

국내 포도나무 흑병 (*Agrobacterium vitis*) 균주의 유전적 다양성김종군 · 최재율¹ · 강희완*한경대학교 생물환경 · 정보통신전문대학원, ¹충남대학교 농업생명과학대학Genetic Diversity of *Agrobacterium vitis* Strains in KoreaJong-Kun Kim, Jae-Eul Choi¹ and Hee-Wan Kang*

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

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

(Received on November 17, 2007)

Fifty nine strains of *Agrobacterium vitis*, the causal agent of crown-gall disease on grapevine, originating from different geographical regions and 16 grapevine cultivars including 35 Kyoho cultivar of Korea, were characterized by PCR polymorphic analysis using Universal Rice Primer(URP). Of 12 URP primers, primers URP1F, URP2R, URP2F, and URP4R, URP17R were available for detecting PCR polymorphic bands among the *A. vitis* strains. PCR polymorphic bands produced by primers URP2F and URP17R were profiled to 12 strain types. *A. vitis* strains originated from Kyoho cultivar of grapevine showed relatively simple genetic diversity of the four PCR types, while the *A. vitis* strains originated from other grapevine cultivars and type culture strains showed various genetic diversity with 8 types. Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean(UPGMA) cluster analysis using the URP-PCR polymorphic bands showed 59 *A. vitis* strains are genetically clustered into large seven groups.

Keywords : *Agrobacterium vitis*, Crown gall, Grapevine, Genetic diversity, Pathogenicity, PCR polymorphic

포도나무에 흑병을 일으키는 병원균은 *Agrobacterium tumefaciens*(biotype)3로 분류하였으며(Burr와 Hurwitz, 1981; Burr와 Katz, 1982; Loubser, 1978; Panagopoulos, 1978), Holmes과 Robert(1978)는 *A. tumefaciens* biovar (biotype) 3의 strain들을 *A. rubi* 집단에 포함시켰으며, Ophel과 Kerr(1900)는 포도나무에서 분리된 *Agrobacterium* biovar 3의 균주들이 *A. rubi*와는 유전적으로 달라 *Agrobacterium vitis*로 명명하였다. 포도 흑병균(*A. vitis*)은 토양서식 균으로서 토양과 접한 기저부위의 상처를 통해 침입하며 본균이 보유하는 Ti-Plasmid(tumour inducing plasmid)내에 존재하는 T-DNA(Transfer DNA)가 포도 유전체 DNA에 삽입되고 T-DNA에 포함된 Cytokinin, Auxin 등의 식물 호르몬이 과 발현됨으로서 포도세포조직이 이상비대가 발생하여 Crown gall이라 하는 흑을 형성하게 된다(Chilton 등, 1997; Zambryski와 Schell 1989). 포도나무의 수령이 증가함과 동시에 흑이 줄기로 확산되고 넝쿨, 가지로 전

반되어 흑이 형성되기도 하며 심하면 포도나무의 활력이 급격히 감소되고 고사하게 된다(Burr와 Otten, 1999; 조 등, 1999). 우리나라에서는 거봉포도(Kyoho) 품종이 포도 흑병균에 대하여 매우 감수성인 것으로 알려져 있으며 국내 거봉포도 주산지인 충남 입장, 경기도 안성의 거봉포도 재배단지에서는 70% 이상의 높은 감염률을 보여 심각한 피해지역으로 나타났다(강 등, 2007). 거봉포도는 4 배체인 대립계로 당도가 높고 품질이 우수하나 내한성이 약해 중부 이북지방에서는 줄기를 땅에 묻어 월동시킨다(Park 등, 2000). 이때 줄기가 뒤틀림 등으로 발생한 상처를 통하여 포도 흑병균(*A. vitis*)이 감염되는 원인이 되는 것으로 생각되고 있다. 최근, 땅에 매립하지 않고 피복 보온하는 월동 법으로 발병률을 감소시키는 연구가 수행된 바 있다(강 등, 2007).

국내에서 재배되고 있는 품종으로부터 다양한 균주가 분리되어 병원성조사와 이화학적 특성 구명에 의하여 균주간의 특성이 수행된 바 있으나 *A. vitis* 균주의 유전적 다양성 분포연구는 아직 수행된 바 없다. 식물병원 세균종의 종내 계통간 병원세균의 유전적 다양성 분포 조사

