $2 \times 10^2$ , 10: $1 \times 10^2$ , 11:50 cfu 12:25 cfu, 13:12 cfu, 14:3 cfu, 15:1.4 cfu

본 연구의 PCR primer와 방법으로 고감도의 포도혹병균 검출을 실현 하였다. Fig 15는 무작위로 다양한 포도재배 농원과 토양으로부터 DNA를 분리하고 토양DNA를 이용하여 고 감도 PCR검출을 시도한 그림이다. 토양으로부터의 DNA분리는 토양 DNA extraction Kit (Omega 사)를 이용 하였다.

Fig 14 의 A는 AVS3-1F/AVS3-1R primer 쌍으로 1차 PCR한 결과이며 PCR밴드가 검출 되지 않고 있다. Fig 14의 B는 AVS3-3F/AVS-3R primer 쌍으로 Nested PCR을 수행한 그림으로서 토양 샘플에 따라 PCR밴드가 검출됨을 관찰 할 수 있었다. 따라서 본 연구의 PCR primer를 이용하게 되면 토양내의 포도혹병균의 존재여부를 조기에 검정 할 수 있을 것으로 사료 되었다.

병원균은 자연환경 조건에서 감염초기에는 적은 밀도로 존재하다가 기주와의 감염



조건이 성립되면 감염하여 급속히 세포수를 증식한다.

식물 병반의 형성은 균의 만연된 감염환경이라고 볼 수 있으며 이때에는 이미 작물의 상품성 및 방제효과가 매우 떨어지는 경향이 있다. 따라서 감염초기에 병원균을 검정하고 신속한 방제를 한다면 병원균의 사전감염을 차단시킬 수 있는 매우 유용한 방법이다. DNA검정에 의한 조기에 병원균 존재여부를 확인 하는 방법으로 PCR의 고감도 검출법을 이용 할 수 있을 것으로 사료 된다.

특히, 포도혹병균은 식물체내로 T-DNA를 도입하여 식물호르몬 유전자가 과 발현됨으로서 결국 포도나무의 흑을 형성한다. 또한 T-DNA영역 내에는 Opine이라고 하는 아미노산치환기를 합성하고 포도혹병균은 이를 탄소원이나 질소원으로 이용하여 포도 흑자체에서 급속하게 세포수가 증가 하게 되어 다른 가지나 토양을 오염시키는 원인이 된다. 이에 적은 밀도에서 포도혹병균을 확인 할 수 있다면 적은 밀도에서 저비용, 노력으로 포도 흑병균의 감염원을 대폭 줄일 수 있다.

결론적으로 본 발명의 AVS3-1F/AVS3-1R와 AVS3-3F/AVS-3R primer 쌍들은 포도혹병균(*A. vitis*)의 특이검출과 조기진단을 위한 PCR 고감도 검출에 매우 유용하게 적용 할 수 있을 것으로 기대 된다.

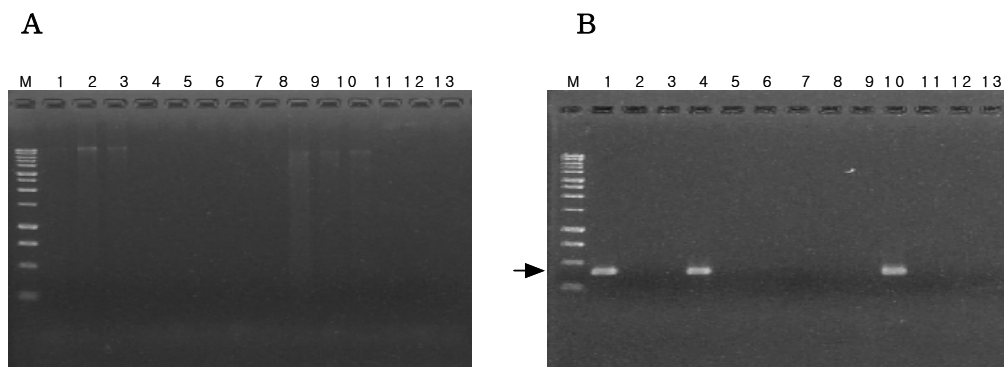


Fig. 15. PCR detection of *A. vitis* specific band from soil DNA. Soil DNA was extracted by using soil DNA extraction kit (Mobis). The soil DNA samples were directly applied for PCR amplification using primer sets AVS2F/AVS2R Lanes 1-12:Soil DNA extracted from various soil samples; lanes 13-14:tap water, distilled water

## 제 4 장 포도흑병 방제

### 제 1 절 서 언

우리나라에서 주로 재배되고 있는 4배체 품종 중 ‘거봉’과 블랙올림피아 등은 구미 잡종 포도로 품질이 매우 우수하여 수입개방화에 대응할 수 있는 품종으로 인식됨에 따라 재배면적이 증가 추세에 있다. 그러나 이들 유럽종은 품질이 우수한 반면 내병성이 약한 단점을 갖고 있다. 그중 포도 뿌리흑병은 포도생산과원이나 묘목을 생산하는 포장에서 큰 피해를 주고 있으나 아직까지 치료약제는 물론 방제에 대한 연구조차 미흡한 실정이다.

포도 뿌리흑병은 포도나무 상처조직을 통하여 감염되어 흑을 형성하면서 포도나무의 활력을 저하시키거나 생산량 감소를 초래 (Schroth 등, 1988)하며 뿌리흑병에 감염된 포도나무는 발병 후 2~3년 내에 22~43%가 고사하는 등 (Dhanvantri, 1983) 전세계 포도재배지역에서 심각한 경제적 손실이 되고 있다 (Burr 등, 1998). 국내에서도 천안, 안성 등 거봉 주산지역에서 뿌리흑이 많이 발생 (Park 등, 2000)된다는 보고는 있으나 아직까지 정확한 피해규모는 조사되지 않은 실정이다.

뿌리흑병의 감염기작은 명확하게 밝혀지진 않았지만 상처난 세포에서 분비되는 여러 가지 페놀화합물 중 Acetosyrigone 등과 같은 페놀화합물이 *A. vitis*의 발현을 유도 (Spencer 등, 1990)하여 상처부위로 침입하는데 침입한 *A. vitis*는 자신이 갖고 있는 Ti-plasmid (tumor inducing plasmid)가 식물염색체로 삽입되어 과잉의 Auxin을 합성하고 지속적인 세포분열을 수행하여 육안으로 관찰이 가능한 크기의 흑이 형성된다(Burr 등, 1998).

식물체로 하여금 흑을 형성하도록 유도한 병원세균은 흑의 중심에 존재하지 않고 흑 선단과 주변의 세포와 세포사이에 발견되며 흑을 이루고 있는 세포들이 만드는 Opine 라는 물질을 영양분으로 사용하며 1~2년 후에 죽은 조직은 나무에서 절편으로 분리되어 이병 잔재로 토양 내에 존재하여 포도원이 뿌리흑병균의 만연을 초래한다

(Person 등, 1988). 뿌리혹병은 주로 포도나무 지체부에 주로 발생하며 지상 1.5m 정도 위의 나무줄기에서도 발병되기도 하는데 전정과 월동을 위한 피복작업 및 동해로 인한 지체부의 나무 균열 등으로 인한 상처가 주요 원인으로 알려지고 있다.

우리나라에서 재배되고 있는 대표적 유럽종 (*V. vinifera*) 포도인 거봉은 충남 천안, 경기 안성 등 중북부지역에 주로 재배되고 있으며 이 지역은 겨울철 최저기온이  $-15^{\circ}\text{C}$  이하 까지 내려갈 우려가 높으며 최근 천안지역의 경우 2001년 1월 15일에  $-22.4^{\circ}\text{C}$ 까지 기온이 급강하 하는 등 동해 우려가 높아 인위적 월동관리가 필요한 실정이다.

동해를 일으키는 원인은 품종, 수체영양, 가지의 성숙도 등에 따라 피해정도가 달라지는데 휴면기의 기온이  $-15^{\circ}\text{C}$ 에서는 40%,  $-18^{\circ}\text{C}$ 에서 70%가 고사된다고 보고 되었다(원예연구소, 1994). 충남 천안에서 노지월동 거봉품종 과원에서 2001년( $-10^{\circ}\text{C}$ 이하 122시간), 2003년( $-10^{\circ}\text{C}$ 이하 65시간)에 삼수를 채취 발아율을 조사한 결과 각각 36.5%, 31.7%가 고사하여 불발아 하였다(천안시농업기술센터, 2002. 2004).

동해에 관여하는 요인으로는 수체내의 함수량(홍, 1982), 탄수화물 함량(Ewart 등, 1954) 그리고 외부기온변화에 의한 세포내 구조적 변화(Asahina, 1977) 등이 관여하며 동해방지를 위해 관행적으로 유럽계 포도를 재배하고 있는 농가에서는 매년 흙매몰을 주로 행하고 있다. 거봉 주산지인 충남 천안의 경우 2004년 거봉재배면적은 1,243ha로 이중 약 86%인 1,070ha를 보온월동처리로 흙매몰을 하고 있다.

그러나 흙매몰 작업시 노동력의 과다 투입은 물론 전정부위나 나무를 눕히는 과정에서 상처가 발생하고 이를 통해 뿌리혹병균이 감염되며(Chamberlain, 1962; Lehoczky, 1968), 또한 포도나무를 갱신할 경우 대부분 묘목을 농가에서 자가 생산하고 있는데 이때 뿌리혹균에 감염된 묘목을 모수로 삼수를 채취할 경우 재감염을 유발하게 된다.

