*Pseudomonas viridiflava*에 의한 오이 점무늬병의 발생 보고

First Report of *Pseudomonas viridiflava* Causing Leaf Spot of Cucumber in Korea

*Co-corresponding authors

Y. Seo

Tel: +82-10-4400-9823

Fax: +82-63-238-6352

E-mail: yunii0824@gmail.com

J.-H. Park

Tel: +82-63-238-6310

Fax: +82-63-238-6305

Email: pjhn@korea.kr

서윤희* · 박미정 · 백창기 · 박종한*

국립원예특작과학원 원예특작환경과

Yunhee Seo*, Mi-Jeong Park, Chang-Gi Back, and Jong-Han Park*

Horticultural and Herbal Crop Environment Division, National Institute of Horticultural and Herbal Science, Wanju 55365, Korea

Received September 10, 2018

Revised October 15, 2018

Accepted October 16, 2018

A severe disease with leaf spots and necrotic symptoms was observed in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings in April 2018 at a nursery in Kimjae, Korea (35°47'09.8"N 127°2'24.3"E). The infected plants initially showed spots on water-soaked cotyledons which, at later stages, enlarged and spread to the leaves, which the lesions becoming dry and chlorotic. The symptomatic samples were collected from cucumber and the isolates were cultured on LB agar. The representative bacterial strain selected for identification showed fluorescent on King's medium B, was potato rot-positive, levan and arginine dihydrolase-negative, oxidase-negative and tobacco hypersensitivity-positive in LOPAT group 2 as determined by LOPAT tests. A pathogenicity test was carried out on a 3-week-old cucumber. After 3 days of inoculation, leaf spots and necrotic symptoms appeared on the cucumber, similar to the originally infected plants. The infecting bacterial strain was identified as *Pseudomonas viridiflava*, by 16S rDNA sequence analysis. This is the first report of leaf spot diseases on cucumber caused by *P. viridiflava*.

Keywords: Cucumber disease, Cucumber leaf spot, *Cucumis sativus* L., *Pseudomonas viridiflava*

오이(*Cucumis sativus* L.)는 전 세계적으로 경제적 가치가 있는 채소 작물로 국내에서 한해동안 5,656 ha 면적에서 337,563여 톤을 생산하고 있는데, 이중 시설재배 4,781 ha 면적에서 333,760여 톤을 생산하여 90% 가량의 생산량이 시설재배에서 재배되는 것을 알 수 있다(Statistics Korea, 2017). 오이 시설재배의 보편화에 따라 연작재배로 인한 병해충 증가로 안정적인 작물 생산에 문제가 되고 있다.

시설재배 오이에 문제를 일으키는 주요병으로는 탄저병(*Colletotrichum* spp.), 흰가루병(*Sphaerotheca fusca*), 덩굴 마

름병(*Didymella bryoniae*), 세균 시들음병(*Erwinia tracheiphila*), 세균성모무늬병(*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*) 등이 있다(Chen과 Dai, 2012; McGrath와 Thomas, 1996; Nuttall과 Jasmin, 1958; Zitter 등, 1996).

최근 국외에서는 온실내 오이를 비롯한 박과작물에 *Pseudomonas viridiflava*에 의한 점무늬병이 발생하여 전체 육묘장내 10–20%의 손실을 야기하는 것으로 보고되고 있다(Aysan 등, 2003; Changyuan 등, 2010). 이 병원성 세균은 병 발생 초기 물방울이 잘 맺히는 자엽과 본엽에 불규칙 작은 반점을 형성하고, 병징이 심화되면 점무늬가 커지면서 잎이 마르고 회색으로 변하며 드물게 식물이 고사하는 것으로 알려졌다(Aysan 등 2003; Changyuan 등, 2010; Goumans와 Chatzaki, 1998). *P. viridiflava*는 형광색을 나타내는 그람음성 세균으로 토양내 존재하는 식

Research in Plant Disease

pISSN 1598-2262, eISSN 2233-9191

www.online-rpd.org

Fig. 1. Symptoms of the leaf-spot disease on container-grown cucumber seedlings in a nursery (A). Water soaked spots with chlorotic lesions on the cotyledons (B). Small, irregular chlorotic spot on a true leaf (C).

