

***Xanthomonas campestris* pv. *sesami*에 의한 참깨의 세균성잎마름병**

이승돈* · 이정희 · 김용기 · 허성기 · 나동수

농업과학기술원 식물병리과

Bacterial Blight of Sesame Caused by *Xanthomonas campestris* pv. *sesami*

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

Plant Pathology Division, National Institute of Agricultural Science and Technology,

Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea

(Received on November 8, 2005)

A new bacterial disease of sesame (*Sesamum indicum*) was observed on field-grown plants in Suwon, Hongchun and Yeonchun in 2000. Leaf symptoms initially appeared as water-soaked spots that gradually enlarged, became necrotic, and were often bordered by a small zone of lemon yellow tissue. In the case of severe infection, dead leaves were defoliated. 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 sesame plants sprayed with bacterial suspensions containing 10^8 cfu/ml of phosphate buffered saline. The Biolog and fatty acid analyses of the two strains (SL3451 and SL3476) from sesame leaf blight showed that they could be identified as *X. campestris* pv. *sesami* because of their high similarity to the tester strain (*X. campestris* pv. *sesami* LMG865) with a match probability of 100%. The bacterium grew well between 18 and 36°C, but optimum temperature was 27°C on LB broth. This is the first report of bacterial blight of sesame in Korea. Symptoms of bacterial blight of sesame are difficult to differentiated with those of bacterial leaf spot caused by *Pseudomonas syringae* pv. *sesami*.

Keywords : Bacterial blight, *Sesamum indicum*, *Xanthomonas campestris* pv. *sesami*

참깨 (*Sesamum indicum* L.)는 참깨과(Pedaliaceae)의 한해살이풀로서 종자에 45~55%의 기름이 들어있고 22% 내외의 단백질이 들어 있어 각종 식품과 조미료로 이용하는데, 특히 아시아 요리에 많이 쓰인다. 참깨의 원산지는 학자에 따라 인도, 아프리카, 수단, 중앙아시아, 말레이시아 등 여러 가지 원산지설이 있었으나 현재는 30여종의 참깨 야생종의 일부가 아프리카에서 발견된 점을 근거로 아프리카 사반나 지대를 원산지로 보고 있다. 국내의 참깨 전래는 확실치 않으나 일본 문헌에 백제로부터 참깨가 도입되었다는 기록으로 보아 삼국시대 이전부터 재배되어 온 것만은 확실하다(강, 2004).

1981년 이후 국내 재배면적이 증가하기 시작하여 1987

년 94천ha까지 재배되었으나 농촌인력의 노령화, 노동력 부족 등으로 점차 감소하여 1995년에는 50천ha선에서 정체되고 있다(강, 2004).

참깨에는 잎마름병(leaf blight), 검은무늬병(*Alternaria* leaf blight), 점무늬병(leaf spot), 흰비단병(southern blight), 시들음병(wilt), 역병(*Phytophthora* blight), 흰가루병(powdery mildew), 질륙병(damping-off), 세균성점무늬병(bacterial leaf spot), 꽃마름병(bacterial wilt) 등이 국내에 보고되어 있다(한국식물병리학회, 2004). 인도, 파키스탄, 수단 등 참깨의 원산지에서는 이외에 *Xanthomonas campestris* pv. *sesami*에 의한 세균성잎마름병(bacterial leaf blight)이 보고되어 있다(Abdel-Rahim과 Adam, 1990; Phookan과 Hazarika, 1993). 저자 등은 2000년 수원, 홍천, 연천의 참깨 포장에서 채집된 감염 잎을 실험실에서 병원세균을 순수 분리할 때 King's B(KB) 배지에서 *Pseudomonas*가 아닌 노란색의 집락(colony)이 생겨 기존의 병이 아닌 새로

*Corresponding author

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

E-mail) sdlee@rda.go.kr

은 병해로 인식하여 병원성을 검정하고 생리생화학적 특성을 분석하여 참깨 세균성잎마름병균을 동정하였다.

재료 및 방법

병원세균의 분리. 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 KB 배지와 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.

병원성 검정. KB 배지에서 분리된 *P. syringae* pv. *sesami*와 YDC 배지에서 분리된 노란색을 띠는 세균을 두 가지 방법으로 병원성을 검정하였다. 첫째, 고체배지에서 48시간 배양한 세균을 PBS(phosphate buffered saline, pH 6.8)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 참깨(*S. indicum* cv. 양백)의 잎에 분무 접종하여 검정하였다. 1주당 세균 현탁액을 10 ml씩 분무 접종한 후 습실상(온도, 25°C; 상대습도, 100%)에서 24시간 배양 후 온실로 옮겼다. 온실 조건은 자연광 아래에서 온도를 24~30°C로 유지하였다.

