

植物病原性 細菌의 藥劑抵抗性에 관한 研究

1. 벼흰빛잎마름병균의 Agrepto 에 對한 抵抗性*

沈 載 昱**

〈接受日字 : 1975. 2. 26〉

Studies on the Chemical Resistance of Phytopathogenic Bacteria
I. Chemical Resistance of the Rice Bacterial Leaf Blight Pathogen,
Xanthomonas oryzae (Uyeda et Ishiyama) Dowson, to Agrepto

Jai Wook Shim**

Abstract

The experiments were conducted to examine the formation of chemical resistance of *Xanthomonas oryzae*, the causal organism of rice bacterial leaf blight, to Agrepto in the succeeding generations. The measurements of the bacterial growth were determined with the optical density as indirect method, and the results obtained were summarized as follows.

1. The Agrepto was effective in hindering the bacterial growth in the treatment of first generation, which was added in the broth even as low concentration as 30ppm.
2. When the successive four generations were treated with same concentrations, the bacterial growth increased conspicuously with succeeding generations and this phenomenon showed remarkable in the plots treated with 30ppm than in that of 10ppm.
3. When selections were repeated at treatment of 20 ppm, increasing the concentrations of the treatment in successive generations, the resistance increased with succeeding generations.
4. There was a tendency to acquire the higher rate of resistance in the progenies which selected from the treated plot of higher concentrations in previous generation than that of low concentrations.

緒 論

微生物의 藥劑에 對한 抵抗性에 관한 研究는 醫學微生物에 있어서는 오래前부터 많은 研究가 이루어져 왔으며 抵抗性機作 및 抵抗性因子의 遺傳學的인 追究도 *Salmonella typhimurium* 및 *Escherichia coli* 등에서 는 많이 이루어져 있다. 農業에 있어서도 農業生産의 向上에 따른 農藥의 使用量 및 使用 頻度의 增加로 植

物의 病原性 微生物에 있어서 藥劑에 對한 抵抗性의 問題가 醫學微生物의 境遇와 마찬가지로 깊은 研究들이 이루어져야 할 것으로 본다. 그러나 植物의 病原性 微生物에 있어서는 特히 細菌病에 對하여 Streptomycin 과 같은 抗生物質을 그 防除에 使用 하면서 부터 抗生劑에 對한 抵抗性의 問題가 提起되기 始作하였다.

植物病原性 細菌에 對한 藥劑 抵抗性에 관한 報告로는 Streptomycin 이 담배의 들불병균(野火病菌 *Pseudomonas tabaci*.)¹⁾, 고추와 토마토의 斑點細菌病菌(*Xa-*

* 文敎部 研究助成費 支援에 의한 研究 임

** 서울大學校 農科大學

** College of Agriculture, Seoul Nat. Univ.

Xanthomonas vesicatoria),¹⁰⁾ *Philodendron* 屬 植物의 斑點細菌病(*Xanthomonas dieffenbachiae*),³⁾ 그리고 벼의 흰빛잎마름병균(*Xanthomonas oryzae*)^{2),11)} 등에 대하여 抵抗力을 形成하였다는 報告를 들수 있고 또한 벼 흰빛잎마름병의 病原菌에 대하여 Chloramphenicol¹²⁾ 및 Phenazine⁵⁾ 등의 藥劑가 防除效果를 나타낸다고 認定되어 있으므로 本 實驗에서는 水稻의 主要病害 中の 하나인 흰빛잎마름병균에 대하여 抗生劑의 一種인 Agrepto를 選定하여 細菌의 世代 經過에 따른 藥劑 抵抗力을 檢討하려고 試圖하였다.

한편 벼 흰빛잎마름병의 病原菌은 普通의 감자 輪腐病菌 培地에서 單細胞로부터의 Colony가 形成되기 極히 어려운 生理的인 特性을 지니고 있어⁸⁾ Suwa⁹⁾는 Fe-EDTA가 添加된 合成培地를 使用하여 計數가 可能한 程度로 稀釋한 細菌懸液을 接種하였을때 高率의 Colony를 얻을 수 있었다고 報告하였으나 우선 本 實驗에서는 藥劑 處理에 의한 細菌의 增殖量을 比色計를 利用한 間接的인 方法으로 推定하여 大體的인 傾向을 밝히고 앞으로의 이 方面에 關係되는 研究의 方向 提示에 도움을 주려고 하였다.

