

Acidovorax avenae subsp. *citrulli*에 의한 멜론 과실썩음병

서상태 · 박종한* · 이중섭 · 한경숙 · 정승룡
원예연구소 원예환경과

Bacterial Fruit Blotch of Melon Caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*

Sang-Tae Seo, Jong-Han Park*, Jung-Sup Lee, Kyoung-Suk Han and Seung-Ryong Cheong

Horticultural Environment Division, National Horticultural Research Institute,
Rural Development Administration, Suwon 441-440, Korea

(Received on August 24, 2006)

In September and October 2005, melons (*Cucumis melo* L.) from the commercial greenhouses in Naju and Gwangju exhibited severe foliar necrosis and fruit rot. Leaf symptoms initially appeared as V-shaped, necrotic lesions and extending to the midrib. Symptoms on the fruit were occurred randomly as necrotic and sunken spots. Two isolates from diseased leaves and fruits were identified as *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* on the basis of bacteriological and genetic characteristics. Pathogenicity of the isolates was confirmed by inoculating on 3-week-old melon and cucumber seedlings. This is the first report of bacterial fruit blotch of melon in Korea.

Keywords : *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, Bacterial fruit blotch, Melon

멜론(*Cucumis melo* L.)은 주로 시설에서 재배되고 있으며, 국내에서는 2000년대 들어서면서 재배면적이 급격히 증가되어 현재 약 900 ha의 재배면적과 생산량은 약 26,000 MT에 이르고 있다. 2005년 가을 전남 광주와 나주지역의 멜론 재배지에서 아직까지 국내에 보고되지 않은 과실썩음병 증상이 발견되었다. 과실썩음병균(*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*)은 1965년 미국의 수박 재배지에서 처음 보고되었으며(Sowel과 Schaad, 1979), 1980년대 미국 전역의 수박 재배지에서 대 발생되어 크게 문제가 되었던 식물병원세균이다(Latin과 Rane, 1990). 최근에는 멜론, 오이, 호박 등의 박과 작물에 대한 피해도 증가하고 있는 실정이다(Isakeit 등, 1997; Langston 등, 1999; Martin 등, 1999).

국내의 경우 *A. avenae* subsp. *citrulli*에 의한 식물병 발생 보고는 송 등(1991)에 의해 전북 고창의 수박 재배지에서 처음 보고되었으나, 다른 박과 작물에서의 발생 보고는 없었다. 본 연구에서는 전남 광주와 나주지역에서

재배되고 있는 멜론으로부터 과실썩음병균을 분리하여 생리생화학적 방법, 분자유전학적 방법 및 병원성 검정을 통하여 동정한 결과를 보고한다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지. 전남 광주와 나주지역에서 분리한 2개의 멜론 과실썩음병균은 Table 1과 같다. 분리방법은 병이 발생한 잎과 과실의 일부분을 70% 에탄올로 멸균한 후 적당한 크기로 잘라 microtube에 넣고 마쇄하였다. 마쇄한 조직은 멸균수를 가하여 순차적으로 10배에서 100,000배까지 희석한 다음 YPDA(yeast extract 3 g, peptone 0.6 g, dextrose 3 g, agar 15 g/l, pH7.2) 배지에 도말배양하여 단일 colony를 얻었다. 순수 분리한 균들은 동

Table 1. *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* isolates

Isolates	Host	Geographical origin	Biolog SI ^a
Aac 91	Melon (leaf)	Gwangju	0.766
Aac 92	Melon (fruit)	Naju	0.734

^aSI(Similarity Index), similarity with *A. avenae* subsp. *citrulli*. Biolog SI was determined through analysis with the Microlog software.

*Corresponding author
Phone) +82-31-290-6231, Fax) +82-31-290-6259
E-mail) pjhn@rda.go.kr

결 보존용 배지(10% skimmed milk, 1.5% sodium glutamate)에 현탁하여 -30°C 에 보관하면서 시험에 이용하였다.

