

## 우리나라 벼 흰빛잎마름병균(*Xanthomonas campestris* *pv. oryzae*)의血清學的 分類 및 診斷

崔在乙·李斗求·徐在煥

湖南作物試驗場

### Serovars of *Xanthomonas campestris* *pv. oryzae* Collected from Korea and Serological Diagnosis of Bacterial Leaf Blight

J. E. Choi, D. K. Lee and J. H. Seo

Honam Crops Experiment Station, Iri 510, Korea

#### 要 約

벼 흰빛잎마름병균 Q7472와 Q7502의 항血清을 사용하여 우리나라에서 수집한 벼 흰빛잎마름병균의血清型을 寒天gel內擴散法에 의해 分類한 結果, 71 菌株中 65 菌株가 血清型A型, 5 菌株가 B-I, 1 菌株가 B-II 型에 屬하였다. 血清型A에 屬하는 菌株는 0.1-1%의 CaCl<sub>2</sub>溶液에서 自己凝集이 거의 일어나지 않았으나 血清型B-I과 B-II에 屬하는 菌株는 심한 自己凝集이 일어나 血清型과 自己凝集 사이에는 密接한 關係가 있었다. 흰빛잎마름병균은 血清學의 方法에 依해 쉽게 檢索될 뿐만 아니라 寒天gel內擴散法에 依해 벼 葉 菌성출무늬병균인 *X. campestris* *pv. oryzae*와 腐生細菌인 *E. herbicola*와도 쉽게 區別되었다. 흰빛잎마름병균 檢出은 病斑을 NaCl溶液에 넣은 후에 搾壓하거나 100°C에서 1時間 熱處理 後 搾壓한 汁液을 寒天gel內擴散法에 依해 抗血清과 反應시킨으로써 可能하였으며, 病斑이 적을 때는 PSA培地에서 培養한 後 使用하면 效果的이었다.

#### ABSTRACT

Seventy-one strains collected from Korea were classified into three serovars (designated A, B-I and B-II) by using agar gel diffusion test with the antisera produced against *Xanthomonas campestris* *pv. oryzae* isolates Q7472 and Q7502. Of 71 isolates tested, 65 isolates belonged to serovar A, 5 isolates were serovar B-I, and one isolate was serovar B-II. The isolates of serovar B-I and B-II could be distinguished clearly from those of serovar A showing marked autoagglutination. *Xanthomonas campestris* *pv. oryzae* was serologically diagnosed in rice leaves by agar gel diffusion tests, possibly being distinguished from *Xanthomonas campestris* *pv. oryzae* and *E. herbicola*. The pathogen could be also serologically detected from the extracts of diseased leaves, squeezed immediately, heated at 100°C or incubated in PSA. Serological detection of *Xanthomonas campestris* *pv. oryzae* is a more reliable and less time-consuming method.

**Key words:** bacterial leaf blight, rice, serology, diagnosis.

## 緒 論

植物細菌病은 病徵만으로 病原菌의 診斷 및 同定이 어렵기 때문에 罹病組織으로부터 病原細菌을 分離, 同定해야 할 境遇가 많다. 그러나 細菌의 同定法은 細菌學에 관한 專門知識이 要求되고 많은 勞力과 時間이 必要하며, 같은 種의 菌株라도 항상 같은 結果를 얻지 못하는 境遇가 많아 生物學的, 生理學的인 細菌 同定法이 完壁한 것 만은 아니다(22).

抗原抗體의 特異的 反應을 利用하는 血清學的 診斷法은 그 方法이 簡單하고, 結果도 빠르며, 個人差도 적기 때문에 植物防疫와 植物病原細菌의 診斷에 널리 利用되고 있다. 血清學的인 細菌 同定法은 醫學에서 부터 利用되기 始作하였으며 그 後 植物病原細菌의 同定에도 應用하게 되었다. 即, 凝集反應에 의한 同定 및 診斷은 *E. carotovora* subsp. *atroceptica*(9, 10), *E. carotovora* subsp. *carotovora*(8), *A. tumefaciens*(16), *C. sepedonicum*(18), 등에서 報告되었으며, 1948年 寒天gel內擴散法이 Ouchterlony(21)에 의해 報告된 後 細菌同定에 널리 利用하게 되었으며, 植物細菌病原菌인 *P. syringae* pv. *phaseolicola*(11), *P. sol-*

*anacearum*(13, 14), *X. campestris* pv. *vesicatoria*(2, 20), *X. campestris* pv. *oryzae*(3, 4, 5, 17)에서도 이 方法이 應用되었다.