물병원성 세균으로 잎, 줄기 과실을 침해한다(Sarris 등, 2012). 대표적으로 토마토(*Solanum lycopersicum*), 멜론(*Cucumis melo*), 국화(*Chrysanthemum morifolium*), 가지(*Solanum melongena*) 등 많은 작물에 피해를 입히는 것으로 보고가 되어있다(Alvizatos, 1986; Aysan 등, 2003; Goumas와 Chatzaki, 1998).

2018년 6월 김제 오이 육묘장에서 *P. viridiflava*에 의한 병징으로 보이는 병이 발생하였다. 이 병은 처음에는 물방울이 잘 맺히는 자엽 엽선 부위에 수침상으로 시작되어 병반이 커지고 잎이 백화 되어 고사하며, 병 발생 환경이 좋은 시기에는 본엽까지 확대되어 불규칙 흰색 부정형 반점을 형성하는데 육묘장 전체 20%의 발병주율을 나타내는 것을 확인하였다(Fig. 1). 병든 식물에서 균주를 순수 분리하여 균학적 특성 및 DNA 염기서열을 토대로 *P. viridiflava*로 동정하였고, 오이에 인공 접종하여 병원성이 일치하는 것을 확인하였다.

병원균 분리 및 특성. 병원균을 분리하기 위하여 발병한 육묘장에서 채집한 이병기주를 건전부분과 감염된 부분이 1:1이 되도록 잘라 1% NaOCl에서 1분, 70% 에탄올에서 1분, 2차 증류수로 2회 세척한 뒤, 멸균된 여과지에서 물기를 건조하여 Luria-Bertain (LB) Agar에 치상 후 28°C 배양기에 3일간 배양하였다. King's (KB) medium B에 도말하여 28°C에서 3일간 배양한 후 UV_{350nm}에서 형광발현을 확인하였다. *Pseudomonas* 균주들을 구별하기 위한 생화학적 방법인 LOPAT tests를 다른 *Pseudomonas* spp. 균주들과 비교해 진행하였다(L: Levan production; O: oxidase production; P: pectinolytic activity; A: arginine dihydrolase production; and T: tobacco hypersensitivity) (Aysan 등, 2003; Lelliott 등, 1966; Moretti 등, 2005; Park 등, 2016; Sarris 등, 2012). Levan 형성 확인을 위하여 sucrose peptone agar (5% sucrose nutrient agar) 배지 28°C에 4일간 배양 후 dome 모양의 콜로니가 형성되지 않는 것을 확인할 수 있었다. Oxidase 활성 여부를 확인하기 위하여 Oxidase test

(N, N-dimethyl-p-phenylenediamine oxalate and α -naphthol) 시약을 여과지에 적신 후, 시약을 적신 여과지에 LB broth에 2일간 배양된 세균을 묻힌 후 10초 안에 보라색 또는 청색으로 변하지 않는 것을 확인할 수 있었다. 감자에 무름을 일으키는지 알아보기 위해 깨끗이 씻은 감자를 70% EtOH로 화학멸균하고 UV에 20분간 소독한 뒤 0.5 cm 두께로 썰어 절편을 준비하였다. Arginine dihydrolase 활성을 확인하기 위하여 Arginine dihydrolase 배지에 LB broth에 2일간 배양한 세균을 접종한 뒤 28°C에서 4일간 배양하여 색이 변하지 않는 것을 관찰할 수 있었다. LB broth에 2일간 키운 병원균을 증류수로 희석하여 분광광도계를 이용하여 1×10^7 CFU/ml¹로 보정한 뒤 감자 절편에 20 μ l 분주한 뒤, 28°C에서 2일 배양 후 무름이 발생한 것을 확인할 수 있었다. 담배 과민성 반응을 보기 위해 파종 후 3주 지난 담배에 LB broth에서 2일간 배양한 병원균의 현탁액(1×10^7 CFU/ml¹)을 담배 잎에 주입하여 과민성 반응을 확인 결과 과민성 반응이 나타나 5개의 LOPAT group중 group2에 속하는 것을 확인하였다 (Lelliott 등, 1966) (Table 1).

Table 1. Comparison of the biochemical characteristics of the isolates from infected cucumber and the other *Pseudomonas* spp.