병원성 검정. YPDA 배지에서 48시간 배양한 세균을 멸균수에 현탁하여 농도를 1×10^8 cfu/ml로 맞춘 다음 파종 3주된 멜론(*Cucumis melo* L.)과 오이(*Cucumis sativus* L.) 잎에 분무접종 후 28°C 습실함온기에서 1일 배양 후 유리온실로 옮겨 3일 후 병원성을 관찰하였다.

병원세균의 생리적 특성조사. 분리된 세균은 Schaad 등(2001)의 방법에 따라 특성을 조사하였다. 세균을 동정하기 위해 그람염색, KB 배지에서의 형광유무, NBY 배지에서의 색소 형성 여부 등을 조사하였다.

Biolog system을 이용한 동정은 Lee 등(2005)이 보고한 방법에 준하여 실시하였다. 세균을 TSBA 배지(BD211825)에서 48시간 배양 후 GN/GP-IF 용액에 현탁시켜 GN2 microplate(BIOLOG GN2 MicroPlate™)에 분주하였다. 24 시간과 48시간 배양 후 MicroLog Gram-negative database (Version 4.02)를 이용하여 동정하였다.

병원세균의 전자현미경 관찰. YPDA 배지에서 48시간 배양한 콜로니를 0.5% potassium phosphotungstate로 염색 후 투과전자현미경(LEO 906E)으로 관찰하였다.

유전적 특성조사. 실험에 이용된 균주들의 DNA는 InstaGene matrix(Bio-Rad)를 이용하여 제조회사가 제시한 방법에 따라 분리하였고, -20°C 에 보관하면서 실험에 사용하였다. 분리된 세균을 동정하기 위해 Walcott와 Gitaitis (2000)가 보고한 종특이적 primer(WFB1, WFB2)를 이용

하여 PCR을 실시한 후 증폭산물의 유무를 조사하였다. PCR 반응은 Takara PCR thermal cycler MP(Takara, Japan)를 이용하였으며, PCR 반응액은 $2 \mu\text{l}$ 의 DNA, 2.5U *Taq* polymerase(Takara, Japan), 100 mM Tris-HCl(pH 8.3), 1.5 mM MgCl_2 , 50 mM KCl, 각각의 dNTP 0.2 mM, primer 50 pmol을 넣고 멸균수로 최종 반응용액의 부피를 $25 \mu\text{l}$ 로 조절하였다. PCR은 초기 변성화 반응(95°C , 5분), 30회의 증폭반응(94°C , 30초; 58°C , 30초; 72°C , 45초), 최종 확장반응(72°C , 10분) 조건으로 수행하였다.

16S rRNA 유전자는 universal primer인 fD1, rP2를 이용하여 William 등(1991)이 제시한 조건에 의해 증폭하였고, 증폭된 PCR 산물은 Ultra clean kit(Mobio Co.)로 정제하였다. 염기서열 분석은 ALF-Express automatic sequencer (Pharmacia Biotech, Lyon, France)를 이용하였고, 염기서열 비교분석은 NCBI BLAST search 프로그램을 활용하였다.

결과 및 고찰

멜론에서의 과실썩음병의 병징으로 앞에서는 주로 잎맥을 따라 조직이 갈색으로 괴사하였으며, 점무늬의 증상도 관찰되었다(Fig. 1A, B). 멜론 과실에서는 표면에 점무늬의 수침상 증상을 볼 수 있었으며, 시간이 경과함에 따라서 수침상이 확대되어 커다란 병반을 형성하였다(Fig. 1C). 과실 내부는 갈색으로 조직이 붕괴되는 병징을 관찰할 수 있었다(Fig. 1D). 이러한 병징을 나타내는 멜론 잎