끝으로 本 實驗은 1974年度 文教部 學術研究 助成費에 의하여 이루어 졌음을 밝히고 本 實驗의 遂行 過程에 始終 協助하여 준 서울大學校 農科大學의 趙源哲, 趙秀慶 兩君과 여러가지로 鞭撻하여 주신 親知들께 깊은 謝意를 表하는 바이다.

材料 및 方法

1. 菌株

本 實驗에 使用된 菌株은 藥劑를 使用하지 않은 벼 흰빛잎마름병의 檢定圃場에서 分離하여 本大學의 農生物學科 植物病理學 教室에 保存중인 71-23 係統을 使用하였다.

2. 藥劑 및 處理方法

使用 藥劑는 Agrepto 水和劑(a.i. 20%)이고 處理方法은 이 藥劑를 蒸溜水 10ml에 1,000ppm이 되도록 稀釋한 基本 溶液을 만든 다음 이 溶液을 直徑 25m/m 길이 180m/m의 試驗管에 10ml씩 分注한 Wakimoto¹¹⁾의 감자 半合成 培地인 液體 培養基에 適正量 씩을 添加하여 各各의 處理濃度를 調整하였다.

3. 菌의 接種 및 生長量 調査

藥劑處理를 爲하여 接種할 菌의 培養은 培養溫度 28±1°C의 條件下에서 斜面培地上에 2日間 培養한 菌을 使用하였다. 各 處理區에 接種한 菌의 量은 直徑 2m/m의 白金耳로 한 loop 떠서 行하였다.

藥劑處理의 效果에 따른 菌의 生長量 調査는 接種後 28±1°C로 固定한 恒溫器內에 靜置하여 72時間 培養한 後 Baush and Lomb의 Colorimeter를 使用하여 Optical Density로 測定 比較하였다. 이때 測定 波長은 400mμ으로 하였고 Blank로는 同一條件의 新鮮培地를 使用하였다.

4. 藥劑處理 菌의 同定

藥劑處理後 每世代의 菌은 斜面 培地에 옮겨 菌의 Colony 特性과 汚染如否를 觀察을 通하여 調査한 다음 次代 處理菌으로 하였으며 最終 段階에서 水稻幼苗 接種法에 의한 判別을 하였다.

그외의 詳細한 方法에 對하여는 試驗結果의 項에서 追加하기로 한다.

結果 및 考察

벼 흰빛잎마름병의 病原菌이 Agrepto 10, 20, 30ppm의 濃度를 4世代 동안 繼續的으로 處理 받았을 때 細菌의 增殖量을 調査하여 表 1과 같은 結果를 얻었다.

Table 1. Effect of successive treatment on the bacterial growth measured by optical density

Conc. (ppm)	Generation			
	I	II	III	IV
10	0.212	0.258	0.272	0.278
20	0.137	0.350	0.306	0.236
30	0.061	0.215	0.259	0.284

表 1에서 使用된 Optical Density(OD)의 값은 液體 培養基에서 자란 細菌의 密度를 나타내는 間接的인 方法의 하나로 藥劑가 添加된 培地에 細菌을 接種하여 72時間동안 培養했을 때의 細菌 密度에 對한 相對值이다 이 實驗에서 對照區인 無處理區의 OD는 0.481로 이 값은 細菌의 密度가 대략 10⁸/ml로 推定되었으나 正確한 密度의 推定值은 *X. oryzae*의 경우 普通의 감자 輪腐病菌 培地에서는 接種源의 細菌密度가 낮을 때는 培地上에 集落이 形成되지 않는다⁸⁾는 事實과 또한 Suwa⁹⁾가 提案한 Fe-EDTA 合成 培地에서도 集落의 計數가 可能한 50~200/ml 個의 細菌을 接種하여 約80%의 集落形成을 얻었다는 報告에 비추어 本 實驗 過程에서 OD에 따른 細菌密度의 比較의 正確한 推定은 할 수 없었으므로 이 問題는 앞으로 別途의 實驗에서 決定되어야 한다고 생각되며 處理效果의 傾向을 파악하기 爲하여는 OD의 測定值도 利用될 수 있는 한 方法이 될 수 있다고 생각된다.

同一處理濃度에서 世代 經過에 따른 細菌의 增殖量을 보면 連續된 藥劑處理가 各 處理區에서 모두 細菌增殖의 增加를 보이며 藥劑에 對한 耐性的 增加는 第4世代 以後에도 繼續되리라고 推測된다.

