

***Xanthomonas hortorum* pv. *hederae*에 의한 헤데라 세균성점무늬병**이승돈\* · 이정희 · 한경숙<sup>1</sup> · 서상태<sup>1</sup> · 김용기 · 허성기 · 나동수농업과학기술원 식물병리과, <sup>1</sup>원예연구소 원예환경과**Bacterial Leaf Spot of English Ivy Caused by  
*Xanthomonas hortorum* pv. *hederae***Seungdon Lee\*, Junghee Lee, Kyoung-Suk Han<sup>1</sup>, Sang-Tae Seo<sup>1</sup>, Yong-Ki Kim,  
Sunggi Heu and Dong-Soo Ra

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

<sup>1</sup>Horticultural Environment Division, National Horticultural Research Institute, Suwon 440-706, Korea

(Received on July 9, 2006)

English ivy (*Hedera helix*) in Araliaceae family is an evergreen climbing vine. A severe bacterial disease of English ivy was observed and investigated in January 2005. Initial symptoms on the leaves appeared as small water-soaked lesions on the lower surface. As the spots enlarged, the center became brown to brownish black and greenish-brown water-soaked, irregular margins surrounded the center. The spots developed into large irregular blotches, sometimes 5~10 mm in diameter, then coalesced. Finally, the water-soaked margins raised, dried out, became corky and broke in the center. A bacterial organism, isolated from the advancing margins of the lesions, was tested for its pathogenicity according to the Koch's postulates and biochemical and physiological tests identified the isolated bacterium as a *Xanthomonas*. The representative *Xanthomonas* strains (SL4821 and SL4822) isolated from English ivy were compared with a reference strain *X. hortorum* pv. *hederae* for fatty acid profiles, metabolic fingerprints and 16s rDNA sequences, showing that all outcomes were indistinguishable between the representative and reference strains. This is the first report of bacterial leaf spot of English ivy in Korea.

**Keywords :** Bacterial leaf spot, *Hedera helix*, *Xanthomonas hortorum* pv. *hederae*

헤데라(*Hedera* spp.)는 두릅나무과(Araliaceae)의 상록성 덩굴식물로 우리나라에는 송악(*H. rhombea*)이라 하여 제주도와 울릉도에서 자생한다. 아이비의 전통적인 이름으로 일반적으로 'English ivy(*H. helix*)'라고 불리는 헤데라는 유럽, 북아프리카, 서아시아 원산으로 어린잎은 3~5개로 얇게 갈라지고 5~8 cm 정도 크기로 자라며, 큰 잎은 타원형 내지 난형이다. 내한성이 좋고 벤젠, 포름알데히드 등의 휘발성물질을 제거하는데 효과적이기 때문에 실내 조경식물로 인기가 높다. 육성된 품종은 대부분 돌연변이종으로 'Glacier', 'Albany Variegata', 'Discolor' 등이 재배되고 있다. 카나리제도, 마테이라 제도, 북아메리카 원산인 'Algerian ivy(*H. canariensis*)'도 잎이 크고 내한성

이 매우 높은 종류로 몇 가지 품종이 재배되고 있다(김, 2006).

헤데라에는 *Botrytis cinerea*에 의한 잿빛곰팡이병(gray mold)과 *Colletotrichum trichellum*에 의한 탄저병(anthrachnose) 두 종류가 국내에 보고되어 있다(한국식물병리학회, 2004). *Xanthomonas campestris* pv. *hederae*에 의한 헤데라의 세균성점무늬병은 1920년에 프랑스에서 처음 보고되었으며, 그 후 영국, 미국, 뉴질랜드, 일본 등에서 보고되었다(Chase, 1987; Suzuki 등, 2002). Vauterin 등(1995)에 의하여 병원균 학명이 *X. campestris* pv. *hederae*에서 *X. hortorum* pv. *hederae*로 바뀌었다.

저자 등은 2005년 용인의 헤데라 재배 온실에서 특이한 병반이 발견되어 원인을 구명하고자 하였다(Fig. 1). 병에 걸린 기주의 잎의 병환부와 건전부의 경계에서 작은 조각을 잘라 1% 차아염소산나트륨(NaOCl)으로 표면

