

밀의 抗黑銹病 抗生物質의 研究 [1]

有効物質의 探索과 生産菌의 性狀

鄭 永 基

(東洲女子專門大學)

Studies on antibiotics against Wheat black rust [1]

Screening of useful antibiotics and Characterization of Producing organism

JEONG, Yong Kee

(Dong Ju women's junior College, Pusan, Korea)

ABSTRACT

In order to isolate microorganisms which produce antibiotics against wheat black rust, some bacteria, molds, and actinomycetes were isolated from soils and screened for the production of antibiotics against wheat black rust.

Beacuse wheat black rust--*Puccinia graminis*--is a complete parasitic mold which can't grow in artificial medium, new method for the screening of antibiotic producing microorganisms against wheat black rust developed by using live leaves of wheat.

With new method, a strain No. 480HS₂₀ which produces a substance having strong anti *Puccinia graminis* activity and very narrow antimicrobial spectrum was isolated.

The substance produced by the strain No. 480HS₂₀ had better anti *Puccinia graminis* activity than any other known antifungal antibiotics such as kasugamycin, blasticidins, actidione, antimycin, oligomycin.

And the substance was observed to be very stable at heat and ultraviolet light. The strain was indentified as *Bacillus subtilis*.

緒 論

1929年 penicillin의 發見 以來 抗生物質의 研究는 급속하게 發展했으며, 抗生物質 및 그 化學修飾物은 細菌感染을 방지하는 主流를 이루게 되었다. 現在, 抗生物質은 微生物의 二次代謝產物中에서도 상세히 研究되고 있는 分野의 하나이고 微生物의 代謝產物로 부터 抗菌作用 以外에도 制癌作用과 抗바이러스作用 등을 보이는

物質에까지 研究가 進行되고 있다.

한편, 抗生物質의 使用範圍는 植物病害의 防除에까지 미치게 되었으며 1958年 벼의 도열병 예방과 防除에 有効한 抗生物質 blasticidins S의 發見을 先頭로, kasugamycin, polyoxin, validomycin 등이 農業抗生物質로 開發되어 널리 使用되고 있다. 現在 農業生産에 使用되고 있는 藥劑로는 有機燐劑, 有機水銀劑 혹은 有機鹽素劑, 등의 많은 合成農藥이 있지만, 殘留性 이라든지, 環境汚染 等 問題가 있고 새로운 藥劑의

開發이 크게 기대되고 있다. 따라서, 農業生産에 있어 難防除病害制御의 一環으로 밀의 黑銹病에 초점을 두고 그 防除의 開發을 위해 有效物質의 探索을 試圖했다. 特히 本研究에 使用된 病原菌 *Puccinia graminis pers.*는 人工培地에서는 그 生育에 限界性을 지니므로 本研究은 바로 *in vivo*에서 screening을 行했기에 그 方法과 結果를 소개한다.

밀의 黑銹病菌 *Puccinia graminis pers.*에 對해 간략히 言及하면, 이 菌은 C.H. Persoon에 의해 命名 되었고, J. Erikson에 의해 寄生의 分化가 밝혀진 菌으로서, 作物에 따라 寄生을 달리하는 多數의 分化型으로서 된 集合種이다. 이 菌은 밀 外에 보리 호밀 등에서 볼 수 있고 정확하게는 벼科中에서도 *Subfam. festucoideae*의 植物에 限하여 나타나는 病이다. 그 生活環에 있어서 1~5種의 孢子-柄孢子, 銹孢子, 夏孢子, 冬孢子, 小孢子-를 形成한다.

*P. graminis*는 擔子菌의 一種으로 Grain host로서 無性世代를 Barberry host로서 有性世대를 지니는 異種寄生菌으로 植物의 條件이 좋으면 無性世代만을 반복하고 越冬을 夏孢子世代에서 行해지는 것도 있다. 그러나, 열매를 맺든지 하여 植物의 生育條件이 달라지게 되면 冬孢子로서 越冬하게 된다. 本研究에서는 koitotoron의 條件을 一定하게 하므로서 夏孢자의 部分만을 screening에 使用했다.