천안의 거봉품종 재배과원에서 뿌리혹병에 관한 평균 감염률을 육안 조사한 결과 3년생 유목에서 21.4%, 4~5년생에서는 64.9%, 6~7년생에서 80.1%, 8년생 이상 성목에서 86.0%, 무피복(6~9년생)에서 51.6%가 감염되는 것으로 조사되었다(천안시농업기술센터, 2002). 위의 조사에서 뿌리혹병 발생률은 수령이 오래될수록 증가하였으며 조사한 모든 과원에서 감염주가 발견 되어 수령이 낮은 어린 유목에서도 잠복 감염되었

을 것으로 추측된다. 무피복한 묘목에서는 월동을 위해 피복처리한 곳에서 뿌리혹병의 발현율은 현저히 낮았다.

뿌리혹병 감염으로 인한 피해는 수령 및 과원별 차이는 있으나 품질저하 및 수량저하로 농가소득이 15~20% 감소되며 묘목 갱신주기 또한 재식 후 평균 7~9년 사이로 수령이 약 2~3년 정도 단축되며 이로 인한 농가의 생산비 상승과 생력재배를 저해시키고 있다. 뿌리혹병 방제를 위해서는 감염되지 않은 건전한 묘목재식이 우선적으로 선행되어야 하는데 Burr 등 (1988)은 정단배양을 통해 *A. vitis*-free 묘를 획득하여 기내와 온실에서 6개월 동안 *A. vitis*-free 상태로 유지가 가능하다고 하였고 정단배양 외에도 30~60분 동안 50℃ 열탕처리가 *A. vitis* 수를 크게 감소시킨다고 하였다 (Burr 등, 1996) 그러나 아직까지 재식 이후의 감염 방제방법에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

이에 본 연구는 우리나라에서 대표적 4배체 재배품종인 거봉의 재배시 뿌리혹병에 의한 피해를 최소화할 수 있는 방제 방법을 확립하기 위해 실시하였다.

## 제 2 절 재 료 및 방 법

### 1. 동해방지 월동법 개발

본 시험은 충남 천안시농업기술센터의 포도시험연구포장에서 2002년부터 2003년까지 2년 간에 걸쳐 수행하였다.

#### 1)공시품종

공시품종은 자근묘 ‘거봉’ 5년생으로 수세가 비슷한 나무를 선정하였으며 수형은 충남 천안에서 주로 구성하는 변형X자형으로 하였다.

## 2) 피복재료

피복재료는 보온덮개(570g/m<sup>2</sup>), vinyl코팅재(570g/m<sup>2</sup>), 보온덮개+벚짚, vinyl코팅재+벚짚, 아큐론(570g/m<sup>2</sup>), 벚짚(두께 10cm), 무처리구, 흙매몰로 구분하여 실시하였다.

## 3) 시험방법

피복은 겨울이 시작되기 전인 11월 하순에 처리하였다. 처리당 반복수는 10주씩 하였고 흙매몰을 제외한 모든 처리는 수관하부 지제부에서 1.8m까지 피복처리 하였으며 지면과 접하는 부분은 흙으로 덮어 처리하였다. 흙매몰은 예비전정 후 결과모지를 가지런히 묶어 놓힌 후 흙으로 30cm 깊이로 매몰 처리하였다.

## 4) 조사방법

온도조사는 온도기록계(SR3000, YOKOKAWA)를 이용하여 외부기온이 최저로 내려간 2004년 1월 19일부터 1월 25일까지 7일간의 온도를 기록하였다. 온도측정부위는 흙매몰 처리구는 흙 표면 30cm 아래, 다른 처리구는 지제부에서 1m 지점 높이에서 측정하였다. 발아율은 1차 눈따기 실시전인 4월 29일에 하였으며 신초장은 만개기인 6월 10일, 과실 수량은 9월 9일 조사하였다.

## 2. 저온처리별 포도 품종의 발아율 조사

### 1) 공시재료

천안시농업기술센터 포도연구포장에서 천안지방에서 많이 재배되고 있는 포도대목(12종)과 접수품종(12종)으로 하였으며 천안시농업기술센터 포도 모수포장에서 품종별 2개의 충실한 눈을 가진 결과모지를 채취하였다(Table 14).

Table 14. Rootstocks vitis used for resistance to low temperature.

Rootstock vitis	Parentage
188-08	<i>Monticola</i> × <i>V. riparia</i>
3306C	<i>V. riparia</i> × <i>V. rupestris</i>
LN33	<i>V. berlandieri</i> × <i>V. riparia</i>
SO4	<i>V. berlandieri</i> × <i>V. riparia</i>
Riparia Gloire	<i>V. riparia</i>
101-14M	<i>V. riparia</i> × <i>V. rupestris</i>
5C	<i>V. berlandieri</i> × <i>V. riparia</i>
5BB	<i>V. berlandieri</i> × <i>V. riparia</i>
8B	<i>V. berlandieri</i> × <i>V. riparia</i>
3309C	<i>V. riparia</i> × <i>V. rupestris</i>
110R	<i>V. berlandieri</i> × <i>V. rupestris</i>
Cabernet Franc	<i>V.</i>
Saint George	<i>V. rupestris</i>

## 2) 시험방법

처리별 반복수는 1눈을 1반복으로 한개 삽수에 2개의 눈으로 하였으며 100반복 처리하였다. 처리방법은 채취한 삽수를 신문지에 싸서 수분증발을 억제시키고 DEEP FREEZER (ilShin 제품)에 넣고 0℃부터 6시간 간격으로 5℃씩 온도를 내려 -25℃ 까지 내리고 30시간 처리한 다음 24시간 전원을 차단하고 상온으로 온도를 올린 후 천안시농업기술센터 유리온실(최저기온:15℃, 최고기온: 23℃)에서 묘상자(가로45cm×60cm×15cm)에 질석과 펄라이트를 각각 1/2로 혼합하여 넣고 발아상황을 조사하였다.

## 3) 조사방법

발아조사는 삽수재식 30일 후 신초길이가 7cm 이상은 양호, 7~3cm는 보통, 1~3cm는 불량, 1cm 미만은 무발아로 하여 조사하였다..

### 3. 뿌리혹 저항성 품종 선발

#### 1) 공시품종

뿌리혹 저항성 품종 선발을 위하여 천안에서 재배되고 있는 8개 품종을 5반복으로 실시하였으며 모든 처리품종은 천안시농업기술센터에서 조직배양한 *A. vitis free* 묘를 사용하였다.

#### 2) 시험방법

처리균주는 한경대학교에서 배양한 YK2800 (농촌진흥청), LMG256 (벨기움), HKA-37 (한경대학교), HKS1-4 (한경대학교)를 사용하였으며 처리방법은 1년생 신초에 날카로운 칼로 인위적인 상처를 내어 침입통로를 제공하였다. 상처 크기는 직경 8~10mm, 깊이는 3mm 정도 하였으며 접종농도는  $10^3$ cfu/mL로 병원균의 양은 5 $\mu$ l하였다.

#### 3) 조사방법

병원균을 접종하고 3개월을 온실에서 생육시켰으며 버니어캘리퍼스를 사용하여 혹 크기를 조사하였다.

### 4. 거봉포도 재배농가포장의 동해피해 조사

#### 1) 공시품종

접수품종 : 거봉, 대목품종 : 5BB, SO4, G. M, 3309, 3306, 188-08, 기타

#### 2) 조사방법

조사지에서 월동 전에 거봉 7~8년생의 답·전과원에서 생육상이 중정도되는 3주

선정하여 나무당 1년생 결과 모지 3가지 채취 (가지당 10마디 정도, 필지당 9가지)하고 이듬해에 결과 모지의 주아, 부아를 횡단으로 잘라 고사여부를 확인 조사하였다.

## 5. 비닐감기에 의한 흑병방제

상처를 낸 포도 줄기 비닐로 2~3겹 감은 다음 병원균을 희석한 용액으로 접종한 토양에 심어 감염시켰다. 발병조사는 10주후에 접종부위 위쪽에 흑이 발생한 개체 및 흑의 크기를 조사하였다.

## 6. 소독제의 예방 및 치료효과 검정

### 1) 공시 약제

공시 약제 및 사용농도는 표 15와 같다.

### 2) 공시 균주

포도흑병을 일으키는 병원세균인 *A. vitis* HKS균주와 HKA 균주를 사용하였다.

### 3) 접종방법

균주는 King's B agar 배지에서 48시간 배양한 뒤에 King's B 배지에서 24시간 진탕 배양한 후에 멸균수로  $10^8$ cells/ml 농도로 희석하여 사용하였다.

각 약제의 예방효과 검정하기 위하여 포도 줄기 상처를 내어 각각 200배로 희석한 현탁액에 10분간 침지하여 음건한 후에 병원세균을 접종한 토양에 심어 감염시켰다. 토양의 수분은 토양전체의 30%의 비율로 수분을 조절하였다. 발병조사는 10주후에 발병개체수를 조사하고 Digmatic Caliper로 뿌리흑의 직경과 높이를 측정하였다.



