

뽕나무 細菌性萎縮病菌 *Pseudomonas mori* (Boyer et Lambert) STEVENS의 Rough Colony Type Mutant에 관한 연구; 病原性 및 一般的 性質

李永根 · 金鍾完* · 趙鏞涉

서울대학교 農科大學 * 農村振興廳 作物改良研究事業所

The Study on Rough Colony Type Mutant of *Pseudomonas mori*(Boyer et Lambert) Stevens, caused Mulberry Bacterial Blight: Pathogenicity and General Characteristics.

Young Keun Yi · Jong Wan Kim* · Yong Sup Cho

College of Agriculture, Seoul National University., Suweon 170, Korea

* Crop Improvement Research Center, Office of Rural Development., Suweon 170, Korea.

ABSTRACT

The study has been carried out to compare the pathogenicity, physiological characteristics and genetic reliability between rough colony type strain and smooth colony type strains of *Pseudomonas mori* (Boyer et Lambert) Stevens which were isolated from diseased plant parts in 5 different areas throughout country.

The results are summarized as follow.

1. The rough colony type strain showed more aggressive reactions to tested host plant varieties than smooth colony type strains though there was no differences in the appearance of lesion types caused by both strains.
2. Both colony types were differentiated morphologically in that the rough colony type strain was having more than 200 μ long filamentous body without flagella where as the smooth colony type strains have short rods with one or several polar flagella.
3. The colony of smooth type strains was circular, entire, smooth and opaque, while the rough type strain showed undulated, irregular margin, rough and wrinkled colony on nutrient agar media.
4. There were no differences between both colony types in the physiological and serological test.
5. Both of smooth and rough colony type strains showed genetic reliability through more than 100 succeeding cultures on the media, and were stable to various chemicals such as 1 to 3 percent of NaCl, 5 kinds of organic acid and 4 kinds of antibiotics.

I. 緒 言

蠶業生産은 크게 栽桑, 育蠶 및 製糸의 3過程으로 나

눌 수 있다. 우리나라 蠶業生産이 農産物 輸出의 大宗을 이루고 있는 한편 農家所得에 있어서도 크게 寄與하고 있음은 事實이나, 아직도 이웃 日本과 生産性을

比較해 볼때 蠶種 箱子當 고치生産량은 32 kg으로 비
 슷하지만, 보다 根本이 되는 桑田의 單位面積當 고치
 生産량은 46.3kg/10a로 日本 (64kg/10a)에 比較 30%
 나 뒤지고 있어 蠶業振興에 크게 問題를 提起해 주고
 있다.^{6,20)} 이와 같은 現狀은 勿論 한가지 決定的인 要
 因에 依한 것이 아니고 氣候, 土壤, 栽培技術 및 品種
 等の 여러가지 條件의 不均衡에서 오는 複合要因의 結
 果라고 하겠으나, 그 中에서도 特히 病虫害로 인한 損
 失은 農藥使用이 極히 制限을 받는 桑葉生産에 하나의
 制限要因이 된다고 하겠다.

現在까지 世界的으로 記錄되어 있는 桑樹病의 種類
 는 모두 26種¹⁹⁾으로 우리나라에서는 그中 21種¹⁰⁾이 알
 려져 있다. 이들 病害 中 細菌에 依한 것은 細菌性 萎
 縮病 뿐이고 其他는 바이러스, 真菌, 마이코플라스마
 에 依해 發生되고 있다. 뽕나무 細菌性萎縮病에 關한
 國內에서의 처음 記錄은 1919年 日本人 中島 等¹⁶⁾이
 勸業模範場 蠶業試驗所 桑田에서 採集, 分離한 細菌의
 形態 및 生理的 性質이 *Pseudomonas mori*와 類似하
 다고 한 것이며, 그 後 中田 等,¹⁷⁾ 野瀬²¹⁾는 本病이
 全國적으로 分布되어 있다고 報告하였다.

最近에는 金 等¹³⁾이 몇個 地域 및 品種 別로 被害를
 調査한 것 외에 本病에 關한 研究는 별로 없으며, 그
 들은 1971년에 淸州에서 7.6%, 春川에서 4.3%, 密陽
 에서 2.7%, 金堤에서 2.6%의 發生을 報告하였다. 그
 러나 筆者는 1976年 5月來에 龍仁郡 一部地域에서 罹
 病率率 14.53%, 罹菌株率 99.9%까지 發生하고 있음
 을 보았다. 日本의 경우 北浦¹⁴⁾가 松本地方에서 調査
 한 報告에 依하던 品種에 따라 5~10%의 收量이 本病
 으로 因하여 減收되었다고 하였으며, 高橋 等⁴⁰⁾은 岩
 手縣에서 64~90%, 群馬縣에서 21%의 發生量을 報告
 한 바가 있다.

뽕나무의 細菌性萎縮病은 一種의 柔組織病으로서 그
 病徵이 여러가지로 나타나는데, 그 典型的인 것으로는
 細菌이 잎맥을 侵害함으로써 잎맥이 變色과 同時에 萎
 縮하여 잎全體가 오갈병으로 나타나는 것과 新梢에
 發生하여 가지全體가 검은색으로 變해 말라 죽고, 어
 린 植物에 感染되면 外部 病徵에 앞서 植物全體가 萎
 生으로 되는 것이 있다.

最近 日本의 佐藤 等³⁰⁾은 人工培地 上에서 育원하
 나란한 本病原細菌의 Rough colony type mutant가
 Wild type에 比較하여 강한 病原性을 보였으며, 紫外線,
 高熱, 抗生物質 等の 外部 環境에 對하여 遺傳的인 安
 定性을 가졌다고 하였다. 이러한 Mutant는 앞으로 檢
 査 增加하여 뽕나무 栽培에 새로운 問題를 提起할 可
 能성이 크다고 하겠다.

本 研究는 뽕나무 細菌性萎縮病에 對한 一連의 試驗

研究를 遂行하는 過程에서 自然狀態의 罹病株로 부터
 病原菌의 Rough colony type mutant를 分離하고, 그
 病原性 및 細菌의 一般的 性質을 Wild type과 比較하
 는데 그 目的이 있었다.

II. 研究史

뽕나무 細菌性萎縮病에 對한 最初의 記錄은 1890年
 이탈리아의 Cuboni, Garbini가 Verona 附近의 뽕나무
 病害의 病原에 對하여 누에의 病原인 *Streptococcus*
bombycis Flügge와 類似한 *Diplococcus*屬이라고 한 것
 이다. 그 後 Macchiati (1892)는 接種試驗을 通하여
Bacillus cubonianus Macchiati라고 命名하였고, Peg-
 lion (1897)은 뽕나무 잎과 新梢에 對한 接種試驗을 거
 처 病原細菌은 黃色 Colony를 形成하며 제라틴을 溶
 解한다고 하였다.

그러나 1893年 프랑스의 Lambert, Boyer는 罹病植
 物에서 白色細菌을 分離, 培養하고 病原性 檢定을 거
 처 *Bacterium mori* Boyer et Lambert라고 命名하였다.

