

## 植物病原性細菌의 藥劑抵抗性에 關한 研究

Ⅲ. 벼 흰빛잎마름병균에 있어서 Streptomycin 耐性菌株의 몇 가지 變異

趙源哲\* · 沈載昱\*\*

### Studies on the Chemical Resistance of Phytopathogenic Bacteria

Ⅲ. Some Variations on the Streptomycin Resistant Isolates of the Rice Bacterial Leaf Blight Pathogen, *Xanthomonas oryzae* (Uyeda et Ishiyama) Dowson

W. C. Cho\* and J. W. Shim\*\*

#### Abstract

The experiments were conducted to investigate the variability of pathogenesis, growth amount and UV-sensitivity on the streptomycin resistant isolate of the rice bacterial leaf blight pathogen, *Xanthomonas oryzae*, which selected by the stepwise transfer in 100, 3,000 and 10,000  $\mu\text{g/ml}$  Argepto contained media. And the results obtained were as follows.

- (1) The SM-resistant isolates were tested the pathogenesis on the differential variety of rice, Wase-Aikoku-3, Rant Emas-2, Hwang ok, and Kimmase. And the SM resistant isolate, obtained from 75-6 isolate, showed the reaction of moderately resistant to the differential variety of Hwang ok instead of susceptible reaction with its parental isolate.
- (2) The growth amount of the SM-resistant isolate was slightly higher than that of parental isolate, on the normal media. And the growth was inhibited on the 100 $\mu\text{g/ml}$  Argepto contained media until 60 hours after transfer, however, its growth exceeded than parental isolate in the normal media, after 70 hours of transfer.
- (3) It is considered that the resistance factor might be stable character, since the sensitivity to UV irradiation (with 254  $\text{m}\mu$  wave length) of the resistant isolate was the same as that of its parental isolate.

#### 緒言

벼 흰빛잎마름병균인 *Xanthomonas oryzae*에 있어서 Streptomycin과 같은 抗生物質에 對한 抵抗性 形成에 關한 問題는 많이 알려져 있다. <sup>6,15,16,17</sup> 抵抗性의 形成이

人爲的인 方法에 依해서는 不過 3~4世代之 藥劑處理 로도 높은 抵抗性을 나타내는 菌株을 쉽게 얻을수 있다는 것이며<sup>18</sup> 自然集團에 있어서도 여러가지 交叉抵抗性을 나타내는 藥劑의 繼續的인 使用으로 耐性菌의 出現이 可能하다는 것이다. 이와같은 現象에 對하여

\* 朝鮮麥酒研究室(Laboratory, Choseon Brewery Co.)

\*\* 서울大學校農科大學(College of Agriculture, SNU)

Wakimoto<sup>15)</sup>는 日本의 全域에서 收集한 *X. oryzae* 菌株들을 調査하여 53個의 Streptomycin에 對한 抵抗性이 다른 地域菌株들을 分離할수 있었다고 報告하고 있다.

細菌에 있어서 藥劑에 對한 抵抗性의 特性은 抵抗性을 나타내는 菌株들을 感受性菌株들과 比較할때 다른 形質에서도 變異를 나타낼수 있을 것이다. Thayer<sup>14)</sup> 등은 高추의 斑點細菌病菌인 *Xanthomonas vesicatoria* 에서 몇가지 形態的 生理的 性質이 相異한 菌株들 間에서 Streptomycin에 對한 耐性의 差異를 認定할수 있었다는 것이며 Cole<sup>9)</sup>은 담배의 野火病菌 *Pseudomonas tobaci*와 角斑病菌 *Pseudomonas angulata*에 對하여 藥劑撒布한 圃場에서 分離한 耐性 菌株들은 畝사리 病原性을 喪失한다고 報告하고 있다. 이에 反하여 Langley 등<sup>7)</sup>은 *Agrobacterium tumefaciens*에서 人爲突然變異로 얻은 藥劑耐性菌이 遺傳的 多面發現의 現象으로 母菌株 보다 강한 病原性을 나타 냈다는 報告를 하고 있다.