Table 15. Details of bactericides used in this study

Common name	Active ingredient	Application	Remark (Korean name)
Octyldecyl dimethyl ammonium chloride	Octyldecyl dimethyl ammonium chloride 2.250%/1L Dioctyl dimethyl ammonium chloride 1.125%/1L Didecyl dimethyl ammonium chloride 1.125%/1L Alkyl dimethyl benzyl ammonium 3.000%/L	200배	파콤에이
Glutaraldehyde	Glutaraldehyde 150g/1L Dimethyl cocobenzyl ammonium chloride 100g/1L	200	올바이지큐
ClO <sub>2</sub>	ClO <sub>2</sub> 24,000~26,000 ppm/1L	200	유에프로
Didecyl dimethyl ammonium bromide	Didecyl dimethyl ammonium bromide 10%/1L	200	부롬셉트
Benzalkonium chloride	Benzalkonium chloride 10%/1L	200	벤잘크린
Didecyl dimethyl ammonium chloride	Didecyl dimethyl ammonium chloride 100g/1L Sodium Gluconate 10g/1L Sodium cireate 1.7g/1L	200	아스토푸
N-Alkyl dimethyl benzyl ammonium chloride	N-Alkyl dimethyl benzyl ammonium chloride 10%/1L Isopropyl alcohol Q.S Benzoic acid Q.S Pine oil Q.S Yucca oil Q.S	200	팜가드
Watersoluble Boron(B)	Watersoluble Boron(B) 0.05%/1L Watersoluble Molybdenum(Mo) 0.0005%/1L	200	뉴오스막
Sodium hypochloride solution(NaClO 4~6%)	Sodium hypochloride solution(NaClO 4~6%) 990ml/1L	200	하라솔
Sodium hypochloride solution(NaClO 4~6%)	Sodium hypochloride solution(NaClO 4~6%)	200	락스

## 7. 경제성 평가

뿌리혹병 감염에 따른 경제적 손실을 알아보기 위해 천안에서 재배되고 있는 거봉 포도과원을 조사대상으로 하였으며 조사방법은 수령별 감염여부와 감염정도를 육안 조사하였다. 감염주의 경우 감염정도를 심, 중, 약으로 3단계로 나누었으며 10a당 평균 생산량과 생산액은 1999년부터 2001년까지 3년간을 기준으로 하였다. 묘목교체에 따른 수확량 감소액 산정은 묘목교체시기를 10년, 성목의 경우 과원의 수관 확대가 완전히 이루어지는 4년생 이상으로 보았으며, 묘목 대는 천안묘목업자가 판매하고 있는 접목하지 않는 묘목가격을 기준으로 하였다.

거봉포도 월동피복별 소요금액의 산출은 수령 5년생인 포도 '거봉'의 월동피복전 가전정부터 이듬해 봄 모지의 유인결속 후 본 전정까지이며 재식간격은 3.6m×1.8m (154주/10a)이고 평균노임단가는 충남 천안의 포도재배농가의 월동피복작업 상용인부 임을 기준으로 계산하였다.

## 제 3 절 결과 및 고찰

### 1. 동해방지 월동법 개발

월동 기간 중 보온피복재 처리별 온도변화는 Table 16과 같다. 최고기온에서는 외부기온(6.4℃)이 가장 높으며, 그 다음으로는 짚 피복(4.7℃), vinyl코팅피복재(3.0℃), 보온덮개와 벚짚+보온덮개 피복(2.7℃), vinyl코팅재+벚짚(3.0℃), 흙매물 순으로 나타났다. 최저기온에서는 외부기온(-13.4℃)이 가장 낮았으며, 그다음으로는 벚짚(-9.7℃), 보온덮개 피복(-9.7℃), 짚+vinyl코팅재(-9.5℃), vinyl코팅재(-7.5℃), 벚짚+보온덮개(-6.9℃), 벚짚(-6.0), 흙매물(0.0℃) 순으로 낮았다.

온도변화의 폭은 흙 매물처리구가 0.3℃로 온도변화가 가장 적었고 그 다음으로는

벗짚+보온덮개피복(9.6℃), vinyl코팅재 피복(10.5℃), 벗짚 피복(10.7℃), 벗짚+vinyl코팅재 피복(11.0℃) 보온덮개 피복(12.4℃), 외부기온(19.8℃) 순으로 나타났다.

동해에 영향을 주는 최고온도와 최저온도와의 차이는 외부기온 19.8℃ 차이에 비하여 처리구 모두 적은 온도 변화를 보였으며 흙매물과 짚+보온덮개 피복에서 각각 0.3℃, 9.6℃로 온도 차이가 적어 동해방지에 가장 효과가 있는 것으로 조사됐다.

Table 16. The maximum and minium temperature around grapevines during the winter according to heat conservation materials('04. 1. 20)

Heat covering materials	Maximum(℃)	Minium(℃)	Range (max-min)
covering	0.3	0.0	0.3
Straw	4.7	-6.0	10.7
Straw+Lagging	2.7	-6.9	9.6
Lagging	2.7	-9.7	12.4
Vinyl coating Lagging+Straw	1.5	-9.5	11.0
Vinyl coating Lagging	3.0	-7.5	10.5
Conrol	6.4	-13.4	19.8

※Control : Temperaturemeans air temperature

월동피복재 처리별 뿌리혹병 감염조사 결과 흙매물 처리의 경우 5주중 3주가 감염되었고 vinyl코팅재 피복, 보온덮개 피복, 보온덮개+벗짚 피복에서는 각각 1주가 발병되었고 나머지 무처리구, vinyl코팅재 피복+벗짚, 벗짚 피복 처리구에서는 발병되지 않았다. 발병부위는 처리구 모두 수관하부인 지제부에서 발병이 되었으며 이는 흙매물의 경우 월동을 위하여 흙에 묻는 과정에서 상처를 통하여 감염이 되었을 것으로 판단되며 흙매물 처리구 이외의 처리에서 발병률이 적게 나타난 것은 감염원인 흙이 차단이 되었기 때문인 것으로 보여진다. 또한 월동처리별 포도나무의 고사 정도를 보면 무피복 처리구에서 5주중 3주가 고사하였고 벗짚 피복이 2주, 벗짚+보온덮개 피복

이 1주, 보온덮개 1주, vinyl코팅피복재 1주, vinyl코팅피복재+볏짚 처리가 1주 고사되었고 흙매물 처리구에서는 고사된 나무가 없었다. 또한 이른 봄 발아조사(4월 29)에는 처리구 모두 발아는 되었으나 생육 후반에 신초가 시들어 죽었다.

Table 17. The Effect of death and agrobacterium vitis contagion 'Kyoho' gapevine according to heat conservation materials

Heat covering materials	Treat number	Death number	Contagion number	
			below 1.5m	over 1.5m
covering	5	-	3	-
Straw	5	2	-	-
Straw+Lagging	5	1	1	-
Lagging	5	1	1	-
Vinyl coating Lagging+Straw	5	1	-	-
Vinyl coating Lagging	5	1	1	-
Control	5	3	-	-

※ Date : 2004. 9. 1

보온피복재 처리에서는 흙매물한 것이 발아율(79%)이 가장 높았고 짚+vinyl코팅피복재 피복(75.4%), 볏짚+보온덮개 피복(75.0%), 볏짚(73.0%), 보온덮개 피복(69.0%), vinyl코팅재 피복(58.0%), 무피복(56.5%)순으로 발아율을 보였다.

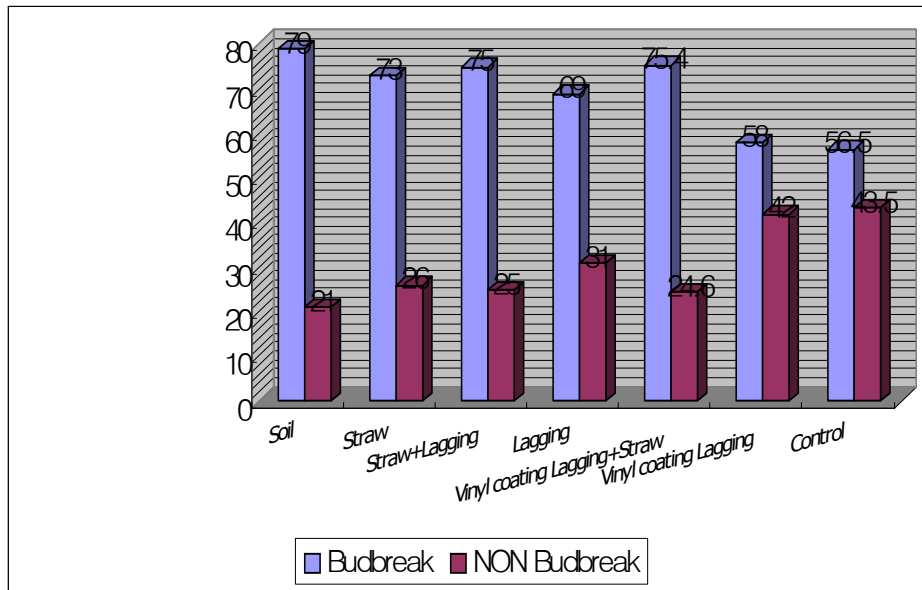


Fig. 16. Budbreak percent according to heat conservation materials of 'Kyoho' grapevine ※ Date : 2004. 4. 29

월동기간 중 보온피복재를 처리하고 이듬해 생장이 멈춘 수확기인 9월 10일 신초의 기부 3~4마디의 절간 굵기를 조사한 결과 무피복의 5.7mm에 비해 흙매몰과 벚짚+보온덮개 피복 처리구가 각각 7.6mm, 7.5mm로 굵게 나타났다. 평균 신초장의 경우는 흙매몰이 95.1cm, 벚짚+보온덮개 피복구가 93.3cm로 무피복 54.7cm 보다 각각 173.8%, 170.5% 신장량이 많았다. 이는 무피복의 경우 동해에 의해 발아와 생장이 둔화된 것으로 판단되며 동해방지를 위해 겨울철 월동관리가 필요함을 알 수 있었다.