병원세균의 생리·생화학적 특성 조사. 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 조사하였다.

Biology system을 이용한 동정은 다음과 같이 수행하였다. 세균을 Bacto™ Tryptic Soy Broth Agar(TSBA, BD211825) 배지에 접종하여 28~30°C에서 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 3×10^8 cfu/ml 농도로 현탁시킨 후 각각 GN2 microplate(BIOLOG GN2 MicroPlate™)의 96 well에 eight-channel pipette으로 150 µl씩 분주하여 28~30°C에서 배양하였다. 배양 후 24시간과 48시간에 MicroLog™ 3-Automated Microstation system을 이용하여 탄소원 이용

여부를 조사하고, MicroLog Gram-negative database (Version 4.02)와 연결하여 동정하였다.

병원세균의 지방산 분석. 지방산 분석은 Miller(1982)의 방법에 준했다. 각 균주를 TSBA 배지에 접종한 후 28°C에서 48시간 배양하였다. 배양된 세균을 loop를 이용하여 성냥 알 4개 정도의 분량을 채취하여 Teflon-lined screw cap이 있는 13×100 mm 크기의 시험관에 옮겼다. 시약 I(saponification reagent; NaOH 45 g, methanol 150 ml, 증류수 150 ml)를 1 ml씩 시험관에 첨가하여 vortex한 다음 100°C에서 5분간 반응시켰다. 다시 vortex하여 완전히 혼합시킨 다음 100°C에서 25분간 반응시켰다. 찬물에 담가 빨리 식히고 시약 II(methylation reagent; 6N HCl 325 ml, methanol 275 ml)를 2 ml씩 첨가하여 vortex한 다음 80°C에서 10분간 반응시켰다. 찬물에 담가 빨리 식힌 다음 시약 III(extraction solvent; hexane 200ml, tertiary butyl methyl ether 200 ml) 1.25 ml씩 첨가하고 orbital shaker를 이용해 10분 동안 부드럽게 혼합시켰다. 정체를 키킨 다음 아래층 부분을 pasteur pipette를 이용해 제거하고, 시약 IV(base wash; NaOH 10.8 g, 증류수 900 ml) 3 ml씩 첨가하여 5분 동안 부드럽게 섞이도록 하였다. 완전 포화된 NaCl 용액을 1 ml씩 첨가하여 부드럽게 섞어준 후 층이 완전히 분리될 때까지 방치하였다. 완전히 층이 분리되면 아래층액이 섞이지 않도록 조심스럽게 상층액을 GC vial로 옮겼다. 지방산 양상은 MIDI Library version, TSBA 5.0과 Library Generation system software version 5.0을 이용하여 분석하였다.

병원세균의 생장에 미치는 온도. 병원세균의 생장에 미치는 온도의 영향을 알아보기 위하여 TSB 배지에서 12시간 배양한 preculture를 10 ml TSB에 접종한 후 4~45°C 사이의 온도 구배를 준 Temperature gradient incubator, Bio-photorecoder(Advantec TN-2612)에서 48시간 동안 배양하면서 5분 간격으로 세균의 농도를 측정하였다.

결과 및 고찰

병징. 포장에서 참깨의 세균성잎마름병은 6월경 아래 잎에 작은 점무늬를 형성함으로 시작된다. 초기에는 작은 점무늬를 형성하는데 잎 뒷면을 보면 점무늬 증상 주위로 짙은 수침상 증상을 볼 수 있다(Fig. 1A, B). 이 점무늬는 점점 커져 주위의 점무늬와 합쳐져 커다란 병반을 형성한다. 병반 주위로 노란색의 테두리가 형성되며 심한 경우 감염된 잎은 떨어진다(Fig. 1C). *P. syringae* pv. *sesami*에 의한 세균성점무늬병의 병징도 세균성잎마름병과 유사하게 잎에 점무늬를 형성하다가 심해지면 잎 전체가 괴



Fig. 1. Symptoms of bacterial blight caused by *Xanthomonas campestris* pv. *sesami* on sesame. **A and B:** leaf spots on infected leaves, **C:** symptoms in the field, **D and E:** spots or blight on front surface (**D**) and back surface (**E**) of infected leaves by artificial spray inoculation, **F and G:** symptoms of bacterial spot caused by *Pseudomonas syringae* pv. *sesami*, **H:** spots on infected leaves by artificial spray inoculation with *P. syringae* pv. *sesami*, **I:** mixed symptoms with *X. campestris* pv. *sesami* and *P. syringae* pv. *sesami* in the field, **J:** colonies of *X. campestris* pv. *sesami* SL3476 on YDC medium.