이에 本人 등은 藥劑處理區에서 繼代培養으로 얻은 Streptomycin 耐性菌을 利用하여 病原性, 生長率 및 紫外線에 對한 感受性等의 特性을 調査하여 報告하는 바이다.

끝으로 本 實驗의 遂行에 있어서 많은 助諒을 주신 서울大學校 農科大學의 鄭厚燮 趙鏞涉 兩 教授님께 깊은 謝意를 表하는 바이며 試驗 過程을 通하여 여러가지로 協助하여 주신 李光雄 黃炳國 임사준 諸 學兄에게 감사 드리는 바이다.

## 材料 및 方法

本 實驗에 使用된 供試 菌株는 農村振興廳 農業技術研究所 病理擔當官室에서 分讓받은 벼 흰빛잎마름병균 75-6 및 75-9와 이들 서로 다른 地域菌株들을 서울大學校 農科大學 農生物學科 遺傳學教室에서 Streptomycin 製劑인 Agrepto를 處理하여 選拔한 SM 耐性菌

株(10mg/ml의 Agrepto 濃度에서 選拔한 選拔菌株)들이었다.

菌株들의 病原性을 調査하기 爲하여는 特別品種으로 Wase-Aikoku-3, Ranti-Emas-2, 黃玉 및 Kimmase를 使用하였고 接種은 菌을 3藥期가 되었을때 一定 濃度의 細菌懸濁液 約 ( $10^8$ cell/ml)을 만들어 가위를 직신다음 第一葉의 끝 1cm 가량을 자르는方式으로 接種하고 接種 15日 後에 罹病程度를 調査하였다.

菌의 生長率을 調査하기 爲해 10ml의 液體培養基에 斜面培養基에서 자란菌을 한 loop 떠서 接種한 後Shaker로 24時間 진탕배양시킨 다음 이를 90ml의 培養液이 담긴 250ml 三角후라스코에 부어繼續 培養시켰다. 培養中의 菌을 5ml씩 10時間 間隔으로 떠서 比色計로  $660\mu$ 의 波長에서 吸光度를 測定하여 生長量을 推定하였다.

紫外線 照射에 對하여 耐性菌과 感受性菌의 感受性의 差異 및 耐性의 突然變異 혹은 耐性의 復歸現象을 알아보기 爲하여 耐性菌과 感受性菌을 各各 Crowes<sup>6)</sup>의 Buffer 溶液에 懸濁液을 만든 다음 細菌의 密度를  $10^8$ cell/ml로 稀釋하여 紫外線을 照射하였다. 照射에 使用된 光源은  $254\mu$ 의 Toshiba 紫外線燈이었고 光源을 50cm 距離에서 時間別로 照射시킨 後 生存 細菌數를 細菌의 懸濁液을 Fe-DETA 合成培地上에 接種하여 細菌의 集落(colony)數를 計數하여 推定 하였다. 그리고 耐性形質의 紫外線에 依한 變異를 調査하기 爲하여 360分間 紫外線照射區의 集落을  $100\mu\text{g/ml}$ 의 Agrepto를 添加한 培地上에 Replica 法으로 옮겨 集落의 變動을 調査하였다.

## 結果 및 考察

藥劑에 對하여 高度의 耐性을 나타내는 選拔菌株가 植物體에 對한 病原性에있어서 나타난 變異를 調査하기 爲하여 菌株 75-6과 75-9를 각각  $100\mu\text{g/ml}$ 의

**Table 1.** Pathogenic reactions of differential rice varieties to parental and SM-resistant isolates<sup>a</sup> of *Xanthomonas oryzae* in green house condition.

| Differential variety | 75~6             |                   | 75~9             |                   |
|----------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|
|                      | Parental isolate | Resistant isolate | Parental isolate | Resistant isolate |
| Wase-Aikoku-3        | HR <sup>b</sup>  | HR                | MR               | MR                |
| Ranti Emas-2         | R                | R                 | MR               | MR                |
| Hwang ok             | S                | MR                | S                | S                 |
| Kimmase              | S                | S                 | S                | S                 |

a: Selected from colonies developed at  $10,000\mu\text{g/ml}$  Agrepto of each isolates in stepwise 4 transfer.  
b: HR; highly resistant, R; resistant, MR; moderately resistant, S; susceptible.

