

## Acidovorax avenae subsp. cattleyae에 의한 팔레놉시스 세균성갈색점무늬병의 발생

한경숙\* · 이승돈<sup>1</sup> · 박종한 · 한유경 · 김대현 · 이종섭

원예특작과학원 원예특작환경과, <sup>1</sup>농촌진흥청 연구조정과

### Incidence of Bacterial Brown Spot of Phalaenopsis Orchids Caused by *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*

Kyung-Sook Han\*, Seung-don Lee<sup>1</sup>, Jong-Han Park, You-Kyoung Han, Dae-Hyun Kim and Jung-Sup Lee

National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA, Suwon 441-440, Korea

<sup>1</sup>Research Policy Bureau, RDA, Suwon 441-707, Korea

(Received on August 11, 2009; Accepted on December 8, 2009)

Leaf spot symptoms were observed in a commercial Phalaenopsis cultivated fields. Circular-elliptical water-soaked spots surrounded by a light green or yellow halo and turned to black when it was severe infection or blacken with gathered symptoms. These spots were finally enlarged to form of larger areas. Under the favorable conditions of temperature and moisture, the infection extended rapidly and dispersed to the crown and sometimes the infected plant became dead. A bacterial organism, isolated from the advancing margins of the lesions, was tested to characterize causing bacterium based on pathogenicity. The biochemical and physiological tests of that bacterium identified that as an *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*. Therefore, we suggested to call that the new Phalaenopsis disease was bacterial brown spot caused by *A.avenae* subsp. *cattleyae* in Korea.

**Keywords :** *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*, Orchid, Phalaenopsis

팔레놉시스(胡蝶蘭; *Phalaenopsis* spp.)는 난과작물로서 국내에서는 2001년부터 재배가 증가하여 현재 재배면적 48 ha, 생산량 10 백만분(농림부, 2008)에 달하는 대표적인 분화작물이다. 팔레놉시스에 발생하는 병으로는 *Dickeya dadantii* (previous name, *Erwinia chryanthimi*)에 의한 무름병과 *Collectotrichum gloeosporioides*에 의한 탄저병, *Fusarium* spp.에 의한 뿌리썩음병이 보고되어 있다(한국 식물병리학회 2004). 2000년대부터 팔레놉시스 재배농가로부터 잎에 수침상 점무늬증상을 형성하는 세균성점무늬병이 발생 하였다. 팔레놉시스 세균성점무늬병은 1911년에 Pavarino에 의해 *Pseudomonas cattleyae*로 처음 보고되었으며, 그 후 1992년 Willems 등에 의해 *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (Pavarino) Willems 등으로 바뀌었다(Stovold 등, 2001). 국내에서는 명 등(2005)에 의해

*Acidovorax*속 발생현황을 조사한 자료에서 팔레놉시스에 *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*에 의한 병이 발생 하는 것으로 조사된 바 있으나 병원균 특성 및 병징에 대한 보고가 미흡하여 본 연구를 통해 팔레놉시스 세균성갈색점 무늬병에 대한 자료를 제공하고자 연구를 수행하였다.

본 연구에서는 팔레놉시스 주요 재배지역인 경기, 부산에서 잎에 노란색 가장자리를 두른 점무늬를 형성하며 수침상으로 썩는 피해증상으로부터 세균을 분리하여 생리생화학적 방법, 병원성 검정을 통하여 동정한 결과를 보고한다.

### 재료 및 방법

**병원균 분리.** 병에 걸린 기주의 잎을 병환부와 건전부의 경계에서 작은 조각을 잘라 1% 차아염소산나트륨 (NaOCl)으로 표면살균한 후 살균수로 2회 씻고 표면 살균한 조각을 1 ml 살균수가 들어있는 Eppendorf tube에

