

Xanthomonas campestris pv. *campestris*에 의한 브로콜리의 검은색음병이승돈* · 이정희¹ · 김선이 · 김용기 · 이용훈 · 허성기 · 나동수농업과학기술원 식물병리과, ¹성균관대학교 유전공학과Black Rot of Broccoli Caused by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*Seungdon Lee*, Junghee Lee¹, Sun Yee Kim, Yong-Ki Kim, Yong-Hoon Lee,
Sunggi Heu and Dong-Soo RaPlant Pathology Division, National Institute of Agricultural Science and Technology,
Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea¹Department of Genetic Engineering, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea

(Received on June 30, 2006)

A new bacterial disease of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) was observed on field-grown plants in Pyungchang during 2003 and 2004. Seedling infections first appeared as a blackening along the margins of the cotyledon. Cotyledon shriveled and dropped off. Infected seedlings were stunted and yellowed and eventually died. The disease was easily recognized by the presence of yellow, V-shaped, or U-shaped areas extending inward from margin of the leaf. As the disease progressed, the yellow lesions turned brown and the tissues died. Isolations made from diseased leaves on yeast extract dextrose calcium carbonate agar yielded nearly pure cultures of a yellow-pigmented bacterium typical of a xanthomonad. Two bacterial strains were purified and used for further tests. Pathogenicity of strains was confirmed on 3-week-old crucifer (cabbage, Chinese cabbage, kale, radish and broccoli) plants cut by scissors with bacterial suspensions containing 10^8 cfu/ml of phosphate buffered saline. The Biolog and fatty acid analyses and 16S rDNA sequencing of two strains (SL4797 and SL4800) from broccoli black rot showed that they could be identified as *X. campestris* pv. *campestris* because of their high similarity to the tester strain (*X. campestris* pv. *campestris* NCPPB528) with a match probability of 100%. This is the first report of black rot of broccoli in Korea.

Keywords : Black rot, *Brassica oleracea* var. *italica*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

지중해 동부 연안이 원산지인 브로콜리(*Brassica oleracea* var. *italica*)는 배추과(Cruciferae)에 속하는 작물로 야생 양배추가 변화된 것이다. 야생 양배추가 진화되어 여러 변종이 생겼는데 먼저 잎이 오글오글한 케일(Kale)로 분화되었고, 꽃이 분화 발달하여 브로콜리(Broccoli)와 꽃양배추(Cauliflower)로 그리고 줄기의 측아가 발달한 방울다다기양배추(Brussels sprouts)로 진화되었다. 브로콜리는 이용부위를 기준으로 할 때 화채류로 분류되어 꽃봉오리인 화뢰를 수확대상으로 한다(성, 2006).

한국식물병목록(한국식물병리학회, 2004)에는 브로콜리는 기주로서 등록되어 있지 않고 꽃양배추 항목에 세균

성무름병(bacterial soft rot), 검은무늬병(black spot), 시들음병(Fusarium wilt), 질록병(damping-off), 균핵병(Sclerotinia rot)이 등록되어 있다. *X. campestris* pv. *campestris*에 의한 검은색음병은 배추과 작물이 재배되는 곳에서는 어디거나 발생하는 병으로 국내에서는 무, 배추, 양배추, 케일에 발생하는 것으로 보고되었다(Shaad와 Alvarez, 1993; 한국식물병리학회, 2004).

저자 등은 2003년부터 2004년에 걸쳐 브로콜리 주재배단지인 평창지역의 많은 포장에서 잎에 V자 형 또는 잎 끝에 노란색을 띠는 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