Table. 18. The effect of the length branch and cluster of 'Kyoho' grapevine according to heat conservation materials

Heat covering materials	Average length branch(cm)	Average daughter between 3~4 internode(mm)
Covering soil	95.1	7.6
Straw	82.2	6.8
Straw+Lagging	93.3	7.5
Lagging	74.9	6.6
Vinyl coating Lagging+Straw	83.3	6.9
Vinyl coating Lagging	74.5	6.7
Control	54.7	5.7

※ 2004. 6. 9

월동피복재별 수확기 10주당 상품이 가능한 포도 착과량은 볏짚+ 보온덮개 피복이 445송이로 가장 많았고, 그다음으로는 흙매물(414송이), vinyl코팅피복(412송이), 볏짚 피복(405송이), vinyl코팅재 피복(388송이), 보온덮개 피복(315송이), 무피복(304송이)으로 조사되었고 과실 당도는 무피복(15.4Brix)으로 가장 낮았고 다른 처리구는 비슷하였다(Table 19). 이러한 결과는 겨울철 보온월동 피복재를 활용하여 포도나무를 보호하면 발아와 과실착과량도 양호하게 나타나는 것을 확인하였으며 과실량이 적어진다면 상대적으로 당도는 상승하게 된다고 판단된다.

Table. 19 The effect of the number of cluster and Average Brix of 'Kyoho' grape according to heat conservation materials

Heat covering materials	Number of cluster(Ea/10hill)	Average Brix
Covering soil	414	15.9
Straw	405	15.9
Straw+Lagging	445	15.9
Lagging	315	15.8
Vinyl coating Lagging+Straw	412	16.0
Vinyl coating Lagging	388	15.8
Control	304	15.4

※ 2004. 9. 9

월동피복재별 동력을 비교한 결과 Table 20과 같이 10a당 노동시간은 흙매물 45.2시간, 볏짚 27.3시간, 볏짚 및 보온덮개 31.5시간, 보온덮개 34.5시간, 비닐코팅 및 보온덮개 18.9시간, 비닐감기+보온덮개+볏짚 31.3시간으로 모든 처리에서 토양에 매물하는 것보다 30~30% 노동력이 절감되었다.

착과량은 흙매물보다 볏짚+ 보온덮개 피복이 많았고, vinyl코팅피복, 볏짚 피복, vinyl코팅재 피복, 보온덮개 피복도 많은 량이 수확되고 당도도 유사하며 월동용 인건비도 낮아 새로운 월동법으로 판단되었다.

Table 20. Effect of heat conservation materials on labor input of 'Kyoho' grapevine between winter and spring (hour/10a)

Working stage	Control	Covering soil	Straw	Straw+Lagging	Lagging	Vinyl coating Lagging	Vinyl coating Lagging+Straw
〈Winter〉							
Cutting	8.5	8.5	-	-	-	-	-
Binding vine	-	7.6	-	-	-	-	-
Clear of branch	-	5.4	-	-	5.4	-	-
Covering soil	-	6.8	-	-	-	-	-
Covering	-	-	13.4	17.6	5.2	5.0	17.4
〈Spring〉							
Cutting	-	-	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5
Clear of branch	5.4	-	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4
Taking soil	-	3.4	-	-	-	-	-
Leading of branch	-	13.5	-	-	-	-	-
Remove cover	-	-	4.3	4.8	4.0	4.0	4.8
Smoothing	-	8.0	-	-	-	-	-
Total	13.9 (30.7)	45.2 (100%)	27.3 (60.4)	31.5 (69.7)	24.5 (54.2)	18.9 (41.8)	31.3 (69.2)

## 2. 저온처리가 포도 품종별 발아에 미치는 영향 구명

12개 포도대목품종을 0℃부터 6시간 간격으로 5℃씩 온도를 내려 -25℃ 까지 내리고 30시간 처리한 다음 24시간 전원을 차단하고 상온으로 온도를 올린 후 천안시농업기술센터 유리온실(최저기온:15℃, 최고기온: 23℃)에서 묘상자(가로45cm×60cm×15cm)에 질석과 펄라이트를 각각 1/2로 혼합하여 넣고 발아상황을 조사한 결과는 Table 21과 같다. GM이 98.31%로 가장 양호한 발아를 보였으며, 그다음으로 St. George(88.46%), 188-08 (83.64%)을 보였고, 3306,S04, 1202, 5C, LN33,5BB, 101-14, 8B, 3309는 63.33~39.68%의 발아율을 보였다. 따라서 국내에서는 GM,, St. George, 188-08은 무피복 월동 대목으로 사용할 수 있을 것으로 판단되었다.



Table 21. Bud browning test of rootstocks cuttings.

Variety	Bud browning(%)				Germination ratio(%)
	Good	Normal	Bad	Non germination	
5BB	56.52	13.04	21.74	8.70	91.30
1202	61.67	26.66	11.67	0	100
3309	39.68	33.34	11.11	15.87	84.13
S04	62.96	9.26	12.96	14.82	85.18
101-14	44.93	18.84	27.54	8.70	91.30
5C	56.92	13.78	13.78	15.52	84.48
188-08	83.64	5.45	9.09	1.82	98.18
8B	40.68	32.2	20.34	6.78	93.22
St .George	88.46	1.92	1.92	7.69	92.31
LN33	56.9	6.9	10.34	25.86	74.14
3306	63.33	1.67	6.67	28.33	71.67
GM	98.31	0	0	1.69	98.31
Average	62.83	13.59	12.26	11.32	88.68

대목과 같은 방법으로 저온 처리한 결과 포도 품종별 발아율은 Table 22와 같다. Alden이 100%로 발아율이 가장 높았고 Early steuben이 71.43%, North Black 68.42%, Wase campbell, Takatsuma, Izunishiki, Bebifuji이 65.52~57.63%, Rizamat, Tensyu, 흥단, 메니큐어핑거, Kyoho 가 49.21~10.71%의 발아율을 보였다

Table 22. Bud browning test of grape variety cuttings

Variety	Bud browning(%)				Germination ratio(%)
	Good	Normal	Bad	Non germination	
Bebifuji	57.63	15.25	11.86	15.25	84.74
Rizamat	49.21	6.35	14.29	30.16	69.85
Early steuben	71.43	4.76	19.05	4.76	95.24
Mamicurefinger	21.43	12.5	21.43	44.64	55.36
Tensyu	36.84	36.84	19.3	7.02	92.98
Hongdan	23.88	22.39	20.9	32.84	67.17
North Black	68.42	5.26	7.02	19.3	80.7
Alden	100	0	0	0	100
Izunishiki	59.65	5.26	12.28	22.81	77.19
Kyoho	10.71	23.31	33.93	32.14	67.95
Takatsuma	61.82	7.21	16.36	14.55	85.39
Wase campbell	65.52	13.79	5.17	15.52	84.48
Average	52.21	12.74	15.13	19.91	80.09

### 3. 뿌리혹 저항성 품종 선발

뿌리혹 저항성 품종 선발을 위하여 8개 품종의 *A. vitis free* 묘에 YK2800(농촌진흥청), LMG256(벨기움), HKA-37(한경대학교), HKS1-4(한경대학교)의 4계통의 뿌리혹 균주를 처리한 결과 YK2800, LMG256은 모든 처리 대목 및 품종에서 발병이 되어 처리품종 모두 이들 균주 계통에서는 저항성이 낮았으며 HKS1-4의 경우 GM, 110R, 5C의 대목 품종에서는 발병이 되지 않아 이들 품종은 HKS1-4 균주에서는 저항성이 높은 것으로 판단된다. 특히 GM, 5C의 경우 HKA-37에서도 발병이 되지 않아 HKA-37에 대해서도 저항성이 있는 것으로 사료된다. 1202, 거봉, 탐나라, 개량머루는 모든 계통의 균주에서 민감하게 반응하여 이들 균주에는 저항성이 낮았다.

