

*Xanthomonas campestris* pv. *vitians*에 의한 상추 세균성점무늬병

이승돈\* · 이정희 · 김용기 · 허성기 · 나동수

농업과학기술원 식물병리과

**Bacterial Leaf Spot and Dry Rot of Lettuce Caused by  
*Xanthomonas campestris* pv. *vitians***

Seungdon Lee\*, Junghee Lee, Yong-Ki Kim, Sunggi Heu and Dong-Soo Ra

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

(Received on July 10, 2006)

During 1997 and 1998, a new disease of lettuce (*Lactuca sativa*) was observed on greenhouse-grown plants in Kwangju and Kwangmyung. Lesions on leaves were irregular, small, pale green to black, water-soaked, and 2 to 5 mm in diameter. Coalescing lesions sometimes caused defoliation of older leaves. 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 (SL0246 and SL1352) were purified and used for further tests. Pathogenicity of strains was confirmed on 5-week-old lettuce plants injected with bacterial suspensions containing  $10^8$  cfu/ml of phosphate buffered saline. The representative *Xanthomonas* strains isolated from lettuce were compared with a reference strain *X. campestris* pv. *vitians* for fatty acid profiles and metabolic fingerprints using GN2 microplate, showing that all outcomes were indistinguishable between the representative and reference strains. This is the first report of bacterial leaf spot and dry rot of lettuce in Korea.

**Keywords :** Bacterial leaf spot, *Lactuca sativa*, *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*

상추(*Lactuca sativa*)는 국화과(Compositae)의 1~2년생 초본식물로 유럽 원산이며, 채소작물로 들여와 전국 각처에서 재배되고 있는 귀화식물이다. 상추는 세계적으로 가장 중요한 위치를 차지하고 있는 샐러드용 채소로 국내에서는 과거에 주로 잎상추가 재배되었으나 최근 결구상추의 수요가 증가하여 재배면적도 아울러 증가하고 있다. 비교적 서늘한 기후에서 생장이 잘되는 호냉성(好冷性) 채소로 생육적온은 15~20°C이며, 지나치게 온도가 낮거나, 30°C 이상이면 발아가 불량하고, 생육기간 중 온도가 높아지게 되면 추대(bolting)되거나 쓴맛이 증가한다(표 등, 1996).

상추에는 모자이크병, 무름병(soft rot), 세균성썩음병(bacterial rot), 잿빛곰팡이병(gray mold), 노균병(downy mildew), 갈색무늬병(*Cercospora* leaf spot), 시들음병(*Fusarium* wilt), 갈색점무늬병(leaf spot), 관부썩음병(crown rot), 역

병(*Phytophthora* root rot), 밑둥썩음병(bottom rot), 균핵병(*Sclerotinia* rot), 잎마름병(leaf blight)의 13가지 병해가 국내에 보고되어 있다(한국식물병리학회, 2004). *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*에 의한 상추의 세균성점무늬병(bacterial leaf spot)은 1918년에 미국 뉴욕에서 처음 보고되었으며, 그 후 호주, 남아프리카공화국, 뉴질랜드, 일본, 이탈리아, 브라질, 캐나다, 터키 등에서 보고되었다(Barak 등, 2001; Brown, 1918; Ohata 등, 1979).

저자 등은 1997년과 1998년에 광주, 광명의 상추 재배 온실에서 기존의 보고된 것과 다른 특이한 병반이 발견되어 원인을 구명하고자 하였다. 처음에는 잎에 병반이 불규칙적이고 작은 연녹색이었다가 점점 커져 지름이 2~5 mm 정도인 수침상의 검은색 병반이 형성되었다. 잎의 아래쪽에서 엽맥을 따라 검은색의 줄무늬 병반이 형성되기도 하고 심해지면 잎이 시들어 말라죽었다(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 ml

\*Corresponding author

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

E-mail) sdlee@rda.go.kr

의 살균수가 들어 있는 Eppendorf tube에 넣고 1시간 정도 상온에서 방치한 다음 현탁액을 Yeast extract-Dextrose-Calcium carbonate(YDC) 배지에 streaking하고 28C에서 3~4일 배양하여 콜로니의 형태, 색상, 빈도를 기준으로 단 콜로니를 순수 분리하였다. 순수 분리된 균은 20% 글리세롤액에 현탁하여 -70C 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  $1 \times 10^8$  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, 세균현탁액을 주사기를 이용하여 상추(적상추와 청상추)의 줄기 및 엽맥에 접종한 후 습실상(온도, 25C; 상대습도, 100%)에서 24시간 배양 후 온실로 옮겼다. 온실 조건은 자연광 아래에서 온도를 24~30C로 유지하였다. 공시된 SL0246과 SL1352 세균은 토마토에서는 과민성 반응을 보였으나, 담배에서는 아무런 반응이 없었다. 주사 접종한 상추의 줄기와 엽맥에서는 접종 5일 후에 진갈색의 조그만 병반이 보이기 시작하여 7일 후에는 병반이 검은색으로 변