*Corresponding author

Phone) +82-31-670-5420, Fax) +82-31-670-2602

E-mail) kanghw2@hknu.ac.kr

는 병원균의 유전적 특성과 병원균의 동태 연구를 위하여 기초 자료로 이용할 수 있으며 국내외로부터 향후 발생할 수 있는 새로운 계통검정 등에 이용될 수 있다. 최근에 분자생물학의 발달로 DNA 마커를 이용한 식물병원 세균의 검정기술이 개발되어 종 다양성 검정 및 종의 분류 미생물의 신속한 검출 등, 획기적인 전기를 마련하며 급속히 발전하고 있다(Louws 등, 1999). DNA 마커를 이용한 검정법은 생리적, 형태적 방법에 비해 환경적 영향을 배제할 수 있으며, 적은 밀도의 미생물에서 신속, 정확하게 고도의 민감성으로 검출할 수 있다. DNA 마커는 종내 계통간의 높은 다형성이 검출되어야 하며 흔히 세균 종 동정에 이용되고 있는 rDNA 분석법은 종내 계통간 DNA 다양성 검정에는 한계점이 있다(Louws 등, 1999) PCR 방법은 신속, 정확하게 세균의 DNA 다양성검정에 이용될 수 있으며 종내 계통간 PCR 분석법으로 Rep (Repetitive sequence based)-PCR법이 이용되고 있으며 세균 종에 보존적인 반복 DNA 염기배열(Repeated DNA sequence)로부터 primer를 제작 하며 repetitive extragenic palindromic(REP) sequence, enterobacterial repetitive intergenic consensus(ERIC) sequence 및 BOX element 등 3가지 Family의 반복배열 DNA가 동정되어 PCR primer를 제작 다양한 세균종에 적용된 바 있다. 이미 *A. vitis*의 균주간 유전적 특성검정을 위하여 Ti-plasmid의 구조적인 차이에 의하여 균주간의 DNA 다형성을 검출하는 방법(Otten 등, 1996)과 23S rRNA의 5 말단 영역의 PCR-RFLP 방법과 RAPD 방법이 보고된 바 있다(Momol 등, 1998). 그러나 국내 *A. vitis* 균주의 유전적 다양성 조사는 아직 수행된 바 없다.

Kang 등(2002a)은 벼 반복배열 DNA로부터 20 mer의

다양한 생물종에 적용할 수 있는 URP primer를 개발하여 세균, 곰팡이 종을 포함하는 다양한 미생물 종의 PCR 다형성 검정에 널리 이용한 바 있다. URP primer의 미생물 종에 대한 유용한 적용 예가 다양한 논문을 통하여 입증되어 왔다(Jana 등, 2005; Kang 등 2001, 2002b, 2003) URP-PCR 법에 이용되는 URP primer의 특징은 RAPD 방법(Williams 등, 1990)과 분석법이 유사하나 20 mer의 긴 염기서로 구성된 primer를 사용하며 높은 annealing 온도에서 PCR 반응을 함으로서 안정되고 재현성이 높은 PCR 다형성 검정을 수행할 수 있다. 김 등(2006)은 천안 입장과 경기 안성지역으로부터 다양한 *A. vitis* 균주를 채집하여 PCR 특이 primer로 분리 동정하고 병원성과 생화학적 특성을 분석한 바 있다.

본 연구에서는 2002년부터 2004년까지 천안 입장, 경기 안성의 주요 거봉 포도단지와 다양한 국내외 포도 품종으로부터 분리한 59종류의 *A. vitis* 균주를 대상으로 *A. vitis* 균주의 유전적 다양성을 URP-PCR 방법으로 유전적 다양성 및 유연관계를 분석하였다.

재료 및 방법

공시균주 및 배양. 국내 거봉포도 주산단지인 천안 입장, 경기일원에서 분리한 50균주와 표준균주로 사용한 LMG(Laboratory of Microbiology, University of Ghent) *A. vitis* 4균주, 충북대학교에서 분양받은 1균주, 농촌진흥청 식물병리과로부터 분양받은 YK 4균주를 포함한 총 59균주를 본 실험에 공시하였다(Table 1). 세균의 배양은 Nutrient Agar(NA) 또는 *Agrobacterium* 선택 배지인 AB 배지(Chilton 등, 1974)를 사용하였다.

Table 1. *Agrobacterium vitis* strains used in this study

<i>Agrobacterium</i> strains	Source/Host	Year Isolated	Pathogenicity		Genetic groups/PCR types
			Grapevine	Carrot	
1. YK 2800	Korea, RDA		+	+++	1/A
2. YK 2823	Korea, RDA		+++	++	1/A
3. YK 2828	Korea, RDA		++	+	2/B
4. YK 3312	Korea, RDA		++	++	1/A
5. 451	Chungbuck Uni.		+	±	1/A
6. LMG 256	<i>A. vitis</i> Type culture		+++	+	6/D
7. LMG 259	<i>A. vitis</i> Type culture		++	++	4/E
8. LMG262	<i>A. vitis</i> Type culture		++	++	6/D
9. LMG 8750	<i>A. vitis</i> Type culture		+	++	4/E
10. CNU-12	Teajon, Korea/Kyoho	2002	+	+	1/A
11. CNU-13	Cheonan, Korea/Kyoho	2002	-	++	1/A
12. CNU-15	Cheonan, Korea/Kyoho	2002	++	++	5/C
13. CNU-25	Cheonan, Korea/Kyoho	2002	+	++	5/C