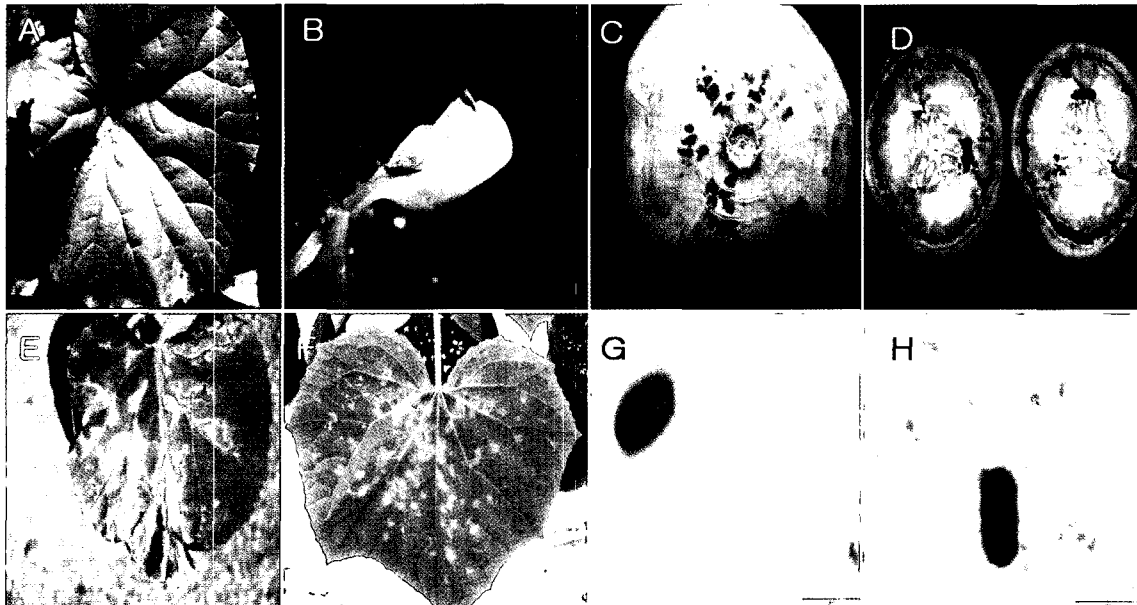


Fig. 1. Symptoms of bacterial fruit blotch of melon caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (A-D). Cucurbit plants inoculated with Aac 91 strain by spray method (E and F). Symptoms caused by Aac 91 on melon (E) and cucumber (F). Electron micrograph of the causal bacterium (G and H).

Table 2. Genus identification of the present isolates from melon

Characteristics	Present isolates <i>Acidovorax</i> ^a	
Gram stain	- ^b	-
Aerobic growth	+	+
Yellow or orange colonies on NBY	-	-
Fluorescent pigment on KB	-	-
Growth on DIM	-	-
Aerial mycelium	-	-

^aDetails of the genus *Acidovorax* are described by Schaad *et al.* (2001).

^b+, positive; -, negative.

Table 3. Species identification of the present isolates from melon

Characteristics	Present isolates	<i>A. avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> ^a
Growth on:		
D-xylose	+ ^b	+
D-fucose	+	+
D-mannitol	-	-
Sorbitol	-	-
Sucrose	-	-
L-threonine	-	-
Nitrate reduction	-	-
Starch hydrolysis	-	-
16S rDNA sequence ^c	98%	

^aDetails of the *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* are described by Schaad *et al.* (2001).

^b+, positive; -, negative.

^cAac 91 strain showed 98% homology with *A. avenae* subsp. *citrulli* (NCBI no. AF137506).

과 과실의 병환부에서 Aac 91과 Aac 92 균주를 분리하여 온실에서 병원성을 조사한 결과 멜론 잎에서는 분무 접종 3일 후 포장에서의 병징과 유사한 병징을 관찰할 수 있었으며(Fig. 1E), 오이 잎에서도 점무늬의 병반을 나타내는 병원성이 확인되었다(Fig. 1F).