한편 處理濃度別 細菌 增殖率을 比較하여 보면 低濃度 處理인 10ppm 區에서 第1世代의 OD가 0.212 그리고 第4世代에서 0.278 로 그 增加 趨勢를 率로 볼 때 1.32 倍의 增加를 보이고 있으나 20ppm 處理區에서는 約 2 倍 그리고 30ppm 處理區에서는 第1世代의 OD 0.061에 比하여 第4世代에서 0.284 로 4.65 倍의 生長率의 增加로 高濃度 處理에 갈수록 耐性的 增加가 크게 됨을 볼 수 있었다.

*X. oryzae*에 對한 Streptomycin 耐성에 關하여 感受性菌은 10ppm 處理에서 生長의 阻止作用을 받으나 耐性菌은 1,000ppm이 含有된 培地에서도 높은 生長率을 보였다¹¹⁾고 하며 *X. dieffenbachiae*에서도 200~400 ppm의 濃度로 藥劑 撒布한 植物體의 病斑에서 分離한 菌株는 1,000ppm이 含有된 培地에서 良好한 生育을 보였다¹²⁾고 報告하고 있다.

따라서 本 實驗의 結果에서도 高濃度處理에서 耐性的 形成이 크게 나타났다는 事實은 世代 經過에 따라 藥劑의 處理 濃度를 높여 갈 경우보다 急激한 耐性

形成이 이루어질 것으로 생각 되었다.

藥劑處理의 濃度가 20ppm에서 選拔한 細菌들은 第2, 第3 및 第4世代에서 藥劑處理의 濃度範圍를 넓혀 世代別로 細菌增殖量의 增加를 調査한 바 圖 1과 같다.

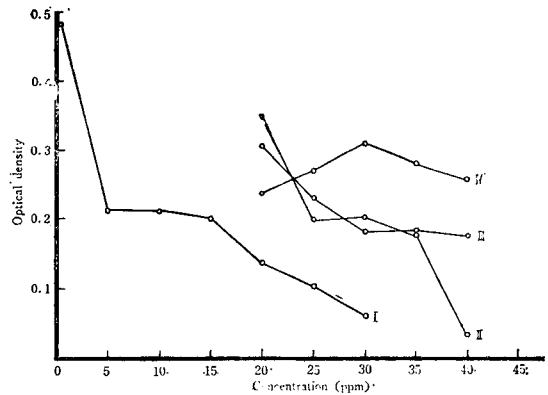


Fig. 1. Growth responses of bacterial cells in the successive generations, which were selected from the plots treated with 20ppm of Agrepto in previous generation. I, II, III, and IV refers to the 1st, 2nd, 3rd, and 4th generation, respectively.

Table 2. Growth rate measurement of bacterial cells with optical density, which selected from various concentrations of treatment in previous generations

Conc. of previous treat.	Generation										
	I	II			III			IV			
Conc. (ppm)	0	10	20	30	20*	30*	40*	20*	30**	40†	50†
0	0.481										
5	0.214										
10	0.212	0.258									
15	0.200	0.203									
20	0.137	0.104	0.350		0.306			0.236			
25	0.105	0.104	0.198		0.228			0.277			
30	0.061	0.075	0.214	0.215	0.180	0.265		0.308	0.244		
35			0.180	0.255	0.181	0.221		0.284	0.239		
40			0.025	0.048	0.076	0.193	0.225	0.257	0.260	0.335	
45				0.048		0.164	0.204		0.232	0.328	
50				0.038		0.062	0.196		0.125	0.360	0.313
55							0.190			0.331	0.248
60							0.132			0.305	0.300
65											0.246
70											0.251

* The stocks used were 20ppm treatment of generation II

** The stocks used were 20ppm treatment of generation III

† The stocks used were 40ppm treatment of generation III

每世代 選抜集團의 20ppm 處理區를 第1世代의 20 ppm 處理區와 細菌의 增殖量을 比較하여 보면 第2世代 以後世代는 모두 第1世代에 比하여 顯著的한 差를 보이고 있다. 또한 世代別 藥劑處理效果는 第2世代의 경우 40ppm 處理에서 OD가 0.025로 急激한 細菌增殖의 阻止作用을 나타내고 있으나 이에 比하여 第3世代에 가서는 同一 40ppm 處理區에서도 第1世代의 5ppm 處理와 비슷한 效果를 보이며 第4世代에 가면 40ppm 處理區에서 OD가 第1世代의 5ppm 處理區의 경우 0.212보다 훨씬 높은 0.260의 細菌增殖效果를 나타내고 있다.