그 後 美國의 Smith(1910)는 Georgia의 罹病植物에
 서 黃色과 白色의 2가지 細菌을 Poured-Plate Method
 에 依하여 純粹分離, 培養하고 病原性檢定 結果, 白
 色細菌의 病原性만을 認定하고, Macchiati의 細菌은
 純粹培養된 것이 아니었다고 否定하였다. 그는 本病의
 病徵, 病原菌의 形態, 제라틴의 溶解, 牛乳反應, Indol
 의 生成, 耐鹽性 等 生理的 性質과 發育溫度, 耐乾性,
 Cohn 및 Uschinsky 培地에서의 培養의 性質 等を 調
 査하여 *Bacterium mori* (Boyer et Lambert) Smith라
 고 命名하였으며 그가 調査한 細菌의 一般的 性質은,
 後에 Bergey's Manual에 記錄되었다.^{2,39,40,41)} Stevens
^{2,25)}는 *Bacterium mori*가 單極毛性이라는 理由에서
 Migula의 分類方法⁷⁾에 따라 *Pseudomonas mori*로 改
 稱할 것을 提唱하였으며, 그 後 Bergey²⁾의 分類 方式
 이 一般化됨에 따라 *Pseudomonas mori*(Boyer et Lam-
 bert) Stevens라고 하게 되었다. 그러나 最近 改定된
 Bergey's Manual³⁾에 依하면 *P. mori*는 *P. syringae*
 Van Hall에 統合되어 있다. 本病의 發生生態에 關한
 一連의 研究로서 北浦 等¹⁴⁾은 뽕나무의 品種, 樹令, 時
 期別 및 降雨와 被害程度와의 關係를 調査하여 特히
 장마 後에 收量이 5~10%까지 減小된다고 하였으며,
 米山⁴⁷⁾는 伐採方法, 桑田內 桑樹의 位置, 桑田의 方向
 및 風向과 本病 發生과의 關係를 調査하여 夏伐을 한
 桑田이나, 桑田 周邊에 位置한 뽕나무에서 被害가 甚
 하였으며 特히 바람이 細菌의 飛散 및 侵入 門戶 開放
 에 重要な 役割을 한다고 하였다.

佐藤 等²⁷⁾, 久保 等¹⁵⁾은 本病原細菌이 罹病된 가지
 나 마른 잎에서 越冬하여 다음 해에 重要な 1次傳染原

이 된다고 하였고, 또한 佐藤 等²⁹⁾은 本 病原細菌의 土壤에서의 越冬可能性에 對하여 土壤粒子的 크기, 土壤 有機物, 他 微生物과의 關係 및 溫·濕度와의 關係 등을 調査하고 그 可能性을 間接的으로 立證한 外에 最近³⁰⁾ 本 病原細菌의 太陽光線, 紫外線 pH 및 溫·濕度 等에 對한 抵抗力을 調査하였다.

本 病原細菌의 phage 는 1936年 Biberdiva 에 依해서 最初로 分離되었으며 항가리의 Klement³⁵⁾, 日本의 高橋 等⁴³⁾과 佐藤 等³⁵⁾은 病原細菌 및 그 phage 를 分離하여 *P. mori* 以外에 6屬 32種의 細菌에 對한 phage 의 寄生範圍를 調査하고, *P. mori* 以外에도 *P. phaseolicola*, *P. glycinea*, *P. striafaciens*, *P. eriobotriae* 에 對하여 寄生성을 나타내나 그 外의 細菌에 對해서는 寄生성을 보이지 않았다고 하였다. 또한 佐藤 等³⁵⁾은 *P. mori* 10個 菌株에 對한 phage 의 寄生性에서 phage 의 系統을 2個 群으로 나누고, phage 의 形態, 不活性化 溫度 및 溶菌斑의 形成適溫 等을 調査하였다. 또 佐藤 等^{28, 31)}은 罹病桑田에서의 年中 phage 의 消長 및 病든 일으키므로 부터 빗물에 依하여 土壤으로 運搬되는 phage 의 移動經路를 調査하였고, 佐藤^{26, 33)}은 phage 의 溫·濕度, 太陽光線, 紫外線, pH 및 乾燥 等 各種 要因에 對한 抵抗力과 病든 일으키 罹病桑田의 土壤內에서의 phage 의 活性持續 期間을 報告하였다. 佐藤 等^{34, 35)}은 6 個群의 phage 를 利用하여 125 菌株의 *P. mori* 를 5系統으로 分類하였으며, 高橋 等⁴²⁾은 本 細菌의 抗血清이 *P. mori* 外에 *P. tabaci*, *P. cichorii*, *P. phaseolicola* 에 對해서도 陽性反應을 나타냈다고 하였다. 이 밖에 Schroth³⁶⁾은 *P. mori* 가 콩나무 外에 Common bean 과 Lima bean 에도 halo blight 狀의 病徵을 나타낸다고 하였다.

形態의 由로 다른 *P. mori* 의 Mutant 가 밝혀진 것은 最近의 일이다. 佐藤 等³⁰⁾은 本 病原細菌이 土壤에서 越冬할 수 있는 가를 試驗하기 爲해, 土壤에 接種한 後에 再 分離하여 繼代培養하는 途中 나타난 Rough colony type mutant 를 分離하여 그 病原性, 形態, 生理的 性質 및 血清學的 性質을 wild type (Smooth colony type) 과 比較 調査하여 報告하였다. 이와 같은 細菌의 形態學的 變異는 1921年 Arkwright³⁹⁾ 에 依해 醫學界에서 論議되기 始作하였으며, 植物病原細菌으로서 是 Sharp³⁷⁾가 *Xanthomonas phaseoli* 에서 Rough 및 Smooth colony 型菌株을 形態的, 血清學的 및 生理的 性質과 病原성을 比較 調査하였다. 그가 調査한 R 型菌株은 colony 의 表面이 거칠고 隆起한 一般의인 Rough colony 型菌株과 같았으며, 生理的 性質이나 血清學的 的으로 S 型菌株과 差異가 없었다고 하였다. 그러나 病原性에서는 Spray 나 Rubbing method 에 依한 接種의

境遇 두 菌株間에 差異가 없었으나, Needle prick 에 依한 傷痕接種에서는 S 型 菌株가 強한 病原성을 나타낸다고 하였다. 또 그는 大豆菌에 R 型菌株를 接種한 結果 S 型 및 R 型菌株를 모두 얻을 수 있다고 하여, 寄生植物을 通하여 R 型에서 S 型菌株로의 變化가 일어나는 것을 보여 주었다.

Link 等¹⁸⁾은 *Xanthomonas citri*, *Pseudomonas medicaginis* var. *phaseolicola*, *Agroqacterium tumefaciens* 에서 R 및 S 型菌株를 分離하였고, Corey 等⁴⁾은 *Xanthomonas phaseoli* 의 4가지 Colony 型菌株 (Rough, Smooth, Mucoid, Semimucoid) 를 分離하여 이들의 多糖類의 量을 比較 하였다. 그 結果 寄主에서 나타나는 病斑面積의 크기는 Rough < Smooth < Semimucoid < Mucoid 의 順序였으며 이것은 菌株의 多糖類의 量과 正比例하였다고 하였다. Reed²⁵⁾ 은 人體病原細菌인 *Serratia marcescens* 의 Rough, Smooth, Mucoid colony 型菌株를 報告하였는데, 其中 R 型과 S 型을 다시 各各 mucoid 와 non-mucoid 型으로 細分하였다. 그는 細胞의 크기가 1~1.5 μ 인 S 型菌株에 比하여 R 型菌株는 그 길이가 50 μ 에 達하는 것도 있다고 하였다.