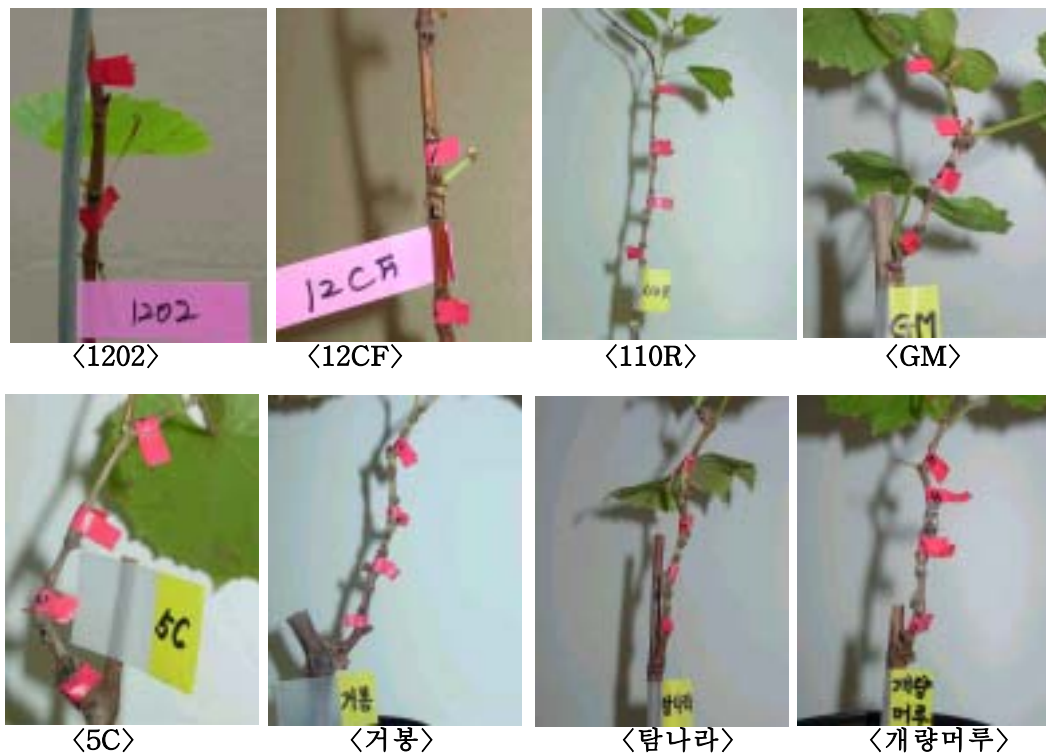


Fig. 17. Gall formation of rootstock and cultivar by inoculation of *A. vitis*

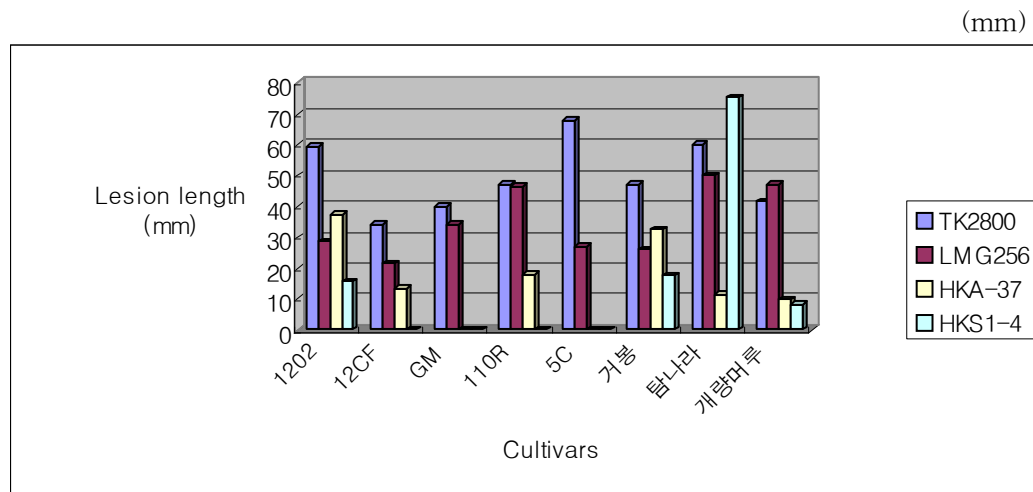


Fig. 18. Gall size of of rootstock and cultivar by inoculation of *A. vitis*

#### 4. 비닐감기에 의한 방제

혹의 발생은 삼수의 절단 부위에서 형성되었으며 인위적으로 상처를 낸 부위에서 일부 발생하기도 하였다.. 토양 속에 묻힐 때 절단부위나 상처에 발병이 되고 비닐을 감을 처리에서는 발병이 되지 않았다(표 23, 그림 19). 뿌리혹은 따라서 월동을 위하여 토양에 묻을 때에 지상부 1m 정도를 비닐로 감을 경우에 혹의 발생이 없을 것으로 예상되어 뿌리혹병 방제법으로 이용될 수 있을 것이다. 포도목이 땅에 묻혔을 때에 상처를 통한 감염이 되어 시작되는 것으로 보여진다.

Table 23. Effect of vinyl coating on gall formation

Treatment	No. of stem cutting	No. of plant gall formed	Ratio (%)
Control	30	30	100
Vinyl winding	30	0	0



상처접종 후 무처리 및 비닐감기



비닐감기 부분의 혹병 발생않음

Fig. 19. Effect of vinyl coating on gall formation

## 5. 포도혹에서 분리한 세균의 항생제 감수성

뿌리혹으로부터 분리한 세균의 항생제에 대한 감수성을 조사한 결과 표 24와 같다. Ampicillin (10 $\mu$ g)에 저항성인 균주로는 CNB 2, 11, 16, 17, 23, 26, 27, 29, 30, 33, 34, 55, 60이었으며, Chloramphenicol (30 $\mu$ g)에 대해서는 CNB 2, 43, 44, 45, 46 균주를 제외하고는 모두 감수성으로 나타났다. Erythromycin (15 $\mu$ g)에는 CNB 16, 38균주 이외는 모두 저항성으로 나타났으며, Kanamycin (30 $\mu$ g), Neomycin (30 $\mu$ g), Rifampin (5 $\mu$ g)에는 검정 균주 모두가 감수성으로 나타났다. Streptomycin (10 $\mu$ g)에 대해서는 CNB 8, 9, 17, 18, 26, 27, 29, 30, 33, 34, 43, 44, 46, 53, 56 균주이고, Tetracycline (30 $\mu$ g)에 저항성인 균주는 CNB 2, 8, 12, 17, 18, 20, 22, 23, 27, 28, 29, 30, 33, 43, 44, 46, 53, 56, 이었다.

이상과 같은 결과를 종합하면 Kanamycin (30 $\mu$ g), Neomycin (30 $\mu$ g), Rifampin (5 $\mu$ g)에는 검정 균주 모두가 감수성으로 나타나 뿌리혹병과 관련된 미생물의 방제에 효과적일 것으로 판단된다.

Table 24. Susceptibility of bacteria from grape gall to antibiotics

Isolate	Am	Ch	Er	Kan	Neo	Rifa	Str	Tet
CNB 1	-	18.1	-	20.7	15.2	10.1	14.5	17.1
2	7.1	-	-	20.1	16.0	10.4	15.6	-
3	-	13.6	-	22.1	16.1	7.7	17.4	19.5
4	-	11.2	-	26.3	20.1	8.9	19.8	22.3
5	-	16.6	-	21.5	17.0	10.3	16.2	21.7
6	-	11.2	-	19.1	14.3	7.6	13.5	16.8
7	-	12.0	-	18.2	15.2	10.3	14.7	16.6
8	-	17.6	-	20.3	16.6	8.7	-	-
9	-	10.2	-	17.3	13.7	9.9	-	9.3
10	-	16.6	-	21.7	15.7	9.4	11.9	14.8
11	7.25	17.8	-	25.2	19.0	11.9	23.3	22.8
12	-	13.4	-	22.5	16.4	11.5	10.2	-

Table 24. Continued

Isolate	Am	Ch	Er	Kan	Neo	Rifa	Str	Tet
13	-	13.0	-	22.3	13.6	8.7	16.1	18.1
14	-	13.1	-	22.5	15.8	11.4	15.8	20.8
15	-	12.4	-	20.1	16.7	10.3	15.6	16.5
16	7.8	12.5	7.4	22.1	18.1	8.3	17.9	8.1
17	7.3	12.0	-	20.1	15.6	11.2	-	-
18	-	16.3	-	21.1	15.1	9.6	-	-
19	-	11.1	-	19.7	17.2	8.7	14.8	19.0
20	-	19.4	-	26.0	17.3	11.7	14.6	-
21	-	14.5	-	22.1	16.3	11.7	16.6	16.3
22	-	13.4	-	20.4	16.7	11.4	10.5	-
23	10.9	15.0	-	22.0	17.4	7.5	18.1	19.5
24	-	13.7	-	20.0	15.0	8.5	9.7	-
25	-	14.9	-	24.9	19.3	14.8	14.9	-
26	7.6	12.3	-	18.7	15.3	10.8	-	6.1
27	8.4	13.4	-	20.7	16.3	8.2	-	-
28	-	12.9	-	21.1	14.5	11.3	8.3	-
29	7.1	13.4	-	19.7	15.5	12.5	-	-
30	8.0	15.1	-	19.8	16.5	12.8	-	-
31	-	14.3	-	20.2	15.1	7.2	11.5	21.8
32	-	16.7	-	22.6	15.9	9.3	15.9	19.3
33	8.5	13.2	-	21.4	16.8	13.0	-	-
34	8.2	15.4	-	20.9	14.4	7.7	-	7.9
35	-	16.3	-	21.8	15.9	8.7	15.8	21.0
36	-	17.4	-	24.0	17.5	11.1	17.9	20.0
37	-	15.3	-	21.0	16.0	10.3	9.2	9.1
38	-	29.0	8.7	22.0	17.6	10.8	10.4	9.1
39	-	18.0	-	21.8	16.8	9.6	13.8	12.2
40	-	7.8	-	21.2	15.8	9.2	17.0	17.6
41	-	11.0	-	20.6	16.1	10.6	15.8	20.8
42	-	13.1	-	23.1	17.4	9.5	14.7	21.1
43	-	-	-	20.3	14.3	7.4	-	-
44	-	-	-	17.8	14.5	8.7	-	-
45	-	-	-	24.1	18.0	10.4	16.3	19.4