\*Corresponding author

Phone) +82-31-290-6233, Fax) +82-31-290-6259

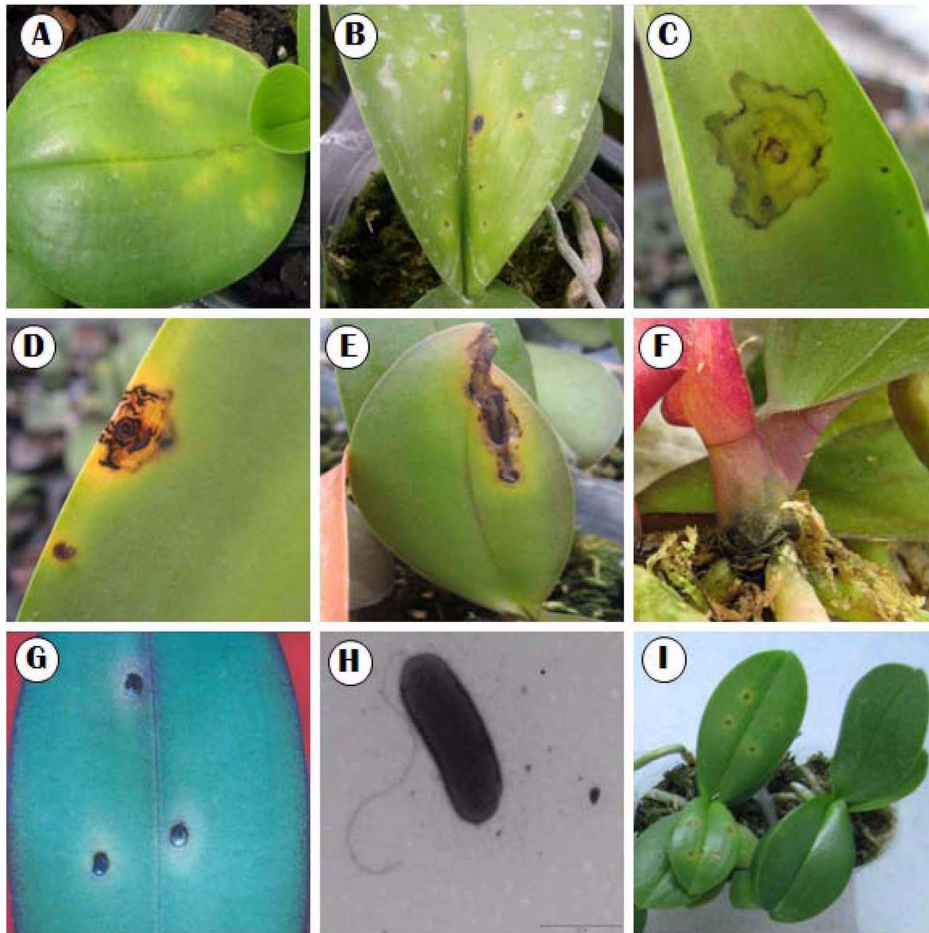
Email) kshan9@rda.go.kr

넣고 1시간 정도 상온에서 방치한 다음 현탁액을 TSA(Tryptic Soy Agar, Merck社) 배지에 도말한 후 28~30°C에 배양하여 단일 콜로니를 순수 분리하였다. 순수분리된 균은 20% 글리세롤액에 현탁하여 -70°C 저온냉동고에 장기보존하고, 계속 사용하는 균은 살균수에 현탁하여 냉장고에 보존하면서 실험에 사용하였다.

**세균 동정.** 분리된 세균은 Schaad 등(2001)의 방법에 따라 생리·생화학적 특성을 조사하였다. 세균의 속명을 동정하기 위하여 그람염색, 호기적 성장, NBY 배지에서 색소형성, KB에서의 형광생성 여부를 조사하였다. 또한 Biolog system을 이용한 동정은 Lee 등(2005)이 보고한 방법에 따라 세균을 TSA 배지에서 48시간 배양 후 GN/GP-IF 용액에서 현탁시켜 GN2 microplate에 분주하고 24시간과 48시간 배양 후 MicroLog Gram-negative database(Version 4.02)를 이용하여 동정하였다. 지방산 분석은 TSA 배지에 streaking 한 후 30°C에서 24시간 배양

된 세균은 4루프 정도의 분량으로 채취하여, 시험관에 옮긴 후 Miller(1982)의 방법에 따라 지방산을 추출하였다. 추출된 시료의 지방산 양상은 MIDI Library version TSBA 5.0과 Library Generation system software version 5.0을 이용하여 분석하였다. 분리한 세균의 형태적 특성을 조사하고자 TSA 배지에서 48시간 배양한 콜로니를 2% phosphotungstic acid로 염색 후 투과전자현미경(TEM, Carl Zeiss)으로 세균의 형태와 크기를 관찰하였다.