사되는 증상을 나타내어 두 가지 병의 구별은 매우 어려웠다(Fig. 1F, G). 또한 하나의 병든 잎에서 병원세균을 분리할 때 *Xanthomonas*와 *Pseudomonas* 두 가지 병원세균이 동시에 분리되기도 하였다(Fig. 1I).

병원성 검정. 분리된 세균 SL3451과 SL3476을 담배와 토마토에서 과민성 반응을 조사하였을 때 토마토에서는 24시간 내에 접종 부위에 괴사가 일어났으나 담배에서는 일어나지 않았다(Table 1). 3주 동안 자란 참깨 잎에 분리세균 SL3451과 SL3476과 *P. syringae* pv. *sesami*를 분무 접종하였을 때 두가지 병원세균 모두 7일째 작은 수침상의 점무늬 병징이 나타나기 시작하다가 점점 병

반이 커져 주위의 병반과 합쳐지는 잎마름병 증상을 보였다(Fig. 1D, E, H). 병징이 나타난 후 10일째 감염된 잎은 떨어지기 시작하였다.

병원세균의 생리·생화학적 특성. *Pseudomonas*속 병원세균은 YDC배지에서 흰색의 콜로니를 형성하고 KB배지에서 형광색소를 형성하는데 비해 분리된 병원세균 SL3451과 SL3476은 YDC 배지에서 전형적인 *Xanthomonas*속 세균의 특징인 노란색의 색소를 형성하였다(Fig. 1J). 또한 그람음성세균이며, 호기성 성장을 하였다(Table 1).

Biolog System을 이용하여 SL3451과 SL3476은 *X. campestris* pv. *sesami* LMG865와 마찬가지로 Acetate, *cis*-Aconitate, L-Alanine, L-Aspartate, Bromo succinate, Cellobiose, Citrate, Dextrin, D-Fructose, L-Fucose, D-Galactose, D-Glucose, L-Glutamate, Glycerol, Ketoglutarate, Lactulose L-leucine, Maltose, D-Mannose, D-Melibiose, Monomethylsuccinate, L-Proline, Succinate, Sucrose, D-Trehalose, L-Threonine을 이용하고 2-Amino ethanol, Adonitol, L-Arabinose, D-Arabitol, i-Erythritol, D-Gluconate, m-Inositol, D-Lactose, D-Mannitol, β -methyl glucoside, L-Ornithine, Quinate, L-Rhamnose, L-Serine, D-Sorbitol, Xylitol은 이용하지 못하였다(Table 2). 그 외 L-Asparagine, L-Histidine, α -Hydroxybutyrate, β -Hydroxybutyrate, D-

Table 1. Bacteriological characteristics of bacterial isolates (SL3451 and SL3476) from sesame bacterial blight and a reference strain *X. campestris* pv. *sesami* LMG865

Characteristics	SL3451	SL3476	LMG865
Gram reaction	- ^a	-	-
Anaerobic growth	-	-	-
Yellow colonies on YDC	+	+	+
Hypersensitive response on tobacco	-	-	-
on tomato	+	+	+
Pathogenicity on sesame	+	+	v

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

Table 2. Metabolic activities of bacterial isolates (SL3451 and SL3476) from sesame bacterial blight and a reference strain *Xanthomonas campestris* pv. *sesami* LMG865 in the Biolog GN2 microplate assay

Substrate	SL3451	SL3476	LMG865	Substrate	SL3451	SL3476	LMG865
2-Amino ethanol	-	-	-	D-Lactate	v	+	+
Acetate	+	+	+	D-Lactose	v	-	-
Adonitol	-	-	-	Lactulose	+	+	+
cis-Aconitate	+	+	+	L-leucine	+	+	v
L-Alanine	+	+	+	Malonate	+	+	v
L-Arabinose	-	-	-	Maltose	+	+	+
D-Arabitol	-	-	-	D-Mannitol	-	-	-
L-Asparagine	-	+	-	D-Mannose	+	+	+
L-Aspartate	+	+	v	D-Melibiose	+	+	+
Bromo succinate	+	+	+	Monomethylsuccinate	+	+	+
Cellobiose	+	+	+	β-methyl glucoside	-	-	v
Citrate	+	+	+	L-Ornithine	-	-	-
Dextrin	+	+	+	L-Proline	+	+	+
I-Erythritol	-	-	-	Propionate	+	+	v
D-Fructose	+	+	+	D-psicose	v	+	v
L-Fucose	+	+	+	Quinate	-	-	-
D-Galactose	+	+	+	D-Raffinose	v	+	v
D-Glucose	+	+	+	L-Rhamnose	-	-	-
D-Gluconate	-	-	-	L-Serine	-	-	-
L-Glutamate	+	+	+	D-Sorbitol	-	-	-
Glycerol	+	+	+	Succinamic acid	v	+	v
L-Histidine	v	+	-	Succinate	+	+	+
α-Hydroxybutyrate	+	+	v	Sucrose	+	+	+
β-Hydroxybutyrate	-	+	v	D-Trehalose	+	+	+
M-Inositol	-	-	-	L-Threonine	+	+	+
Ketoglutarate	+	+	+	Xylitol	-	-	-

