

Xanthomonas axonopodis pv. *phaseoli*와 *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*에 의한 팥의 세균성잎마름병

이승돈* · 이정희 · 문종경¹ · 허성기 · 나동수

농업과학기술원 식물병리과, ¹작물과학원 작물기능개발과

Bacterial Common Blight and Fuscous Blight of Small Red Bean caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*

Seungdon Lee*, Junghee Lee, Jung-Kyung Moon¹, Sunggi Heu and Dong-Soo Ra

Plant Pathology Division, National Institute of Agricultural Science and Technology, Suwon 441-707, Korea

¹Breeding Resource Development Division, National Institute of Crop Science, Suwon 441-707, Korea

(Received on July 9, 2006)

A bacterial disease of small red bean (*Phaseolus angularis*) was observed on field-grown plants in Suwon in year 2003. Leaf symptoms initially appeared as water-soaked spots that gradually enlarged, became flaccid and necrotic and were often bordered by a small zone of lemon yellow tissue. In the case of severe infection, dead leaves were defoliated. Pod symptoms consisted of the lesions that were generally circular, slightly sunken and dark reddish brown. Isolation made from diseased leaves on yeast extract dextrose calcium carbonate agar yielded nearly pure cultures of a yellow-pigmented bacterium typical of a xanthomonad. Three bacterial strains were purified and used for further tests. Pathogenicity of strains was confirmed on 3-week-old small red bean plants sprayed with bacterial suspensions containing 10^8 cfu/ml of phosphate buffered saline. The representative *Xanthomonas* strains isolated from small red bean were compared with *X. axonopodis* pv. *phaseoli* and *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* type strains for fatty acid profiles, biochemical tests and metabolic fingerprints using Biolog GN2 microplate, showing that all outcomes were indistinguishable between our isolates and reference strains. Two of three strains produced a melanin-like brown pigment extracellularly on King's medium B agar. These results suggest that this new small red bean disease observed in Suwon is bacterial fuscous blight caused by *X. axonopodis* pv. *phaseoli* and *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*.

Keywords : Bacterial fuscous blight, *Phaseolus angularis*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*

팥(*Phaseolus angularis*)은 콩과의 한해살이풀로서 아시아 극동지역이 원산지로서, 2000년 전부터 중국에서 재배되었으며, 현재 중국, 일본, 한국에서 재배되고 있다. 팥은 콩보다 생육기간이 짧아서 고령지에서 재배하기 알맞고 뒷그루로 늦심기를 할 때 유리하므로 7월 상순까지도 파종이 가능하다. 콩과 비슷한 기후에 알맞지만 콩보다 따뜻하고 습한 기후가 적합하며, 냉해와 서리의 피해를 받기 쉽다. 팥에는 녹말 등의 탄수화물이 약 50% 함유되어 있으며, 그 밖에 단백질 약 20%, 비타민 B도 많이 들

어 있다. 씨껍질의 색소가 안토시아닌이므로 알칼리나 철냄비에 끓이면 검은색이 되고, 산이나 공기에 닿으면 붉은색을 띤다(홍 등, 1995).

팥에는 모자이크병, 세균성갈색무늬병(bacterial brown spot), 겹무늬병(circular leaf spot), 갈색무늬병(leaf spot), 탄저병(anthrachnose), 모잘록병(damping-off), 갈색무늬병(brown leaf spot), 마름병(cottony leak), 흰가루병(powdery mildew), 녹병(rust) 등이 국내에 보고되어 있다(한국식물병리학회, 2004). *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*에 의한 잠두(bean)의 세균성잎마름병(common bacterial blight)은 1897년에 세계적으로 처음 보고되었으며, 그 후 melanin을 형성하고 병원성이 다른 변이균을 *X. axonopodis* pv.