材料 및 方法

1. 밀의 黑銹病의 繼代

밀의 黑銹病의 繼代는 幼生밀의 葉上에서 하였다. 使用한 밀은 Marquis C.I 3641과 日本의 農林 6號로서 예비실험의 結果 發芽의 形態와 그 後의 生長이 거의 同一했기 때문에 秋播種밀인 農林 6號를 使用했다. 生育條件으로는 20°C의 koitotoron에 습도와 바람을 적당히 加하여 밀이 生育하기에 좋은 조건으로 맞추었다. 使用한 菌은 *Puccinia graminis pers f.sp.*로 日本北海道 常呂郡 訓子府町, 道立北農農業試驗場에서 採集한 레이스를 使用했다.

먼저, 밀의 生長日數別 病原菌接種後의 發病狀況을 관찰했다. Table 1에서 보이는 바와 같

이 生長日數에는 관계없이 植後 6~7日 부터 發病하기 시작했다.

Table 1. Relationship between seedling ages of wheat and falling of black rust

Seedling ages (days)	8	12	17	25
Days showing symptom from infection (days)	7	6	6	6

위의 結果로 檢定用 밀은 播種後 8~5日間 發育시킨 것을 使用했다.

2. 밀의 黑銹病의 生物檢定法의 確立

胞子は 밀로부터 採集한 夏孢자를 使用하고 條件을 均一하게 하기 위하여 희석도의 發病과의 關係를 檢討했다. 胞子の 稀釋時는 증류수를 使用했으며 그 結果는 Table 2에서 보인다.

胞子の 稀釋度는 spectrophotometer로서 測定하였다(optical density 610nm).

Table 2. Effect of spore density on degree of disease outbreak and incubation period of wheat black rust

Densities of spores (optical density at 610nm)	0.03	0.06	0.1	0.5
Degree of disease outbreak*	±	+	++	+++
Incubation period (days)	6	6	6	6

* ±: Less than 5 pustules per leaf

+: Moderate (Infection area was less than 1/3 of leaf)

++: Severe (Infection area was more than 1/2 of leaf)

이 結果로 부터 使用胞子の 稀釋度는 OD 0.1로 定했다.

그러나, 保存用의 胞子를 大量採集하기 위해서는 20日以上 成長한 밀에 稀釋하지 않은 胞子를 그대로 移植했다. 黑銹病에 感染된 밀로부터 얻은 黑銹病菌은 5°C에서 保存했다.

微生物의 培養液으로 부터 發病을 抑制하는 物質의 檢定은 미리 感染시킨 被檢植物에 對하여 藥劑의 塗布(또는 噴霧)를 行하고 그後 20°C의 수증기포화 상태의 incubator에 9時間 방치한 後 koitotoron 內에서 培養했다. 效果의 判定은 8日後에 葉面에 생긴 病斑의 數와 藥劑대신에 증류수를 처리한 control과의 病斑數를 比較했다.

3. 前培養과 本培養

土壤으로 부터 分離한 方線菌을 포함한 약간의

細菌과糸狀菌의菌株에다음과같이液體培養을하고그培養液을前記의生物檢定에使用했다.

前培養은大試驗管中에15ml의前培地를分注하고各各의slant로부터菌을移植하고27°C에서2日~4日間振盪培養을했다.前培養은하나의菌株에對하여2種類즉,PC-I과PC-II의前培地에培養하고그中에서菌의生育狀態가良好한것을택하여本培養을실시했다.本培地에移植한前培養液量은5cc씩使用했다.前培地의組成은Table3과같다.

Table 3. Composition of inoculation medium

Medium PC-III		Medium PC-I	
Component	%	Component	%
Yest ext.	4	Starch	1
Malt ext.	1	Peptone	1
Glucose	0.4	Molasses	1
Vitamin comlex	1(ml)	Beaf ext.	1
pH 7.3		pH 7.2	

本培養은500ml의△-flask에液體培地100ml씩넣어前培養液2cc를植菌하고27°C에서振盪(230rpm)培養했다.本培地로서는Table4에보인바와같이N培地와P培地를使用하고각각을2日과4日째에sampling해서生物檢定에使用했다.