Agrepto 添加培地上에서 選拔하고 再次 3,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 選拔한 다음 10 $\text{mg}/\text{ml}$  濃度의 藥劑添加 培地에서 生存하는 菌을 耐性菌으로 하여 그들의 母菌과 病原性を 調査比較하였다. 病原性的 比較에는 4個 判別品種을 使用하여 IRR의 試驗基準에 따라 接種 15日 後에 發病度를 調査하였고 그 結果는 表 1과 같다.

表 1에서 보는바와 같이 75-9菌株의 경우는 耐性菌이 母菌과 病原성에 差異를 볼수 없었으나 75-6菌株에 있어서는 判別品種 黃玉에 있어서 母菌이 感受性 反應을 보이는데 反하여 耐性菌은 中程度의 抵抗性 反應을 보였다.

이와같은 病原性的 變異는 病原性變異와 藥劑耐性間에는 一定한 相互關係가 없는것으로 생각되었다. 그러나 耐性菌에 있어서 病原性的 變化가 빠르게 된다는 事實에 對하여 Cole<sup>20</sup>은 담배의 野火病菌에 있어서 藥劑散布로 얻어진 耐性菌이 病原성을 쉽게 喪失하게 된다는 것이며 이와 反對로 Langley<sup>7</sup>는 *Agrobacterium*에서 人爲의 突然變異로 얻은 SM 耐性菌은 母菌보다 病原성이 強해 졌다는 報告에 비추어 보면 4個의 判別品種으로 病原性 變異에 對한 結論的인 判斷은 어렵은 것으로 생각된다.

그러나 Bragg<sup>11</sup> 및 Brubaker等<sup>21</sup>에 依하면 藥劑耐性的 機作으로 因한 代謝過程의 一部 特定廻路가 變異되어 病原性的 變動이 可能하다는 것이며 Weiner 와 Swanson<sup>13</sup>은 耐性機作과 毒素物質의 生成이 어떤 關連性을 갖게되어 病原性 變異가 可能할것으로 보고하고 있다.

이와같은 報告들에 비추어 보면 75-6菌株가 判別品種 黃玉에 있어서만 약간의 病原性變動을 나타내는 反應을 보였지만 藥劑耐性과 病原性 變異는 어느 方向으로 屯간에 變動이 可能할 것으로 생각된다.

耐性菌의 다른 變異의 한가지로 培養時間에 따른 生長量의 變動을 調査하기 爲하여 75-9 菌株에서 얻은 耐性菌株와 母菌株를 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  Agrepto 添加培地와 正常 감자 半合成培地에서 10時間 間隔으로 70時間까지 生長量을 調査한 結果는 그림 1과 같다.

그림 1에서 보는바와 같이 母菌株와 耐性菌株의 生長量을 比較하여 볼때 接種後 20時間까지는 生長量의 差異를 認定할수 있었으나 30時間 以後부터는 耐性菌이 母菌에 比하여 多少 높은 生長量을 보였다. 接種後 30時間에는 耐性菌의 生長이 OD가 1.0인데 比하여 母菌은 0.77로 顯著한 生長量의 差異를 보였으며 接種 60時間 以後 70時間에 이르러서는 母菌株와 耐性菌株가 모두 生長量의 減少를 보이기 始作하였다. 그런데 70時間의 調査에서도 耐性菌이 OD가 1.33인데 比하여 母菌은 OD가 1.02로 菌의 生長量 減少期에 있어서도 耐性菌이 보다 屯한 反應을 보였다.