*Corresponding author

Phone)+82-31-290-0419, Fax)+82-31-290-0406

E-mail) sdlee@rda.go.kr

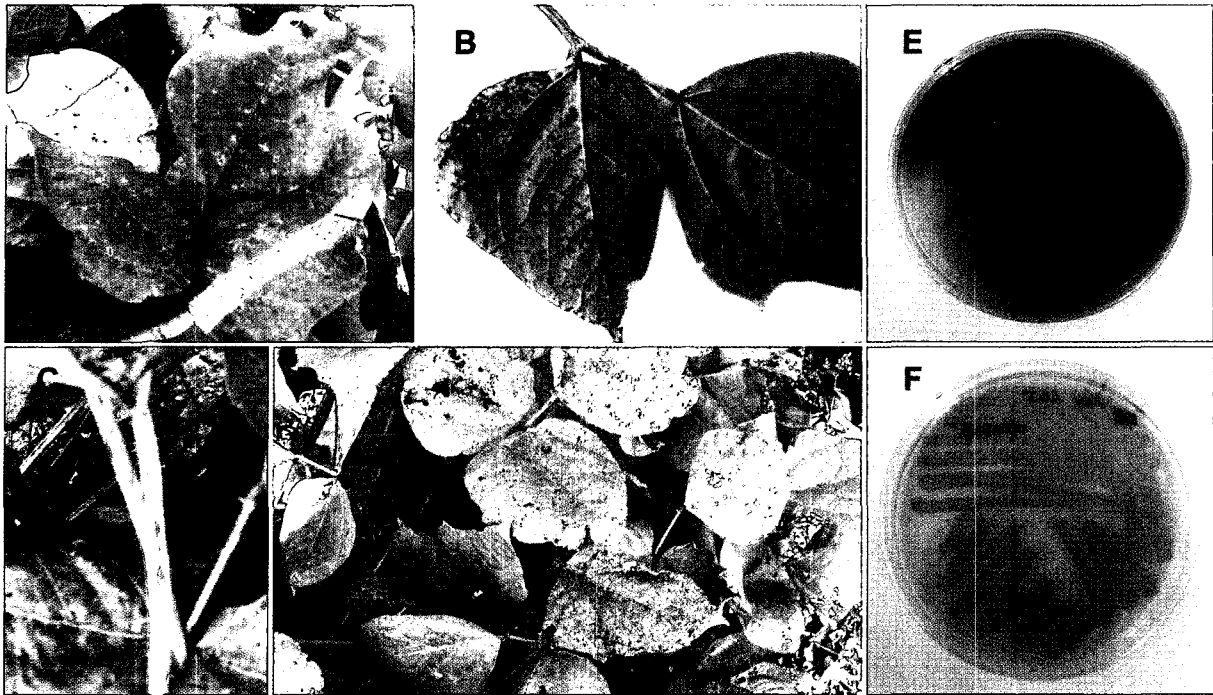


Fig. 1. Symptoms of bacterial fuscous blight caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* on small red bean. **A:** front surface of infected leaves, **B:** back surface of infected leaves, **C:** spots on infected petioles, **D:** infected plants in the field, **E:** brown pigment production by *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var *fuscans* SL4309 on KB medium, **F:** no brown pigment production of *X. axonopodis* pv. *phaseoli* SL4311.

phaseoli var. *fuscans*로, 이로 인한 병은 fuscous blight라고 명명하였다(Vidaver, 1993; Goodwin과 Sopher, 1994).

저자 등은 2003년 수원의 팥 재배 포장에서 특이한 병반이 발견되어 원인을 구명하고자 하였다(Fig. 1). 병에 걸린 기주의 잎의 병환부와 건전부의 경계에서 작은 조각을 잘라 1% 차아염소산나트륨(NaOCl)으로 표면 살균한 후 살균수로 2회 씻고 표면 살균된 조각을 1 ml의 살균수가 들어 있는 Eppendorf tube에 넣고 1시간 정도 상온에서 방치한 다음 현탁액을 Yeast extract - Dextrose - Calcium carbonate (YDC) 배지에 streaking하고 28°C에서 3~4일 배양하여 콜로니의 형태, 색상, 빈도를 기준으로 단 콜로니를 순수 분리하였다. 순수 분리된 균은 20% 글리세롤액에 현탁하여 -70°C 저온냉동고에 장기보존하고, 계속 사용하는 균은 살균수에 현탁하여 냉장고에 보존하면서 실험에 사용하였다.