그 後 植物組織內 또는 土壤內에 植物病原細菌의 存在를 顯微鏡으로 直接 觀察하거나 細菌을 血清學的으로 同定하는데 利用되는 螢光抗體法은 Allen과 Ke-lman(1), Jenkins 등(14), Kikumoto와 Sakimoto(15)等에 依해 報告되었으며, 最近에는 ELISA法(7, 24)에 依해서도 精度 높은 結果를 얻었다고 報告하였다.

本 試驗은 우리나라 흰빛잎마름병균의 血清學的인 特性을 밝히고 흰빛잎마름병균에 感染된 植物體로부터 直接 病原細菌의 診斷法을 開發하기 위하여 實施한 結果를 報告하는 바이다.

## 材料 및 方法

菌株 및 抗血清: 供試菌株는 湖南作物試驗場에서 分離한 菌株와 農業技術研究所에서 分讓받아 液體과 라된 重層法으로 貯藏중인 菌株를 使用하였다.

抗血清의 調製에 使用한 菌株와 抗原處理는 表 1과 같으며 抗血清은 日本九州大學에서 調製하여 -20

Table 1. Description of antisera used for *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*

Antiserum	<i>X. campestris</i> pv. <i>oryzae</i> isolates used for preparing antiserum	Pathogenic group of the isolate	Treatment given prior to injection
Anti-Q7472-serum	Q7472	I	Intact whole cell
Anti-Q7502-serum	Q7502	IV	Intact whole cell
Anti-Q7472(sonic)-serum	Q7472	I	Sonicated for 30 min.

℃에서 凍結乾燥한 後, 4℃에서 貯藏중인 것으로 使用 直前に 0.85% NaCl溶液으로 稀釋하여 使用하였다.

血清學的 實驗方法: 寒天gel內擴散法 등 血清學的의 實驗은 Choi(3, 4)等이 報告한 方法을 使用하였다. 抗原은 PSA培地(3, 4)에서 48時間 培養한 細菌을 약  $10^8$  cells/ml의 濃度가 되도록 0.85% NaCl溶液으로 稀釋한 後 使用하였다.

罹病葉을 利用한 診斷法: 罹病葉을 가위로 잘라 寒天gel內에 넣어 反應시키거나 罹病葉 1g當 5 ml의 NaCl溶液(0.85%)을 加하여 室溫에서 2時間 놓아 둔 後, 유리봉으로 汁液을 抽出하여 抗血清과 反應시켰다. 熱處理는 0.85% NaCl溶液에 病斑을 넣

어 100℃에서 1時間 놓아두었다.

發病이 不明確하거나 發病面積이 적어 血清反應이 일어나지 않는 病斑은 1cm의 病斑을 表面殺菌하여 殺菌된 가위로 잘라 PSA培地에 넣고 28℃에서 48時間 진탕배양 후 抗血清과 反應시켰다.

## 結果 및 考察

血清型: 力價가 640~1280인 抗血清과 抗原을 寒天gel內에 넣고 室溫에서 24時間 및 48時間 後에 調査한 結果, 大部分의 沈降線은 24時間 後에 形成되었으나 그 後에 形成된 것은 反應도 弱하고 再現性도 낮았다.

供試菌株中에는 Q7472抗血清과 反應하여 굵은 沈降線을 形成하는 菌株과 形成하지 않는 菌株로 크게

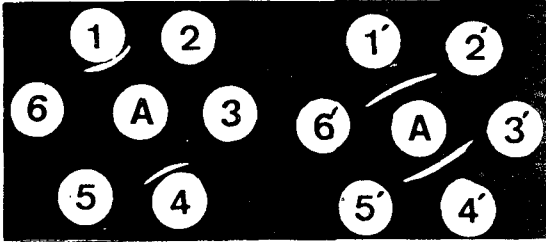


Fig. 1. Serological reactions of three different serovars of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*. Center well A contains anti-Q7472-serum. Outer wells were filled with whole cell suspensions in 0.85% NaCl solution, i.e., the wells 1, 4 = the solution of the bacteria belonging to serovar A, the wells 2, 5 = serovar B-I, and the wells 3, 6 = serovar B-II. The wells 1', 2', 3', 4', 5' and 6' contain the cell suspensions numbered above as heated at 100°C for 1 hr.