Table 1. Continued

<i>Agrobacterium</i> strains	Source/Host	Year Isolated	Pathogenicity		Genetic groups/ PCR types
			Grapevine	Carrot	
14. HKA-1	Ansung, Korea/Kyoho	2002	+++	++	5/C
15. HKA-2	Ansung, Korea/Kyoho	2002	+	++	2/B
16. HKA-3	Ansung, Korea/Kyoho	2002	+	++	1/A
17. HKA-4	Ansung, Korea/Kyoho	2002	±	++	2/B
18. HKA-5	Ansung, Korea/Kyoho	2002	±	+	5/C
19. HKA-7	Ansung, Korea/Kyoho	2002	+	++	2/B
20. HKA-8	Ansung, Korea/Kyoho	2002	+	+	2/B
21. HKA-12	Ansung, Korea/Kyoho	2002	++	+	2/B
22. HKA-13	Ansung, Korea/Kyoho	2002	+++	++	2/B
23. HKA-25	Ansung, Korea/Kyoho	2002	++	++	2/B
24. HKA-27	Ansung, Korea/Kyoho	2002	++	++	2/B
25. HKA-31	Ansung, Korea/Kyoho	2003	++	++	2/B
26. HKA-36	Ansung, Korea/Kyoho	2003	-	±	2/B
27. HKA-37	Ansung, Korea/Kyoho	2003	ND	S+++	2/B
28. HKA-38	Ansung, Korea/Kyoho	2003	ND	++	2/B
29. HKA-39	Ansung, Korea/Kyoho	2003	ND	S+++	6/F
30. HKA-41	Ansung, Korea/Kyoho	2003	++	S+++	5/C
31. HKA-42	Ansung, Korea/Kyoho	2004	++	S+++	5/C
32. HKA-43	Ansung, Korea/Kyoho	2004	++	++	2/B
33. HKA-45	Cheonan, Korea/Kyoho	2004	++	+++	2/B
34. HKA-46	Cheonan, Korea/Kyoho	2004	++	++	2/B
35. HKA-50	Cheonan, Korea/Kyoho	2004	++	-	2/B
36. HKA-51	Cheonan, Korea/Kyoho	2004	-	++	2/B
37. HKA-52	Cheonan, Korea/Kyoho	2004	-	+++	2/B
38. HKA-53	Cheonan, Korea/Kyoho	2004	+	+	2/B
39. HKA-54	Cheonan, Korea/Kyoho	2004	+	++	2/B
40. HKA-55	Cheonan, Korea/Kyoho	2004	ND	+	2/B
41. HKA-59	Cheonan, Korea/Kyoho	2004	ND	+++	2/B
42. HKA-61	Cheonan, Korea/Kyoho	2004	ND	+	2/B
43. HKA-62	Cheonan, Korea/Kyoho	2004	++	+++	2/B
44. HKA-63	Cheonan, Korea/Kyoho	2004	-	+	2/B
45. HKS 1-4	Suwon, Korea/1-6	2003	++	S+++	2/G
46. HKS 2-2	Suwon, Korea/1-3	2003	++	S+++	2/B
47. HKS 3-1	Suwon, Korea/Hongbusa	2003	ND	+++	2/B
48. HKS 4-3	Suwon, Korea/Kitsaki Red	2003	ND	+	2/H
49. HKS 6-1	Suwon, Korea/Yangoek	2003	ND	++	2/I
50. HKS 7-2	Suwon, Korea/Rube muscat	2003	+++	+	2/B
51. HKS 8-4	Suwon, Korea/T-Seedress	2003	++	+	2/B
52. HKS 10-2	Suwon, Korea/Honey Red	2003	++	+	3/J
53. HKS 11-1	Suwon, Korea/R-Bianche	2003	++	++	7/K
54. HKS 12-3	Suwon, Korea/4-3	2003	++	++	3/J
55. HKS 14-2	Suwon, Korea/5-12	2003	+++	±	2/B
56. HKS 15-3	Suwon, Korea/Fuen	2003	+++	++	6/L
57. HKS 16-1	Suwon, Korea/Big Unicon	2003	+++	+	6/L
58. HKS 17-3	Suwon, Korea/3-1	2003	+++	+	2/B
59. HKS 19-2	Suwon Korea/Deabong	2003	++	+	7/G

Agrobacterium vitis 분리 및 Genomic DNA 추출. 거봉 포도 주산단지인 천안 입장과, 경기 일원을 중심으로 2002년부터 2004년에 걸쳐 *A. vitis*를 분리하였다. 6~8월 사이에 거봉포도 줄기에 발생한 흑 병반에서 신선한 병반을 채집하고 *A. vitis* 검출 특이 primer에 의해 검출된 균주는 병원성 검정을 거쳐 Genomic DNA를 추출하였다. 특이 primer에 의한 *A. vitis* 검출과 병원성 검정은 이전의 실험방법에 따라 실시하였다(김 등, 2006). Genomic DNA 추출을 위해 배양 균주 중 Single colony를 취하여 5 ml NB(Nutrient broth) 든 Test 튜브에서 2~3일간 배양하였다. 배양액을 1.5 ml Test 튜브에 수확하여 추출용 완충액(200 mM Tris-HCL PH 8.0, 200 mM NaCl, 25 mM EDTA, 10% SDS) 567 μ l와 Proteinase K(20 mg/ml) 3 μ l를 첨가하여 잘 섞어준 다음 37°C 항온기에서 1시간 동안 Incubation 한다. 이 혼합액에 5 M NaCl 100 μ l를 첨가하여 완전히 섞어주고 여기에 2 \times CTAB(Cetyltrimethyl Ammonium Bromide) [2% CTAB(w/v), 100 mM Tris-HCl(pH 8.0), 20 mM EDTA(pH 8.0), 1.4 M NaCl, 1% PVP(polyvinylpyrrolidone Mr 40,000)] 80 μ l를 첨가하여 65°C에서 10분간 방치하고 700 μ l Phenol:Choroform:Isoamylalcohol(25:24:1)을 넣어 잘 섞어준 다음 12,000 rpm에서 원심분리 하였다. 상등 액을 새 튜브로 옮기고 0.6 volume Isopropanol을 첨가하고 실온에서 5분간 방치한 후 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 DNA를 침전하였다. 70%의 ethanol로 DNA 침전물을 Washing하여 진공건조한 후 TE buffer(10 mM Tris-HCl PH 8.0, 1 mM EDTA) 50 μ l에 용해하였다. 10 mg/ml RNase 2 μ l를 넣어 37°C에서 1시간 방치하여 그 용액 속에 함유된 RNA를 제거하였다. DNA 농도는 Spectrophotometer의 260 nm의 파장에서 측정하였다.