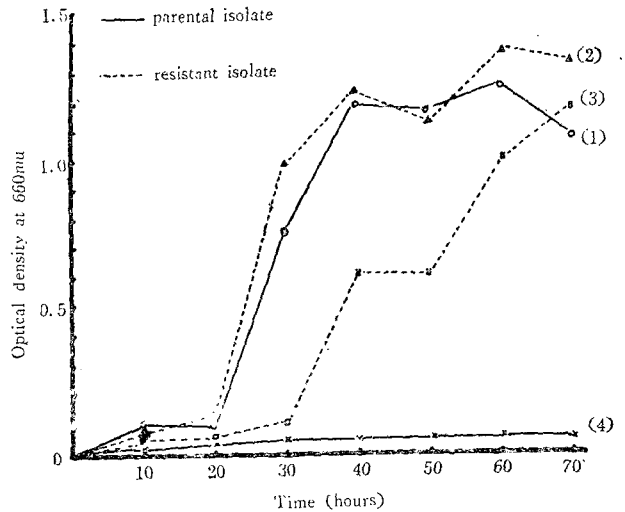


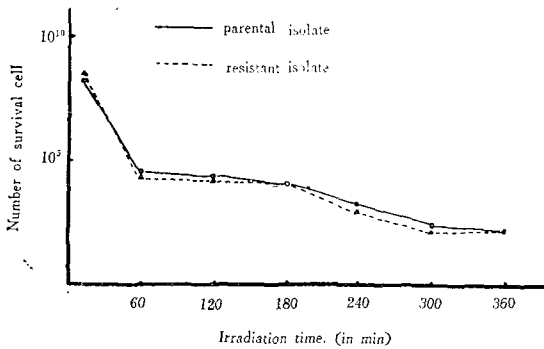
Fig.1 Growth curves of parental and resistant isolates on both normal and treated media. solid lines represents parental and broken lines represents its resistant isolates. And (1) and (2) were grown at normal media, (3) and (4) were grown on the treated media with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  of Agrepto.

한편 이들 兩 菌株의 生長量을 藥劑添加 培地上에서 比較하여 보면 接種 40時間 以後부터 耐性菌은 急激한 生長을 보이는데 反하여 母菌株는 거의 生長하지 않았다. 뿐만아니라 接種 70時間까지도 生長減少期에 들어 가지 않았다.

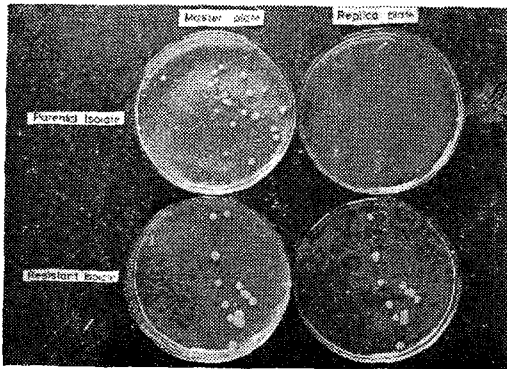
生長量 比較에서 接種 後 70時間의 경우를보면 이 時期는 母菌株의 生長減少期임에도 不拘하고 耐性菌은 正常培地上에서 生長量의 減少가 적었고 藥劑添加培地上에서도 繼續的인 生長期에 있었다. 이와같은 事實은 Thayer와 Stall<sup>14</sup>의 報告에서 고추의 *X. vesicatoria*는 生理的 特性差가 耐性的 差를 갖어올수 있다고 하였으며 Miller<sup>7</sup>等의 *Meningococcus*에서 變異菌株들은 SM 含有培地와 正常培地에서 生長速度가 달라진다는 報告와 비추어 自然集團에 混存하는 SM 耐性菌들이 SM과 같은 특정 環境抵抗에 對한 生長反應이 母菌과 多少 相異할 可能性도 있다. 뿐만아니라 自然集團에서 耐性的 增加速度가 빠를수록 耐性菌의 生理的 特性이 生長速度 및 環境抵抗力 等과 같은 形質과 關係가 있을 것으로 생각된다.