\*Corresponding author

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

E-mail) sdlee@rda.go.kr

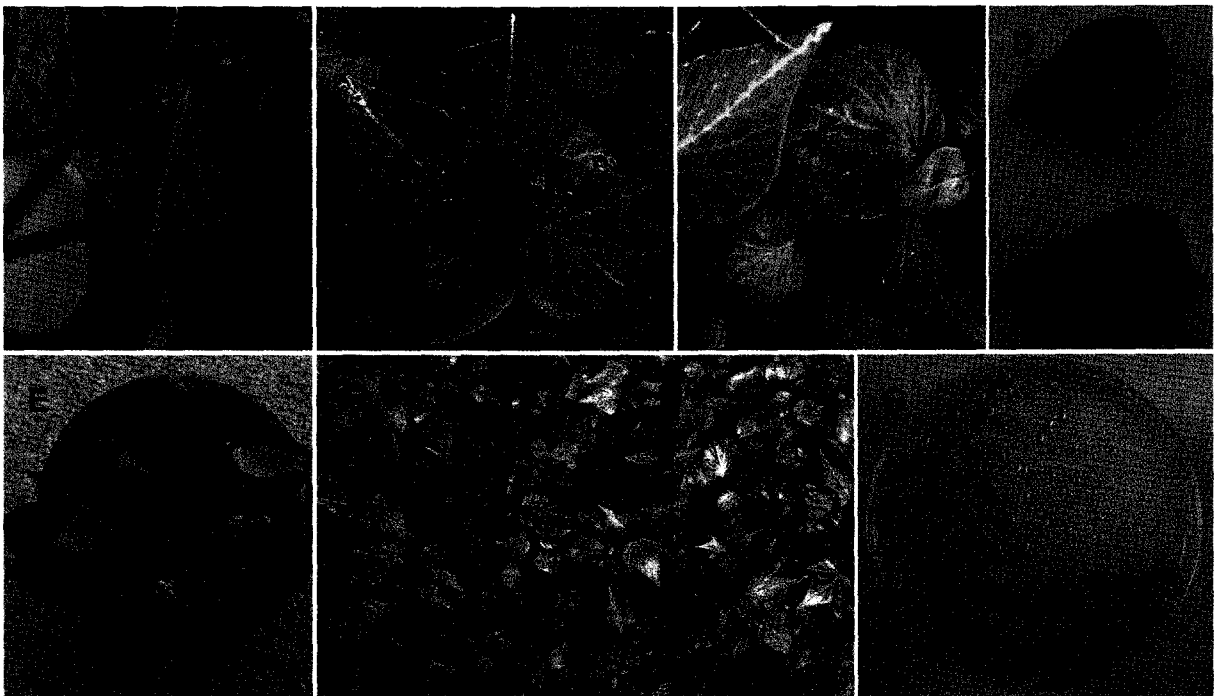


Fig. 1. Symptoms of bacterial leaf spot caused by *Xanthomonas hortorum* pv. *hederae* on English Ivy. A and B: spots on infected leaves, C and E: blight symptoms after the spots were developed, F: symptoms on leaves in farmer's greenhouse, D: spots or blight on leaves by artificial inoculation, G: colonies of *X. hortorum* pv. *hederae* SL4821 on YDC medium.

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  $1 \times 10^8$  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 헤데라의 잎 뒷면에 접종한 후 습실상(온도, 25°C; 상대습도, 100%)에서 24시간 배양 후 온실로 옮겼다. 온실 조건은 자연광 아래에서 온도를 24~30°C로 유지하였다. 공시된 SL4821과 SL4822 세균은 토마토에서는 과민성 반응을 보였으나, 담배에서는 아무런 반응이 없었다. 주사 접종한 헤데라 잎에서는 접종 1주일 후

Table 1. Bacteriological characteristics of bacterial isolates (SL4821 and SL4822) from English Ivy bacterial leaf spot and *Xanthomonas hortorum*

Characteristics	SL4821	SL4822	<i>Xh</i> <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 English Ivy	+	+	

<sup>a</sup>Hilderbrand *et al.* (1993).

<sup>b</sup>+, positive; -, negative.

에 수침상을 띤 점무늬 병반이 보이기 시작하여 점점 진행되어 잎이 떨어졌다(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 SL4821과 SL4822 모두 YDC 배지에서 전형적인 *Xanthomonas*속 세균의 특징인 노란색의 색소를 형성하였다. 또한 그람음성세균이며, 호기성 성장을 하였으며, MS

배지에서는 자라지 못했다(Fig. 1과 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  $\mu$ l씩 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 SL4821과 SL4822는 Vauterin 등 (1995)이 보고한 것과 비슷하게 L-Alanine, Bromo succinate, Cellobiose, Dextrin, D-Fructose, L-Fucose, D-Galactose,

D-Glucose, L-Glutamate, Ketoglutarate, Lactate, D-Mannose, D-Melibiose, Monomethylsuccinate, D-Psicose, L-Serine, Succinamate, Succinate, Sucrose, D-Trehalose을 이용한 반면, 2-Amino ethanol, Adonitol, cis-Aconitate, L-Arabinose, D-Arabitol, L-Asparagine, L-Aspartate, Citrate, i-Erythritol, D-Gluconate, L-Histidine,  $\beta$ -Hydroxybutyrate, m-Inositol, D-Lactose, L-Leucine, D-Mannitol,  $\beta$ -methyl glucoside, L-Ornithine, L-Proline, Quinate, L-Rhamnose, D-Sorbitol, L-Threonine, Xylitol은 이용하지 못하였다. 그 외 Acetate, Glycerol,  $\alpha$ -Hydroxybutyrate, D-Lactulose, Malonate, Maltose, Propionate, D-Raffinose는 균주에 따라 이용정도가 약간의 차이를 있었다. Biolog system은 SL4821과 SL4822 균주를 38.4%와 60.8%의 유사도로 *X. campestris* pv. *begoniae*로 동정하였다(Table 2).