岡部²³⁾은 *Pseudomonas solanasearum* 의 F (fluidal), Op (Opalescent), C (circular) 等 16가지 Colony 型菌株를 調査하였으나, 그가 稱한 R' 및 R'' 型은 一般의인 Rough Colony 型과 같은 糸狀型 細菌은 아니었다. 後藤⁹⁾은 *Xanthomonas citri* 等 *Xanthomonas* 屬 細菌 12種의 透明 Colony 型變異株 (T type) 를 分離하여 病原性 및 phage 의 感受성을 各各 wild type 과 比較한 結果, 病原성에 있어서 *X. citri* 와 *X. pisi* 를 除外한 *X. oryzae* 等 10種에서 wild type 보다 낮은 病原성을 보였으며, phage 에 對한 感受성은 變異에 依해서 多様な 變化를 나타내어 一定한 傾向을 볼 수 없었다고 하였다.

細菌의 이러한 形態的 變異를 일으키는 原因을 究明하기 爲하여 Rane²⁴⁾은 *Xanthomonas phaseoli* 에서 R \rightleftharpoons S 型의 變化에 影響을 미치는 外的 要因을 調査하였다. 그는 37.5°C 의 高溫에서 不完全하나마 S 型菌株가 R 型으로 變하였고, 10~15% Pepton 液體培地에서 거의 完全하게 R 型으로 變하였다고 하였다. 또한 그는 同-한 Colony 型의 菌株를 抗原으로 製造된 抗血清 10%를 含有하는 培地에서 거의 完壁한 R \rightleftharpoons S 型의 變化를 觀察하였다고 하였다. Allison¹⁾은 *Escherichia coli* 를 紫外線 照射 및 NaCl 의 濃度を 달리한 培地에서 培養한 結果, 0.2% NaCl 을 處理한 培地에서 40~50 μ 의 糸狀型菌株 (elongated cell) 를 얻었고, 高濃度인 1% NaCl 을 含有한 培地에서는 紫外線 處理를 하

지 않은 母細胞에 比하여 500~1,000倍 크기의 不定型 巨大細胞(Amorphous giant cell)를 얻었다고 하였다. Otsuji 等²³⁾도 *E.coli*에 紫外線을 照射한 結果 膠膜이 없는 糸狀型 菌株(nonseptate filaments)를 얻었다고 報告하였다. 이 밖에 Colony 型의 變異는 細胞壁의 化學的 變化와 密接한 關係가 있으며 電解物質, 毒生物質 等 外部環境에 依한 것으로 생각되고 있으나 아직 그 仔細한 機作은 明確하지 않다.³⁾

III. 材料 및 方法

1. 病原細菌의 分離

1975年 7月~1976年 6月 사이에 京畿道 水原 蠶業試驗場, 龍仁郡 松田農高, 江原道 蠶種場(春川), 江原道 春城郡 韓生蠶業研究所, 慶北 尙州郡 一般 養蠶農家에서 採集한 罹病組織에서 病原菌 35個 菌株를 分離하였다. 分離方法은 新鮮한 病患部를 70% Ethanol에서 1~2秒, 1,000倍 HgCl₂에서 2分間 表面殺菌하여 King, ward and Raney B培地(Proteose pepton 20g, Glycerin 10ml, K₂HPO₄ 1.5g, MgSO₄·7H₂O 1.5g, Agar 20g)에서 分離하였다. 供試菌은 35個 菌株 中에서 寄主의 品種에 對한 病原性에 依하여 나누어진 wild type 4個 菌株와 Rough colony type 1個 菌株로 하였다(表 1, 2).

Table 1. The source of isolates of *Pseudomonas mori* used in the study

Isolates	Origin of isolates		Collection date
	Locality(Prov.)	Plant part	
R*	Suweon, Kyeongki	Shoot	July 1975
S-1	Yongin, Kyeongki	Shoot	August 1975
S-2	Suweon, Kyeongki	Shoot	July 1975
S-3	Sangju, Kyeongbuk	Leaf	June 1976
S-4	Chunseong, Kangweon	Vein	June 1976

* S; Rough colony type mutant.
S; Smooth colony type isolates.

2. 病原性 檢定

接種原은 King B培地에서 48時間 培養하여 細菌懸濁液 200ml/當 Tween 20를 2량울씩 沾착제로 添加하여 使用하였다.

35菌株의 系統을 區分하기 爲하여 罹病性 品種인 市平(Shipyeong), 耐病性인 魯桑(Nosang), 그리고 感受性 與否가 分明하지 않은 --之賴(Iljirae)로서 定植한 3年生 成木을 供試하였다.

接種方法은 昆蟲針(Shiga insect headless pins, No. 250) 15個를 묶어서 使用한 多針法과 噴霧接種으로 하였다. 傷痕接種은 新梢, 葉脈, 葉肉의 3部分으로 나누어 各 5個體씩, 噴霧接種은 5 잎씩 處理하여 各 3反復

을 두었다.

3. 細菌의 一般의 性質의 比較

1) 形態 및 染色性

供試菌의 모양, 크기, 鞭毛, 皮膜의 有無 等의 形態를 King B培地에서 25°C에 24時間 培養하여 滅菌蒸溜水에 懸濁하고, 2% P.T.A(phosphotungstic acid)에 染色한 後 dip method에 依하여 電子顯微鏡(Hitachi Model HU11-E)으로 觀察하였다. 運動性은 hanging drop method에 依하여 調査하였으며, Gram 染色 및 其他 細菌染色은 Skerman³⁸⁾의 方法에 따랐다.

2) 培養 및 生理的 性質

培養的 性質은 25°C에서 培養하여 調査하였으며 Colony의 色은 Japan color standards(日本色彩社)를 使用하였고, 生理的 性質은 Cowan⁵⁾, Harrigan 等¹¹⁾, Kim¹²⁾, Skerman,³⁸⁾ 富永⁴²⁾의 方法에 준하였다.

4. 血清學的 性質의 比較

R菌株와 S-1菌株의 生菌에 對한 抗血清을 富永⁴²⁾의 方法에 따라 各名 調製하였으며 力價의 測定은 Slide glass 法에 依하였다. 調製된 兩 抗血清에 對한 凝集域의 比較는 富永⁴²⁾의 方法에 따라 寒天內擴散法(Agar-gell double diffusion test)에 依하여 調査하였으며, 앞서 供試된 *P.mori* 5菌株 및 *P.glycinea*, *Xanthomonas phaseoli*, *X. oryzae*-1, *X. oryzae*-2 (Kressek type), *Erwinia carotovora*, *E.cherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*를 對象菌株로 하였다.