순수 분리된 노란색을 띠는 세균을 두 가지 방법으로 병원성을 검정하였다. 첫째, 고체배지에서 48시간 배양한 세균을 PBS(phosphate buffered saline, pH6.8)에 현탁하여 농도를 1×10^8 cfu/ml로 맞춘 다음 잎이 완전히 전개된 담배(*Nicotiana tabacum* cv. Samsun)와 토마토(*Lycopersicon esculentum* cv. 서광) 잎에 3반복으로 주입하여 48시간 이내에 과민성반응 여부를 조사하였다. 둘째, 완전히 잎이

전개된 팥(경원팥, 중원팥, 충주팥)과 콩(진품콩)에 세균 현탁액을 가위로 접촉한 후 습실상(온도, 25°C; 상대습도, 100%)에서 24시간 배양 후 온실로 옮겼다. 온실 조건은 자연광 아래에서 온도를 24~30°C로 유지하였다. 공시된 SL4309, SL4310과 SL4311 세균은 토마토에서는 과민성 반응을 보였으나, 담배에서는 아무런 반응이 없었다. 분무접종한 팥에서는 접종 3주일 후에 조그만 점무늬 병반이 보이기 시작하여 점점 병반수가 많아지고 잎 뒷면에 암갈색의 점무늬를 형성했으나 콩에서는 병반을 형성하지 못했다(Fig. 1과 Table 1).

분리된 세균은 Schaad 등(2001)의 방법에 따라 생리·생화학적 특성을 조사하였다. 세균의 속명을 동정하기 위하여 그람 염색, 호기적 성장, MS 배지에서의 성장, YDC 배지에서의 색소 생성 여부를 조사하였을 때 분리된 병원세균 SL4309, SL4310, SL4311 모두 YDC 배지에서 전형적인 *Xanthomonas*속 세균의 특징인 노란색의 색소를 형성하였다. 또한 그람음성세균이며, 호기성 성장을 하였으며, MS배지에서는 자라지 못했다. SL4309와 SL4310은 KB 배지에서 짙은 갈색의 색소를 생성하였으나 SL4311은 색소를 만들지 못했다(Fig. 1과 Table 1).

세균을 Bacto™ Tryptic Soy Broth Agar (TSBA, BD211825) 배지에 접종하여 28~30°C에서 24~48시간 배

Table 1. Bacteriological characteristics of bacterial isolates (SL4309, SL4310 and SL4311) from common bacterial blight and fuscous blight of small red bean and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*

Characteristics	SL4309	SL4310	SL4311	<i>phaseoli</i> ^a	<i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i> ^a
Gram reaction	- ^b	-	-	-	-
Anaerobic growth	-	-	-	-	-
Yellow colonies on YDC	+	+	+	+	+
Growth on MS	-	-	-	-	-
Brown pigment on KB	+	+	-	-	+
Hypersensitive response on tobacco	-	-	-	-	-
on tomato	+	+	+	-	-
Pathogenicity on small red bean					
cv. Kyungwon	+	+	+	-	-
cv. Jungwon	+	+	+	-	-
cv. Choongju	+	+	+	-	-
on soybean	-	-	-	-	-
Utilization of substrates					
Acetate	+	+	+	+	+
cis-Aconitate	-	-	+	+	-
L-Alanine	+	+	+	+	+
L-Arabinose	-	-	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-	+s	-
L-Asparagine	-	-	+	+s	-
L-Aspartate	-	-	+	+s	-
Citrate	+	+	+	+	+
Dextrin	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+
Glycerol	+s	+s	-	+	-
L-Histidine	-	-	+s	+s	-
D-Lactate	-	-	+s	+s	-
Lactose	+s	+s	+s	+s	+s
Lactulose	+	+	+	+	-
Malonate	+s	+s	+	+s	-
Maltose	+	+	+	+	-
Mannitol	+s	+s	-	+s	+s
Mannose	+	+	+	+	+s
Melibiose	+	+	+	+s	+s
L-Ornithine	-	-	-	+s	-
L-Proline	+	+	+	+s	+
Propionate	+s	+s	-	+s	+s
Quinate	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-
Sucrose	+	+	+	+	+s
Trehalose	+	+	+	+	+

^aHilberbrand *et al.* (1993). *J. Appl. Bacteriol.* 75: 447-455.