Tests	<i>P. viridiflava</i> ^a	<i>P. syringae</i>	<i>P. cichorii</i>
Fluorescence	+	+	+
Levan		+	-
Oxidase	-	-	+
Pectinolytic activity	+	-	-
Arginine dihydrolase	-	-	-
Tobacco hypersensitivity	+	+	+
Group ¹	II	I a	III

+, positive reaction; -, negative reaction.

^a*P. viridiflava* was isolated from cucumber (GenBank accession number: MH744636.1).

¹*Pseudomonas* spp. groups were referenced from Lelliott et al. (1966).

Fig. 2. Symptoms developing observed on cucumber after 3 days of incubation with *P. viridiflava*. Left: No symptoms were observed in control plants (A). Right: irregular spots, chlorotic and greyish necrotic spots were noted on leaves of the infected plants (B-D).

병원성 검정. 분리한 병원균에 의한 오이 점무늬병 병원성 검정을 위해 LB broth에 2일간 28°C에서 배양한 세균 현탁액을 증류수로 희석하여 1×10^8 CFU/ml로 보정하였다. 온실에서 파종 3주된 1-2엽기의 오이(*Cucumis sativus* cv. Cheongbeak-beakchimdadaki)에 분무 접종한 뒤 $28 \pm 3^\circ\text{C}$ 의 실내 온실 안에 습도 90%를 2일간 유지시켜 3일 뒤 발병유무를 확인한 결과 김제 육묘장에서 발생된 오이 병징과 동일한 병징임을 확인하였다(Fig. 2).

염기서열 및 유연관계 분석. 오이에서 분리된 병원균의 염기서열 분석을 하기 위해 9F (5'-GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3'), 1512R (5'-ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT-3') primer를 이용하여 16S rDNA sequencing를 수행하였다(Hansen

등, 1998). 분석된 염기서열은 미국국립생물정보센터(National Center for Biotechnology Information, NCBI, USA)의 BLAST 검색결과 Genbank에 등록된 *P. viridiflava* 분리균주들과 100% 뉴클레오티드 상동성을 보였다. 분리된 균주의 염기서열은 NCBI GenBank database에 등록하였다(Accession number:MH744636.1).

계통학적 유연관계를 분석하기 위하여 병원균의 염기서열과 *Pseudomonas* 속의 다른 종들의 시퀀스를 NCBI의 Genbank database에서 수집한 후 MEGA 6.0 프로그램에서 neighbor-joining method를 사용하여 작성하였고, 외집단(outgroup)으로 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*를 사용하였다(Table 1). *P. viridiflava*에 의한 병은 국내에서 상추, 고추, 토마토, 고무나무, 배추, 유채 등에 대해 무름병, 썩음병, 검은무늬병, 점

Fig. 3. Phylogenetic analysis of the pathogen species using the neighbor-joining method on the basis of 16S rDNA sequences. The numbers beside branches represent the percentage of congruent clusters in 1,000 bootstrap trials. The bar indicates 2% sequence dissimilarity.

무늬병 등으로만 보고되어 있다(Choi, 1989; Choi와 Kim, 1989; Lee 등, 2000; Myung 등, 2010). 해외에서는 이탈리아와 터키에서 메론에 대해 점무늬병과 잎 괴사로 보고되어 있다(Aysan 등, 2003; Moretti 등, 2005). 우리나라 박과작물 내에서는 보고가 되어 있지 않았으며 국내 최초로 점무늬병으로 명명하여 보고하고자 한다.

요 약

2018년 4월 전북 김제 오이 육묘장에서 오이의 자엽과 본엽에 반점이 형성되고 괴사되는 증상이 관찰되었다. 초기증상은 물방울이 잘 맺히는 자엽 부근에서 시작되었고, 병증상이 확대되면 본엽에 반점이 생기면서 백화 되어 마르는 증상이 관찰되었다. 세균병이 의심되는 식물체를 채집하여 LB agar에 계대하였다. 분리한 한 균주를 가지고 LOPAT test를 수행한 결과, KB agar에서 형광발현, 감자절편에서 무름 증상이 나타나며, Arginine dihydrolase 음성임을 확인하였다. oxidase를 형성하지 않고 담배과민성 실험에서 양성인 것을 확인하여 LOPAT 2그룹에 속하는 것을 확인하였다. 병원성 실험은 발아 후 3주된 오이에 접종하여 접종 3일 후 병징이 동일하게 발생된 것을 확인하였다. 16s rDNA 유전자 염기서열을 이용하여 염기서열분석과 계통수를 분석하여 분리된 균주가 *P. viridiflava*로 동정되었다. 이 병은 국내에서 처음으로 *P. viridiflava*에 의해 발생되는 오이 점무늬병으로 보고하고자 한다.