Table 4. Comoposition of production medium

N Medium		P Medium	
Component	%	Component	%
Soybean meal	1.5	Beaf ext.	0.1
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.2	Peptone	0.1
Yeast ext.	0.2	Glucose	1.5
Starch	2.5	Glycerin	0.1
NaCl	0.5	CaCO ₃	0.4
CaCO ₃	0.4		
pH	6.4	pH	7.2

4) 既知抗곰팡이 抗生物質의 效果

上記의方法으로從來알려져있는抗곰팡이抗生物質의黑銹病에對한效果를試驗했다.그結果를Table5에提示한바와같이強한抗菌活性을가지는antimycin과olygomycin은이

系에서는그만큼有效하지못함이判明되었다.

Table 5. Effect of known Antifungal antibiotics against wheat black rust

Antibiotics	*Activity		
	50r/ml	25r/ml	10r/ml
Kasugamycin	-	-	-
Blasticin S	+	+	+
Actidione	+	+	+
Antimycin	‡	‡	‡
Olycomycin	‡	‡	‡

* - : Nothing activity (Same as control)
 ± : Less than 30% activity
 + : Between 30~70% activity
 ‡ : Between 70~95% activity
 † : Over than 95% activity

5. 抗菌活性의 檢定

Screening에使用한broth는有效物質의檢定과同時에抗菌活性檢定을行했다.Gram+, Gram- 및곰팡이효모等通常의screening系에使用되는여러種의檢定菌에對하여抗菌活性이보이지않는broth를선택하므로써이미알려져있는物質을제외한新抗生物質을찾아내리라예상했다.抗菌檢定은糸狀菌으로는*M. ramianus*, *P. Chrysogenum*, *P. oryzae*使用했고Gram陽性細菌인*B. subtilis*, Gram陰性細菌인*E. coli*를使用했다.

Screening의概略은Fig. 1에보인다.

結果 및 考察

1. Screening의 내역

Screening에使用한全菌株134株에해당하는broth 536 sample中約9.3%가強한活性을가지고그외의活性物質은Table6에나타났다.

Table 6. Number of effective strains screened for wheat black rust

Activity	Samples	Percentage(%)
‡	50	9.3
‡	41	7.6
+	42	7.8

Total samples (536)

이中에서菌株No. 480HS₂₀이抗菌 spectrum

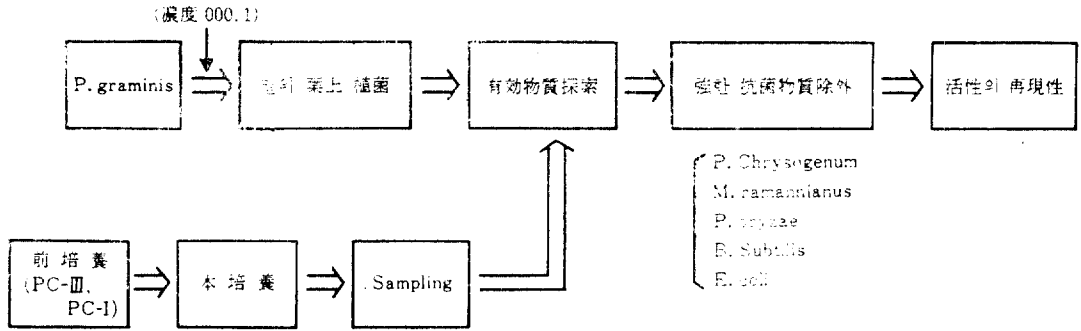


Fig. 1. Scheme of screening

도 좁고 밀의 黑銹病菌에 對하여 強한 活性을 보 HS₂₀의 抗菌 spectrum 은 Table 7에 表示했다. 이고, 또한 再現性도 확인되었다. 菌株 No. 480

Table 7. Antimicrobial spectrum of strain No. 480HS₂₀

Samples	Organisms				
	B. Subtilis	E. coli	P. chrysogenum	M. ramannianus	P. oryzae
2N	-	-	-	-	-
2P	-	-	-	-	* 14
4N	-	-	-	-	* 22
4P	-	-	-	-	* 15

* Numerals are diameter of inhibition zone on synthetic medium (mm).