Table 2. Nucleotide sequences of URP primers used in this study

Primers	Sequences (5-3)	GC (%)	PCR poly- /Tm (°C)	morphism
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	TACACGTCGATCTACAGG	50/65		No
URP38F	AAGAGGCATTCTACCACCAC	50/65		No

Agrobacterium vitis의 URP primer 및 PCR 반응조건. PCR 반응을 위하여 *A. vitis* 균주로부터 추출한 genomic DNA 100 ng을 주형 DNA로 하고 Table 2의 12종류의 각각의 URP (Universal Rice Primer) Primer를 100 ng 사용하였다. PCR 반응용액 조성은 50 μ l를 최종 volume으로 하고 반응 buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.01% gelatin), 200 mM dNTP(dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 및 2.5 unit Taq polymerase(Promega)를 넣어 실시하였다. DNA 증폭을 위해 MJ. Research사의 PTC(Peltier Thermal Cycler)-200 PCR 기기를 사용하였다. PCR 조건은 처음 94°C에서 4분간 pre denaturation시킨 후 94°C에서 1분간 denaturation, 55°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 2분 extension하여 총 35 cycle 실시하였으며 최종 DNA 합성은 72°C에서 10분으로 하였다. 증폭산물은 1.5% Agarose gel에서 5 vol/cm로 전기영동하였다. Agarose gel 상에서의 DNA 검출은 Ethidium bromide 용액에 염색하여 UV lamp 상에서 DNA 밴드를 촬영하여 분석하였다. URP-PCR을 수행하여 형성된 밴드의 유무에 따라 NTSYS-PC의 UPGMA program을 이용하여 dendrogram을 작성하고 국내 *A. vitis* 균주의 유전적 유연관계를 분석하였다.

결과 및 고찰

Agrobacterium vitis 균주의 URP-PCR 다형성. 포도 흑병균의 URP-PCR 다형성 검출에 적용할 수 있는 URP primer를 선별하기 위하여 Table 2의 12종류의 URP primer를 적용하였다. 흑병균의 genomic DNA를 주형 DNA로 하여 재료 및 방법에서 제시한 조건에 준하여 PCR 증폭을 실시하였다. Table 2에서 나타난 것 같이 유전적 다양성 검출 가능한 primer로서 URP1F, URP2F, URP2R, URP4R, URP17R로 나타났으며 0.3 kb에서 5.0 kb 범위의 PCR 다형성 밴드를 검출하였다. 위의 primer를 이용하여 2002년부터 2004년까지 중부지역의 천안, 안성, 대전, 수원 일대의 포도재배 농가로부터 포도흑병균에 감염된 다양한 포도품종의 병반을 순수 분리 동정하였다. 순수 분리한 균주와 표준균주로서 LMG에서 도입한 4개의 외국 균주를 포함하는 Table 1의 59균주의 *A. vitis*를 이용하여 URP-PCR 방법에 의한 유전적 다양성을 조사하였다. 천안 입장과 경기 안성지역에서는 주로 거봉 포도품종의 포도 흑병반으로부터 분리하였으며 기타 여러 가지 포도 품종으로부터의 *A. vitis* 분리는 원예연구소 포도재배 실험 단지로부터 분리하였다.