Table 2. Serovars of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* isolates collected from Korea

Serovar	Isolate							
A	HB7891,	JN7853,	JN79120,	HB8002,	CN8008,	HB8005,	HB8007,	
	HB8009,	HB8012,	HB8013,	HB8016,	HB8017,	HB8018,	HB8019,	
	HB8020,	HB8022,	HB8023,	HB8024,	HB8027,	HB8028,	HB8031,	
	HB8033,	HB8036,	HB8040,	HB8043,	HB8047,	HB8050,	HB8052,	
	HB8053,	HB8054,	HB8056,	HB8057,	HB8063,	HB8065,	HB8066,	
	HB8068,	HB8070,	HB8071,	HB8079,	HB8081,	HB8099,	HB80118,	
	HB80127,	KB7813,	JB79106,	JB7909,	HB8001,	HB8011,	HB8014,	
	HB8044,	HB8058,	HB8060,	HB8067,	HB8083,	HB8102,	HB8127,	
	HB8144,	HB8153,	HB8114,	HB8126,	HB8130,	HB8131,	HB8133,	
	HB8154,	HB8125						
	B-I	CN7808,	HB8006,	HB8010,	HB8124,	HB8055,		
	B-II	HB8046						

Table 3. Relationship between serovar of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* and autoagglutination in different reagent solutions

Reagent	Serovar A	Serovar B-I	Serovar B-II
Distilled water	- <sup>a)</sup>	-	-
Distilled water (H)	+	+	+
0.85% NaCl	+	+	+
0.85% NaCl (H)	+	+++	+++
0.1% CaCl <sub>2</sub>	+	+++	+++
1% CaCl <sub>2</sub>	+	+++	+++

a) +++: Complete autoagglutination,  
 -: No autoagglutination,  
 +: Partial autoagglutination,  
 H: Heated at 100°C for 1 hr.

大別할 수 있었으며(그림 1), 초음파 處理하여 調製한 Q7472(Sonic.)抗血清 및 Q7502抗血清과는 全供試菌株과 反應하여 沈降線을 形成하였다.

이들 菌株을 100°C에서 1時間 熱處理한 結果 Q7472抗血清과 反應하였던 菌株은 그림 1에서와 같이 2개의 沈降線을 形成하였으나 無處理抗原과 反應하지 않았던 菌株은 熱處理 後에도 沈降線을 形成하지 않았다.

Choi等(3)의 方法에 依해 供試 菌株의 血清型을 分類하였던 바, 71菌株中 65菌株가 血清型A, 5菌株가 血清型 B-I, 1菌株가 血清型B-II로 구분되었다(표 2).

血清型B-I 및 B-II에 屬하는 菌株의 懸濁液은 Choi等(4)이 報告한 바와 같이 0.1-10%의 CaCl<sub>2</sub> 溶液中에서 顯著한 自己凝集 反應을 나타냈으나, A에 屬하는 菌株은 거의 反應이 일어나지 않았다(표 3).

罹病葉을 利用한 檢索: 罹病葉에서 抽出한 汁液이

나 잘게 찢은 罹病葉을 寒天gel 구멍에 넣어 抗血清과 反應하여 形成된 沈降線은 그림 2와 같이 비흰빛 잎마름병균과 形成된 沈降線과 同一하였다. 20個 標本中 罹病葉에서 抽出한 13個 標本과, 罹病葉을 熱處理하여 抽出한 汁液은 17個 標本이 抗血清과 反應하여 沈降線을 形成하였으나 3個 標本은 어느 境遇도 沈降線이 形成되지 않았다(表 4). 100°C에서 1時間 熱處理하여 抽出한 抗原은 沈降線이 鮮明하였고 NaCl溶液으로 抽出한 것에서 形成되지 않았던 標本 2, 10, 15와 20에서도 沈降線이 形成되었다. 이러한 結果는 熱處理함으로써 罹病組織으로부터 보다 많은 病原細菌 및 多糖質이 抽出되기 때문이라 생각된다.

한편 1cm의 病斑을 表面殺菌하여 잘게 잘라 5ml

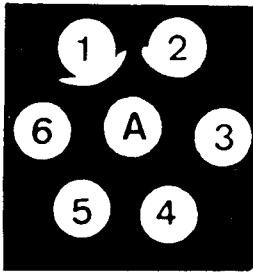


Fig. 2. Serological reactions with suspensions of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*, *Xanthomonas campestris* pv. *olyzicola* and extracts of diseased leaves. Center Well(A) contain anti-Q7472-serum. Outer wells were filled with antigen solutions in 0.85% NaCl solution, i.e., the well 1 = whole cell suspension of *X. campestris* pv. *oryzae*, 2 = extracts of diseased leaves, 3 = extracts of healthy leaves, 4 = NaCl solution, 5 = whole cell suspension of *E. herbicola*, 6 = whole cell suspension of *X. campestris* pv. *olyzicola*, respectively.