이와 같은 現象은 表1에서도 볼 수 있는 바와 같이 同一 濃度 處理에서 細菌增殖量의 增加 뿐만 아니라 더 높은 濃度の 處理에서도 견딜 수 있는 耐性的의 增加가 可能함을 暗示하고 있다.

藥劑에 對한 耐性的의 形成效果를 低濃度 處理와 高濃度 處理에서 比較하여 보기 爲하여 前世代의 處理濃度를 달리하여 前代處理 濃度別 耐性 反應을 調査하고 그 結果를 表2에 要約하였다.

第2表의 結果에서 耐性 形成의 大體의인 傾向을 分析하기 爲하여 各 世代別로 分離하여 보면 圖2, 3, 4, 와 같다.

第2表의 結果 一部分을 圖2에서 要約하여 보면 第1世代의 10ppm 處理區에서 選抜된 集團은 第2世代에서도 30ppm 處理濃度 範圍까지는 第1世代의 경우와 비슷하나 20ppm 과 30ppm 에서 選抜된 集團의 경우는 그 增殖量 比較에서 顯著的한 差를 보이고 있어 第2世代의

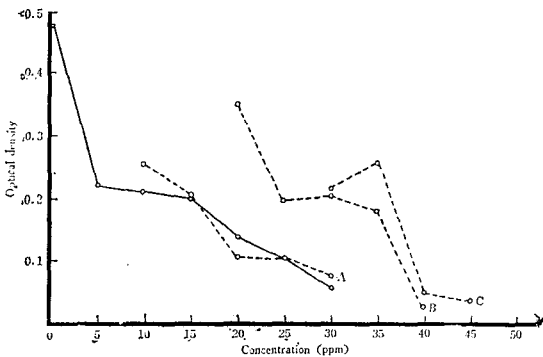


Fig. 2. Growth responses of bacterial cells treated with various concentrations of treatment in the second generation, which selected from the plots treated with 10ppm (A), 20ppm (B), and 30ppm (C) in previous generation. The solid line indicates the growth response of treatment in first generation as comparable measure.

處理濃度 35ppm에서도 OD가 各各 0.180 및 0.255로 第2世代부터 前世代의 高濃度 選抜이 보다 높은 耐性形成 效果를 나타내는 것으로 생각 되었다.

또한 第3世代 試驗區에서는 第1世代에서 30ppm 處理區의 細菌을 第2世代에서 20, 30 및 40ppm으로 處理하고 第3世代에서 各各을 處理濃度가 높은 範圍에서 處理하고 同一한 方法으로 細菌의 增殖量을 調査하였다. 그 結果 第2世代에서와 마찬가지로 耐性形成에 對한 選抜效果는 強選抜에 갈수록 큰 것으로 생각되었고 특히 40ppm의 選抜集團에서 뚜렷한 增殖 阻止作用을 나타내는 濃度範圍가 20ppm이나 30ppm 選抜集團에서 보다 더 넓은 것으로 생각 되었다.

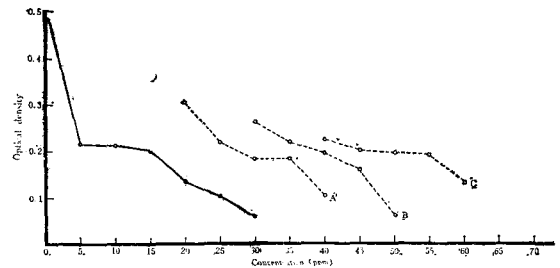


Fig. 3. Growth responses of bacterial cells treated with various concentrations of treatment in the third generation, which selected from the plots treated with 20ppm (A), 30ppm (B), and 40ppm (C) in second generation. Stocks used were 20ppm treatment of 2nd generation.

第4世代에서는 그 前代의 選抜集團이 다른 두 개의 細菌을 使用하였다. 即 第1世代와 第2世代에서는 同一 集團이었으나 第3世代의 20ppm 處理區에서 圖4의 A와 B에 使用된 選抜集團을 얻었고 40ppm 處理區에서 C와 D에 使用된 選抜集團을 얻었다.