**병원성 검정.** 순수 분리된 세균의 병원성 검정을 위해 TSA 배지에서 48시간 배양한 세균을 멸균수에 현탁하여 농도를  $1 \times 10^8$  CFU/ml로 맞춘 다음, 직경 7 cm 크기의 비닐포트에 재배한 팔레놉시스 유묘의 잎에 곤충용 해부침으로 상처를 준 뒤 세균현탁액을 잎 앞면과 뒷면에 충분히 묻도록 분무접종하였다. 접종한 식물체는 습실상(온도 28°C, 상대습도 100%)에서 24시간 둔 후 차광막을 설치한 유리온실에 두고 병징을 관찰하였다.



**Fig. 1.** Symptoms of bacterial brown spot caused by *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* on *Phalenopsis* orchids (A-G). A and B; leaves appeared circular-elliptical spots surrounded by a yellow halo, C; adaxial surface of infected leaves, D; abaxial surface of infected leaves, E; leaves turned blacken with age, F; spots on bulb, G; symptoms stopped by fungicides or under unfavorable environmental conditions, H; Electron micrograph of the causal bacterium, I; spots on leaf by artificial inoculation(right: non-infected plant, left: infected plant).

## 결과 및 고찰

**병징 및 세균분리.** 팔레놉시스 주요 재배지역인 경기, 부산에서 잎에 수침상점무늬를 형성하며 갈색으로 썩는 피해증상으로부터 세균을 분리하였다(Fig. 1A~F). 병징은 기존에 세균병으로 보고된 무름병 증상과 달리 잎에 부정형의 갈색 점무늬 병반을 형성하였다. 점무늬 병반의 가장자리는 선명한 노란색을 띄며(Fig. 1A,B) 잎 뒷면을 햇빛에 비춰볼 때 수침상을 나타내었다(Fig. 1C,D). 병징이 심해지면 수침상 점무늬 병반이 합쳐지면서 잎 전체가 짙은 갈색으로 말라죽었다(Fig. 1E). Stovold 등(2001)도 노란색 halo를 띤 갈색점무늬를 형성하는 것이 본 병의 전형적인 병징이라고 보고한 것과 일치하였다. 그러나 Miller(1990)는 *A.avenae* subsp. *cattleyae*에 의한 병징에 있어 병반이 잎에만 국한되기 때문에 식물체를 통째로 죽게 만들지 않는다고 보고하였으나 실제 농가에서는 별부 부분이 감염되어 다습한 조건에서는 수침상 병반으로 확대되어 식물체 전체가 말라죽는 증상도 관찰할 수 있었다(Fig. 1F).

또한 살균제를 살포하거나 발병에 부적합한 조건에서는 병징의 진행이 멈추면서 수침상 병반이 없어지고 움푹 패인 점무늬(Fig. 1G)만 형성하기도 하였다.

**병원세균의 생리적 특성 조사.** 분리된 세균은 Schaad 등(2001)의 방법에 따라 생리·생화학적 특성을 조사한 결과(Table 1), 세균의 속명을 동정하기 위하여 그람염색, 호기적 생장, NBY 배지에서의 색소형성, KB에서의 형광생성 여부를 조사하였을 때 분리된 병원세균은 노란색 또는 형광색을 발현하지 못하였다.

또한 Biolog system을 이용한 동정에서 분리균주와 Aac 균주에 대한 탄소원 이용여부를 조사한 결과 D-Arabinose, D-Glucose, Fucose, Mannitol, Sorbitol, Ribose, Isobutyrate, Isovalerate, *n*-Caproate, Adipate, Citrate, L-Threonine, L-

Tryptophan는 이용하였으며, D-Xylose, Malonate, 2-Ketogluconate, Aconitate, D-Mannose와 p-Hydroxybenzoate는 이용하지 못하였다. 따라서 팔레놉시스에 발생하는 병징

**Table 2.** Metabolic activities of isolated strain from infected Phanlenopsis plants showing bacterial brown spot

	Present isolates	Aac <sup>a</sup>
D-Arabinose	+ <sup>b</sup>	+
D-Xylose	-	-
D-Glucose	+	+
Fucose	+	+
Mannitol	+	+
Sorbitol	+	+
Malonate	-	-
2-Ketogluconate	-	-
Ribose	+	+
D-Mannose	-	-
Isobutyrate	+	+
Isovalerate	+	+
<i>n</i> -Caproate	+	+
Aconitate	-	-
Adipate	+	+
Citrate	+	+
p-Hydroxybenzoate	-	-
L-Threonine	+	+
L-Tryptophan	+	+

<sup>a</sup>Previous known characteristics of Aac by Willems *et al.* (1992).  
<sup>b</sup>+, positive, -, negative.