5. 遺傳的 安定性

繼代培養에 依한 遺傳的인 安定性은 King B培地 및 肉汁寒天培地(Beef extract 10g, pepton 10g, NaCl 3g, Agar 15g)을 不規則하게 交互로 排列하여 100回 以上 繼代培養하였으며, 抗生物質에 對한 安定性은 Streptomycin, Tetracyclin, Chloramphenicol, Oleandomycin, H₂SO₄ 各 10r, 50r를 含有하는 肉汁液體培地에서 10日間 培養하여 觀察하였다. 營養要素에 依한 變異의 誘發에 對해서는 有機酸의 나트륨염 5種(Sodium acetate, Sodium citrate, Sodium glutamate, Sodium malonate, Sodium tartrate) 各 2%를 炭素源으로 하는 培地(NaCl 1g, MgSO₄·7H₂O 0.2g, (NH₄)₂PO₄ 1g, KH₂PO₄ 0.5g, 有機酸의 나트륨염 2g, 寒天 20g)에서 10日間 培養하였다. 또한 NaCl 1~3%를 含有하는 肉汁液體培地에서 10日間 培養하여 滲透壓에 對한 安定性을 觀察하였다.

VI. 實驗結果

1. 病原性

分離된 35個 菌株를 뽕나무 3品種(市平, --之賴, 魯桑)에 接種한 結果는 다음과 같다. (表 2)

Table 2. Reactions of 35 isolates of *P.mori* on 3 mulberry varieties when the lesion was observed 7 days after artificial inoculation with wound and spray methods

Mulberry varieties	Inoculation method	Reactions of <i>P. mori</i> isolates:*				
		R	S-1	S-2	S-3	S-4
Shipyeong	wound	+++	++	++	++	+++
	spray	++	-	+	-	++
Iljiroe	wound	+++	++	+++	++	+++
	spray	+++	++	++	-	++
Nosang	wound	++	+	+	+	++
	spray	++	+	-	-	+
Total No. of the isolates		3	9	16	5	2

* R; Rough colony type isolate.

S; Smooth colony type isolate.

+++ severe, ++ moderate, + mild, - no symptom.

3品種間の 서로 다른 菌株에 對한 感受性的 程度는 傷痕接種에 依해서는 그 差異가 적었으나 噴霧接種에 依해서는 많은 差異를 보였다. 즉 噴霧接種의 境遇 R 菌株과 S-4 菌株는 모든 品種에 對해 강한 病原性을 보였으며, 菌株 S-3는 모든 品種에 對해 강한 病原性을 나타내었다. 그러나 S-1 菌株는 市平보다 魯桑에서, S-2 菌株는 魯桑보다 市平에서 강한 病原性을 보였다. 모든 處理에서 R 型菌株는 S 型의 4 菌株들 보다 病原性이 강한 것으로 나타났다. (表 1)

뽕나무에 나타나는 病徵에서 R 型和 S 型菌株間에 아무런 差異를 볼 수 없으며, 本病에서 볼 수 있는 3가지 病徵(잎에 나타나는 黑褐色 壞死型 斑點, 잎의 萎縮, 新梢의 軟腐)은 供試된 모든 菌株에서 發現되었다. 그러나 供試된 品種間의 病徵 別 感受性的 差異는 認定할 수 있었다. 즉 잎에 發生하는 黑褐色 斑點(Ns)은 一之類에서 가장 甚하였으나, 잎의 萎縮(Cr) 및 新梢의 軟腐(Bb)는 市平에서 가장 甚하였다. (表 3)

Table 3. Reaction of rough and smooth colony type isolates of *P.mori* on three mulberry varieties when the lesion was observed after 10 days incubation period following wound inoculation

Isolates	Reactions with each lesion type on;								
	Shipyeong			Iljiroe			Nosang		
	Ns	Cr	Bb	Ns	Cr	Bb	Ns	Cr	Bb
R**	+++	++	++	+++	+	++	++	+	++
S-1	++	+	++	+++	+	+	+	+	+
S-2	++	++	++	+++	+	+	++	+	++
S-3	++	-	++	++	-	+	+	-	+
S-4	+++	++	++	+++	+	++	++	+	++

* Ns; Necrotic spots on the leaf.

Cr; Crinkled leaf.

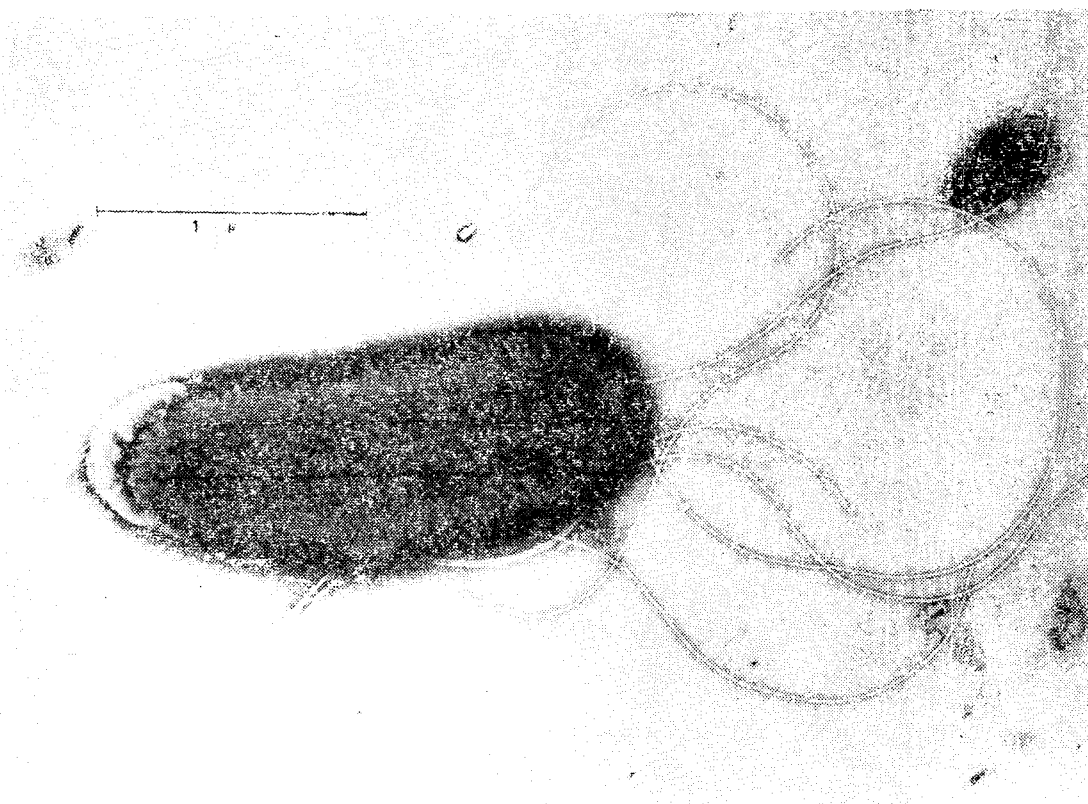
Bb; Black blight of the shoot.