^b+, positive; +s, slow growth; -, negative.

양한 후 신선한 균총을 면봉으로 채취하여 GN/GP-IF (0.40% sodium chloride, 0.03% pluronic F-68, 0.01% gellan gum) 용액에 3×10^8 cfu/ml 농도로 현탁시킨 후 각각 GN2

microplate (BIOLOG GN2 MicroPlate™)의 96 well에 eight-channel pipett으로 150 μl씩 분주하여 28~30°C에서 배양하였다. 배양 후 24시간과 48시간에 MicroLog™ 3 -

Table 2. Fatty acid profiles of the bacterial isolates (SL4309, SL4310 and SL4311) from common bacterial blight and fuscous blight of small red bean and *Xanthomonas axonopodis*

Shorthand name	Systematic name	SL4309	SL4310	SL4311	<i>X. axonopodis</i> ^a
10:0	decanoic acid	1.0	0.9	0.6	0.8 ± 0.4
11:0 ISO	9-methyldecanoic acid	4.2	3.7	4.3	5.1 ± 1.5
11:0 ANTEISO	8-methyldecanoic acid	0.3	0.3	0.1	0.0 ± 0.1
10:0 3OH	3-hydroxydecanoic acid	0.3	0.3	0.3	0.2 ± 0.2
Unknown 11.799		1.4	1.2	1.5	1.7 ± 0.7
11:0 ISO 3OH	3-hydroxy-9-methyldecanoic acid	2.3	2.0	1.8	2.6 ± 1.0
11:0 3OH	3-hydroxyundecanoic acid	0.5	0.5	0.1	0.1 ± 0.2
12:0 ISO 3OH	3-hydroxy-10-methylundecanoic acid	0.4	0.4	0.3	0.1 ± 0.3
12:0 3OH	3-hydroxydodecanoic acid	3.2	2.9	2.2	3.0 ± 1.1
14:0 ISO	12-methyltridecanoic acid	0.6	0.7	0.7	0.5 ± 0.9
14:0	tetradecanoic acid	1.1	1.1	1.1	1.1 ± 1.2
13:0 ISO 3OH	3-hydroxy-11-methyldodecanoic acid	3.5	3.3	4.8	5.8 ± 2.0
13:0 2OH	2-hydroxytridecanoic acid	0.5	0.5	0.2	0.2 ± 0.4
15:1 ISO F	13-methyltetradecanoic acid isomer F	0.6	0.6	0.4	0.1 ± 0.4
15:0 ISO	13-methyltetradecanoic acid	21.5	20.9	29.5	28.2 ± 6.7
15:0 ANTEISO	12-methyltetradecanoic acid	13.0	12.4	5.6	9.3 ± 3.5
15:1 w6c	cis-9-pentadecanoic acid	0.5	0.5	0.3	0.4 ± 0.5
15:0	pentadecanoic acid	1.5	1.7	0.6	1.3 ± 0.9
16:0 ISO	14-methylpentadecanoic acid	2.8	3.8	3.5	2.6 ± 1.5
16:1 w9c	cis-7-hexadecanoic acid	2.5	2.6	2.0	0.7 ± 0.8
16:1 w7c	cis-9-hexadecanoic acid	14.8	14.5	18.0	16.2 ± 4.2
16:0	hexadecanoic acid	5.4	5.9	5.6	4.1 ± 2.0
ISO 17:1 w9c	cis-7-15-methylhexadecanoic acid	6.9	7.1	6.4	6.5 ± 3.1
17:0 ISO	15-methylhexadecanoic acid	5.3	5.6	6.2	6.7 ± 2.8
17:0 ANTEISO	14-methylhexadecanoic acid	0.6	0.6	0.2	0.4 ± 0.5
17:1 w8c	cis-9-heptadecanoic acid	2.0	2.1	0.7	1.1 ± 0.9
18:1 w9c	cis-9-octadecanoic acid	0.8	0.8	0.5	0.3 ± 0.4
18:1 w7c	cis-11-octadecanoic acid	0.5	0.6	0.4	0.2 ± 0.4