耐性菌과 母菌에 對하여 突然變異誘起에 가장 效果가 높은 紫外線 254 $\text{m}\mu$ 의 波長을 60分 間隔으로 360分까지 照射하고 生存菌을 調査하여 紫外線에 對한 感受性을 比較한바 그림 2와 같다.

그림 2에서 보면 母菌과 耐性菌이 모두 照射時間 60分에서 急激한 生存菌數의 減少를 보이고 그 以上の 照



**Fig.2** Radiation sensitivity of UV irradiation which wave length of 254m $\mu$  were measured by survivorship of the bacterial cell on the parental and resistant isolates of *X. oryzae*.



**Fig.3** Development of colonies on Fe-EDTA media containing Agrepto 100 $\mu$ g/ml when colonies survived after UV irradiation were printed on replica plate by use of replica method.

射時間에 對하여는 점차 生存菌數의 減少傾向이 完만 하였으며 360分の 照射에서는 生存菌數가 耐性菌과 母菌에서 모두 10<sup>2</sup>/ml個 程度로 減少하였다.

한편 360分間의 照射에서 살아남은 耐性菌과 母菌을 耐性形質에 對한 遺傳的 要素의 紫外線에 의한 影響을 調査하기 爲하여 이들 各 菌株들을 各 100 $\mu$ g/ml의 藥劑를 添加한 Fe-EDTA 培地에 Replica 法으로 옮겨 耐性形質의 變動을 調査하였다.

母菌集落 227個와 耐性菌 集落 108個를 調査한 結果 母菌에서 耐性이 形成되어 100 $\mu$ g/ml에서 生存할수 있는 集落은 全無였으나 耐性菌의 集落에서 옮긴 Replica에서는 그림 3에서 보는 바와같이 藥劑添加培地에서 集落이 形成되지 않는 경우가 있었다.

耐性形質을 갖는 菌이 紫外線 照射에 對하여 生存力에는 母菌과 同一한 感受性을 나타낸다고 볼수 있다. 이와같은 現象은 耐性菌과 母菌이 서로 다른 遺傳的 要

素를 많이 가지지 않기 때문이라고 생각된다. 耐性菌의 集落에서 紫外線照射에 의하여 藥劑添加培地에서 生存할수 없는 集落이 出現하였다는 點과 母菌에서는 耐性形成個體가 없었었다는 事實은 耐性因子가 Demerec<sup>4)</sup> 및 Newcomb<sup>9)</sup> 등이 지적하는 바와같이 遺傳的 要素라고 假定할때 紫外線의 照射 影響이 어떤 因子의 形成보다 破壞가 容易한 때문이라고 생각된다. 또한 耐性因子가 遺傳的 要素라는 點에 對하여 Panapolus<sup>10,11)</sup>의 報告에서 *Pseudomonas*屬 植物病原細菌이 抗生物質에 對한 耐性因子 R-factor를 갖고 있다고 하여 이들 R-factor는 接合 等의 方法으로 傳達된다는 結果에서도 立證된바 있다. 따라서 이러한 耐性因子에 對한 問題는 調査集落의 數를 充分히 하여 앞으로 究明되어야 할것이라고 생각된다.

## 摘 要

選拔에 依하여 얻은 버 흰빛잎마름병균 *Xanthomonas oryzae*의 Streptomycin 耐性菌에 對하여 病原性, 培地內에서의 生長量 및 紫外線 感受性에 對한 變異性을 調査하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

(1) SM-耐性菌은 Wase-Aikoku-3, Rant Emas-2 黃玉 및 Kimmas의 4個 判別品種에 對한 病原性 比較에서 75-6의 耐性菌株가 黃玉에 對하여 感受性 反應이 母菌과 달리 中程度의 抵抗性을 나타내었다.