+: positive, -: negative, v: variable.

Lactate, Malonate, Propionate, D-psicose, D-Raffinose, Succinamic acid는 균주에 따라 24시간 배양시 약간의 차이는 있었으나 48시간 배양시 거의 같은 이용 형태를 보였다. 위의 Biolog system을 이용한 탄소원의 이용 정도는 Hildebrand 등(1993)이 보고한 *Xanthomonas campestris*의 탄소원 이용 정도와 매우 유사하였다.

병원세균의 지방산 조성. 분리세균 SL3451, SL3476과 *X. campestris* pv. *sesami* LMG865는 9-methyldecanoic acid(11:0 ISO), 13-methyltetradecanoic acid(15:0 ISO), 12-methyltetradecanoic acid(15:0 ANTEISO) 등의 saturated branched-chain fatty acid, hexadecanoic acid(16:0)등의 saturated straight-chain fatty acid, *cis*-9-hexadecanoic acid(16:1w7c), *cis*-7-15-methylhexadecanoic acid(ISO 17:1w9c) 등의 cyclopropane acid, 3-hydroxy-9-methyldecanoic acid(11:0 ISO 3OH), 3-hydroxydodecanoic acid(12:0 3OH)의

hydroxy acid 등 30가지의 지방산을 가지고 있었다(Table 3). 이중 13-methyltetradecanoic acid의 함량이 23~27%로 가장 높았고, 그다음 *cis*-9-hexadecanoic acid(12~16%), 12-methyltetradecanoic acid(10~14%), 9-methyldecanoic acid(5~6%), 15-methylhexadecanoic acid(4~5%), 3-hydroxy-9-methyldecanoic acid(3~5%)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.

병원세균의 생장에 미치는 온도. 분리된 병원세균 SL3476은 5°C와 40°C 이상에서는 성장하지 않았으나, 11°C와 36°C에서 약간의 성장을 하였고, 18~36°C에서 생장이

Table 3. Fatty acid profiles of the bacterial isolates (SL3451 and SL3476) from sesame bacterial blight and a reference strain *Xanthomonas campestris* pv. *sesami* LMG865

Shorthand name	Systematic name	Percent of fatty acid		
		SL3451	SL3476	LMG865
Unknown 9.531		0.56	0.42	0.46
10:0	decanoic acid	0.74	1.20	1.03
11:0 ISO	9-methyldecanoic acid	6.06	4.87	5.12
11:0 ANTEISO	8-methyldecanoic acid	0.26	0.24	0.25
10:0 3OH	3-hydroxydecanoic acid	0.25	0.41	0.38
Unknown 11.799		1.82	1.83	1.92
11:0 ISO 3OH	3-hydroxy-9-methyldecanoic acid	2.93	2.80	3.36
11:0 3OH	3-hydroxyundecanoic acid	0.30	0.53	0.56
13:0 ISO	11-methyldodecanoic acid	0.41	0.28	0.31
12:0 ISO 3OH	3-hydroxy-10-methylundecanoic acid	0.60	0.41	0.45
12:0 3OH	3-hydroxydodecanoic acid	2.47	3.77	3.70
14:0 ISO	12-methyltridecanoic acid	0.95	0.82	0.72
14:0	tetradecanoic acid	0.83	1.50	1.14
13:0 ISO 3OH	3-hydroxy-11-methyldodecanoic acid	4.96	3.50	4.50
13:0 2OH	2-hydroxytridecanoic acid	0.59	0.68	0.81
15:1 ISO F	13-methyltetradecanoic acid isomer F	0.56	0.24	0.23
15:0 ISO	13-methyltetradecanoic acid	27.07	23.44	23.26
15:0 ANTEISO	12-methyltetradecanoic acid	9.97	13.81	13.97
15:1w6c	<i>cis</i> -9-pentadecanoic acid	0.46	0.60	0.61
15:0	pentadecanoic acid	0.83	1.74	1.51
16:0 ISO	14-methylpentadecanoic acid	3.99	2.72	2.53
16:1w9c	<i>cis</i> -7-hexadecanoic acid	1.25	2.05	1.82
16:1w7c	<i>cis</i> -9-hexadecanoic acid	11.97	15.59	14.09
16:0	hexadecanoic acid	2.96	5.73	4.36
ISO 17:1w9c	<i>cis</i> -7-15-methylhexadecanoic acid	8.45	2.59	3.36
17:0 ISO	15-methylhexadecanoic acid	4.45	3.83	4.46
17:0 ANTEISO	14-methylhexadecanoic acid	0.39	0.40	0.51
17:1w8c	<i>cis</i> -9-heptadecanoic acid	0.96	1.39	1.57
18:1w9c	<i>cis</i> -9-octadecanoic acid	0.34	0.34	0.40
18:1w7c	<i>cis</i> -11-octadecanoic acid	0.39	0.23	0.31