하면서 점점 커졌다(Fig. 1, 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 SL0246과 SL1352 모두 YDC 배지에서 전형적인 *Xanthomonas*속 세균의 특징인 노란색의 색소를 형성하였다. 또한 그람음성세균이며, 호기성 성장을 하였으며, MS 배지에서는 자라지 못했다(Fig. 1, Table 1).

세균을 Bacto™ Tryptic Soy Broth Agar(TSBA, BD211825) 배지에 접종하여 28~30C에서 24~48시간 배양한 후 신선한 균총을 면봉으로 채취하여 GN/GP-IF(0.40% sodium chloride, 0.03% pluronic F-68, 0.01% gellan gum) 용액에  $3 \times 10^8$  cfu/ml 농도로 현탁시킨 후 각각 GN2 microplate (BIOLOG GN2 MicroPlate™)의 96 well에 eight-channel pipett으로 150 µl씩 분주하여 28~30C에서 배양하였다. 배양 후 24시간과 48시간에 MicroLog™ 3 - Automated Microstation system을 이용하여 탄소원 이용여부를 조사하고, MicroLog Gram-negative database(Version 4.02)와 연결하여 동정한 결과 SL0246과 SL1352는 Vauterin 등(1995)이 보고한 것과 비슷하게 L-Alanine, Bromo succinate, Cellobiose, Citrate, Dextrin, D-Fructose, L-Fucose, D-Galactose, D-Glucose, L-Glutamate, Ketoglutarate, Lactate,



**Fig. 1.** Symptoms of bacterial leaf spot and dry rot caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* on lettuce. **A** and **B**: blackening of the leaf veins in the immediate vicinity of the lesions, **C**: the affected tissues dried out, **D**, **E** and **F**: black lesions on leaf veins by artificial inoculation, **G**: colonies of *X. campestris* pv. *vitians* SL1352 on YDC medium.

**Table 1.** Bacteriological characteristics of *Xanthomonas campestris* pv. *vitiensis* and bacterial isolates (SL0246 and SL1352) from infected lettuce plants showing leaf spot and dry rot

Characteristics	SL0246	SL1352	Xcv <sup>a</sup>
Gram reaction	- <sup>b</sup>	-	-
Anaerobic growth	-	-	-
Yellow colonies on YDC	+	+	+
Growth on MS	-	-	-
Hypersensitive response on tobacco	-	-	-
on tomato	+	+	
Pathogenicity on red lettuce	+	+	
on green lettuce	+	+	

<sup>a</sup>Hilderbrand *et al.* (1993).<sup>b</sup>+, positive; -, negative.

D-Lactulose, Malonate, Maltose, D-Mannose, D-Melibiose, Monomethylsuccinate, L-Proline, Propionate, D-Psicose,

D-Raffinose, L-Serine, Succinate, Sucrose, D-Trehalose를 이용한 반면, 2-Amino ethanol, Adonitol, cis-Aconitate, L-Arabinose, D-Arabitol, L-Asparagine, L-Aspartate, i-Erythritol, D-Gluconate, Glycerol, L-Histidine,  $\alpha$ -Hydroxybutyrate,  $\beta$ -Hydroxybutyrate, m-Inositol, D-Lactose, L-Leucine, D-Mannitol,  $\beta$ -methyl glucoside, L-Ornithine, Quinate, L-Rhamnose, D-Sorbitol, L-Threonine, Xylitol은 이용하지 못하였다. 그 외 Acetate, Succinamate는 균주에 따라 이용 정도가 약간의 차이는 있었다. Biolog system은 SL0246과 SL1352 균주를 *Xanthomonas*속까지는 동정되었으며 탄소원 이용정도는 Vauterin 등(1995)이 보고한 *X. campestris*의 이용정도와 유사하였다(Table 2).