^aVauterin *et al.* (1996). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 298-304.

Automated Microstation system을 이용하여 탄소원 이용 여부를 조사하고, MicroLog Gram-negative database (Version 4.02)와 연결하여 동정한 결과 SL4309과 SL4310은 *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*와 마찬가지로 Acetate, L-Alanine, Citrate, Dextrin, D-Galactose, D-Lactose, D-Mannose, D-Melibiose, L-Proline, Propionate, Sucrose, D-Trehalose을 이용하고 cis-Aconitate, L-Arabinose, D-Arabitol, L-Asparagine, L-Aspartate, L-Histidine, Lactate, L-Ornithine, Quinate, D-Sorbitol은 이용하지 못하였다. SL4311은 *X. axonopodis* pv. *phaseoli*와 유사하게 cis-Aconitate, L-Asparagine, L-Aspartate, L-Histidine, Lactate를 이용하였다(Table 2). 그 외 Glycerol, D-Lactulose, Malonate, Mannitol은 배양시간에 따라 약간의 차이는 있었으나 Hildebrand 등(1993)이 보고한 자료의 탄소원 이용도와 매우 유사하였다.

지방산 분석은 Miller(1982)의 방법에 준했다. 지방산 양상은 MIDI Library version, TSBA 5.0과 Library Generation system software version 5.0을 이용하여 분석하였을 때, 분리세균 모두 9-methyldecanoic acid (11:0 ISO), 13-methyltetradecanoic acid (15:0 ISO), 12-methyltetradecanoic acid (15:0 ANTEISO), 15-methylhexadecanoic acid (17:0 ISO) 등의 saturated branched-chain fatty acid, hexadecanoic acid (16:0) 등의 saturated straight-chain fatty acid, cis-9-hexadecanoic acid (16:1 w7c), cis-7-15-methylhexadecanoic acid (ISO 17:1 w9c) 등의 cyclopropane acid, 3-hydroxy-9-methyldecanoic acid (11:0 ISO 3OH), 3-hydroxydodecanoic acid (12:0 3OH), 3-hydroxy-11-methyldecanoic acid (13:0 ISO 3OH)의 hydroxy acid 등 28가지의 지방산을 가지고 있었다(Table 2). 이중 13-methyltetradecanoic acid의 함량이 21~30%로 가장 높았고, 그다음 cis-9-hexadecanoic acid

(15~18%), 12-methyltetradecanoic acid (6~13%), *cis*-7-15-methylhexadecanoic acid (6~7%), 15-methylhexadecanoic acid (5~6%), hexadecanoic acid (5~6%), 9-methyldecanoic acid (3~4%), 3-hydroxy-11-methyldecanoic acid (3~4%), 3-hydroxydodecanoic acid (2~3%)의 순으로 함유하고 있어, Vauterin 등(1996)의 보고에 의한 *Xanthomonas axonopodis*의 지방산 조성 및 함량이 유사하였다. 특이한 것은 melanin 색소를 생성하는 SL4309와 SL4310균주는 melanin 색소를 생성하지 않는 SL4311 균주보다 13-methyltetradecanoic acid 함량이 7~8%, *cis*-9-hexadecanoic acid 함량이 3~4% 낮은 반면, 12-methyltetradecanoic acid 함량이 6~7% 높았다(Table 2). 이것은 RFLP, RAPD, DNA 교잡 등에 의해 *X. axonopodis* pv. *phaseoli*는 *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*와 유전적으로 상이하다는 보고를 뒷받침하고 있다(Birch 등, 1997; Chan과 Goodwin, 1999; Hilderbrand 등, 1990).