의 PSA培地에 넣고 48時間 培養한 後, 寒天gel 內擴散法에 依해 檢定한 結果, 汁液에서 反應하지 않았던 標本 6과 13에서도 沈降線이 形成되어 本病 檢索이 可能하였다.

PS培地에서 培養된 菌을 Single Colony 分離法에 依해 純粹分離하여 同定한 結果 腐生細菌인 *E. herbicola*(12) 등이 分離되었다. 腐生細菌인 *E. herbicola*는 PSA培地에서 흰빛잎마름병균에 比하여 빨리 增殖될 뿐만 아니라 *X. campestris* pv. *oryzae*와 區別이 어려웠다. 特히 細菌數測定을 위한 Suwa培地에서는 區別이 더욱 어려워 病理生態의인 實驗에서 많은 不便을 주고 있다. 그러나 培養液中에 흰빛잎마름병균과 腐生細菌이 混合되어 있어도 沈降線形成에 影響이 없어 本菌 檢索에 어려움은 없었다.

中國과 東南아시아 地域에서 發生되는 벼 세균성 줄무늬 병균(*X. campestris* pv. *olyzicola*)(6)은 흰빛잎마름병균의 抗血清과 沈降線을 形成하지 않아 血清學的으로 區別되었다.

Choi等(5)은 血清學의 方法에 依해 흰빛잎마름병

Table 4. Comparison of the serological methods for detecting *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* from diseased leaves of rice

Sample no.	Serological reaction with:		Serological reaction with the diseased leaves incubated in PSA medium	Physiological identification of the cultures isolated from lesion leaf incubated in PS medium
	ED	EH <sup>a</sup>		
1	+	+	+ <sup>b</sup>	X <sup>a</sup>
2	-	+	+	X
3	+	+	+	X
4	+	+	+	X
5	+	+	+	X, E
6	-	-	+	X, E
7	-	-	-	-
8	+	+	+	X
9	+	+	+	X
10	-	+	+	X
11	+	+	+	X, E
12	+	+	+	X
13	-	-	+	E
14	+	+	+	X, E
15	-	+	+	X
16	+	+	+	X, E
17	+	+	+	X
18	+	+	+	X
19	+	+	+	X
20	-	+	+	X

<sup>a</sup> ED: Extracts from diseased leaves, EH: Extracts from diseased leaves by heating at 100°C for 1 hr, X: *X. campestris* pv. *oryzae*, E: *Erwinia herbicola*.

<sup>b</sup> +: precipitation reaction, -: no precipitation reaction.

균을 同定하기 위하여 *Xanthomonas*屬 22 菌株, *Pseudomonas*屬, *Erwinia*屬, *Agrobacterium*屬, *Bacillus*屬, *Corynebacterium*屬 21 菌株를 흰빛잎마름병균 抗血清과 寒天 gel內擴散法으로 反應시킨 結果, 超音波處理하여 調製한 Q7472 抗血清과 100 °C에서 1 時間 熱處理한 投原 사이에는 흰빛잎마름병균 以外는 沈降線이 形成되지 않아 흰빛잎마름병균의 同定에 利用할 수 있다고 報告하였다.

Vruggink와 Mass Geesteranus(25)는 血清學의 方法에 依해 감자塊莖과 줄기에서 *E. carotovora* subsp. *atroseptica*를 檢索하였으며, *E. carotovora* subsp. *carotovora*와도 쉽게 區別할 수 있다고 하였으며, Graham(9)은 감자에서 *E. carotovora* subsp. *atroseptica*를, Morton等(19)은 *P. solanacearum*을, 陶山와 藤井(23)는 *P. syringae* pv. *syringae*를 血清學의 方法에 依해 診斷하였다고 報告하였다.

後藤(7)가 血清學의 利用은 血清學의 特異性, 抗原構造 變異, 血清型的 有無 등이 밝혀져야 한다고 하였으나 흰빛잎마름병균은 Choi等(4, 5, 6)에 依하여 血清型, 血清學의 特異性, 抗原構造變異 등이 밝혀졌기 때문에 必 흰빛잎마름병의 診斷에 血清學의 方法이 有用하게 利用될 것으로 생각된다.