2. 細菌의 一般의 性質

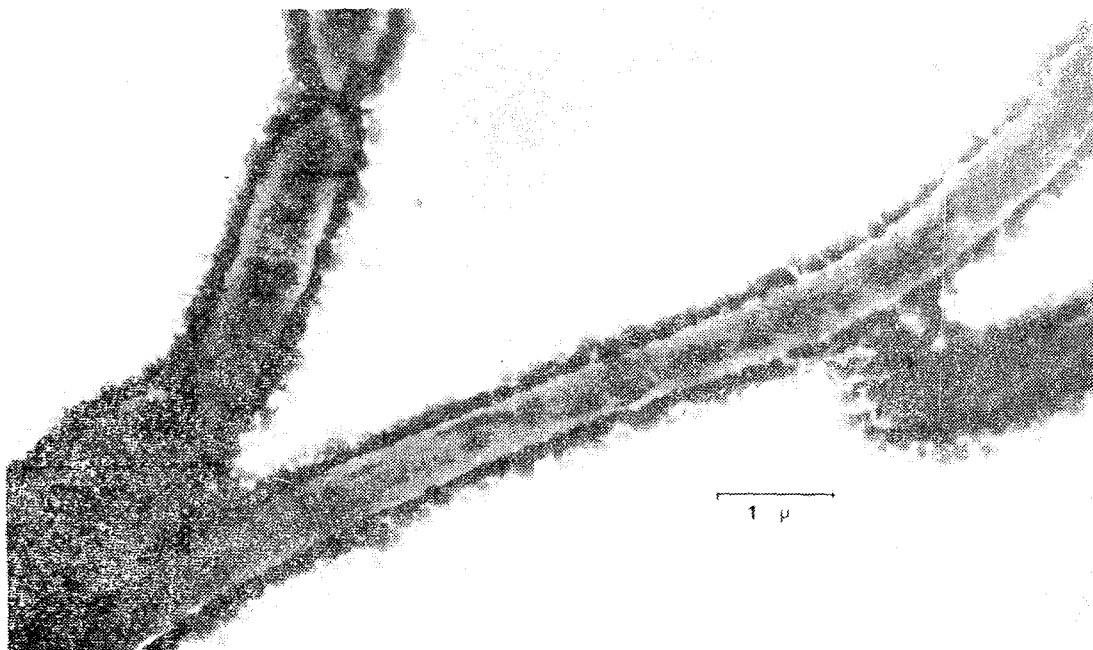
가. 形態 및 染色反應

R 型菌株와 S 型菌株 사이에는 型態의 으로 뚜렷한 差異를 보여서, S 型菌株는 兩끝이 둥근 短桿狀의 細菌으로서 2~8 個의 單極毛를 갖고 있으며, 孤立되어

있으나 가끔 2個씩 連結된 것도 있었다. 變形體는 없고 運動性이 있으며 King B 培地에서 25°C 에 24 時間 發育하였을 境遇 크기는 0.51~0.7×1.4~3.2μ 으로 皮膜을 形成하지 않으며, Gram 陰性이고, Methylene blue, Safranin O 等 一般細菌染色 色素에 잘 染色되며 孢子



A. Smooth colony type (X10,000).



B. Rough colony type (X6,500)

Fig 1. Electron micrographs of rough and smooth colony types cells of *P. mori* grown on King's B medium for 24 hours incubation at 25°C.

는 만들지 않았다. 이에 비하여 R型菌株는 그 形態가 短桿狀이 아닌 絲狀으로, 그 길이가 最長 200 μ 以上에

達하며 鞭毛가 없는 非運動性 細菌이었다. (表 4, 그림 1)

Table 4. Comparison of morphology and reactions on staining between R and S colony type isolates

Subjects	Present work		Sato et al ³⁹⁾		Smith ³⁹⁾
	R*	S	R	S	
Shape of cell	filamentous	rod	filamentous	rod	rod
Flagella	no	a pollar	no	a pollar	a pollar
Motility	-	+	-	+	+
Capsule	-	-	-	-	-
Spore	-	-	-	-	-
Size	0.56-0.76 X2.73-200 μ	0.51-0.7 X1.4-3.2 μ	0.9X200 μ	0.9 2.8 μ	0.9-1.3 X1.8-4.5 μ
Gram stain	-	-	-	-	-

* R; Rough colony type isolate.

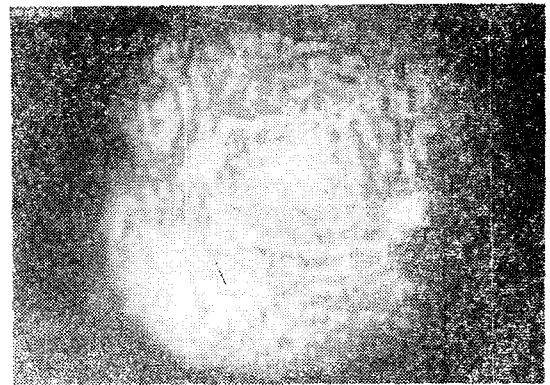
S; Smooth colony type isolate.

이러한 R型菌株는 母體에서 不規則하게 떨어져 나가 分裂, 増殖하는 것이 觀察되었으며 이렇게 하여 分離된 子細胞도 역시 鞭毛가 없었다. (그림 1) R型菌株의 絲狀型菌株는 培養 1~2日 後에 最長 200 μ 으로 가장 길었으나, 培養後 時日이 經過 함에 따라 分裂되어 점차 짧아져서 4~5日 後에는 45~100 μ 程度로 되었으며 1週日 後에는 대체로 S型菌株와 같은 크기로 되었다.

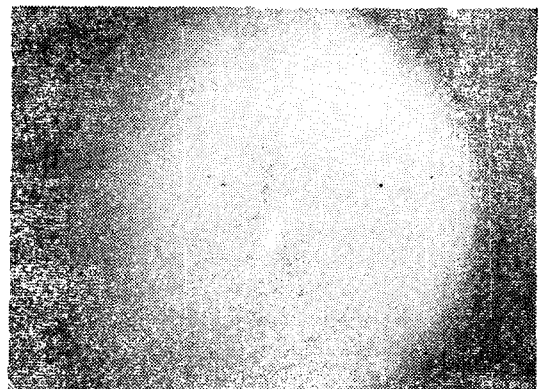
나. 培養的 性質

肉汁寒天平板培地에서 S型菌株의 colony는 白色(graish white), 圓形(circular), 全緣(entire), 中高(raised)로서 半透明(opaque)하고 培地를 變色시키지 않았다. 그러나 R型菌株는 colony의 周邊이 不規則한 波狀(undulate)으로 그 中央部位에 많은 주름무늬(wrinkled)가 있었다. (그림 2) 生長速度는 中程度로서 培養 5時間 後 colony의 直徑이 平均 1.5mm 이고 菌株間 差異가 없었다. King B 斜面培地에서는 모든 菌株 培養 17時間에 培地를 綠變시켰으나, S型菌株의 colony는 絲狀(filiform)으로 濕光을 띄고 平滑한데 비하여 R型菌株는 colony의 周邊이 거칠었으며(echinate), 中央線이 隆起해 있었다.

King A 斜培地(Pepton 10g, Glycerin 10ml, K₂HPO₄ g, MgCl₂ 1.4 g, Agar 20 g)에서의 colony型은 두 colony型菌株가 모두 King B 斜面 培地에서의와 같았으며, 培地의 變色은 極히 微弱하였다. 其他 培地에서의 養的 性質은 두 colony型菌株間에 差異가 없었던 바, 汗液體培地에서의 發育는 中程度로서 培養 1日 後에 濁되었고 3日 後에는 약간의 沈澱이 있었다. 無機窒



A. S colony type.



B. R colony type

Fig 2. Colony morphology of rough and smooth type of *P. mori* grown on nutrient agar medium for 4 days incubation at 25°C.