*Corresponding author

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

E-mail) sdlee@rda.go.kr

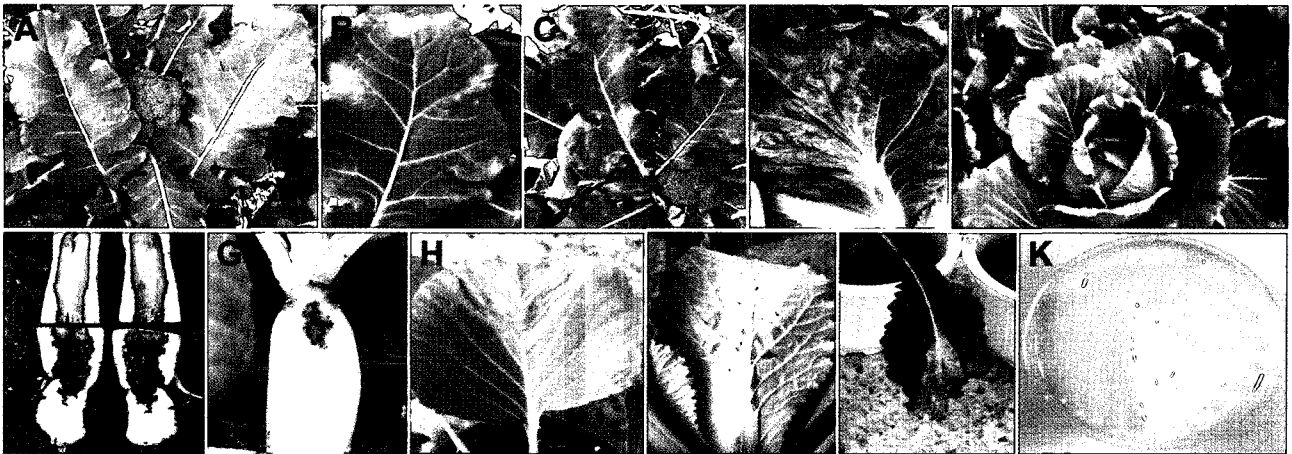


Fig. 1. Symptoms of black rot caused by *X. campestris* pv. *campestris* on Crucifers. Leaf blights on infected leaves of broccoli (A, B and C), Chinese cabbage (D) and cabbage (E) and black rot of radish roots (F) in the fields. Black rot of radish root (G) by artificial injection inoculation and V-shaped symptoms of cabbage (H), Chinese cabbage (I) and kale (J) by artificial leaf cutting inoculation. K: colonies of *X. campestris* pv. *campestris* on YDC medium.

extract - Dextrose - Calcium carbonate (YDC) 배지에 streaking 하고 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 두가지 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 전개된 브로콜리, 양배추, 배추, 케일에 세균현탁액을 가위로 접종하고, 무에는 10 μ l를 주사 접종한 후 습실상 (온도, 25°C; 상대습도, 100%)에서 24시간 배양 후 온실로 옮겼다. 온실 조건은 자연광 아래에서 온도를 24~30°C로 유지하였다. 공시된 SL4797과 SL4800과 대조균인 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NCPPB528은 토마토에서는 과민성 반응을 보였으나, 담배에서는 아무런 반응이 없었다. 배추과 작물에서는 접종 1주일 후에 접종부위부터 병반이 보이기 시작하여 점점 엽맥을 타고 안으로 진전되었다. 무의 뿌리에서는 접종부위로부터 주위로 썩어들어가 진갈색을 보였다(Fig. 1과 Table 1).

분리된 세균은 Schaad 등(2001)의 방법에 따라 생리·생화학적 특성을 조사하였다. 세균의 속명을 동정하기 위하여 그람 염색, 호기적 성장, YDC 배지에서의 색소 생성 여부를 조사하였을 때 분리된 병원세균 SL4797과

Table 1. Bacteriological characteristics of bacterial isolates (SL4797 and SL4800) from broccoli black rot and a reference strain *X. campestris* pv. *campestris* NCPPB528

Characteristics	SL4797	SL4800	NCPPB528
Gram reaction	- ^a	-	-
Anaerobic growth	-	-	-
Yellow colonies on YDC	+	+	+
Hypersensitive response on tobacco	-	-	-
on tomato	+	+	+
Pathogenicity on broccoli	+	+	+
cabbage	+	+	+
Chinese cabbage	+	+	+
radish	+	+	+
kale	+	+	+

^a+, positive; -, negative.