Conflicts of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

Acknowledgement

This study was carried out with the support of Cooperative Research program for Agricultural Science & Technology Development (Project No. PJ011368022018) Rural Development Administration, Republic of Korea.

References

Aysan, Y., Mirik, M., Ala, A., Sahin, F. and Cinar, O. 2003. First report of *Pseudomonas viridiflava* on melon in Turkey. *Plant Pathol.* 52: 800.

- Chen, Y. and Dai, G. 2012. Antifungal activity of plant extracts against *Colletotrichum lagenarium*, the causal agent of anthracnose in cucumber. *J. Sci. Food Agric.* 92: 1937-1943.
- Choi, J. 1989. Identification of bacteria causing rot disease of vegetables in the fields and post-harvest period in Korea 1. Bacterial rot disease of Chinese cabbage. *Plant Pathol. J.* 5: 20-24.
- Choi, J. and Kim, H. 1989. Identification of bacteria causing rot disease of vegetables in the fields and post-harvest period in Korea 4. Bacterial rot disease of lettuce. *Plant Pathol. J.* 5: 65-71.
- Goumans, D. E. and Chatzaki, A. K. 1998. Characterization and host range evaluation of *Pseudomonas viridiflava* from melon, blite, tomato, chrysanthemum and eggplant. *Eur. J. Plant Pathol.* 104: 181-188.
- Hansen, M. C., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M. and Molin, S. 1998. Biased 16S rDNA PCR amplification caused by interference from DNA flanking the template region. *FEMS Microbiol. Ecol.* 26: 141-149.
- Lee, E. J., Cha, J. K. and Choi, J. E. 2000. Bacterial root rot and bacterial leaf blight of *Ficus* spp. by *Pseudomonas cichorii* and *P. viridiflava* in Korea. *Res. Plant Dis.* 6: 6-9.
- Lelliott, R. A., Billing, E. and Hayward, A. C. 1966. A determinative scheme for fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *J. Appl. Bacteriol.* 29: 470-489.
- McGrath, M. T. and Thomas, C. E. 1996. Powdery mildew. In: *Compendium of Cucurbit Diseases*, eds. by T. A. Zitter, D. L. Hopkins and C. E. Thomas, pp. 28-30. APS Press, St. Paul, MN, USA.
- Myung, I. S., Lee, Y. K., Lee, S. W., Kim, W. G., Shim, H. S. and Ra, D. S. 2010. A new disease, bacterial leaf spot of rape, caused by atypical *Pseudomonas viridiflava* in South Korea. *Plant Dis.* 94: 1164.
- Moretti, C., Sequino, S. and Buonauro, R. 2005. First report of leaf necrosis caused by *Pseudomonas viridiflava* on melon seedlings in Italy. *Plant Dis.* 89: 109.
- Nuttall, V. W. and Jasmin, J. J. 1958. The inheritance of resistance to bacterial wilt (*Erwinia tracheiphila* E.F. Smith, Holland) in cucumber. *Can. J. Plant Sci.* 38: 401-404.
- Park, K. S., Kim, Y. T., Kim, H. S., Lee, J. H., Lee, H. I. and Cha, J. S. 2016. Bacterial spot disease of green pumpkin by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Res. Plant Dis.* 22: 158-167.
- Sarris, P. F., Trantas, E. A., Mpalantinaki, E., Ververidis, F. and Goumas, D. E. 2012. *Pseudomonas viridiflava*, a multi hostplant pathogen with significant genetic variation at the molecular level. *PLoS One* 7: e36090.
- Statistics Korea. 2017. Agricultural area survey. Statistics Korea, Daejeon, Korea. (In Korean)
- The Korean Society of Plant Pathology. 2009. List of Plant Diseases in Korea. 5th ed. The Korean Society of Plant Pathology, Suwon, Korea. (In Korean)
- Zitter, T. A., Hopkins, D. L. and Thomas, C. E. 1996. *Compendium of Cucurbit Diseases*. 1st ed. APS Press, St Paul, USA. 87 pp.