素鹽培地인 Cohn 培地에서는 發育되지 않았으며, Usinsky 培地에서는 中程度로 發育되어 1週日 後에는 부 쪼이지 쉬운 얇은 膜(pellicle)을 形成하였다.

가. 生理的 性質

供試菌株는 어느 것이나 綠色, 螢光色素를 生成하며 好氣性으로 제라틴을 液化하지 않았고, Litmus 牛乳을 알카리화 하였으며 牛乳을 凝固시키지 않았고, 硝酸鹽을 還元하지 않았으며 Indol과 硫化水素를 生成하지 않았으나 NH₃를 生成하였다.

O.F (Oxidative/Fermentative) 試驗에서는 酸化의 으로 糖을 分解하였으며 Catalase나 Urease 試驗에서는 陽性이었고, Sodium acetate, Sodium citrate, Sodium glutamate, Sodium malonate, Sodium tartrate의 有機酸을 利用하였다. Arginine dehydrolase, Lysine decarboxylase 및 Ornithine dehydrolase는 갖고 있지 않았으며 Benjidine 試驗에서는 陽性이나, M·R·V·P 試驗, 殿分의 加水分解, Phenylalanine의 說아미노, Ethanol에서 酸生成, Tyrosine 및 Arginine의 加水分解, Ox-

ydate 試驗, KCN 培地에서의 發育 등의 試驗에서는 陰性이었다. 또한 Esculin과 Tween을 加水分解하며 NaCl의 發育沮止濃度는 3% 이었다. 糖分解試驗에서는 Arabinose, Dextrose, D-galactose, Glycerin, Inositol, D-mannitol, Saccharose 및 Raffinose를 分解하여 酸을 生成하였으나 Cellobiose, Dextrine, Inulin, Lastose, Maltose, Soluble starch, Rhamnose 및 Xylose로 부터는 酸을 生成하지 않았다.

이와 같이 生理的 性質은 S型菌株 間에서는 勿論, R型和 S型菌株 사이에서도 一致하여 그 相異點을 볼 수 없었다.

3. 血清學的 性質

R型 및 S型菌株의 抗血清 모두에서 그 力價는 8,200이었으며, 凝集域에 있어 아무런 差異를 볼 수 없었다. 즉 두 菌株의 抗血清과 供試된 *P. mori* 5菌株와의 사이에는 뚜렷한 沈降帶가 形成되었으나, *P. glycinea*를 비롯한 其他 菌株와의 사이에서는 아무런 反應을 볼 수 없었다.(그림 3)

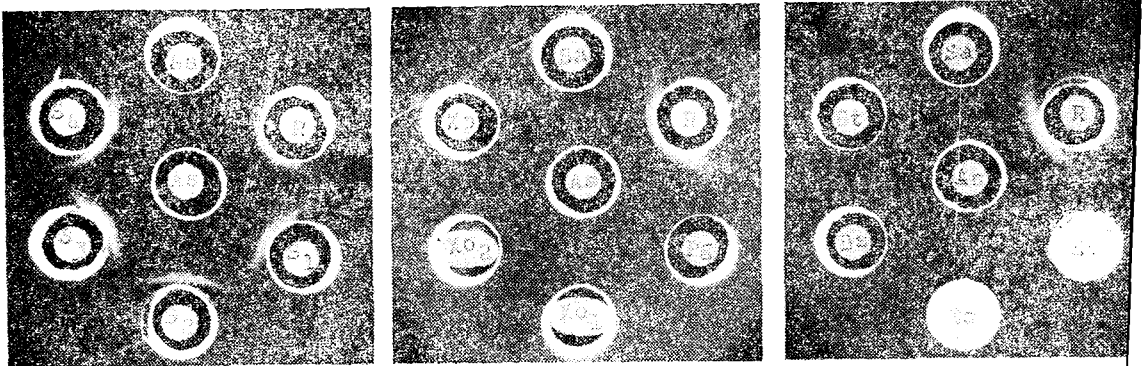


Fig 3. Agar-gel double diffusion test with antiserum of rough colony type, *P. mori*. As) Antiserum, Sa) Saline, R) Rough colony type, S₁-S₂) Smooth colony type, Pg) *Pseudomonas glycinea*, Xp) *Xanthomonas phaseoli*, Xo₁) *Xanthomonas oryzae*-1, Xo₂) *Xanthomonas oryzae*-2, Ec) *Erwinia carotovora*, Es) *Escherichia coli*, Bs) *Bacillus subtilis*, Bt) *Bacillus thuringiensis*.

4. 遺傳的인 完全性

R 및 S型菌株 모두 肉汁寒天培地와 King B培地를 不規則하게 交互로 排列한 100個 以上の 繼代培養과 1~3%의 NaCl 및 4種의 抗生物質을 各各 含有하는 肉汁液體培地에서의 培養에서 形態的으로 變化를 보이지 않았으며, 有機酸의 Sodium鹽 5種을 炭素源으로 하여 培養한 結果 역시 形態的으로 아무런 變化도 없었다.

V. 考 察

*Pseudomonas mori*의 系統分類는 佐藤 等^{34, 35)}에 의하여 phage를 利用한 分類가 報告된 바 있으나, 寄主植物의 서로 다른 品種에 對한 病原性을 利用한 系統分類는 처음 試圖된 것이었다. 물론 水稻 等 他作物에

서는 判別品種을 利用한 病原菌의 race나 strain의 類가 많이 行하여 지고 있다. 그러나 營養築植과 選이나 變異에 依하여 育種이 이루어져 온 粟나무에 어서는 그 遺傳的인 系統이 明確하지 않으며, 現在 分되어 있는 山桑系와 白桑系, 그리고 魯桑系의 粟나무 系統別, 또는 品種別로 本病에 對한 感受性 與否 비롯한 基礎調査가 아직 되어 있지 않아 判別品種 概念을 導入하기에는 대단히 어려운 點이 있었다.

本 試驗에는 山桑系와 白桑系, 魯桑系에서 各 1品씩 供試하였으며, 金 等¹³⁾, 北浦 等¹⁴⁾, 遠藤⁴⁶⁾에 依서 山桑系인 市平은 罹病性으로, 魯桑系인 魯桑은 病性으로 報告된 바 있고, 白桑系인 一之類는 金 等은 耐病性으로, 北浦 等¹⁴⁾은 罹病性이라고 하여 그

受性 程度가 分明하지 않은 것이었다. 本 試驗에서는 全國 5個 地域에서 採集된 35個 菌株는 R型菌株를 除外한 4系統으로 區分되었다. 그러나 本 病原細菌의 系統分類에 判別品種의 概念을 導入하기 爲하여는 더 많은 菌株 및 品種에 依한 判別品種의 確立이 先行되어야 할 것이다.

R型과 S型菌株에 依한 寄主植物에의 病徵에는 아무런 差異도 認定되지 않았으며 佐藤 等³⁵⁾이 記述한 本病의 3가지 病徵은 病原細菌의 差異에 依한 것이 아니고 콩나무의 品種, 細菌의 濃度 및 浸入部位에 따라 다르게 나타나는 것으로 생각된다.