지방산 분석은 Miller(1982)의 방법에 준했다. 지방산 양상은 MIDI Library version, TSBA 5.0과 Library Generation system software version 5.0을 이용하여 분석

**Table 2.** Metabolic activities of *Xanthomonas campestris* and bacterial isolates (SL0246 and SL1352) from infected lettuce plants showing leaf spot and dry rot in the Biolog GN2 microplate assay

Substrate	SL0246 <sup>a</sup>	SL1352 <sup>a</sup>	Xc	Substrate	SL0246	SL1352	Xc
2-Amino ethanol	- <sup>b</sup>	-	33 <sup>c</sup>	D-Lactate	v	+	63
Acetate	+	-	37	D-Lactose	-	-	0
Adonitol	-	-	0	Lactulose	+	+	89
cis-Aconitate	-	-	16	L-leucine	-	-	5
L-Alanine	+	+	79	Malonate	+	v	89
L-Arabinose	-	-	0	Maltose	+	v	100
D-Arabitol	-	-	0	D-Mannitol	-	-	0
L-Asparagine	-	-	0	D-Mannose	+	+	95
L-Aspartate	v	-	16	D-Melibiose	+	+	100
Bromo succinate	+	+	100	Monomethylsuccinate	+	+	95
Cellobiose	+	v	100	$\beta$ -methyl glucoside	-	-	0
Citrate	+	v	53	L-Ornithine	-	-	0
Dextrin	v	v	100	L-Proline	+	v	47
i-Erythritol	-	-	0	Propionate	+	+	68
D-Fructose	+	+	100	D-psicose	+	+	95
L-Fucose	+	v	89	Quinate	-	-	0
D-Galactose	+	v	95	D-Raffinose	v	v	53
D-Glucose	+	+	100	L-Rhamnose	-	-	0
D-Gluconate	-	-	5	L-Serine	+	+	84
L-Glutamate	+	+	100	D-Sorbitol	-	-	0
Glycerol	v	-	37	Succinamate	-	+	74
L-Histidine	-	-	0	Succinate	+	+	100
$\alpha$ -Hydroxybutyrate	v	-	21	Sucrose	+	+	58
$\beta$ -Hydroxybutyrate	-	-	0	D-Trehalose	+	+	100
M-Inositol	-	-	0	L-Threonine	v	-	21
Ketoglutarate	+	+	100	Xylitol	-	-	0

<sup>a</sup>SL0246 and SL1352 were identified to Genus *Xanthomonas* in the Biolog GN2 microplate assay.<sup>b</sup>+, positive; -, negative; v, variable.<sup>c</sup>average % of positive strains of *X. campestris* tested (Vauterin *et al.*, 1995).

**Table 3.** Fatty acid profiles of *Xanthomonas campestris* and the bacterial isolates (SL0246 and SL1352) from infected lettuce plants showing leaf spot and dry rot

Shorthand name	Systematic name	SL0246 <sup>a</sup>	SL1352 <sup>a</sup>	Xc <sup>b</sup>
10:0	decanoic acid	1.0	1.0	0.6 ± 0.3
11:0 ISO	9-methyldecanoic acid	3.9	4.0	4.5 ± 0.7
10:0 3OH	3-hydroxydecanoic acid	0.4	0.5	0.0 ± 0.1
Unknown 11.799		1.5	1.4	1.7 ± 0.2
11:0 ISO 3OH	3-hydroxy-9-methyldecanoic acid	2.1	3.1	2.8 ± 0.4
11:0 3OH	3-hydroxyundecanoic acid	0.3	0.3	0.1 ± 0.2
13:0 ISO	11-methyldodecanoic acid	0.2	0.2	0.0 ± 0.2
12:0 3OH	3-hydroxydodecanoic acid	3.8	3.2	2.6 ± 0.5
14:0 ISO	12-methyltridecanoic acid	0.3	0.4	0.7 ± 0.5
14:0	tetradecanoic acid	1.6	1.5	0.8 ± 0.4
13:0 ISO 3OH	3-hydroxy-11-methyldodecanoic acid	2.7	2.9	4.7 ± 0.7
13:0 2OH	2-hydroxytridecanoic acid	0.3	0.5	0.3 ± 0.3
15:1 ISO F	13-methyltetradecanoic acid isomer F	0.2	–	0.4 ± 0.4
15:0 ISO	13-methyltetradecanoic acid	24.8	23.3	26.5 ± 3.4
15:0 ANTEISO	12-methyltetradecanoic acid	12.3	15.3	13.9 ± 2.2
15:1 w6c	<i>cis</i> -9-pentadecanoic acid	0.4	0.7	0.6 ± 0.4
16:0 ISO	14-methylpentadecanoic acid	1.3	1.7	3.2 ± 1.3
16:1 w9c	<i>cis</i> -7-hexadecanoic acid	2.1	1.6	0.9 ± 0.7
16:1 w7c	<i>cis</i> -9-hexadecanoic acid	18.6	21.4	12.7 ± 2.0
16:0	hexadecanoic acid	5.1	3.7	2.0 ± 1.1
ISO 17:1 w9c	<i>cis</i> -7-15-methylhexadecanoic acid	5.9	4.8	8.5 ± 2.1
17:0 ISO	15-methylhexadecanoic acid	6.1	4.2	6.8 ± 1.4
17:0 ANTEISO	14-methylhexadecanoic acid	0.7	0.7	0.8 ± 0.5
17:1 w8c	<i>cis</i> -9-heptadecanoic acid	1.0	1.0	1.4 ± 0.5
18:1 w9c	<i>cis</i> -9-octadecanoic acid	0.5	0.4	0.2 ± 0.3
18:1 w7c	<i>cis</i> -11-octadecanoic acid	0.6	0.4	–
17:0 ISO 3OH	3-hydroxy-15-methylhexadecanoic acid	0.4	0.4	0.1 ± 0.2