Fig. 1은 URP 2F와 URP17R primer로 PCR 증폭한 59

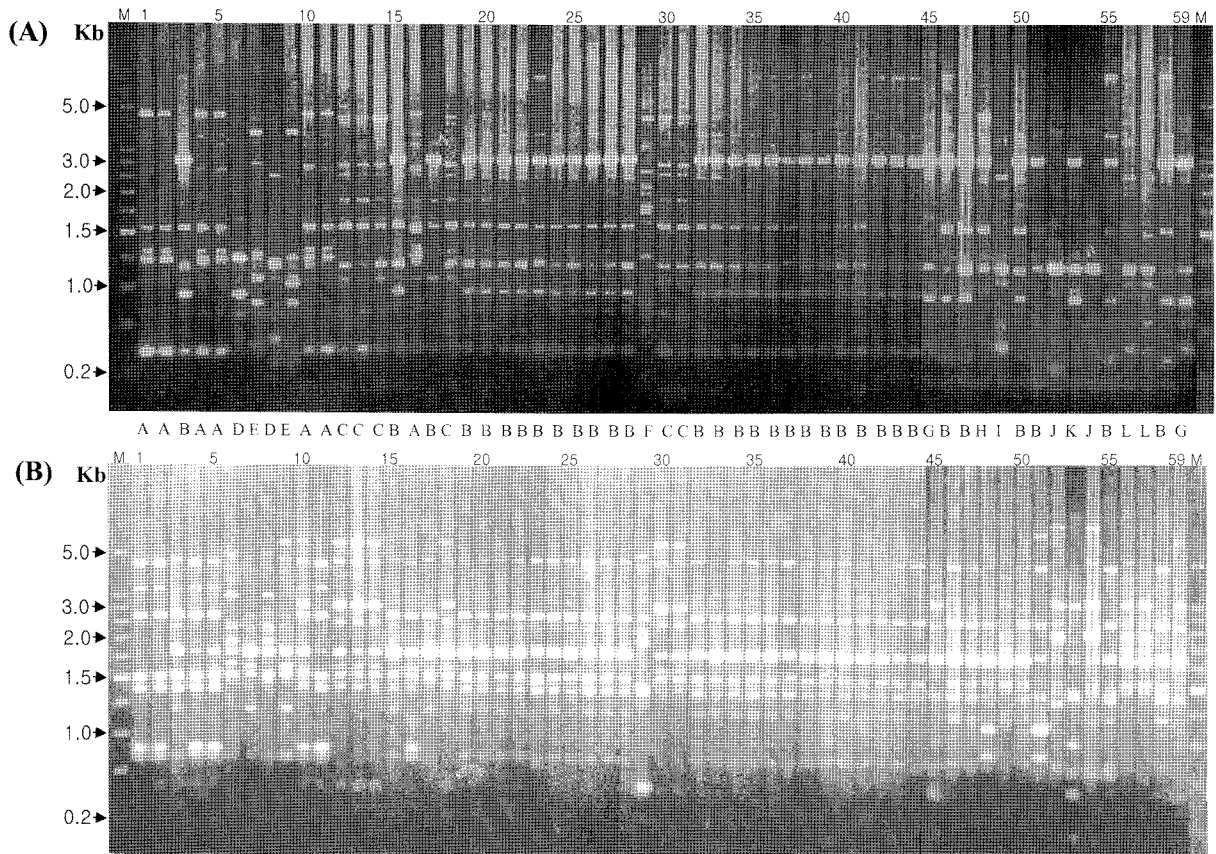


Fig. 1. PCR polymorphism of *Agrobacterium vitis* strains produced by URP2F: (A), and URP17R: (B). M: 1 kb ladder.

A. vitis 균주를 나타내고 있다. 균주간의 A에서 L까지 12 PCR type을 형성하였으며 그 중, 거봉포도로부터 분리한 10번부터 44번까지 35개의 *A. vitis* 균주는 A, C, B, F의 4 type으로 나눌 수 있었으며 그중에서 B type이 25균주로 71%를 차지하였다. 거봉에서 분리한 균주 중에서 HKA-39 균주는 독특한 PCR 다형성밴드를 생산하였으며 당근을 이용한 병원성 검정에서 강한 병원성을 보였다. 이 균주가 진정으로 *A. vitis*인지를 알아보기 위하여 Ti-plasmid의 viA 유전자 영역과 Pectate lysase를 검출하는 *A. vitis* 특이 검출 primer(Louws 등 1999)로 PCR 검출을 실시한 결과 모두 특이적인 PCR 증폭산물을 생산하였으며 *Agrobacterium* 선택배지인 AB 배지에서도 잘 성장하여 *A. vitis* 균주임을 시사하였다. 농촌진흥청과 충북대학교에서 보존중인 YK와 451균주들은 본 연구에서 분리한 CNU와 HK균주들의 strain type에 포함되고 있었다. 국외에서 도입한 LMG 균주는 균주 간에도 서로 다른 PCR 밴드를 형성해 국내 토착균주와 외국 균주 간에 특징적인 유전적 다양성이 분포하는 것으로 생각되었다. 거봉 이외에 다양한 포도품종으로부터 분리한 15균주 중에서 6균주(HKS2-2, HKS3-1, HKS 7-2, HKS8-4, HKS14-2, HKS17-

3)가 B type으로 나타났으며 기타 다른 균주는 균주간의 연관된 PCR 다형성 band를 생산하였다.

결론적으로 URP primer를 이용한 *A. vitis* 균주의 PCR 다형성검정은 균주간의 다양한 PCR type을 생산하면서 *A. vitis*의 유전적 다양성 검출에 효과적으로 적용할 수 있었다. 특히, 거봉으로부터 분리한 균주 간에 있어서는 대체적으로 다양성이 적게 나타났으며 외국균주나 다른 포도 품종에서 분리한 균주는 높은 URP-PCR 다형성을 나타내었다. 일반적으로 세균의 종내 strain typing에 사용되는 PCR 방법으로는 특성의 보전적인 반복배열 염기서열의 반복성을 검출하는 방법으로 고안된 REP-PCR, ERIC-PCR, BOX-PCR 등이 이용되고 있으나 이러한 반복배열 DNA를 보유하지 않은 세균종의 적용에는 한계가 있다(Louws 등, 1999). 따라서 어느 연구자나 다범위한 생물종에 쉽게 적용할 수 있는 RAPD 방법이 개발되어 다양한 세균류의 종간, 종내의 PCR 다형성 검출에 널리 이용되어 왔다(Williams 등, 1990). 그러나 RAPD primer는 10 mer로 짧아 primer와 주형 DNA 간의 비 특이적 결합을 유도하는 PCR 조건으로 인하여 재현성이 떨어지는 문제점이 지적되어 왔다. 이러한 문제점을 극복하기 위하여