Table 24. Continued

Isolate	Am	Ch	Er	Kan	Neo	Rifa	Str	Tet
46	-	-	-	18.8	15.5	8.30	-	-
47	-	16.6	-	22.2	15.7	9.6	13.1	22.3
48	-	16.0	-	19.8	14.5	7.6	15.0	19.2
49	-	17.3	-	19.8	16.0	9.1	13.8	20.2
50	-	16.3	-	22.2	16.3	10.1	15.7	20.7
51	-	9.0	-	20.8	15.9	8.6	12.5	14.3
52	-	18.0	-	16.1	12.5	8.6	14.3	14.3
53	-	20.0	-	21.1	16.4	9.4	-	-
54	-	21.1	-	23.5	17.1	9.3	16.0	21.4
55	6.75	13.8	-	22.5	17.5	9.8	16.6	18.0
56	-	8.5	-	20.4	16.5	8.2	-	-
57	-	15.8	-	24.4	16.1	8.0	17.5	18.2
58	-	20.0	-	24.3	19.6	9.8	10.0	10.0
59	-	9.2	-	24.4	18.1	8.4	18.4	18.0
60	10.5	28.2	-	22.0	17.1	10.0	16.1	20.4
61	-	10.0	-	23.1	17.5	8.4	15.3	18.5

Ampicillin 10 $\mu$ g, 2 : Chloramphenicol 30 $\mu$ g, 3 : Erythromycin 15 $\mu$ g, 4 : Kanamycin 30 $\mu$ g, 5 : Neomycin 30 $\mu$ g, 6 : Rifampin 5 $\mu$ g, 7 : Streptomycin 10 $\mu$ g, 8 : Tetracycline 30 $\mu$ g. 제조회사 : Becton, Dickinson and Company

## 6. 소독제에 의한 흑병 방제 효과

뿌리흑병의 약제 효과를 검정하기 위하여 거봉포도에 인공접종한 후 실내검정에서 뿌리흑병균의 생육을 억제하는 약제로 선발된 2조합을 처리한 결과는 표 25와 같다. 무처리의 경우는 모든 개체에서 흑이 발생하였으나 포도삽수에 상처를 주어 흑병균을 인공 접종한 결과 무처리구에서는 처리한 개체가 모두 흑이 발생하였으나 인공접종 후에 부롬셉트+UFO로 살균한 개체의 경우는 30.0%, 파콤에이+올바이지큐를 처리한 개체의 경우는 56.7%의 발병률을 나타냈다

병원균을 접종한 후 1일에 약제를 분무한 것은 전혀 발병하지 않았고 접종 후 7~14일 후에 처리한 것도 1~3개체 정도만 발병하여 약제처리 효과가 인정되었다.

표 25. Effect of disinfectant on crown gall formation in Kyoho cultivar

Treatment	Treatment day after inoculation	Gall formation	Remark
Control	1	10/10	혹의 직경이 2~5mm이었음.
	7	10/10	
	14	10/10	
A+D	1	0/10	혹의 직경이 2mm이하였음.
	7	1/10	
	14	3/10	
B+C	1	1/10	혹의 직경이 2mm이하였음.
	7	2/10	
	14	2/10	

A : Glutaraldehyde, Dimethyl cocobenzyl ammonium chloride

B : Didecyl dimethyl ammonium bromide, C : 안정화 이산화염소(ClO<sub>2</sub>)

D : Alkyl dimethyl benzyl ammonium chloride, Octyldecyl dimethyl ammonium chloride, Dioctyl dimethyl ammonium chloride, Didecyl dimethyl ammonium chloride

## 7. 뿌리혹병균 방제의 경제성 평가

### 1) 천안거봉포도 뿌리혹병 감염에 따른 피해 추정액

포도뿌리혹병 감염율을 육안 조사한 결과 수령에 따라 다르게 나타났다. 포도나무 수령이 3년생 이하의 경우 21.4%, 4~5년생의 경우 64.9%, 6~7년생은 80.1%, 8년생 이상은 86.0%로 감염되어 평균 65.6%가 감염된 것으로 나타났으며 6~9년생 무피복 감염율은 51.6%로 흙매몰 평균 감염율 86.2% 보다 31.6% 감염율이 낮았으며 발병 정도도 미약하였다. 또한 무피복의 경우 유목시 월동처리로 흙매몰로 인해 감염되었을 것으로 판단된다.



Table 26. The infection rate of gall formation according to soil burying (2003)

Plant age (year)	Area (3.3m <sup>2</sup> )	No. of orchard	No. of Plant (A)	No. of plant gall formed (B)	Ratio (%) (B / A)
3	3,120	3	2,777	595	21.4
4~5	7,750	7	3,755	2,440	64.9
6~7	8,282	7	3,418	2,740	80.1
≥8	7,700	8	3,742	3,220	86.0
Total	26,850	25	13,692	8,995	-
Average					65.6
Non covering (6 year)	3,500	4	1,326	685	51.6

천안의 거봉포도재배면적은 1,372ha로 이중 1,098ha(80%)가 월동처리로 흙매몰을 하고 있으며 이중 약 65.6%가 포도뿌리혹병에 감염이 된 것으로 조사되었다. 이로 인해 직접적으로 1,215톤 생산량이 감소되어 2,621백 만원의 농가소득 감소가 되는 것으로 조사되었다.

Table 27. Yield reduction of grape by grown-gall disease

Area (ha)	Yield/10a (kg) (‘99~‘01)	Yield reduction amount of infection degree				Average (won) (‘02~‘04)	Total (million won)
		Deep	Medium	Slightly	Total infection ratio		
		Area of infection degree (ha) Ratio (%)	164.7 (15.0)	219.6 (20.0)	335.9 (30.6)	720.2 (65.6)	
1,098	1,696	Reduction ratio (%)	20	10	5	-	2,156
		Total Reduction (kg)	558,662	372,441	284,843	1,215,946	

또한 뿌리혹병 감염으로 수령이 단축되어 10년마다 묘목을 교체 할 경우 묘목대가 년 평균 253백만 원 소요되며 성목이 될 때까지 묘목교체에 따른 년 평균 수량감소가 3,445톤으로 금액으로 7,427백만 원으로 뿌리혹병 감염으로 인한 총 손실은 약 10,301백만 원으로 거봉포도 총 생산액 450억 원의 22.8%를 차지하는 것으로 사료된다.

Table 28. The amount of planting-stock change by crown-gall disease

	Area (ha)	No. of plant/10a	Average age of changing planting-stock (year)	Cost/ plant (won)	Total (million won)
The total amount of changing planting-stock	1,098	154	10	1,500	253

Table 29. Yield reduction by the amount of planting-stock change

planting-stock change age (year)	Area (ha)	Average yield (kg)	☆ Yield reduction (ton/year)	Price / kg (won) ('02~'04)	Price reduction (million won/year)
10	1,098	1,696	3,445	2,156	7,427

☆ : 교체후 10년간 생산량 감소액의 합계/교체년수(10년)

- 천안지역 뿌리혹병 감염에 의한 소득감소 추정액 =10,301백만원
- 천안지역 뿌리혹병 감염에 의한 수량감소 및 소득감소 추정액 : 2,621백만원
- 2004년 천안포도 총생산액 : 450억원

Table 30. The amount of over-wintering mulching materials for Kyoho cultivar(10a)

		Control	Covering soil	Straw	Straw+lagging	Lagging	Vinyl coating	Vinyl coating +straw
Personnel expenses		69,500	266,000	158,000	181,500	142,500	114,500	180,500
자재비	Pruning	12,500	12,500	12,500	12,500	12,500	12,500	12,500
	String	-	8,400	8,400	8,400	8,400	8,400	8,400
	Rotary	-	5,000	-	-	-	-	-
	Straw	-	-	30,000	30,000	-	-	30,000
	Lagging	-	-	-	45,000	45,000	-	-
	Vinyl coating	-	-	-	-	-	100,000	100,000
Total price of material		12,500	25,900	50,900	95,900	65,900	120,900	150,900
Total price		82,000	291,900	208,900	277,400	208,400	235,400	331,400
Degree of difficulty		-	++++	++	++	+	+	++

※ 인건비 : 40,000원(남자 50,000, 여자30,000 2인 공동 작업기준) - 식사비 별도

10a당 월동피복에 따른 투입되는 노동력 투하량은 흙매물의 경우 53.2시간으로 가장 많이 소요되고 짚+보온덮개피복 36.3시간, vinyl코팅+짚피복 36.1시간, 짚 피복 31.6시간, 보온덮개 피복 28.5시간, vinyl코팅피복 22.9시간, 무처리의 경우 13.9시간이 투입되었으며 월동피복을 위해 소요되는 자재비는 vinyl코팅피복+짚피복이 150,900원으로 가장 많이 소요되었고 vinyl코팅피복 120,900원, 짚+보온덮개피복 95,900원, 보온덮개 65,900원, 짚 피복 50,900원, 흙매물 25,900원, 무처리 12,500원 순으로 나타났다. 총경비는 vinyl코팅+짚이 331,400원으로 가장 많이 소요되었고 그 다음으로는 흙매물이 291,900원, 짚+보온덮개 피복 277,400원, vinyl코팅피복 235,400원, 짚 피복 208,900원, 보온덮개 피복 208,400원, 무처리 82,000원으로 나타났다. 작업난이도는 흙매물 처리가 가장 어려운 것으로 조사되었으며 짚 피복, vinyl코팅+짚 피복, 짚+보온덮개 피복이 작업난이도가 비슷하였으며 보온덮개, vinyl코팅피복은 작업난이도가 가장 낮은 것으로 조사되었다.