SL4800은 YDC 배지에서 전형적인 *Xanthomonas* 속 세균의 특징인 노란색의 색소를 형성하였다(Fig. 1K). 또한 그람음성세균이며, 호기성 성장을 하였다(Table 1).

세균을 Bacto™ Tryptic Soy Broth Agar(TSBA, BD211825) 배지에 접종하여 28~30°C에서 24~48시간 배양한 후 신선한 균총을 먼봉으로 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 μ l씩 분주하여 28~30°C에서 배양하였다. 배양 후 24시간과 48시간에 MicroLog™ 3 - Automated Microstation system을 이용하여 탄소원 이용여부를 조사하고, MicroLog Gram-negative database(Version 4.02)와

Table 2. Metabolic activities of bacterial isolates (SL4797 and SL4800) from broccoli black rot and a reference strain *X. campestris* pv. *campestris* NCPPB528 in the Biolog GN2 microplate assay

Substrate	SL4797	SL4800	NCPPB528	Substrate	SL4797	SL4800	NCPPB528
2-Amino ethanol	-	-	-	D-Lactate	+	+	+
Acetate	+	+	+	D-Lactose	-	-	-
Adonitol	-	-	-	Lactulose	-	+	v
cis-Aconitate	+	+	+	L-leucine	-	-	-
L-Alanine	-	+	+	Malonate	+	+	+
L-Arabinose	-	-	-	Maltose	+	+	+
D-Arabitol	-	-	-	D-Mannitol	-	-	-
L-Asparagine	-	-	-	D-Mannose	+	+	+
L-Aspartate	-	-	-	D-Melibiose	+	+	+
Bromo succinate	+	+	+	Monomethylsuccinate	+	+	+
Cellobiose	+	+	+	β -methyl glucoside	-	-	-
Citrate	+	+	+	L-Ornithine	-	-	-
Dextrin	+	+	+	L-Proline	+	+	+
I-Erythritol	-	-	-	Propionate	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	D-psicose	+	+	+
L-Fucose	+	+	+	Quinate	-	-	-
D-Galactose	+	+	+	D-Raffinose	-	-	-
D-Glucose	+	+	+	L-Rhamnose	-	-	-
D-Gluconate	-	-	-	L-Serine	-	-	-
L-Glutamate	+	+	+	D-Sorbitol	-	-	-
Glycerol	+	+	+	Succinamate	v	v	v
L-Histidine	-	-	-	Succinate	+	+	+
α -Hydroxybutyrate	+	-	v	Sucrose	+	+	+
β -Hydroxybutyrate	-	-	-	D-Trehalose	+	+	+
M-Inositol	-	-	-	L-Threonine	+	+	+
Ketoglutarate	+	+	+	Xylitol	-	-	-

^a+, positive; -, negative; v, variable.

연결하여 동정한 결과 SL4797과 SL4800은 *X. campestris* pv. *campestris* NCPPB528과와 마찬가지로 Acetate, cis-Aconitate, Bromo succinate, Cellobiose, Citrate, Dextrin, D-Fructose, L-Fucose, D-Galactose, D-Glucose, L-Glutamate, Glycerol, Ketoglutarate, Lactate, Malonate, Maltose, D-Mannose, D-Melibiose, Monomethylsuccinate, L-Proline, Propionate, D-Psicose, Succinate, Sucrose, D-Trehalose, L-Threonine을 이용하고 2-Amino ethanol, Adonitol, L-Arabinose, D-Arabitol, L-Asparagine, L-Aspartate, i-Erythritol, D-Gluconate, L-Histidine, β -Hydroxybutyrate, m-Inositol, D-Lactose, L-Leucine, D-Mannitol, β -methyl glucoside, L-Ornithine, Quinate, D-Raffinose, L-Rhamnose, L-Serine, D-Sorbitol, Xylitol은 이용하지 못하였다(Table 2). 그 외 L-Alanine, α -Hydroxybutyrate, D-Lactulose, Succinamate는 균주에 따라 24시간 배양시는 약간의 차이는 있었으나 48시간 배양시는 거의 같은 이용 형태를