**Table 2.** Metabolic activities of bacterial isolates (SL4821 and SL4822) from English Ivy bacterial leaf spot and *Xanthomonas hortorum* in the Biolog GN2 microplate assay

Substrate	SL4821 <sup>a</sup>	SL4822 <sup>a</sup>	<i>Xh</i>	Substrate	SL4821	SL4822	<i>Xh</i>
2-Amino ethanol	- <sup>b</sup>	-	3 <sup>c</sup>	D-Lactate	+	+	93
Acetate	-	-	55	D-Lactose	-	-	0
Adonitol	-	-	0	Lactulose	v	v	69
cis-Aconitate	-	-	38	L-leucine	-	-	0
L-Alanine	v	+	97	Malonate	-	-	52
L-Arabinose	-	-	7	Maltose	-	-	97
D-Arabitol	-	-	3	D-Mannitol	-	-	0
L-Asparagine	-	-	0	D-Mannose	+	+	100
L-Aspartate	-	-	48	D-Melibiose	+	+	97
Bromo succinate	+	+	97	Monomethylsuccinate	+	+	100
Cellobiose	+	+	97	$\beta$ -methyl glucoside	-	-	3
Citrate	-	-	38	L-Ornithine	-	-	3
Dextrin	+	+	83	L-Proline	-	-	28
i-Erythritol	-	-	0	Propionate	-	-	52
D-Fructose	+	+	100	D-psicose	+	+	97
L-Fucose	+	+	86	Quinate	-	-	0
D-Galactose	-	-	72	D-Raffinose	v	v	31
D-Glucose	+	+	100	L-Rhamnose	-	-	0
D-Gluconate	-	-	3	L-Serine	+	+	93
L-Glutamate	+	+	100	D-Sorbitol	-	-	10
Glycerol	v	v	48	Succinamate	+	+	93
L-Histidine	-	-	3	Succinate	+	+	100
$\alpha$ -Hydroxybutyrate	-	-	55	Sucrose	+	+	79
$\beta$ -Hydroxybutyrate	-	-	0	D-Trehalose	+	+	100
M-Inositol	-	-	0	L-Threonine	-	-	21
Ketoglutarate	+	+	100	Xylitol	-	-	0

<sup>a</sup>SL4821 and SL4822 were identified to *X. campestris* pv. *begoniae* with 38.4% and 60.8% similarities, respectively in the Biolog GN2 microplate assay.

<sup>b</sup>+, positive; -, negative; v, variable.

<sup>c</sup>average % of positive strains of *X. hortorum* tested (Vauterin et al. 1995).

**Table 3.** Fatty acid profiles of the bacterial isolates(SL4821 and SL4822) from English Ivy bacterial leaf spot and *Xanthomonas hortorum*

Shorthand name	Systematic name	SL4821 <sup>a</sup>	SL4822 <sup>a</sup>	<i>Xh</i> <sup>b</sup>
10:0	decanoic acid	0.7	0.7	0.7 ± 0.3
11:0 ISO	9-methyldecanoic acid	3.5	3.7	4.7 ± 0.8
10:0 3OH	3-hydroxydecanoic acid	0.3	0.3	0.0 ± 0.1
Unknown 11.799		1.2	1.2	1.5 ± 0.3
11:0 ISO 3OH	3-hydroxy-9-methyldecanoic acid	2.0	2.0	2.8 ± 0.6
11:0 3OH	3-hydroxyundecanoic acid	0.2	0.3	0.0 ± 0.1
12:0 3OH	3-hydroxydodecanoic acid	2.0	2.0	2.5 ± 0.5
14:0 ISO	12-methyltridecanoic acid	0.3	0.3	0.7 ± 0.5
14:0	tetradecanoic acid	1.4	1.4	1.4 ± 0.3
13:0 ISO 3OH	3-hydroxy-11-methyldecanoic acid	3.1	3.0	4.1 ± 0.7
13:0 2OH	2-hydroxytridecanoic acid	0.7	0.7	0.3 ± 0.4
15:1 ISO F	13-methyltetradecanoic acid isomer F	0.2	0.2	0.0 ± 0.1
15:0 ISO	13-methyltetradecanoic acid	25.2	25.5	33.2 ± 3.5
15:0 ANTEISO	12-methyltetradecanoic acid	18.8	19.4	15.7 ± 2.0
15:1 w6c	<i>cis</i> -9-pentadecanoic acid	0.7	0.8	1.3 ± 0.6
16:0 ISO	14-methylpentadecanoic acid	1.5	1.4	1.7 ± 0.6
16:1 w9c	<i>cis</i> -7-hexadecanoic acid	1.5	1.5	0.1 ± 0.3
16:1 w7c	<i>cis</i> -9-hexadecanoic acid	18.6	19.0	18.6 ± 1.9
16:0	hexadecanoic acid	4.2	3.7	2.0 ± 1.1
ISO 17:1 w9c	<i>cis</i> -7-15-methylhexadecanoic acid	4.2	4.1	3.9 ± 1.4
17:0 ISO	15-methylhexadecanoic acid	4.3	3.7	2.7 ± 1.4
17:0 ANTEISO	14-methylhexadecanoic acid	0.7	0.6	0.1 ± 0.3
17:1 w8c	<i>cis</i> -9-heptadecanoic acid	1.4	1.5	0.5 ± 0.5
18:1 w9c	<i>cis</i> -9-octadecanoic acid	0.4	0.3	0.0 ± 0.1