20개의 염기로 구성되어 있는 URP primer가 벼 반복배열 DNA 염기서열로부터 개발되었다. URP-PCR 조건은 primer와 주형 DNA 간의 특이적 결합을 유도하는 반응 조건으로서 상기의 RAPD 방법과는 다르다고 볼 수 있다. Annealing 온도를 초기부터 55°C로 함으로서 특이적인 PCR 산물을 증폭할 수 있어 RAPD에서 제기되었던 낮은 재현성 문제를 극복하였다는 점에서 특징으로 볼 수 있다. URP primer는 곰팡이 세균을 포함하는 미생물의 종간, 종내 PCR 다형성분석에 매우 유용하게 적용될 수 있다(Kang 등, 2002b). 세균에 대한 적용은 식물병원세균인 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Kang 등, 2003), 동물병원세균인 대장균(*Escherichia coli*), 식중독균(*Salmonella* spp.), 결핵균인 *Mycobacterium*, *Bhucella* spp. 에 적용된 바 있으며, 산업 미생물인 *Bacillus* 계통과 *Lactobacillus* 계통에 이용될 수 있어(발표하지 않은 결과) 그람양성균, 그람음성균 할 것 없이 그 적용성이 넓은 것으로 밝혀졌다(Kang 등, 2002a). 특히, 세균의 종간뿐만 아니라 종내 세균의 계통간 DNA 다형성을 검출 하는데 매우 유용하며 URP-PCR 다형성밴드는 종간, 종내 특이성을 나타내므로 이 종 특이밴드를 분리하고 염기서열을 분석하여 종 특이검출 primer를 제작하여 적용할 수 있으며 채소무름병을 일으키는 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*와 상항버섯인 *Phellinus*

linteus 를 특이적으로 검출 동정할 수 있는 primer로 보고 된 바 있다(Kang 등, 2003; Kang 등 2002b). Jana 등 (2005)은 URP-PCR을 이용하여 특이적 구름 *Macrophomina phaseolina* 균주의 유전적 구분을 수행한 바 있다.

Agrobacterium vitis 균주의 유전적 유연관계분석. URP (URP1F, URP2F, URP2R, URP4R, URP17R)

PCR의 결과를 이용하여 Fig. 2는 59균주에 의해 형성된 밴드를 이용하여 밴드 유무에 따라 NTSYS-PC의 UPGMA program을 이용하여 dendrogram을 작성한 것이다. 그 결과 7개의 대 그룹으로 분류되었으며, 그룹 간에는 62~100%까지 유연관계를 나타냈다. 그중에서 그룹 1은 URP-PCR type의 A 균주를 포함하고 있었으며 농업과학기술원으로부터 분양받아 대조균으로 사용한 YK 2800, YK 2823, YK 3312와 국내에서 분리한 4개의 균주가 속한 그룹으로서 균주 간에 85~100%의 유연관계를 나타내었다. 그룹 2에는 YK 2828을 포함하며 URP-PCR type B가 주류를 이루고 있었으며 총 34개 국내 분리 균주가 이에 속했다. 그룹 간에는 80~100%까지 유사 하였다. 그룹 3은 본 연구에서 거봉포도 이외의 포도대목품종에서 분리한 균주 HKS 10-2와 HKS 12-3 두 균주를 포함하고 있었으며 비교적 병원성이 약한 균주로 나타났다. 균주 간에는 83% 이상의 유연관계를 나타냈다. 그룹 4는 외국에서 도입한 LMG 259, LMG 8750 단 두 균주만이

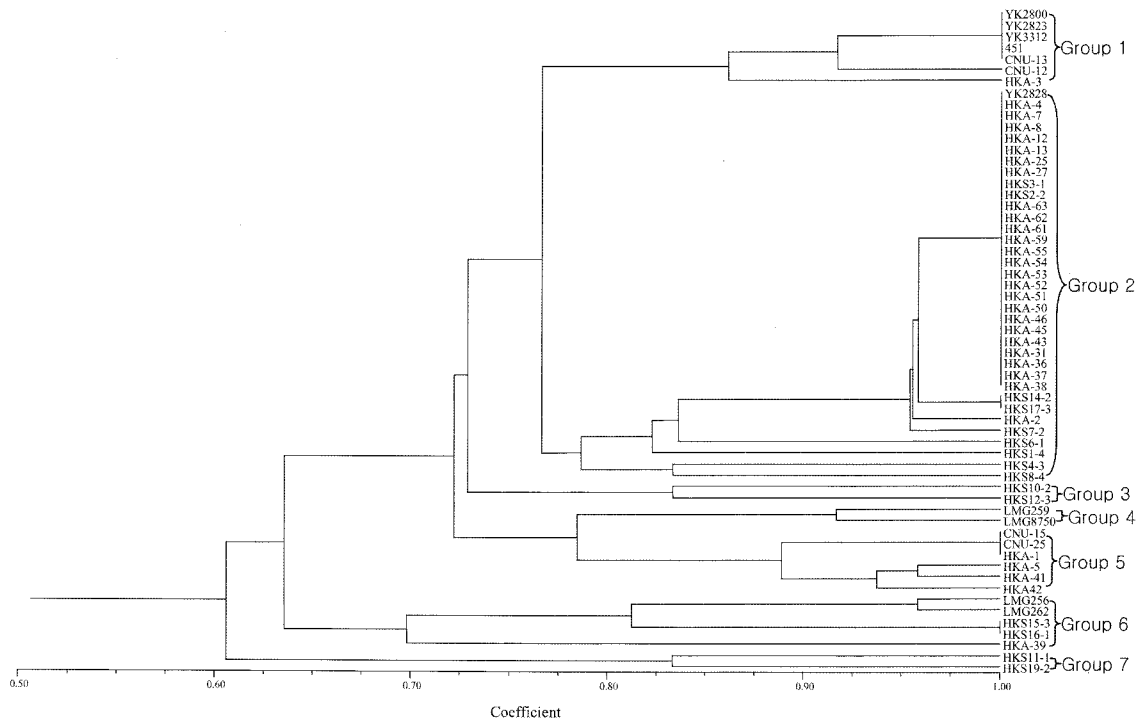


Fig. 2. Construction of UPGMA dendrogram using URP-PCR polymorphic bands of *Agrobacterium vitis* strains isolated from grapevine galls.