Table 31. The labor hour for over-wintering mulching (unit:hr./10a)

		Control	Covering soil	Straw	Straw+lagging	Lagging	Vinyl coating	Vinyl coating +straw
Winter	Cutting	8.5	8.5	-	-	-	-	-
	Binding vine	-	7.6	-	-	-	-	-
	Clear of branch	-	5.4	-	-	5.4	-	-
	Covering soil	-	6.8	-	-	-	-	-
	Covering	-	-	13.4	17.6	5.2	5.0	17.4
Spring	Cutting	-	-	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5
	Clear of branch	5.4	-	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4
	Taking soil	-	3.4	-	-	-	-	-
	Leading of branch	-	13.5	-	-	-	-	-
	Remove cover	-	-	4.3	4.8	4.0	4.0	4.8
	Smooting	-	8.0	-	-	-	-	-
Total		13.9	53.2	31.6	36.3	28.5	22.9	36.1
Degree of difficulty		-	++++	++	++	+	+	++

Table 32. The amount of over-wintering mulching materials(won/10a)

Material	Price/ea	Amount	Price	Use year	Price reduction (price/year)
Pruning	25,000	1	25,000	2	12,500
Rotary	5,000	5	25,000	5	5,000
Straw	100,000	0.3	30,000	1	30,000
Lagging	30,000	3	90,000	2	45,000
Vinyl coating	500,000	0.6	300,000	3	166,660
String	8,400	1	8,400	1	8,400

월동피복재별 수확기 과실수량은 짚+보온덮개 피복 처리구가 가장 많은 송이를 수확하였고 짚 피복, 짚+vinyl코팅 피복, vinyl코팅제 피복, 흙매몰은 87~93% 착과수를 보였고 무처리와 보온덮개 피복은 짚+보온덮개 피복제 처리구의 각각 68.3%, 70.7%의 송이를 수확하였다. 처리별 과실당도는 무처리를 제외한 모든 처리구에서 비슷하였다.

10a당 월동피복에 따른 투입되는 노동력 투하량은 흙매물의 경우 53.2시간으로 가장 많이 소요되고 짚+보온덮개피복 36.3시간, vinyl코팅+짚피복 36.1시간, 짚 피복 31.6시간, 보온덮개 피복 28.5시간, vinyl코팅피복 22.9시간, 무처리의 경우 13.9시간이 투입되었으며 월동피복을 위해 소요되는 자재비는 vinyl코팅피복+짚피복이 150,900원으로 가장 많이 소요되었고 vinyl코팅피복 120,900원, 짚+보온덮개피복 95,900원, 보온덮개 65,900원, 짚 피복 50,900원, 흙매물 25,900원, 무처리 12,500원 순으로 나타났다. 총경비는 vinyl코팅+짚이 331,400원으로 가장 많이 소요되었고 그 다음으로는 흙매물이 291,900원, 짚+보온덮개 피복 277,400원, vinyl코팅피복 235,400원, 짚 피복 208,900원, 보온덮개 피복 208,400원, 무처리 82,000원으로 나타났다. 작업난이도는 흙매물 처리가 가장 어려운 것으로 조사되었으며 짚 피복, vinyl코팅+짚 피복, 짚+보온덮개 피복이 작업난이도가 비슷하였으며 보온덮개, vinyl코팅피복은 작업난이도가 가장 낮은 것으로 조사되었다.

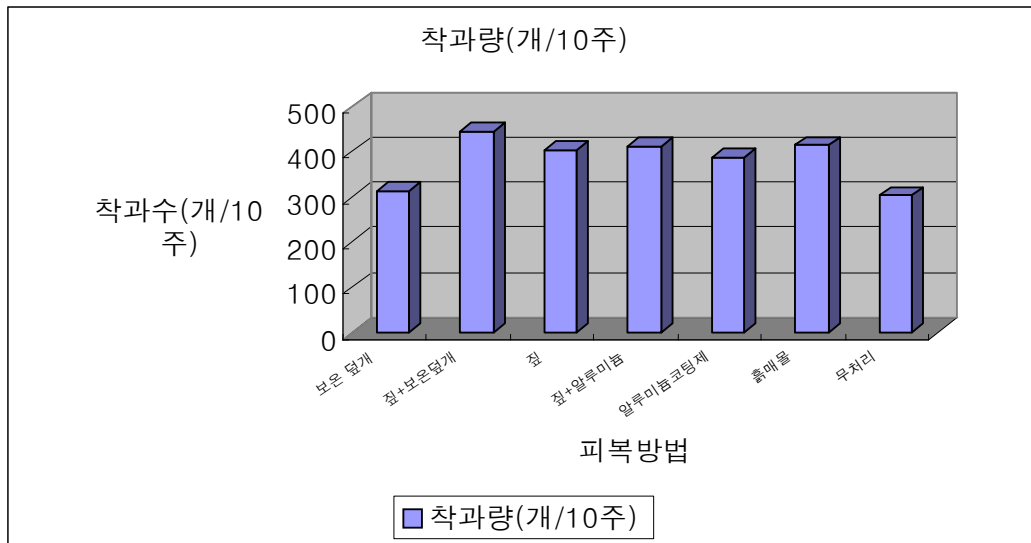


Fig 20. Effect of different mulching materials on grape yield

포도 뿌리혹병의 종합적인 방제를 위해서는 무병주로부터 부병묘목을 생산하고 무

병토양에서 재배하는 것이 가장 이상적인 방제법이다. 그러나 무병주의 선정을 위해서는 육안적인 방법과 분자생물학적인 검정에 의하여 포도줄기에서 병원세균의 존재를 확인하고 또한 토양의 감염 유무를 확인해야한다. 본 연구에서는 DNA maker에 의한 포도조직 및 토양의 오염유무를 정확히 판정할 수 있는 기술을 개발하여 무병주 및 무병토양 선정 방법을 가능하게 하였다.

거봉은 자연 월동이 불가능하여서 토양에 묻는 방법을 택하고 있다. 그러므로 토양이 오염된 지역에서는 월동 중에 병원세균이 감염되어 발병한다. 본 연구에서는 소독제에 의한 감염억제 및 비닐감기에 의한 상처침입을 방지할 수 있는 방법을 개발하였다. 이상과 같은 방법을 종합적으로 이용한다면 뿌리혹 방제에 크게 기여 할 것이다.

## 참 고 문 헌

- Agrios, G.N. 1978. Plant pathology. 2nd edition. Academic Press. pp.484-488.
- Agrios, G.N. 1988. *Plant Pathology*, Third Edition. Academic Press, Inc., Sandiego, California. 803pp.
- Asahina, E. 1965. Freezing injury in egg cells of the sea urchin. *Inst. Low Temp. Sci.* 19:211-229
- Asahina, E. 1977. Freezing processes and injury in plant cell. *Inst. Low Temp. Sci.* 31:18-36.
- Bernaerts, M. J. and De Ley, J. 1963. A biochemical test for crown gall bacteria. *Nature(London)*197:406-407.
- Brisbane, P. G. and Kerr. A. 1983. Selective media for three biovars of *Agrobacterium*. *J. Appl. Bacteriol.* 54:425-431.
- 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 siol. *Phytopathology* 73:163-165.
- Burr, T.J. and B. H. Katz, A.L. Bishop, C.A. Meyers, and V.L, Mittak. 1988. Effect of shoot age and tip culture propagation on gapes on systemic infestation by

*Agrobacterium tumefaciens* biovar 3. Am. J. Enol. Vitic. 39:67-70.

Burr, T. J. and C. L. Reid. 1993 Biological control of grape crown gall with nontumorigenic *Agrobacterium vitis* strain F2/5. Am. J. Enol. Vitic. 45:213-219.

Burr, T. J. and L. Otten. 1998. Crown gall of grape : Biology and disease management. Ann. Rev. Phytopathol. 37:53-80.

Burr, T. J and L. Otten. 1999. Crown gall of grape: Biology and disease management. Annu Rev Phytopathol , 37:53-80.

Burr, T. J., C. Bazzi, S. Sule, and L. Otten. 1998. Crown gall of grape-Biology of *Agrobacterium vitis* and the development of disease control strategies. Plant Disease 82:1288-1297.

Burr, T. J., C. L. Reid, D. F. Spittstoesser, and M. Yoshimura. 1996. Effect of heat treatments on grape bud mortality and survival of *Agrobacterium vitis* in vitro and in dormant grape cutting. Am. J. Enol. Vitic. 47:119-123.

Burr, T. J., C. L. Reid, M. Yoshimura, E.A. Momol, and C. Bazzi. 1995. Survival and tumorigenicity of *Agrobacterium vitis* in living and decaying grape roots and canes in soil. Plant Dis. 79:677-682.

Burr, T. J., C. L. Reid, D. F. Splittstoesser and Yoshimura. M.1996. Effect of heat treatments on grape bud mortality and survival of *Agrobacterium vitis in vitro* and in Dormant Grape Cuttings. Am. J. Enol. Vitic. 47:2.

Chamberlain, G. C. 1962. The occurrence of aerial crown gall of grapevines in the



Niagara Peninsula of Ontario, Canada. Can. plant Dis. Surv. 42:208-211.

Chamberlain, P. G. 1962. The occurrence of aerial crown gall of grapevines in the Niagara peninsula of Ontario. Can. Plant Dis. Surv. 42:208-211.

Chen, P. M. and L. V. Gusta. 1977. The role of water in cold hardiness of winter. Plant Physiol. 60:165-173.

Chung, K. J. and J. S. Shim. 1996. Isolation and Identification of pathogenic bacteria of grapevine crown gall in Korea. Kor. J. Plant Pathol.12:197-201.

Davis, M. B., M. Macarthur, and D. Williams. 1955. Freezing effects on apple wood. Progr. Rep. Hort. Div. Center. Exp. Fm. Ottawa. pp.131-134.

Dhanvantari, B. N. 1983. Etiology of grape crown gall in Ontario. Can. J. Bot. 61:2641-2646.

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 Disease 79:882-827.

Edgerton, L. J. 1954. Fluctuation in the cold hardiness of peach flower buds during rest period and dormancy. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 64:171-179.