**Table 3.** Fatty acid profiles of bacterial isolates from infected Phanlenopsis bacterial brown spot

Fatty acids	Systemetic name	Present isolates	Aac <sup>a</sup>
10:0	Decanoic acid	0.4 ± 0.0	tr <sup>b</sup>
10:0 3OH	3-Hydroxydecanoic acid	4.3 ± 0.3	3.7 ± 0.2
12:0	Dodecanic acid	2.9 ± 0.0	2.3 ± 0.1
12:1 3OH	3-Hydroxydecanoic acid	1.4 ± 0.4	0.6 ± 0.1
12:0 3OH	3-Hydroxydodecanoic acid	0.6 ± 0.1	tr
14:0	Tetradecanoic acid	2.1 ± 0.1	1.7 ± 0.1
15:0	Pentadecanoic acid	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.1
16:1 <i>cis</i> 9	<i>cis</i> -9-Hexadecanoic acid	41.4 ± 0.3	40.6 ± 0.3
16:0	Hexadecanoic acid	32.0 ± 0.1	34.9 ± 0.4
17:0 cyclo	<i>cis</i> -9,10-Methylene hexadecanoic acid	0.4 ± 0.0	0.5 ± 0.2
17:0	Heptadecanoic acid	0.3 ± 0.0	0.2 ± 0.2
18:1 <i>cis</i> 11	<i>cis</i> -11-Octadecanoic acid	12.7 ± 0.5	14.4 ± 0.6
18:0	Octadecanoic acid	0.6 ± 0.1	0.2 ± 0.2

<sup>a</sup>Previous known characteristics of Aac by Stead (1992).  
<sup>b</sup>tr, trace amounts are present in same strains.

**Table 1.** Bacteriological characteristics of isolated strain from infected Phanlenopsis plants showing bacterial brown spot

Characteristics	Present isolates	Aac <sup>a</sup>
Gram reaction	- <sup>b</sup>	-
Fluorescent pigment on KB	-	-
Levan production	-	-
Oxidase	+	+
Gelatin hydolysys	-	-
Nitrate reduction	+	+
Hypersensitive response	+	+

<sup>a</sup>Previous known characteristics of Aac by Willems *et al.*(1992).  
<sup>b</sup>+, positive, -, negative.

으로부터 분리된 세균은 Willems 등(1992)이 기술한 *A. avenae* subsp. *cattleyae*와 일치함을 알 수 있었다(Table 2).

분리세균의 지방산 분석한 결과는 Table 3과 같이 분리세균은 Decanoic acid(10:0) 등 모두 13가지의 지방산을 가지고 있었으며, Stead(1992)가 보고한 결과와 비교할 때 Decanoic acid(10:0)와 3-Hydroxydodecanoic acid(12:0 3OH)이 각각 0.4, 0.6%로 낮은 수치지만 추가로 분석되었다. *cis*-9-Hexadecanoic acid(16:1 *cis* 9)의 함량이 41.4%로 가장 높았고, 그 다음 Hexadecanoic acid(16:0)도 32.0%로 높게 조사되었다. *cis*-11-Octadecanoic acid(18:1 *cis* 11) 12.7%, 3-Hydroxydecanoic acid(10:0 3OH) 4.3%, Dodecanoic acid(12:0) 2.9%, Tetradecanoic acid(14:0) 2.1%의 순으로 함유하고 있어, Stead(1992)의 보고에 의한 *Pseudomonas cattleyae*의 지방산 조성과 함량이 유사하였다. 또한 분리한 세균의 형태를 투과전자현미경으로 조사한 결과, 1개의 단극모를 가진 간균이었으며, 크기가 약 0.5~0.8 $\mu$ m 1.5~3.0  $\mu$ m였다(Fig. 1H).