보였다. 위의 Biolog system을 이용한 탄소원의 이용정도는 Hildebrand 등(1993)이 보고한 *Xanthomonas campestris*의 탄소원 이용정도와 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 SL4797, SL4800과 *X. campestris* pv. *campestris* NCPPB528은 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)의 hydroxy acid 등 30가지의 지방산을 가

Table 3. Fatty acid profiles of the bacterial isolates (SL4797 and SL4800) from broccoli black rot and a reference strain *X. campestris* pv. *campestris* NCPPB528

Shorthand name	Systematic name	SL4797	SL4800	NCPB528
10:0	decanoic acid	0.83	1.04	0.82
11:0 ISO	9-methyldecanoic acid	3.37	3.79	4.12
11:0 ANTEISO	8-methyldecanoic acid	0.25	0.28	0.25
10:0 2OH	2-hydroxydecanoic acid	0.20	0.22	0.18
10:0 3OH	3-hydroxydecanoic acid	0.25	0.36	0.38
Unknown 11.799		1.05	1.39	1.22
11:0 ISO 3OH	3-hydroxy-9-methyldecanoic acid	2.32	2.67	2.86
11:0 3OH	3-hydroxyundecanoic acid	0.32	0.51	0.36
13:0 ISO	11-methyldodecanoic acid	0.26	0	0.21
12:0 ISO 3OH	3-hydroxy-10-methylundecanoic acid	0.28	0.33	0.35
12:0 3OH	3-hydroxydodecanoic acid	2.79	3.65	3.70
14:0 ISO	12-methyltridecanoic acid	0.33	0.29	0.42
14:0	tetradecanoic acid	0.93	0.83	1.14
13:0 ISO 3OH	3-hydroxy-11-methyldodecanoic acid	3.31	3.46	3.50
13:0 2OH	2-hydroxytridecanoic acid	0.39	0.48	0.41
15:1 ISO F	13-methyltetradecanoic acid isomer F	0.39	0.41	0.43
15:0 ISO	13-methyltetradecanoic acid	18.39	16.98	19.26
15:0 ANTEISO	12-methyltetradecanoic acid	12.92	12.86	13.97
16:0 ISO	14-methylpentadecanoic acid	3.00	2.41	2.53
16:1 w9c	<i>cis</i> -7-hexadecanoic acid	2.07	2.48	1.82
16:1 w7c	<i>cis</i> -9-hexadecanoic acid	13.25	15.33	14.09
16:0	hexadecanoic acid	6.69	5.69	5.36
ISO 17:1 w9c	<i>cis</i> -7-15-methylhexadecanoic acid	8.73	7.90	8.36
17:0 ISO	15-methylhexadecanoic acid	10.12	8.39	8.46
17:0 ISO 3OH	3-hydroxy-15-methylhexadecanoic acid	0.54	0.72	0.66
17:0 ANTEISO	14-methylhexadecanoic acid	1.41	1.28	1.21
17:1 w8c	<i>cis</i> -9-heptadecanoic acid	1.74	2.29	1.57
18:1 w9c	<i>cis</i> -9-octadecanoic acid	1.08	1.02	0.90
18:1 w7c	<i>cis</i> -11-octadecanoic acid	1.02	0.97	0.81

지고 있었다(Table 3). 이 중 13-methyltetradecanoic acid의 함량이 17~19%로 가장 높았고, 그 다음 *cis*-9-hexadecanoic acid(13~15%), 12-methyltetradecanoic acid(12~14%), 15-methylhexadecanoic acid(8~10%), *cis*-7-15-methylhexadecanoic acid(8~9%), hexadecanoic acid(5~7%), 9-methyldecanoic acid(3~4%), 3-hydroxy-9-methyldecanoic acid(3~3%)의 순으로 함유하고 있었으며, 세 개의 균주 간에는 큰 차이를 보이지 않았으나, 다른 속 병원세균과는 매우 다른 지방산 조성을 가지고 있었다(Table 3). Vauterin 등 (1996)의 보고에 의하면 *Xanthomonas*속 병원세균은 다른 식물병원세균에 비하여 매우 다양한 지방산 조성을 가지고 있으며, 본 실험의 결과도 이와 유사하였다.