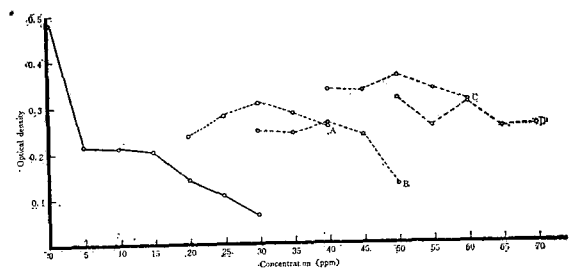


Fig. 4. Growth responses of bacterial cells in 4th generation. The stocks used were selected from 20ppm (A and B) and 40ppm (C and D) treatment plots of 3rd generation.

第4圖에서 보는 바와 같이 前代의 低濃度 選抜集團인 第3世代 處理 30ppm(圖 4의 B)의 경우 第4世代 處理의 反應은 50ppm 處理에서 細菌의 増殖量이 떨어지나 第3世代의 40ppm 處理集團(C)과 50ppm 處理集團(D)은 第4世代에서 處理濃度 60이나 70ppm에서도 細菌 増殖量의 顯著한 減少傾向을 보이지 않아 A나 B에 比하여 形成된 耐性的의 範圍가 훨씬 넓은 것으로 생각되었다.

微生物에 있어서 藥劑抵抗性的의 特性은 *E. coli*에서 接合의 方法으로 쉽게 感受性菌에서 옮겨 갈 수 있는 遺傳的 要素라고 하며^{7,12)} 여러 種類의 抗生物質에 對하여 別個의 遺傳因子가 關係되고 이들 遺傳因子는 集團內에서 消失될 수 있다⁶⁾는 報告가 있다. 뿐만 아니라 抵抗性因子는 接合 形質轉換 等에 의하여 傳達이 可能하고 因子間의 分離, 再組合의 可能性 等 遺傳子의 特性을 지닌 因子들이 報告되어 있다^{13,14)} 또한 Suda⁶⁾의 報告에 依하면 *Sacharomyces cerevisiae*에서 Oligomycin이나 Erythromycin 等이 藥劑 耐性突然變異의 偶發的인 誘發이 可能하였다는 것이다.

本 實驗의 結果들을 綜合하여 以上の 報告들과 比하여 볼 때 *X. oryzae*가 Agrepto에 對하여 累代處理에서 耐性的의 增加를 보이며 또한 그 選抜의 效率이 高濃度 處理에서 높아진다는 事實은 *X. oryzae*의 集團內에 存在하는 抵抗性 因子의 作用 結果라고 생각된다. 따라서 *E. coli*에서와 같이 다른 藥劑에 對한 別個의 抵抗性因子의 存在 證明과 아울러 앞으로 抵抗性的의 遺傳的 研究가 많이 이루어져야 함을 強調하고 싶다.

摘 要

벼 흰빛잎마름병의 病原菌(*Xanthomonas oryzae*)을 利用하여 抗生劑의 一種인 Agrepto에 對한 藥劑抵抗性形成을 調査하기 爲하여 世代 經過에 따른 藥劑處理效果를 Optical Density로 間接 測定하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. Agrepto는 液體培養基에 添加 되었을 때 處理第1世代에서 30ppm까지의 낮은 濃度 處理에서도 細菌 増殖에 顯著한 阻止 效果를 나타내었다.

2. 同一濃度의 4世代間 處理에서 世代의 經過에 따라 細菌 増殖量이 顯著히 增加하였고 増殖率은 10ppm 處理區에서 보다 30ppm 處理區에서 더욱 뚜렷하였다.

3. 前世代 20ppm 處理區의 選抜集團의 境遇 世代가 經過할수록 더욱 耐性的의 增加 現狀을 나타내었다.

4. 高濃度 處理區에서 選抜된 細菌이 低濃度處理區에서 選抜된 細菌의 境遇보다 抵抗性 形成이 顯著히 增加되는 傾向을 보였다.