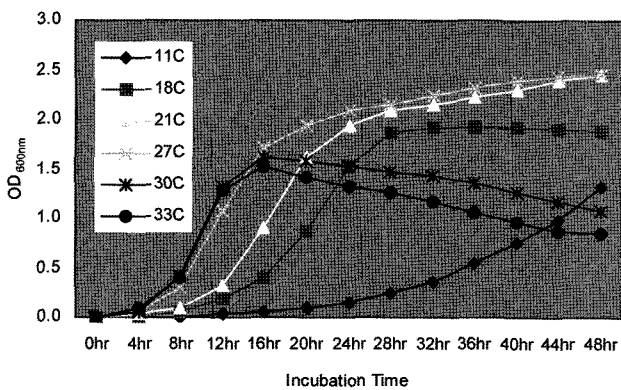


Fig. 2. Effect of temperature on growth of *Xanthomonas campestris* pv. *sesami* SL3476 on LB broth.

양호하였으며, 27°C에서 가장 우수하였다(Fig. 2).

이상과 같이 본 실험에서 분리한 병원세균 SL3451과 SL3476은 YDC 배지에서의 colony 형태, 탄소원 이용정도, 지방산 조성 및 함량에 근거하여 *Xanthomonas campestris*로, 최종적으로 참깨에서의 병원성에 근거하여 *X. campestris* pv. *sesami*로 동정하였으며 이 병을 참깨의 세균성잎마름병으로 명명하여, *P. syringae* pv. *sesami*에 의한 세균성점무늬병과 구별할 것을 제안한다.

요 약

2000년 수원, 홍천, 연천 지역의 참깨 포장에서 새로운

병해가 발견되었다. 처음에는 잎에 수침상의 작은 점무늬를 형성하다가 점점 커져 괴사가 일어나고 주위로 황화되었다. 심하게 감염된 경우는 병든 잎은 떨어졌다. 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 참깨 잎에 분무 접종하였을 때 처음과 같은 증상이 재현되었다. 분리된 세균은 대조균주 *X. campestris* pv. *sesami* LMG865와 지방산 조성 및 다양한 탄소원 이용 정도를 이용하여 비교하였을 때 100%의 가능성으로 *X. campestris* pv. *sesami*로 동정되었다. 분리된 병원균은 18~36°C에서 생장이 양호하였으며, 27°C에서 가장 우수하였다. 이 보고는 국내에서 참깨의 세균성잎마름병 최초 보고이며, *P. syringae* pv. *sesami*에 의한 세균성점무늬병과 외부적인 병징으로 구별하기가 매우 어렵다.

참고문헌

- Abdel-Rahim, A. M. and Adam, F. S. 1990. Some etiological characteristics of *Xanthomonas campestris* pv. *sesami* and disease reaction of different sesame cultivars. *J. Phytopathol.* 129: 165-169.
- 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.
- 강철환. 2004. 참깨의 특성. 농촌진흥청 homepage(<http://www.rda.go.kr>), 농업과학기술대전.
- 한국식물병리학회. 2004. 한국식물병목록, 제4판. 779 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.
- Phookan, A. K. and Hazarika, R. 1993. Damping-off of sesmae caused by *Xanthomonas campestris* pv. *sesami* in Assam. *Indian Phytopathol.* 46: 249-250.
- 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.