분리세균 SL4797, SL4800의 16S rDNA 염기서열을 다른 *Xanthomonas* 속 세균과 비교하였을 때 *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913의 16S rDNA의 염기서열

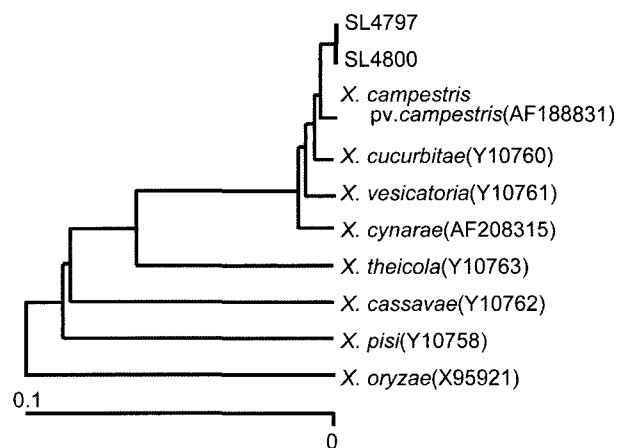


Fig. 2. Phylogenetic tree of isolates SL4797 and SL4800 based on the 16S rDNA sequences of *Xanthomonas* strains. The 16S rDNA of SL4797 and SL4800 shared 99% sequence identity with the 16S rDNA of *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913.

(AF188831)과 99% 유사하였다(Fig. 2).

이상과 같이 본 실험에서 분리한 병원세균 SL4797과 SL4800은 YDC 배지에서의 colony 형태, 탄소원 이용정도, 지방산 조성 및 함량에 근거하여 *Xanthomonas campestris*로, 최종적으로 배추과 작물에서 병원성에 근거하여 *X. campestris* pv. *campestris*로 동정하였으며 이 병을 브로콜리의 검은썩음병으로 명명할 것을 제안한다.

요 약

2003년부터 2004년 평창 지역의 브로콜리 포장에서 새로운 병해가 발견되었다. 유묘 감염이 되었을 때 떡잎의 주위로부터 검게 변색되기 시작하여 결국 떡잎이 떨어지고 유묘는 죽었다. 성체에서는 잎 가장자리로부터 엽맥을 타고 진전되어 V자 또는 U자형의 노란색 병반을 형성하였다. YDC 배지에서 병원세균을 순수 분리하였을 때 *Xanthomonas*속 세균의 전형적인 특징인 노란색 색소를 띤 세균이 형성되었다. 분리된 세균을 10^8 cfu/ml로 현탁한 후 3주 동안 자란 브로콜리, 양배추, 배추, 케일, 무에 가위 접종하여 병원성을 확인하였다. 지방산 조성 및 함량, 다양한 탄소원 이용정도 및 16S rDNA 염기서열을 이용하여 분리세균 SL4797과 SL4800을 대조균주 *X. campestris* pv. *campestris* NCPPB528과 비교하였을 때

우 유사하였다. 이 논문은 국내에서 브로콜리의 검은썩음병 최초 보고이다.

참고문헌

- 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. of Appl. Bacteriol.* 75: 447-455.
- 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.
- Shaad, N. W. and Alvarez, A. 1993. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: cause of black rot of crucifers. In : *Xanthomonas*. ed. by J.G. Swings and E.L. Civerolo, pp. 51-56. Chapman and Hall, London, UK.
- 성기철. 2006. 브로콜리 작물특성과 재배기술. 농촌진흥청 homepage(<http://www.rda.go.kr>), 농업과학기술대전.
- 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.