植物病原細菌의 R型菌株는 Corey 等⁴⁾, Sharp³⁷⁾에 依해서 *Xanthomonas phaseoli*에서도 報告되었으므로 그들은 R型菌株가 S型菌株보다 病原性이 弱하다고 하였으나, 本 *P. mori*의 R型菌株에서는 供試된 어느 S型菌株보다도 강한 病原性을 보였고, 특히 傷痕接種에서 보다 噴霧接種에서 더욱 顯著한 差異를 볼 수 있었다. 供試된 콩나무의 品種은 달랐으나 佐藤 等³⁰⁾의 R型菌株도 同一한 傾向으로 報告된 바 있다. 이것이 供試된 콩나무 品種의 生理, 氣孔의 크기 等 形態의 特性에 起因했던 것인지는 좀더 研究해야 할 課題라 생각된다. 그러나 이러한 結果에서, R型菌株는 氣孔을 通하여 쉽게 콩나무에 浸入함으로써 自然狀態에서 S型菌株보다 높은 感染率을 나타낼 可能性이 있음을 알 수 있었다.

病原細菌의 形態는 佐藤 等³⁰⁾의 報告와 一致하였으나 S型菌株의 境遇 Smith³⁹⁾의 記錄과도 一致하였다. 그 밖에 電子顯微鏡을 通하여 R型菌株는 不規則한 크기로 母體로부터 分裂되어 增殖하는 것이 認定되었으나 培養初期의 긴 絲狀型으로부터 어떤 原因에 依하여 時日이 經過함에 따라 점차 짧아져서 S型菌株와 같은 크기로 되는지는 明確하지 않다. Rane²⁴⁾은 *Xanthomonas phaseool*에서 R型菌株를 抗原으로 製造된 抗血清 10%를 含有하는 培地에서 거의 完璧한 R \rightarrow S型의 變化가 일어났다고 하였고, Frobisher⁸⁾는 電解物이나 物理性物質 等 外部環境에 依하여 細胞壁에 化學的 變化를 生적 colony型의 變化가 일어난다고 하였다. 그러나 本 實驗에서는 이러한 點에 까지는 調査가 미치지 않았다.

佐藤 等³⁰⁾에 依하여 報告된 *P. mori*의 R型變異株에 S型菌株와 血清學的 性質이 一致하였으며, Sharp³⁷⁾ 역시 *Xanthomonas phaseoli*에서 R型과 S型菌株 血清學的으로 差異가 없다고 하였다. 本 實驗에서 두 菌株 間에 血清學的으로 差異가 없었던 것은 R型菌株가 初期의 긴 糸狀型菌體로부터 培養 途中 分하여 S型菌株와 같은 크기의 短桿狀 菌體로 되는

것과 關聯이 있는 것으로 생각된다. 高橋 等⁴²⁾은 *P. mori*의 抗血清이 *P. mori* 外에 *P. tabaci*, *P. cichorii*, *P. phaseolicola*에 對해서도 陽性反應을 나타내었다고 하였다. 따라서 本 實驗에서는 R型 및 S型菌株의 두 抗血清 모두 R型 및 S型의 *P. mori* 5菌株를 除外한 5屬 7種 8菌株에 對해서 아무런 反應을 보이지 않음으로서 높은 特異性을 나타 내었으나 上記한 *P. tabaci* 等 더 많은 菌株를 對象으로 하여 調査가 이루어져야 할 것이다.

培養의 性質이나 生理的 性質에서도 本 R型菌株는 佐藤 等³⁰⁾에 依해서 繼代 培養 途中 培地上에서 偶然히 分離된 R型菌株와 一致하였으며, 이러한 R型菌株는 그 發生原因은 分明하지 않으나 實題로 水原地方의 콩나무에 細菌性萎縮病을 發病시키는 病原細菌의 하나로 分布되어 있는 것으로 認定된다.

wild type과 形態의 由로 다른 R型菌株는 Sharp,³⁸⁾ Link,¹⁸⁾ Leed²⁵⁾ 等에 依하여 이미 다른 細菌에서 報告되어 있으며, 또한 Allison,¹⁾ Otsyji 等²³⁾, Rane²⁴⁾ 等은 細菌의 R \rightarrow S型의 變化에 實驗的으로 成功한 바 있다. 따라서 本 實驗에 使用된 R型菌株는 *P. mori*의 wild type과 形態 및 一部 培養的 性質은 다르나, 콩나무에서의 病徵 및 調査된 46가지 生理的 性質, 그리고 血清學的 性質이 一致하는 點에서 콩나무 細菌性萎縮病菌 *P. mori*의 mutant로 認定되어야 할 것이다. 그리고 本 *P. mori*의 R型菌株는 그 강한 病原性과 遺傳的인 安定性을 考慮할 때 앞으로 더욱 增加하여 콩나무 栽培 새로운 問題點을 提起할 憂慮가 있으며, 이에 對한 基礎 調査로서 實際 圃場에서 本 R型菌株로 因한 細菌性萎縮病이 分布되어 있는 比率外에 그 傳播 速度를 비롯한 R型菌株의 各種 環境要因에 對한 抵抗力 等 傳染病學的인 側面에서도 研究가 뒤 따라야 할 것이다.

Ⅵ. 摘 要

1975年 水原 蠶業試驗場 桑田에서 콩나무 細菌性萎縮病菌 *Pseudomonas mori*(Boyer et Lambert) Stevens의 形態의 由로 다른 Rough colony型(R型) 菌株를 分離하였다. 이를 全國 5개 地域에서 採集, 分離한 wild type인 Smooth colony型(S型) 菌株와 病原性 및 細菌의 一般의 性質을 比較하고 遺傳的인 安定性을 檢討한 結果는 다음과 같다.

1. R型菌株는 S型菌株에 比하여 강한 病原性을 보였으나 病徵에는 아무런 差異가 없었다.
2. R型菌株는 그 길이가 200 μ 以上에 達하는 絲狀하며 鞭毛가 없는 非運動性 細菌으로, 短桿狀이고 運

動성이 있는 S型菌株의 型態으로 달랐다.

3. 肉汁寒天培地에서 S型菌株의 colony는 白色, 圓形, 全緣으로 平滑한데 比하여, R型菌株의 colony는 周邊이 不規則한 波狀으로 그 中央部位에 많은 주름부러가 있다.

4. 46種의 生理的 性質 및 血清學的 性質에서는 R型과 S型菌株 사이에 아무런 差異가 없었다.