멜론에서 분리한 세균을 동정하기 위해 생리생화학적 특성을 조사한 결과 분리 세균은 노란색 또는 형광색을 발현하지 못하였으며, D-xylose, D-fucose에서 성장하는 등 Schaad 등(2001)이 기술한 *A. avenae* subsp. *citrulli*와 일치함을 알 수 있었다(Table 2, 3). Biolog system을 이용하여 Aac 91 균주와 Aac 92 균주에 대한 탄수화물 이용도를 조사한 결과 Tween 40, Tween 80, L-Arabinose, D-Galactose, Pyruvic Acid Methyl Ester, Succinic Acid Mono-Methyl Ester, D-Gluconic Acid, β-Hydroxybutyric Acid, D,L-Lactic Acid, Sebacic Acid, Succinic Acid, Bromosuccinic Acid, L-Asparagine, L-Aspartic Acid, L-Glutamic Acid, L-Proline, L-Pyroglutamic Acid, 2-Aminoethanol을 이용하였

고, α-Cyclodextrin, Dextrin, Glycogen, N-Acetyl-D-Galactosamine, N-Acetyl-D-Glucosamine, Adonitol, D-Arabitol, D-Cellobiose, I-Erythritol, L-Fucose, Gentiobiose, α-D-Glucose, m-Inositol, α-D-Lactose, Lactulose, Maltose, D-Mannitol, D-Mannose, D-Melibiose, β-Methyl-D-Glucoside, D- Psicose, D-Raffinose, L-Rhamnose, D-Sorbitol, Sucrose, D-Trehalose, Turanose, Xylitol, Cis-Aconitic Acid, Citric Acid, Formic Acid, D-Galactonic Acid Lactone, D-Galacturonic Acid, D-Glucosaminic Acid, D-Glucuronic Acid, α-Hydroxybutyric Acid, γ-Hydroxybutyric Acid, p-Hydroxy-phenylacetic Acid, Itaconic Acid, α-Ketobutyric Acid, α-Ketoglutaric Acid, α-Ketovaleric Acid, Malonic Acid, Propionic Acid, Quinic Acid, D-Saccharic Acid, Succinamic Acid, Glucuronamide, L-Alaninamide, L-Alanine, L-Alanyl-Glycine, Glycyl-L-Aspartic Acid, Glycyl-L-Glutamic Acid, L-Histidine, Hydroxy-L-Proline, L-Leucine, L-Omithine, L-Phenylalanine, D-Serine, L-Threonine, D,L-Camitine, γ-Aminobutyric Acid, Urocanic Acid, Inosine, Uridine, Thymidine, Phenylethyl-amine, Putrescine, 2,3-Butanediol, Glycerol, D,L,α-Glycerol Phosphate, α-D-Glucose-1-Phosphate, D-Glucose-6-Phosphate는 이용하지 못하였다. D-Fructose, Acetic Acid, D-Alanine, L-Serin은 균주와 배양시간에 따라 다른 반응을 나타내었다.

Walcott 등(2004)은 유전적 분석에 의해 *A. avenae* subsp. *citrulli*를 크게 두 그룹으로 분류하였는데, Group I은 주로 수박 이외의 박과 작물에서 분리된 균이 속하며, Group II는 주로 수박에서 분리한 균이 속한다. Group I에 속하는 균은 탄수화물 이용도에서 α-Hydroxybutyric Acid, L-Leucine은 대부분이 이용하지 못하며, 2-Aminoethanol은 이용한다고 보고하였는데, 본 실험에서 분리한 두 균주도 위와 같은 탄수화물 이용도를 나타내어 Group I에 속하였다. Group I에 속한 균들은 대부분 구리에 저항성을 나타내어(Walcott 등, 2004) 구리를 이용한 제제로는 멜론 과실썩음병을 방제하기 곤란할 것으로 사료된다.

Aac 91 균주를 전자현미경으로 관찰한 결과 크기가 약 0.5-0.8×1.5-3.0 μm였으며, 1개의 단극모를 가지고 있었다(Fig. 1G, H). Walcott와 Gitaitis(2000)가 보고한 종특이적 primer(WFB1, WFB2)를 이용하여 PCR을 실시한 결과 Aac 91, Aac 92 균주 모두 360 bp의 유전자가 증폭되어 생리생화학적 실험에 의한 동정결과와 일치했다(Fig. 2). 또한, Aac 91 균주의 16S rDNA를 partial sequencing 결과 *A. avenae* subsp. *citrulli* (NCBI no. AF137506)와 98%의 유사성을 나타내었다(Table 3).