속했으며 균주간 92% 이상의 유연관계를 보였다. 그룹 5는 국내거봉포도 나무에서 분리한 6개의 균주가 속했으며, 6균주 모두 URP-PCR C type이었다. 그룹 5에 속한 균주들의 특징은 포도나무와 당근에 비교적 강한 병원성을 나타내는 균주들이었으며, 균주간 88% 이상의 유전적 유연관계를 보였다. 그룹 6에는 외국에서 도입한 표준균주인 LMG 256, LMG 262와 국내거봉 품종에서 분리한 HKA-39한 균주 그리고 거봉이외의 포도품종에서 분리한 2균주를 포함하고 있었으며 균주 간에 70% 이상의 유연관계를 나타냈으며 다른 그룹과는 63% 이상의 원연관계를 나타냈다. 그룹 7에는 거봉이외의 품종인 HKS 11-1와 HKS 19-2의 두 균주만이 포함하고 있으며 두 균주는 83% 이상의 유연관계를 나타냈지만 다른 그룹들과는 62%의 낮은 유전적 유사성을 보여 주었다.

위의 *A. vitis* 균주간 유전적 유사성 결과들로 미루어 국내외에서 분리한 *A. vitis*는 균주 간에 62~100%까지의 유전적인 유연관계에 있음을 나타내었고, 국내에서 분리한 *A. vitis*는 대부분의 균주가 80% 이상의 높은 유전적 유사성을 보여 주었다. 그러나, 외국에서 도입하여 표준균주로 사용한 LMG 균주와 거봉 이외의 외국포도 품종으로부터 분리한 *A. vitis* 균주는 국내 균주와 낮은 유전적 유사성을 보임으로서 포도품종에 따른 *A. vitis* 균주의 유전적 다양성을 시사했다. Momol 등(1998)은 미국, 유럽의 다양한 지역으로부터 분리한 *A. vitis* 균주를 23S rRNA 5말단영역의 PCR-RFLP와 RAPD 방법으로 유전적 다양성을 조사하여 총 5개 그룹으로 분류한 바 있으나 본 연구의 URP-PCR은 7 그룹의 주요 그룹으로 더욱 상세한 유전적 정보를 제공할 수 있을 것으로 사료되었다. *A. vitis*는 질소원과 탄소원을 취하기 위한 Ti-plasmid 내에 nopaline, octopine, cucummopine, vitopine를 생산 또는 분해하는 유전자를 포함하고 있다. 이들의 다양한 opine 형에 따라서 Ti-plasmid type이 나누어지는데 이러한 Ti-plasmid 형태에 따라 *A. vitis* 균주의 유전적 특성을 분류하기도 하였다(Burr 등, 1990).

결론적으로 URP-PCR 다형성 분석에 의한 *A. vitis* 균주의 유전적 다양성 검출은 높은 PCR 다형성과 함께 균주간의 고유 특성을 구별하기 위한 유용한 방법으로 나타났다. 우리나라에 분포하는 *A. vitis* 균주는 포도품종의 분리원에 따라 그 유전적 특성이 다양하게 나타났으며 URP-PCR type과 병원성과의 연관성도 다소 일치하게 나타났다. 또한 PCR type B가 국내포도 흑병균주의 주류를 이루고 있었다. 본 연구의 *A. vitis* 균주의 유전적 다양성 data는 병원균의 생물학적 분포와 병 방제를 위한 기초자료로 활용 가능할 것이다. 또한, 특정균주에 보전적인 PCR

밴드는 특정균주의 PCR 검출을 위한 유용 DNA 마커로 사용 가능하고 세계도처에 존재하는 *A. vitis* 균주의 국내 유입여부와 균주들의 확산동태 조사 등에 유용하게 적용할 수 있을 것이다.

요 약

거봉 포도나무에 흑병을 일으키는 *A. vitis* 균주간의 DNA 다양성 평가를 하기 위하여 12종류의 URP primer 적용 성을 조사한 결과 URP1F, URP2F, URP2R, URP4R, URP17R primer가 균주 간 DNA 다형성검정에 유용하였다. 국내외에서 분리한 59 *A. vitis* 균주를 URP-PCR 증폭하였던바 균주간의 매우 다양한 PCR 다형성 밴드를 형성 하였으며 12 strain type으로 나눌 수 있었으며 거봉포도로부터 분리된 *A. vitis* 균주는 4 strain type의 비교적 단순한 유전적 다양성으로 나타났으나, 거봉이외의 다른 포도 품종이나 국외에서 도입된 *A. vitis* 균주는 8 strain type의 많은 유전적 다양성을 보여 거봉품종 유래 국내 균주와는 PCR 다형성 type에 있어 차이점을 보였다. URP-PCR 다형성 밴드를 집괴 분석하여 UPGMA dendrogram을 작성한 결과 7개의 대 Group으로 분류할 수 있었으며, 그룹 간에는 62~100%까지 다양한 유전적 유사성이 나타났다.