2. 生産物質의 安定性

菌株 No. 480 HS₂₀의 生産物質의 安定性은 溫度, pH, 자외선을 中心으로 試驗했으며 特別히 이 物質은 農業에의 使用에 目的을 두고 있으므로 자외선의 安定性은 더욱 重要한 的의를 가진다. 熱과 pH의 安定性은 pH 2, 7, 9로 區分하여 100°C의 熱을 加한後 活性을 測定하였으며, 자외선 檢定은 자외선 lamp가 부착된 無菌상자를 使用하여 培養液과 자외선등과의 間격을 30cm 정도 되게 하여 24時間 방치 한後 活性을 無처리 control과 比較했다. 그結果 熱과 pH의 安定性은 pH 2와 7에서는 安定性을 보였으나 pH 9에서는 活性이 떨어졌다. 한편, 자외선試驗에서는 活性에 變化가 없는 것으로 보아 충분한 安定性을 보인다. 物質의 安定性에 對한 結果를 Table 8에 나타냈다.

3. 生産菌의 分類學的 性狀

生産菌株 480 HS₂₀은 日本北海道川上郡標茶町の 野菜밭의 土壤資料에서 分離한 것이다. 本菌株은 Hucker의 變法에 의하여 Gram 陽性菌으로

Table 8. Stability of substance produced by strain No. 480HS₂₀

Section	Activity *	
Control	##	
100°C	pH2	##
	pH7	##
	pH9	+
Ultraviolet light	##	

* Each symbols mean degree of antifungal activity against P. oryzae in the synthetic medium

: Diameter of inhibition Zone in 25~30mm

: Diameter of inhibition Zone in 20~24mm

+: Diameter of inhibition Zone in 15~19mm

로 判明되고 特別히 好氣性桿菌으로 内生孢子形成하는 것으로 보아 Bacillus屬에 속하는 것으로 여겨진다. 生産菌의 形態는 Fig. 3~6에서 보는 바와 같다.

本菌의 分類學的 特性은 R.E. Gordon等의 方法에 따라 實驗 觀察하고 그 結果를 다음과같이

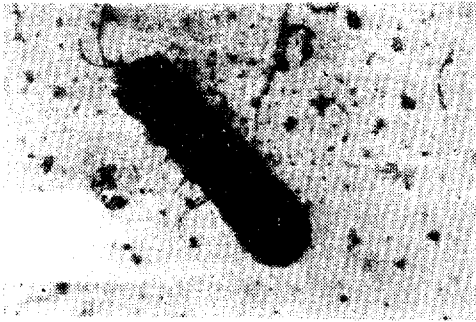


Fig. 3. Light microscopic picture of product mycelium

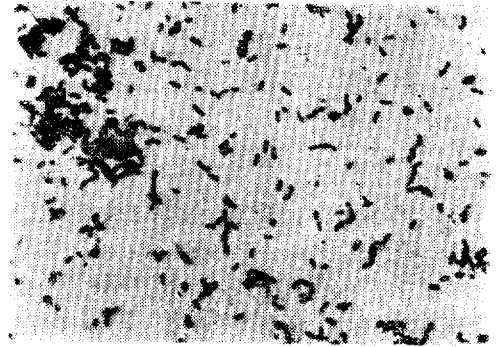


Fig. 4. Location of spores in sporangia



Fig. 5. Light microscopic picture of separated spore from sporangia



Fig. 6. Light microscopic picture of sporangia after removal of spore

要約했다. 즉, 이들의 特性을 指標로 하여 R.E. Gordon 等의 두檢索表에 의해 本菌株의 所屬種의 檢索을 실시했다. Table 9를 參考하면서 먼저, 檢索表 key 1에 의하면

(1) catalase 는 positive, (2) voges-proskaver 反應은 positive, (3) 嫌氣寒天上의 生育은 negative, (8) starch의 分解는 positive인 것으로부터 *B. subtilis*에 到達했다.