이상의 생리생화학적 실험, 전자현미경 관찰, 종특이적

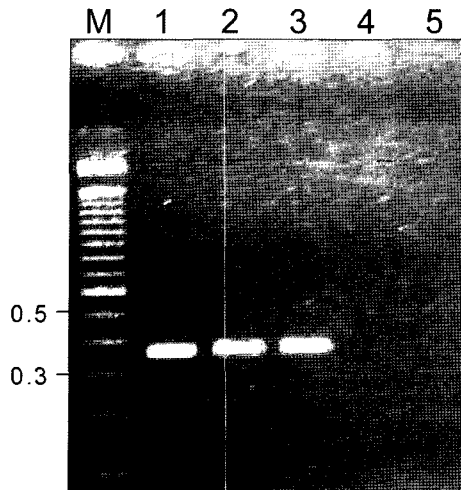


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of PCR-amplification products from *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* strains with primers WFB1 and WFB2. Lanes: M, DNA ladder (100 bp); 1, KACC 10651 (*A. avenae* subsp. *citrulli*); 2, Aac 91; 3, Aac 92; 4, ATCC 15713^T (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*); 5, KACC 10298 (*Agrobacterium tumefaciens*).

primer를 이용한 PCR 실험 및 병원성 실험을 종합한 결과 본 실험에서 분리한 병원세균을 *A. avenae* subsp. *citrulli*로 동정하였으며, 멜론 과실썩음병으로 명명할 것을 제안한다.

요 약

2005년 전남 나주와 광주의 멜론 재배포장에서 잎맥을 따라 갈색으로 변색되면서 시드는 증상이 관찰되었고, 과실 표면에는 점무늬의 수침상이 형성되며 과실 내부는 갈색으로 썩는 증상이 관찰되었다. 잎과 과실의 병반부로부터 2개의 세균을 분리하여 생리생화학적 실험, 유전적 실험 및 병원성 실험 결과 *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*로 동정되었다. 이 보고는 국내에서 최초이며, 이 병을 멜론 과실썩음병으로 명명할 것을 제안한다.

참고문헌

- Isakeit, T., Black, M. C., Barnes, L. W. and Jones, J. B. 1997. First report of infection of honeydew with *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Plant Dis.* 81: 694.
- Latin, R. X. and Rane, K. K. 1990. Bacterial fruit blotch of watermelon in Indiana. *Plant Dis.* 74: 331.
- Langston, D. B., Jr., Walcott, R. D., Gitaitis, R. D. and Sanders, F. H., Jr. 1999. First report of a fruit rot of pumpkin caused by *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* in Georgia. *Plant Dis.* 83: 199.
- Lee, S. D., Lee, J. H., Kim, Y. K., Heu, S. G. and Ra, D. S. 2005. Bacterial blight of sesame caused by *Xanthomonas campestris* pv. *sesami*. *Res. Plant Dis.* 11: 146-151.
- Martin, H. L., O'Brien, R. G. and Abbott, D. V. 1999. First report of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* as a pathogen of cucumber. *Plant Dis.* 83: 965.
- Schaad, N. W., Jones, J. B. and Chun, W. 2001. *Plant pathogenic bacteria*. 3rd ed. APS Press, Minnesota, USA.
- Song, W. Y., Kim, H. M., So, I. Y. and Kang, Y. K. 1991. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli*: The causal agent of bacterial fruit blotch rot on watermelon. *Korean J. Plant Pathol.* 7: 177-182.
- Sowel, G. Jr. and Schaad, N. W. 1979. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* on watermelon: Seed transmission and resistance of plant introductions. *Plant Dis. Rep.* 63: 437-441.
- Walcott, R. R., Fessehaie, A. and Castro, A. C. 2004. Differences in pathogenicity between two genetically distinct groups of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* on cucurbit hosts. *J. Phytopathol.* 152: 277-285.
- Walcott, R. R. and Gitaitis, R. D. 2000. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon seed using immunomagnetic separation and the polymerase chain reaction. *Plant Dis.* 84: 470-474.
- William, G. W., Susan, M. B., Date, A. P. and David, J. L. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173: 697-703.