감사의 글

본 연구는 2002년부터 2005년까지 농림부 농림기술개발사업의 지원에 의해서 수행되었기에 감사드립니다.

참고문헌

- Burr, T. J. and Hurwitz, B. 1981. Occurrence of *Agrobacterium radiobacter* pv. *tumefaciens* (Smith and Townsend) Conn biotype 3 on grapevines in New York State. *Phytopathology* 71: 206.
- Burr, T. J. and Katz, B. H. 1982. Isolation of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 from grapevine gall and sap, and from vineyard soil. *Phytopathol.* 73: 163-165.
- Burr, T. J., Noreilli, J. L., Katz, B. H. and Bisshop, A. L. 1990. Use of Ti-plasmid DNA probes for determining tumorigenicity of *Agrobacterium vitis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1782-1785.
- Burr, T. J. and Otten, L. 1999. Crown gall of grape : Biology and disease management. *Annu Rev Phytopathol.* 37: 53-80.
- Chilton, M. D., Currier, T. C., Farrand, S. K., Bendich, A. J., Gordon, M. P. and Nester, E. W. 1974. *Agrobacterium* DNA and PS 8 bacteriophage DNA not detected in crown gall

- tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 3672-3676.
- Chilton, M. D., Drummond, M. H., Merlo, D. J., Sciaky, D., Monyoya, A. L., Goldon, M. P. and Nester, E. W. 1997. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells : the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell.* 11: 263-271.
- 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, *Agrobacterium rubi* (Hilderbrand) Starr & Weiss 1943. *J. Appl. Bacteriol.* 50: 443-467.
- Jana, T. K., Singh, N. K., Koundal, K. R. and Sharma, T. R., 2005. Genetic differentiation of charcoal rot pathogen, *Macrophomina phaseolina*, into specific groups using URP-PCR. *Canadian Journal of Microbiol.* 51: 159-164.
- 조용섭 등. 1999. 식물세균병학. 서울대학교
- Kang, H. W., Park, D. S., Park, Y. J., You, C. H., Lee, B. M. and Go, S. J. 2001. Genomic differentiation among oyster mushroom cultivars released in Korea by URP-PCR fingerprinting. *Mycobiol.* 29: 85-89.
- Kang, H. W. Go, S. J. and Eun, M. Y. 2002a. Fingerprinting of Diverse Genomes using PCR with Universal Rice Primers (URPs) Generated from Repetitive Sequence of Korean Weedy Rice. *Mol. Cells.* 13: 1-7.
- Kang, H. W., Park, D. S., Park, Y. J., Lee, B. M., Cho, S. M., Kim, K. T., Seo, K. S. and Go, S. J. 2002b. PCR Based Detection of *Phellinus linteus* using Specific Primers Generated from Universal Rice Primer (URP) Derived PCR Polymorphic Band. *Mycobiol.* 30: 202-207.
- Kang, H. W., Kwon, S. W. and Go, S. J. 2003. PCR based specific and sensitive detection of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* by primers generated from a URP-PCR fingerprinting-derived polymorphic band. *Plant Pathology* 52: 127-133.
- 강성수, 박상현, 박문균, 박태진, 강희완, 최재율. 2007. 거봉의 뿌리혹병 방제를 위한 저항성 대목 선발 및 월동법. *식물병 연구* 13: 98-103.
- 김종균, 임선화, 이대성, 최재율, 윤해근, 박상현, 강성수, 강희완. 2006. PCR 특이 검출에 의한 국내 포도나무 흑병균 (*Agrobacterium vitis*) 균주의 신속분리 및 병원학적, 생화학적 특성비교. *식물병연구* 12: 205-212.
- Louws, F. J., Rademaker, J. L. W. and de Bruijn, F. J. 1999. The three ds of PCR-based genomic analysis of phyto bacteria: diversity, detection, and disease diagnosis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37: 81-125.
- Loubser, J. T. 1978. Identification of *Agrobacterium tumefaciens* biotype 3 on grapevine in South Africa. *Plant Dis. Rep.* 62: 630-631.
- Momol, E.A., Burr, T. J., Reid, C. L., Momol, M. T., Hseu, S. H and Otten, L. 1998. Genetic diversity of *Agrobacterium vitis* as determined by DNA fingerprints of the 5'-end of the 23S rRNA gene and random amplified Polymorphic DNA. *J. Appl. Microbiol.* 85: 685-692.
- 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., de Ruffary, P., Momol, M. T. and Burr, T. J. 1996. Phylogenetic relationship between *Agrobacterium vitis* isolates and their Ti plasmid. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9: 782-786.
- Panagopoulos, C. G., Psallidas, P. B. and Alivizatos, A. S. 1978. Studies on biotype 3 of *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens*. *Proc. 4th Int. Conf. Plant Pathogenic Bacteria.* 221-228.
- Park, K. H., Jeong, K.S. and Cha, J. S. 2000. Incidence of severe crown gall disease on tetraploid cultivars of grape in Korea. *Plant Pathol. J.* 16: 290-293.
- Williams, J. G. K., Kubelic, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitray primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Res.* 18: 6531-6535.
- Zambryski, P. J. and Schell, J. 1989. Transfer and function of T-DNA genes from *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids in plants. *Cell* 56: 191-201.