<sup>a</sup>SL4821 and SL4822 were identified to *X. hortorum* pv. *hederae* with 64.94% and 73.1% similarities, respectively according to fatty acid analysis.

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

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 24가지의 지방산을 가지고 있었다(Table 3). 이 중 13-methyltetradecanoic acid의 함량이 25%로 가장 높았고, 그다음 12-methyltetradecanoic acid(18~19%), *cis*-9-hexadecanoic acid(18~19%), *cis*-7-15-methylhexadecanoic acid(4%), 15-methylhexadecanoic acid

(4%), hexadecanoic acid(4%), 9-methyldecanoic acid(3~4%), 3-hydroxy-11-methyldecanoic acid(3%), 3-hydroxydodecanoic acid(2%), 3-hydroxy-9-methyldecanoic acid(2%)의 순으로 함유하고 있어, Vauterin 등(1996)의 보고에 의한 *X. hortorum*의 지방산 조성 및 함량이 유사하였다. MIDI Library를 통하여 SL4821과 SL4822 균주는 65.0%와 73.1%의 유사도로 *X. hortorum* pv. *hederae*로 동정되었다(Table 3).

분리세균 SL4822의 16S rDNA 염기서열을 다른 *Xanthomonas* 속 세균과 비교하였을 때 *X. hortorum*의 16S rDNA의 염기서열(EMBL accession no. Y10759)과 99.9% 유사하였다.

이상과 같이 본 실험에서 분리한 병원세균 SL4821과 SL4822는 YDC 배지에서의 colony 형태, 탄소원 이용정도, 지방산 조성 및 함량에 근거하여 *X. hortorum*으로, 헤데라에서 병원성에 근거하여 최종적으로 *X. hortorum* pv. *hederae*로 동정하였으며 이 병을 헤데라의 세균성점무늬 병으로 명명할 것을 제안한다.

## 요 약

2005년 용인의 헤데라 재배 온실에서 새로운 병해가 발견되었다. 처음에는 아래 잎에서 수침상 점무늬가 형성되고 점점 커져 주위로 노란색의 테두리를 형성하는 갈색의 반점을 형성하다가 잎 전체가 검게 말라 죽어 떨어진다. YDC 배지에서 병원세균을 순수 분리하였을 때 *Xanthomonas*속 세균의 전형적인 특징인 노란색 색소를 띤 세균이 형성되었다. 분리된 세균을  $10^8$  cfu/ml로 현탁한 후 헤데라의 잎에 주사 접종하여 병원성을 확인하였다. 지방산 조성 및 함량, 다양한 탄소원 이용정도 및 16s rDNA 염기서열을 이용하여 분리세균 SL4821과 SL4822를 *X. hortorum* pv. *hederae*로 동정하였으며 이 병을 헤데라의 세균성점무늬병으로 명명하였다.

## 참고문헌

- Chase, A. R. 1987. *Xanthomonas* leaf spot of *Hedera* (Araliaceae). In Compendium of ornamental foliage plant diseases. pp. 60-61, APS Press, St. Paul, Minnesota.
- 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.
- 김형득. 2006. 화훼. 원예연구소 homepage(<http://www.nhri.go.kr>), 원예작물재배기술.
- 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.
- Suzuki, A., Kusumoto, A., Horie, H. and Takikawa, Y. 2002. Bacterial leaf spot of ivy caused by *Xanthomonas campestris* pv. *hederae*. *J. Gen. Plant Pathol.* 68: 398-400.
- 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.