Ewart, M. H., D. Siminovitch, and D. R. Briggs. 1954. Studies on the chemistry of the living black locust in relation to its frost hardiness. VIII. Possible enzymatic processes involved in starch-sucrose interconversions. Plant Physiol. 29:407-413.

FAO. 2002. <http://apps.fao.org/>.

Ferreira, J. H. S. and F. G. H. van Zyl. 1986. Susceptibility of grape-vine rootstocks to strains of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3. S. Afr. J. Enol. Vitic. 7:101-104.

Fuchigami, L. H., C. J. Weiser, and D. R. Evert. 1971. Induction of cold acclimation in *Cornus stolonifera* Michx. Plant Physiol. 47:98-103.

Goodman, R. N., R. Drimm, and M. Frank. 1993. The influence of grape rootstock on the crown gall infection process and tumor development. Am. J. Enol. Viti. 44:22-26.

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.

홍성각. 1982. 0°C 인접온도로 유발되는 사과나무의 저온과 냉각이동에 영향을 미치는 인자. 농업자원개발 연구소 논문집 7:17~29.

Kahl, G. and Schell, J. S. 1982. Molecular Biology of Plant Tumors. Academic Press, N. Y.

Kang, H. W. Go S. J and Eun, M. Y. 2002. Fingerprinting of Diverse Genomes using PCR with Universal Rice Primers (URPs) Generated from Repetitive Sequence of Korean Weedy Rice. Molecules and Cells.13(2): 1-7.

강희완, 권순우, 고승주 1998 PCR다형성 밴드유래 DNA probe에 의한 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 특이 검출. 한국식물병리학회 14(1):164-170.

Kaufmann, M., Kassemeyer, H. H. and Otten, L. 1996. Isolation of *Agrobacterium vitis*. from grapevine propagating material by means of PCR after immunocapture cultivation. *Vitis* 35:151-153.

Kean, P. J., Kerr, A., New, P. B. 1970. Crown gall of stone fruit. II. Identification and nomenclature of *Agrobacterium* isolates. *Aust. J. Bilo. Sci.* 23:585-595.

Kerr, A. and Brisbane, P. G. 1983. *Agrobacterium*. In: *Plant Bacterial Diseases-A Diagnostic Guide*, ed. by P. C. Fahy and G. J. Persley, pp. 28-43. Academic Press, NY.

Kerr, A. and Panagopoulos, C. G. 1977. Biotypes of *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens* and their biological control. *Phytopathology Z.* 90:172-179.

Kerstens, K. and De Ley, J. 1984. Genus III. *Agrobacterium* Conn 1942, 359<sup>AL</sup>. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., Vol. 1, ed. by R. E. Murray *et al.*, PP. 244-254. Williams & Wilkins, Baltimore, U.S.A.

김광식 외. 1982. 한국의 기후. 일지사. pp.179-183.

김광식 외. 1990. 증보농업기상학. 향문사. pp.46-83, 333-355.

Kitaura, K. 1967. Supercooling and ice formation in mulberry tree. *Bull. Serical Exp.Sta.* 31:17-29.

Kuiper, P. J. C. 1964. Inducing resistance to freezing and desiccation in plants by decenylsuccinic acid. *Science* 146:544-546.

이광연, 고광출, 이재창, 유영산, 김선규. 1985. 앞으로의 포도재배. 대한교과서주식회사. p.94-97

Lehoczky, J. 1968. Spread of *Agrobacterium tumefaciens* in the vessels of the grapevine after nature infection. Phytopathol. Z. 63:239-246.

Lehoczky, J. 1971. Further evidence concerning the systemic spreading of *Agrobacterium tumefaciens* in the vascular system of grapevines. Vitis 10:215-221

Lehoczky, J. 1978. Root system of the grapevine as a reservoir of *Agrobacterium tumefaciens* cells. Proc. 4th Int. Conf. Plant Pathol. Bact. Angers 239-243.

Loubser, J. T. 1978. Identification of *Agrobacterium tumefaciens* biotype 3 on grapevine in South Africa. Plant Dis. Rep. 62:630-631.

Malenin, L. 1970. Etude de la propagation del' *Agrobacterium tumefaciens* le long des vaisseaux de bois de la vigne et la formation de tumeurs secondaires. Gradinarcka I Lozarska Nauka(Sofia). 7:127-135.

농림부. 2002. 과수실태조사.

문종렬, 최종승, 신건철. 1986. 포도결과모지고사 원인조사. 한국원예학회논문발표요지 2(2):50-51.

Nasciment, T., Oliveria, H., Schulz, T. and Barba, M. 1999. Identification of *Agrobacterium vitis* by amplification of molecular markers. Petria :81-84.

농업기술연구소. 1990. 주요 과수 재배지대의 기후 특성. 농촌진흥청. pp.183-199.

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. and Ruffray, P. de. 1996. Major difference between the *rrnA* operons of two strains of *Agrobacterium vitis*. Arch.Microbiol. 166:68-70.

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. pp. 221-228.

Park, K. H., K. S. Jeong, and J. S. Cha. 2000. Incidence of severe crown gall disease on tetraploid cultivars of grape in Korea. Plant pathol. J 16:290-293.

Peoson, R. C., and A. C. Goheen. 1988. Compendium of grape diseases. APS Press. P.41.

Pogosyan, K. S. and A. Sakai. 1972. Effect of thawing speed on the survival of grape vines plants. UDC 581, 036. 5:1023, 1028.

Proebsting, E. L. and H. H. Mills. 1969. Effect of growth regulators on fruit bud hardiness in *Prunus*. HortScience 4:254-255.

Pu, X. A. and R. N. Goodman. 1993. Tumor formation by *Agrobacterium tumefaciens* is suppressed by *Agrobacterium radiobacter* HLB-2 on grape plants. Am. J. Enol. Vitic. 44:249-254.

Roy, M. and Saasser, M. 1983. A medium selective for *Agrobacterium tumefaciens* biotype 3. *Phytopathology* 73:810.

농촌진흥청. 1979. 정밀토양개략도.

농촌진흥청. 1995. 삼정농사시험연구조사기준.

Schroth, M. N., A. H. McCain, J. H. Foott, and O. C. Huisman. 1998. Reduction in yield and vigor of grapevine caused by crown gall disease. *Plant Dis.* 72:241-246.

Schulz, T. F., Bauer, C., Lorenz, D., Plapp, R. and Eichhorn, K. W. 1993. Studies on the evolution of *Agrobacterium vitis* as based on genomic fingerprinting and IS element analysis. *Systemic Appl. Microbiol.* 16:322-329.

Shin, K. C., J. S. Choi, S. B. Kim., J. Y. Moon, and J. H. Kim. 1986. Influence of low temperature and its duration on cold injury of deciduous fruit tree. res. rept. RDA. *Hort.* 28(1):48-52.

Stover, E. W., Swartz, H. J. and Burr, T. J. 1997. Crown gall formation in a diverse collection of *Vitis* genotypes inoculated with *Agrobacterium vitis*. *American J. Enology Viticulture.* 48:26-32.

Stover, E. W., H. J. Swartz, and T. J Burr. 1997a. Crown gall formation in a diverse collection of *Vitis* genotypes inoculated with *Agrobacterium vitis*. *Am. J. Enol. Vitic.* 48:26-32.

Stover, E. W., H. J. Swartz, and T. J Burr. 1997b. Endophytic *Agrobacterium* in crown gall-resistant and -susceptible *Vitis* genotypes. *Vitis* 36:21-26.

Sule, S. and T. S. Burr. 1998. The effect of resistance of rootstocks to crown gall(*Agrobacterium* spp.) on the susceptibility of scions in grape vine cultivars. *Plant Pathol.* 47:84-88.

Sule, S., J. Mozsar, and T. J. Burr. 1994. Crown gall resistance of *Vitis* spp. and grapevine rootstocks. *Phytopathol.* 84:607-611.

Süüle, S. and Burr, T. J. 1998. The effect of resistance of rootstocks to crown gall(*Agrobacterium* spp.) on the susceptibility of scions in grape vine cultivars. *Plant Pathol.* 47:84-88.

Süüle, S., Mozsar, J. and Burr, T. J. 1994. Crown gall resistance of *Vitis* spp. and grapevine rootstocks. *Phytopathology* 84:607-611.

Szegedi, E., J. Korbuly, and I. Koleda. 1984. Crown gall resistance in East-asian *Vitis* species and their *V. vinifera* hybrid. *Vitis* 23:21-26.

Tarbah, F. A. and R. N. Goodman. 1986. Rapid detection of *Agrobacterium tumefaciens* in grapevine propagating material and the basis for an efficient indexing system. *Plant Dis.* 70:566-568.

Wample, R.L. 1993. Influence of pre- and post-treatment storage on budbreak of hot water treated cuttings of 'Cabernet Sauvignon'. *Am. J. Enol. Vitic.* 44:153-158.

Winkler, A. J., J. A. Cook, W. M. Kliewer, and L. A. Lider. 1974. *General viticulture*. University of California Press. pp.490-494.

Yajie, L., Z. Jaiying, and M. Dequin. 1990. A biotype 3 strain of *Agrobacterium*

*radiobacter* inhibits crown gall formation on grapevine. Acta Phytopathol. Sin.30:165-171.

Young, J. M., Takikawa, Y., Gardan, L. and Stead, D. E. 1992. Changing concepts in the taxonomy of plant pathogenic bacteria. Annu, Rev. Phytopathol. 30:67-105.



## 주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.