#### 參 考 文 獻

1. ALLEN, E. & KELMAN, A. (1977). Immuno-fluorescent stain produres for detection and identification of *Erwinia carotovora* var. *atroseptica*. *Phytopathology* 67:1305-1312.
2. CHARUDATTAN, R., STALL, R. E. & BATCHELOR, D. L. (1973). Serotypes of *Xanthomonas vesicatoria* unrelated to its pathotypes. *Phytopathology* 63:1260-1265.
3. CHOI, J. E., MATSUYAMA, N. & WAKIMOTO, S. (1980). Serovars of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* collected from Asia. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 46:209-215.
4. CHOI, J. E., MATSUYAMA, N. & WAKIMOTO, S. (1980). Serological specificity of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 46:455-463.
5. CHOI, J. E., MATSUYAMA, N. & WAKIMOTO, S. (1981). Antigen analysis of the polysaccharides of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 47:199-205.
6. FANG, T. C., REU, H. C., CHEN, T. Y., CRU, Y. K., FAAN, H. C. & WU., S. C. (1957). A comparison of the bacterial leaf blight against with the bacterial leaf streak organisms of rice and *Leersia hexandra* Swartz. *Acta. Phytopathol. Sinica* 3:99-124.
7. 後藤正夫(1981). 新細菌病學, ソフトサイエンス社, 272.
8. GOTO, M. & OKABE, N. (1957). Studies on strains of *E. carotovora* (Jones) Holland. IV. Antigenic variation. *Bull. Fac. Agric. Shizuoka Univ.* 7:11-20.
9. GRAHAM, D. C. (1963). Serological diagnosis of potato blackleg and tuber soft rot. *Plant Pathol.* 12:142-144.
10. GRAHAM, D. C. (1964). Taxonomy of the soft rot coliform bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* 2:13-42.
11. GUTHRIE, J. W. (1968). The serological relationship of race of *Pseudomonas paseolicola*. *Phytopathology* 58:716-717.
12. HSIEH, S. P. Y. & BUDDENHAGEN, I. W. (1974). Suppressing effects of *Erwinia herbicola* on infection by *Xanthomonas oryzae* and on symptom development in rice. *Phytopathology* 64:1182-1185.
13. JENKINS, S. F., MORTON, D. J. & DUKES, P. D. (1966). Distinguishing *Pseudomonas solanacearum* infections from other peanut wilt diseases by the use of serological techniques. *Plant Dis. Repr.* 50:836-838.
14. JENKINS, S. F., MORTON, D. J. & DUKES, P. D. (1967). Comparison of techniques for detection of *Pseudomonas solanacearum* in artificially infected soil. *Phytopathology* 57:25-27.
15. KIKUMOTO, T. & SAKIMOTO, M. (1967). Ecological studies on the soft rot bacteria of vegetables. III. Application of immunofluorescent staining for the detection and the counting of *Erwinia aroideae* in soil. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 33:181-186.

16. LINK, G. K. K. & LINK, A. D. (1928) Further agglutination tests with bacterial plant pathogens. I. *Bacterium campestre*-*Bact. phaseoli* group, *Bact. medicaginis* var. *phaseolicola*; *Bact. tumefaciens*. *Bot. Gaz.* 85:178-197.
17. MAHANTA, I. C. & ADDY, S. K. (1977). Serological specificity of *Xanthomonas oryzae* incitant of bacterial blight of rice. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 27:383-385.
18. 松崎美文, 佐々木邦雄. (1963). 圃場検査におけるジャガイモ輪腐病の血清による診断方法. 植防研報 2:33-40.
19. MORTON D. J., DUKES, P. H. & JENKINS JR., S. F. (1965). Serological identification of *Pseudomonas solanacearum* in four solanaceous hosts. *Phytopathology* 55:1191-1193.
20. O'BRIEN, L. M., MORTON, D. J., MANNING, W. J. & SCHEETZ., R. W. (1967). Serological differences between apparently typical pepper and tomato isolates of *Xanthomonas vesicatora*. *Nature* 215:532-533.
21. OUCHTERLONY, O. (1984). In vitro method for testing the toxin-producing capacity of diphtheria bacteria. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 25:186-189.
22. SCHAAD, N. W. (1979). Serological identification of plant pathogenic bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* 17:123-147.
23. 陶山一雄, 藤井溥. (1984). 抗血清によるキュウリ斑点細菌病の診断. 植物防疫 38:32-37.
24. VRUGGINK, H. (1978). Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) in the serodiagnosis of plant pathogenic bacteria. *Proc. 4th. Int. Conf. Plant Path. Bact. Angers*:307-310.
25. VRUGGINK, H. & MAAS GEESTERANUS, H. P.(1975). Serological recognition of *Erwinia carotovora* var. *atroceptica*, the causal organism of potato blackleg. *Potato Res.* 18:546-555.
26. WILLIAMS, O. B. & GLASS, H. B. (1931). Agglutination studies of *Phytomonas malvacearum*. *Phytopathology* 21:1181-1184.