5. R型과 S型菌株 모두 100회 以上の 繼代培養이나 1~3%의 NaCl 및 有機酸의 Sodium鹽 5種, 抗生物質 4種에 依한 處理에서 遺傳的인 安定성을 보였다.

Ⅷ. 引用文獻

- Allison, D.P., 1971, Giant cells of *Escherichia coli*; a morphological study. J. Bacteriol. 108(3): 1390—1401.
- Breed, R.S. et al., 1957, Bergeys manual of determinative bacteriology. 7th ed. William & Wilkins Co., Baltimore.
- Buchanan, R.E. et al., 1974, Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th ed. William & Wilkins Co., Baltimore.
- Corey, R.R., and Mortimer P. Starr., 1957, Colony types of *Xanthomonas phaseoli* J. Bacteriol. 74: 137—140
- Cowan, S.T., 1974, Manual for the identification of medical bacteria. 2nd ed. Cambridge Univer. Press, London.
- 대한잡사회, 1975. 세계 잡사 견업 통계 13pp.
- Dowson, W. J., 1957, Plant disease due to bacteria. Cambridge Univer. Press, London. 13—19pp.
- Frobisher, M., 1957, Fundamentals of microbiology. W.B. Saunders Co., Philadelphia. 228—230pp.
- 後藤正夫, 1970. *Xanthomonas*屬 細菌의 集落變異와 病原性および ฟู지의 感受性との 關係. 日植病報. 36(3): 171.
- 韓國植物保護學會, 1972, 韓國 植物病·害虫 雜草 名鑑.
- Harrigan, W.F., and M.E. McCane, 1966, Laboratory methods in microbiology Academic Press, New York.
- Kim, J.W., 1971, Studies on the plant pathogenic *Corynebacterium*. (1) Morphological, Cultural and physiological specific characteristics of the plant pathogenic *Corynebacterium*. M.S. thesis, Tokyo Univer. Agri, Tokyo.
- 김영택, 백현준, 1970, 뽕나무 병충해 방제시험. 蠶試研報. 76—79.
- 北浦 澄, 成田正士, 家城洋之, 久保村安衛, 1970, 桑의 品種, 樹令 等による 縮葉性細菌病의 發生および 被害狀況의 差について. 日蠶中部講要, 9.
- 久保村安衛, 中山賢三, 1975, クワ의 枯葉 中における クワ 縮葉性 細菌病의 越冬について. 日蠶雜, 44(4), 287—293.
- 中島友輔, 瀧元清透, 1921, 早春に 於ける 桑樹의 枯死 及えに 伴ふ 細菌に 就て, 朝鮮農會報. 16(3): 4—9.
- 中田覺五郎, 瀧元清透, 1928, 朝鮮 作目 病害 目錄 朝總觀研報. 15, 33.
- Link, G.K. K., and Hull, K.L., 1927, Smoothness and roughness and spontaneous agglutination of *Bacterium citri*, *Bacterium medicaginis* var. *phaseolicola*, *Bacterium phaseoli sojens*. and *Bacterium tumefaciens*. Bot. Gaz. 83: 412—419.
- 日本植物防疫協會, 1968, 日本有用植物病虫害名鑑, 東京. 日本.
- 농수산부, 1976, 75년도 잠업 진흥 사업 성과, 117—119.
- 野瀬直毅, 1933, 朝鮮に 於ける 桑細菌及其 隨伴菌의 分布, 朝鮮農會報. 7(1): 126—127.
- 岡部徳夫, 1937, *Bacterium solanacearum*의 變異에 關する 研究(豫報) 日植病報. 7(2): 95—105.
- Otsuji, N.H., Iyehara and Hideshima, 1974, Isolation and characterization of an *Escherichia coli* mutant which form nonseptation filaments after low doses of ultraviolet light. J. Bacteriol. 117(2): 337—344.
- Rane, L., 1929, Virulence, electrophoresis, and conversion characteristics of *Bac. phaseoli sojens* S and R. Pro. Soc. Exptl. Biol. Med. 26, 299—301.
- Reed, G.B., 1937, Independent variation of several characteristics in *S. marcescens* J. Bacteriol. 34: 255—266.
- 佐藤 守, 1974, クワ縮葉細菌病의 發生生態에 關する 研究. V. *Pseudomonas mori* ฟู지의 各種 要因에 對する 抵抗力. 日蠶雜 43(3): 224—229.
- , 高橋幸吉, 1972, クワ縮葉細菌病의 發生生態에 關する 研究. (1) 病原細菌의 越冬. 日蠶雜

- 41(4) : 285—293.
28. —, —, 1973, クワ縮葉細菌病の 發生生態に 關する 研究. (2) 桑園土壤 中の *Pseudomonas mori* フォジの 消長. 日蠶雜. 42(3) : 207—212.
 29. —, —, 1973, クワ縮葉細菌の 發生生態に 關する 研究 (3) 病原細菌の 土壤 中における 生存 條件. 日蠶雜, 42(3) : 213—218.
 30. —, —, 1973, クワ縮葉細菌病菌 *Pseudomonas mori* (Boyer et Lambert) Stevens の ラフ型 集落 變異株. 日植病報. 39(5) : 425—428.
 31. —, —, 1974, クワ縮葉細菌病に 關する 研究. 第29報, 桑園に おける *Pseudomonas mori* および フォジの 時期別 分布(講要) 日植病報. 40(3) : 198.
 32. —, —, 1974, クワ縮葉細菌病の 發生生態に 關する 研究. V. 病原細菌の 各種 要因に 對する 抵抗力. 日蠶雜. 43(3) : 217—223.
 33. —, —, 1975, クワ縮葉細菌病の 發生生態に 關する 研究. IV. クワ組織内 および 土壤中での *Pseudomonas mori* (Boyer et Lambert) Stevens と その フォジの 生存. 日蠶雜, 44(2) : 99—104.
 34. —, —, 1976, クワ縮葉細菌病菌 *Pseudomonas mori* (Boyer et Lambert) Stevens の フォジに よる 系統類別. 日蠶雜 45(2) : 150—155.
 35. —, —, 脇本 哲, 1971, クワ縮葉細菌病の 病原細菌と その フォジの 性狀. 日植病報. 37(2) : 128—135.
 36. Schroth, M.N., Vilma B. Vitanza and D.C. Hilderbrand, 1971, Pathogenic and nutritional variation in the halo blight group of fluorescent *Pseudomonas* of bean. phytopath. 61(7) : 852—857.
 37. Sharp, C.G., 1927, Virulence, serological, and other physiological studies of *Bacterium flaccumfaciense*, *Bac. phaseoli*, and *Bac. phaseoli sojense*. Botan Gaz. 83(2) : 113—144.
 38. Skerman, V.B.D., 1967, Guide to the identifications of the genera of bacteria 2nd ed. William & Wilkins Co., Baltimore.
 39. Smith, E.F., 1910, Mulberry bacterial blight. Science 31(803) : 792—794.
 40. —, 1912, Bacterial mulberry blight phytopath. 2 : 175.
 41. —, 1914, Identity of the American and French mulberry blight. phytopath. 4 : 34.
 42. 高橋幸吉, 佐藤 守, 1969. クワ縮葉細菌病に 關する 研究. 第二報. クワ縮葉細菌病の 抗血清に ついて. 日蠶關東講要. 20 : 29.
 43. —, —, 1970, クワ縮葉細菌病に 關する 研究. 第四報. *Pseudomonas mori* フォジの 系統類別. (講要) 日植病報. 36(3) : 176.
 44. —, —, 1970, クワ縮葉細菌病に 關する 研究. 第五報, 病原細菌の 越冬 および 第1次 傳染源に ついて, 日蠶關東講要. 21.
 45. 富永時任, 1971, 日本に おける 牧草 および 飼料 作物の 病害に 關する 研究. 1. 關東, 東山 地域の 牧草. および 飼料作物の 病害調査. 日農技研報. C (25) : 205—301.
 46. 遠藤保太郎, 1929, 桑樹病害論. 明文堂, 東京, 日本. 91—99pp.
 47. 米山光郎, 1975, クワ縮葉細菌病の 春蠶用 桑に おける 發病に ついて. (講要) 日植病報. 41(1) : 85.