한편, 檢索表 key 2에 의하면 有孢子細胞는 明確하게 膨脹하지 않으며 孢子는 橢圓體 또는 圓筒形으로 有孢子細胞의 거의 中央에 存在하고 初期의 桿菌은 Gram 陽性[Group 1]; 포도당寒天上에서 生育한 桿菌에는 染色되지 않는 小球가 보이지 않고 [B], 7%의 NaCl에 生育하며 litmus milk에서 酸을 만들지 않는다 [1]; pH5.7에서 生育하고 V-P 反應은 陽性[(a)]; starch를 分解하며 硝酸鹽을 亞硝酸으로 還元한다. [(1)]; 好氣性으로 propion 酸鹽을 利用하지 않는다 [(b)]. 이러한 事實로부터 檢索表Key 2에 의한 檢索結果는 檢索表 Key 1과 일치한 것으로부터 本菌株는 *B. Subtilis*에 到達했다.

Table 10. Summary of properties of *Bacillus subtilis* 480HS₂₀

<i>Rads:</i> seldom in chains; Gram-positive; stain uniformly; 0.7~0.8 by 2.1~2.7 μm; long peritrichous flagella; motile
<i>Spores:</i> ellipsoidal or cylindrical; 0.6~0.7 by 1.2~1.3 μm; distending the sporangia slightly central or paracentral
<i>Growth temperature:</i> maximum 55°C; minimum 10°C
<i>Positive reaction:</i> catalase; Voges-Proskauer (acid production); growth in 7% NaCl; growth at pH 5.7; acid from glucose, arabinose, mannitol and trehalose; hydrolysis of starch; utilization of citrate; reduction of nitrate; alkaline digestion of litmus milk
<i>Negative reaction:</i> anaerobic growth; unilization of propionate; formation of black pigment on glucose agar and tyrosine agar; acid from xylose

以上の 2가지 檢索의 結果, 本菌株는 *B. Subtilis*에 제일 近接한다고 생각해서 그 特性(Table

Table 9. Identification procedures for the *Bacillus*

Key 1 :

1. Catalase:	positive	2
	negative	16
2. Voges-Proskauer:	positive	3
	negative	9
3. Growth in anaerobic agar:	positive	4
	negative	8
4. Growth at 50°C:	positive	5
	negative	6
5. Growth in 7 percent NaCl:	positive	<i>B. licheniformis</i>
	negative	<i>B. coagulans</i>
6. Acid and gas from glucose:	positive	<i>B. polymyxa</i>
(inorganic N ₂)	negative	7
7. Growth at pH 5.7:	positive	<i>B. cereus</i>
	negative	<i>B. alvei</i>
8. Hydrolysis of starch:	positive	<i>B. subtilis</i>
	negative	<i>B. pumilus</i>

Key 2 :

Group 1. *Sporangia not definitely swollen; spores ellipsoidal or cylindrical, central to terminal; Gram-positive.*

A. Unstained globules demonstrable in protoplasm of lightly stained cells grown on glucose agar.

1. Strictly aerobic; acetylmethylcarbinol not produced...*B. megaterium*
2. Facultatively anaerobic; acetylmethylcarbinol produced...*B. cereus*
 - a. Pathogenic to insects.....*B. cereus* var. *thuringiensis*
 - b. Rhizoid growth.....*B. cereus* var. *mycoides*
 - c. Causative agent of anthrax.....*B. cereus* var. *anthracis*

B. Unstained globules not demonstrable in protoplasm of litmus stained cells grown on glucose agar.

1. Growth in 7 percent NaCl; acid not produced in litmus milk.

a. Growth at pH 5.7; acetylmethylcarbinol produced.

(1) Starch hydrolyzed; nitrates reduced to nitrites.

(a) Facultatively anaerobic; propionate utilized.....*B. licheniformis*

(b) Aerobic²¹; propionate not utilized.....*B. subtilis*

(2) Starch not hydrolyzed; nitrates not reduced to nitrites..... *B. pumilus*

b. No growth at pH 5.7; acetylmethyl carbinol not produced*B. firmus*

10 참조)과 R.E. Gordon 등의記載 및 T. Gibson and R.E. Godon의記載와 비교 檢討한 結果 本菌은 *B. Subtilis*의 한 菌株라고 同定했다. 이로서 本生産物質은 지금까지 開發 使用되고 있는 農用 抗生物質, blasticidin S, kasugamycin polyoxin, validomycin 등이 주로 方線菌에 의하여 生産된데 反해 細菌의 生産物質이라는 點에서 주목할만하다.