이상과 같이 본 실험에서 분리한 병원세균 SL4309, SL4310과 SL4311은 YDC 배지에서의 colony 형태, 탄소원 이용정도, 지방산 조성 및 함량에 근거하여 *Xanthomonas axonopodis*로, 팥과 콩에서 병원성에 근거하여 SL4311은 *X. axonopodis* pv. *phaseoli*로, 최종적으로 KB 배지에서의 melanin 색소 생성 여부에 따라 SL4309와 SL4310은 *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*로 동정하였으며 이 병을 팥의 세균성잎마름병으로 명명할 것을 제안한다.

요 약

2003년 수원의 팥 재배 포장에서 새로운 병해가 발견되었다. 처음에는 잎에서 수침상 점무늬가 형성되고 점점 커져 주위로 노란색의 테두리를 형성하는 진갈색의 반점을 형성한다. 심해지면 잎이 떨어지고 잎자루 및 꼬투리에도 진갈색의 병반이 형성된다. YDC 배지에서 병원세균을 순수 분리 하였을 때 *Xanthomonas*속 세균의 전형적인 특징인 노란색 색소를 띤 세균이 형성되었다. 분리된 세균을 10^8 cfu/ml로 현탁한 후 3주 동안 자란 팥과 콩에 분무 접종하여 병원성을 확인하였다. 지방산 조성 및 함량과 다양한 탄소원 이용정도를 이용하여 분리세균 SL4311

은 *X. axonopodis* pv. *phaseoli*로 SL4309와 SL4310은 *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*로 동정하였으며 이 병을 팥의 세균성잎마름병으로 명명하였다.

참고문헌

- Birch, P. R. J., Hyman, L. J., Taylor, R., Opio, A. F., Bragard, C. and Toth, I. K. 1997. RAPD PCR-based differentiation of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans*. *Eur. J. Plant Pathol.* 103: 809-814.
- Chan, J. W. Y. F. and Goodwin, P. H. 1999. Differentiation of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* by PFGE and RFLP. *Eur. J. Plant Pathol.* 105: 867-878.
- Goodwin, P. H. and Sopher, C. R. 1994. Brown pigmentation of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* associated with homogentistic acid. *Can. J. Microbiol.* 40: 28-34.
- 한국식물병리학회. 2004. 한국식물병목록. 제4판. 한국식물병리학회. 779 pp.
- Hildebrand, D. C., Hendson, M. and Schroth, M. N. 1993. Usefulness of nutritional screening for the identification of *Xanthomonas campestris* DNA homology groups and pathovars. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 447-455.
- Hilderbrand, D. C., Palleroni, N. J. and Schroth, M. N. 1990. Deoxyribonucleic acid relatedness of 24 xanthomonad strains representing 23 *Xanthomonas campestris* pathovars and *Xanthomonas fragariae*. *J. Appl. Bacteriol.* 68: 263-269.
- 홍은희, 김석동, 이영호, 유용환, 서형수, 신두철, 송수현, 김두열, 이야성, 이강효, 배경은. 1995. 두류의 품종. 작물시험장. 205 pp.
- Miller, L. T. 1982. Single derivatization method for routine analysis of bacterial whole-cell fatty acid methyl esters, including hydroxy acids. *J. Clin. Microbiol.* 16: 584-586.
- Schaad, N. W., Jones, J. B. and Chun, W. 2001. *Plant Pathogenic Bacteria*. 3rd ed. APS Press, Minnesota, USA. 373 pp.
- Vauterin, L., Yang, P. and Swings, J. 1996. Utilization of fatty acid methyl esters for the differentiation of new *Xanthomonas* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 298-304.
- Vidaver, A. K. 1993. *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*: cause of common bacterial blight of bean. In : *Xanthomonas*, ed. by J. G. Swings and E. L. Civerolo, pp. 40-44. Chapman and Hall, London, UK.