<sup>a</sup>SL0246 and SL1352 were identified to *X. campestris* pv. *vitians* with 54.7% and 65.0% similarities, respectively according to fatty acid analysis.

<sup>b</sup>Vauterin *et al.* (1996).

하였을 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 27가지의 지방산을 가지고 있었다(Table 3). 이중 13-methyltetradecanoic acid의 함량이 23~25%로 가장 높았고, 그다음 *cis*-9-hexadecanoic acid (19~21%), 12-methyltetradecanoic acid(12~15%), *cis*-7-15-methylhexadecanoic acid(5~6%), 15-methylhexadecanoic

acid(4~6%), hexadecanoic acid(4~5%), 9-methyldecanoic acid(4%), 3-hydroxydodecanoic acid(3~4%), 3-hydroxy-11-methyldecanoic acid(3%), 3-hydroxy-9-methyldecanoic acid (2~3%)의 순으로 함유하고 있어, Vauterin 등(1996)의 보고에 의한 *X. campestris*의 지방산 조성 및 함량이 유사하였다. MIDI Library를 통하여 SL0246과 SL1352 균주는 54.7%와 65.0%의 유사도로 *X. campestris* pv. *vitians*로 동정되었다(Table 3).

이상과 같이 본 실험에서 분리한 병원세균 SL0246과 SL1352는 YDC 배지에서 colony 형태, 탄소원 이용 정도, 지방산 조성 및 함량에 근거하여 *Xanthomonas*로, 상추에서 병원성에 근거하여 최종적으로 *X. campestris* pv. *vitians*로 동정하였으며 이 병을 상추의 세균성점무늬병으로 명명할 것을 제안한다.

## 요 약

1997년과 1998년 광주와 광명의 상추 재배 온실에서 새로운 병해가 발견되었다. 처음에는 잎에 병반이 불규칙적이고 작은 연녹색이었다가 점점 커져 지름이 2~5 mm 정도인 수침상의 검은색 병반이 형성되었다. 잎의 아래쪽에서 엽맥을 따라 검은색의 줄무늬 병반이 형성되기도 하고 심해지면 잎이 시들어 말라 죽었다. YDC 배지에서 병원세균을 순수 분리하였을 때 *Xanthomonas*속 세균의 전형적인 특징인 노란색 색소를 띤 세균이 형성되었다. 분리된 세균을  $10^8$  cfu/ml로 현탁한 후 상추의 엽맥에 주사 접종하여 병원성을 확인하였다. 지방산 조성 및 함량과 다양한 탄소원 이용 정도를 이용하여 분리세균 SL0246과 SL1352를 *X. campestris* pv. *vitiensis*로 동정하였으며 이 병을 상추의 세균성점무늬병으로 명명하였다.

## 참고문헌

- Barak, J. D., Koike, S. T. and Gilbertson, R. L. 2001. Role of crop debris and weeds in the epidemiology of bacterial leaf spot of lettuce in California. *Plant Dis.* 85: 169-178.
- Brown, N. A. 1918. Some bacterial diseases of lettuce. *J. Agric. Res.* 13: 367-388.
- 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.
- 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.
- Ohata, K., Tsuchiya, Y. and Shirata, A. 1979. Difference in kinds of pathogenic bacteria causing head rot of lettuce of different cropping types. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 45: 333-338.
- 표현구, 최정일, 이경희. 1996. 채소원예각론. 제13판. 향문사. 398 pp.
- Schaad, N. W., Jones, J. B. and Chun, W. 2001. *Plant Pathogenic Bacteria*. 3rd ed. APS Press, Minnesota, USA. 373 pp.
- Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K. and Swings, J. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 472-489.
- 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.