引用文獻

1. Akitoshi Tajimi, 1975. A phylogenetic study of the host plant of *Puccinia graminis* f. sp. *li*. *Bull. Natl Grassl. Res. Inst.* No. 81~88
2. Akitosi Taiimi, 1976. Genetic control of uredial development of stem rust in orchardgrass. *Annals of the phtopathological society of Jap*

摘 要

밀의 黑銹病菌 *Puccinia graminis pers.* 는 完全寄生菌임으로 살아있는 植物體에서만 生育이 可能하다. 이를 바탕으로 Screening 한 結果

- 1) 藥劑를 直接 感染體에 處理하는 “噴霧法” 檢定法으로 screening 에 임했다.
- 2) 既知抗곰팡이성 抗生物質 中 完全 *P. graminis* 의 生育을 저지하는 것은 없었다.
- 3) 生産菌株 No. 480HS₂₀ 이 生成하는 物質은 *P. graminis* 에 선택적인 特異한 活性을 보이거나 다른菌(Gram 陽性, 陰性細菌, 약간의 곰팡이)에 對해 抗菌 spectrum 이 극히 좁았다.
- 4) 밀의 黑銹病菌에 有效한 이 物質은 pH 9 에서 약간 不安定하나 熱과 자외선에 對하여 安定성이 높았다.
- 5) 生産菌株 480HS₂₀ 은 *Bacillus subtilis* 로 同定 되었다.

an. 42 No. 2 149~155

3. Alexopoulos, Introductory mycology 468~473
4. 橋岡良夫, 最新農業講座 6. 病害 46~48
5. 但見明俊 1979: 植物原菌의 分化. 遺傳 33 2~6
6. Gibson. T. and R.E. Gordon. 1974. Genus. I. *Bacillus* 529~550
7. Gordon R.E., W.C. Haynes and C.H. pang. 1973. The Genus. *Bacillus* 36~41
8. Gordon R.E., W.C. Haynes and C.H. Pang. 1973. The Genus. *Bacillus*. 97~99
9. Hiroshi Yonehara. 1979. Studies on pesticide antibiotics in Japan. *Nippon Nigeikagaku Kaishi* 53 No. 6, 71~76
10. Michiaki teranaka, Naoyoshi Yamada and Aki-toshi Tajimi. 1975. Formation of infection type structures of *Puccinia graminis f. sp. dactylidis* on various peptone media. 宇都宮大學學術報告 第9卷 2 1~10
11. Nakato Naito, Toshikazu Tani and Yoshimatau Okumura. 1960. The germ-tube elongation of uredospore of *Puccinia cornata* and *Uromyces alopecuri* on nutrient agar.
12. 內藤中人, 谷利一, 戶出英輝, 1964. ヌンバタ冠銹菌夏胞子の人工培地とわかる infection-type structure. 香川大學農學部學術報告 第16卷 1號 44~46
13. 中村昭四郎, 田中信男. 抗生物質大要 46~48
14. P. G Williams, K.J. Scott, Joyl, Kuhl, and D. J. Maclean. 1967. Sporulation and pathogenicity of *Puccinia graminis f. sp. tritici* grown on and artificial medium. *Phytopathology* 57, 326~327
15. P.G. Williams, K.J. Scott, and Joy L, Kuhl, 1966. Vegetative growth of *Puccinia giaminis f.sp. tritici* in vitro/*phytopathology* 56, 1418~1819
16. Thomas G. Pridham, Lloyd A. Lindenfulser, Odete Lshotwell, William H. Preston, and John W. Mitchell. 1956. Antibiotics against plant disease. I. Laboratory and greenhouse survery. *phytop athology* 46, 568~575
17. Thomas G. Pridham, Odete L. Shotwell, Robert G. Bendiet and Richaed W. Jackson. 1956. Antibiotics against plant disease II. Effective agents produced by *Streptomyces Cinnamome-us* forma azocoluta F. NOV. *Phytopathology* 46; 575~581
18. W.R. Bushnell and D.M. Stewart. 1971. Development of American isolates of *Puccinia gra minis f. sp. tritici* on an artificial medium. *Phytopathology* 61, 376~379
19. 長谷川武治, 微生物の分離と同定 211~217