引用文獻

1. Cole, J.S. 1960. Field Spray Trials Against Wildfire and Angular Leaf Spot of Tobacco in Rhodesia. Ann. App. Biol. 48(2); 291—298.
2. 福永一夫·米原弘·見里朝正·沖本陽一郎. 1961. 抗生物質による 白葉枯病 防除に 關する 研究(第1報) 既知抗生物質の 阻止 阻法 ならび 接種試驗法による スクリニング. 日 植病報 26 : 77—78.
3. Knauss, J.F. 1971. Resistance of *Xanthomonas dieffenbachiae* isolates to Streptomycin. (Ann. Meeting Abstracts) Phytopath. 61 : 898—899.
4. Mitsuhashi, S., K. Harada, H. Hashimoto, M. Kameda, and M. Suzuki. 1962. Combination of Two Types of Transmissible Drug-Resistance Factor in a Host Bacterium. J. Bacteriol. 84 : 9—16.
5. Sekizawa, Y., T. Watanabe, and M. Oda. 1965. Effect of Phenazine Against Rice Leaf Blight Bacterium, and its Biochemical Mechanisms. Ann. Phytopath. Soc. Japan 30(3) : 145—152
6. Suda, K. and A. Uchida. 1972. Segregation and Recombination of Cytoplasmic Drug-Resistance Factors in *Saccharomyces cerevisiae*. Japan J. Genetics. 47(6) : 441—444.
7. Sugino, Y. and Y. Hirota. 1962. Conjugal Fertility Associated with Resistance Factor R in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 84 : 902—910.
8. Suwa, 1960. Single Cell Culture of *Xanthomonas oryzae* (Uyeda et Ishiyama) Dowson, the Causal Organism of Bacterial Leaf Blight of Rice Plant. Ann. Phytopath. Soc. Japan 25(4) : 199—203.
9. Suwa, 1962. Studies on the Culture Media of *Xanthomonas oryzae* (Uyeda et Ishiyama) Dowson. Ann. Phytopath. Soc. Japan. 27(4); 165—171.
10. Thayer, P.L. and R.E. Stall. 1961. Effect of Variation in the Bacterial Spot Pathogen of Pepper and Tomato on Control with Streptomycin. Phytopath. 51 : 571.
11. Wakimoto, S. and H. Mukoo. 1963. Natural Occurrence of Streptomycin Resistant *Xanthomonas oryzae*, the Causal Bacteria of Leaf Blight Disease of Rice. Ann. Phytopath. Japan. 28(3) : 153—158.
12. Watanabe, T. and T. Fukasawa. 1961. Epistome-Mediated Transfer of Drug Resistance in

Enterobacteriaceae. I. Transfer of Resistance Factor by Conjugation J. Bacteriol. 81 : 669-677.

13. _____ and _____, 1961, Episome-Mediated Transfer of Drug Resistance in Enterobacteriaceae, III. Transduction of Resistance Factor. J. Bacteriol. 82 : 202-209.

14. _____ and _____, 1962, Episome-Mediated Transfer of Drug Resistance in Enterobacteriaceae. IV.

Interactions between Resistance Transfer Factor in *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 83 : 727-735.

15. Yakushiji, K. and O. Wakae. 1971. Action of 2-Amino-1,3,4-thiadiazole in Controlling Plant Diseases. II. Properties as Rice Bacterial Leaf Blight Controlling Agent. Ann. Phytopath. Soc. Japan. 37 : 104-107.



“柑橘害虫에 대한 綜合防除”

農業技術研究所

李升燦 金洪善

1973년부터 柑橘害虫에 대한 綜合防除法를 確立코자 濟州道에서 試驗調査한 結果 蝟응애의 天敵으로 반날개 류의 일종인 *Oligota yasumatsui* Y. 등 10여종이 발견되었다.

한편 濟州柑橘 栽培地에서는 害虫防除를 위한 藥劑撒布回數가 매년 增加되고 있는 實情으로 本 試驗을 통하여 藥劑를 撒布치 않은 條件下에서 天敵의 증가로 蝟응애의 發生密度가 經濟的 被害水準 以下로 維持되어 生物學的 防除의 可能性을 얻었다.

그러나 藥劑撒布回數가 많은 圃場에서 別로 문제가 되지 않는 이세리아까지벌레 빨밀까지벌레 특히 루비까지벌레와 蝟응애나방이 藥劑를 撒布치 않은 條件에서는 主要害虫으로 登場하게 되었는데 이 害虫의 生物學的 防除를 위한 天敵의 利用研究 또는 選擇性 殺虫劑 選拔을 위한 試驗研究가 繼續되고 있다.