(2) SM-耐性菌은 正常培地에서 母菌보다 약간 높은 生長量을 보였고 100 $\mu$ g/ml Agrepto 添加 培地에서는 接種後 60時間까지 生長이 阻止되었으나 70時間以後에는 母菌의 生長量을 능가 하였다.

(3) SM-耐性菌은 254m $\mu$  波長의 紫外線 照射에서 母菌과 同一한 感受性을 나타내어 耐性因子는 安定된 것으로 생각되었다.

## Literature Cited

1. Bragg, P.D., and W.J. Polglase. 1962, Extracellular metabolites of streptomycin mutants of *Escherichia coli*. J. Bact. 84:370-374
2. Brubaker, R.R. and M.J. Surgalla. 1962, Genotypic alterations associated with a virulence in streptomycin resistance. J. Bact. 84:615-624
3. Cole, J.S. 1960, Field spray trials against wildfire and angular leaf spot of tobacco in Rhodesia. Ann. App. Biol. 48(2):291-298
4. Demerec, M. 1948, Origin of bacterial resistance to antibiotics J. 56:522-523
5. Gould, J.C. 1957, Origin of antibiotic-resistance

- in *Escherichia coli* analysed by transduction. Natur. 180:282-283
6. Hidake, E. and H. Murano, 1959, Studies on the streptomycin for plants, Ann. Phytopath. Soc. Japan 24:119-121
  7. Langley, R.A. and C.I. Kado, 1971, Genetic evidence for pleiotropic factors involved in the tumor inducing ability of *Agrobacterium tumefaciens*. Phytopath 61:899-900
  8. Miller, C.P. and Bohnhoff, 1947, Development of Streptomycin-resistant variants of *Meningococcus*. Science 105:620-621
  9. Newcomb, H.B. and R. Hawirko, 1949, Spontaneous mutation to streptomycin resistance and dependence in *Escherichia coli*, J. Bact. 57:565-572
  10. Panapoulos, N.J., W.V. Guimaracs and M.N. Schroth, 1973, Transfer of R, factor carrying carbenicillin resistance to plant pathogenic *Pseudomonas*. Phytopath. 63:12-17
  11. Panapoulos N.J., W.V. Guimaracs, J.J. Cho, and M.N. Schorth, 1975, Conjugative transfer of *Pseudomonas aeruginosa* R factors to plant pathogenic *Pseudomonas* spp. Phytopath. 65:380-388
  12. Weiner and Swanson, 1960, Changes in somatic antigens occurring in chloramphenicol resistant mutants of *Salmonella typhosa*, J. Bact. 79:863-868
  13. Shim, J.W. 1975, Studies on the Chemical resistance of phytopathogenic bacteria I. Chemical resistance of the rice bacterial leaf blight pathogen, *Xanthomonas oryzae* to Agrepto, Kor. J. Pl. Prot. 14(1):7-12
  14. Thayer, P.C. and R.E. Stall 1961, Effect of variation in the bacterial spot pathogen of pepper and tomato on control with streptomycin, Phytopath 51:568-571
  15. Wakimoto, S. and H. Mukoo, 1963, Natural occurrence of streptomycin resistant *Xanthomonas oryzae*, the causal bacteria of leaf blight disease of rice. Ann. Phytopath. Soc. Japan 28:153-158
  16. Yakushiji, K. and O. Wakae 1971, Action of I-amino 4-thiazole in controlling plant disease II Properties as rice bacterial leaf blight controlling agent. Ann. Phyopath. Soc. Japan 37:104-107
  17. 中西勇・天野隆・田邊潔・小生仁上, 1970 イネ白葉枯病に對する藥劑 水面施用効果. 日植病報 36:193