**병원성 검정.** 팔레놉시스 잎에 침으로 상처를 주고 세균현탁액을 분무접종한 잎에서는 접종 24시간 후부터 상처부위에서 수침상을 띤 황색 점무늬 병반을 보이기 시작하며 점차 갈색의 점무늬로 진전되었다. 상처를 주지 않고 세균현탁액을 접종한 잎에서는 별다른 병징을 보이지 않았다(Fig. 1I). 그러나 식물체 전체에 병원균을 분무접종한 결과 간혹 잎자루나 벌브 부위에서 수침상 병반이 형성되며 병반이 진전되는 경우도 관찰되기도 하였다. 이것은 인위적으로 상처를 주지 않았음에도 식물체의 상처부위를 통해 감염이 이루어진 것으로 판단되었다. 이처럼 상처의 유무에 따른 병원성 차이를 보이는 것은 Divinagracia 등(1984)과 Stovold 등(2001)에 의한 병원성 검정결과에서도 상처를 주었을 때만 병징이 나타난다는 보고와 일치하였다. Divinagracia 등(1984)은 팔레놉시스 뿐 아니라 다양한 난과식물에 병원성을 검정한 결과에 의하면 팔레놉시스 원종(*Phalenopsis equestris*)과 반다(*Vanda lamellata*)에서만 병원성을 나타낸다고 보고하였으나 최근에는 덴드로비움속도 발생하는 것으로 보고되고 있다(Scortichini, 2005).

이상과 같이 본 실험에서 분리한 병원세균을 콜로니 형태, 탄소원 이용정도, 지방산 조성 및 함량 등 생리생화학 실험에 근거하고, 전자현미경 관찰 및 병원성 실험을 종합한 결과 *A. avenae* subsp. *cattleyae*로 동정하였으며, 이 병을 팔레놉시스 세균성갈색점무늬병으로 명명할 것을 제안한다.

## 요 약

팔레놉시스 주요 재배지역인 경기, 부산에서 잎에 점무늬를 형성하며 병반의 가장자리는 선명한 노란색을 띄며, 잎 뒷면을 햇빛에 비취볼 때 수침상을 나타내었고 병징이 심해지면 수침상 점무늬 병반이 합쳐지면서 잎 전체가 짙은 갈색으로 말라죽었다. 팔레놉시스 잎의 병반부로부터 세균을 분리하여 생리생화학적 방법, 병원성 시험 결과 *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*로 동정하였으며 이 병을 팔레놉시스 세균성갈색점무늬병으로 명명하였다.

## 참고문헌

- Divinagracia, G. G., Candole, B. L. and Cadapan, E. T. 1984. Some studies on bacterial brown spot of orchids caused by *Pseudomonas cattleyae* (Pavarino) Saverlesco. *Philippine Phytopathology* 20: 3-4.
- 한국식물병리학회. 2004. 한국식물병명목록. 제4판. 한국식물병리학회. 779 pp.
- 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.
- Miller, J. W. 1990. Bacterial brown spot of orchid caused by *Pseudomonas cattleyae*. *Plant Pathology circular* No.330.
- 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.
- 명인식, 이영기, 홍성기. 2005. 농업과학기술원 보고서(농업생물부편). 13-29 pp.
- 농림부. 2008년 화훼재배현황, 106 pp.
- Schaad, N. W., Jones, J. B. and Chun, W. 2001. *Plant Pathogenic Bacteria*. 3rd ed. APS Press, Minnesota, USA. 373 pp.
- Scortichini, M. D., Ascenzo, D. and Rossi, M. P. 2005. New record of *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* on orchid in Italy. *Journal of Plant Pathology* 87: 244.
- Stead, D. E. 1992. Grouping of plant-pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. by using cellular fatty acid profiles. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 281-295.
- Stovold, G. E., Bradley, J. and Fahy, P. C. 2001. *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (*Pseudomonas cattleyae*) causing leafspot and death of *Phalenopsis* orchids in New South Wales. *Australasian Plant Pathology* 30: 73-74.
- Willems, A., Goor, M., Thielemans, S., Gillis, M., Kersters, K. and De Ley, J. 1992. Transfer of several phytopathogenic *Pseudomonas* species to *Acidovorax* as *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* subsp. nov., comb. nov., *Acidovorax avenae* subsp. *citulli*, *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*, and *Acidovorax konjaci*. *IJSB.* 42: 107-119.