

벼 종자에서 *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*의 분리를 위한 선택배지

김형무* · 송완엽 · 소인영 · 이두구¹
전북대학교 농과대학, ¹호남작물시험장

A Semiselective Medium for the Isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* from Rice Seed

Hyung Moo Kim*, Wan Yeob Song, In Young So and Doo Gu Lee¹
College of Agriculture, Chonbuk National University, Chonju 560-756, Korea
¹Homam Crop Experiment Station, Iri 570-080, Korea

ABSTRACT: A semiselective agar medium (XCO) was developed for the isolation of bacterial blight pathogen, *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*, from rice seed. The medium contained yeast extract 1.0 g, peptone 2.0 g, sucrose 5.0 g, sodium glutamate 1.0 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.05 g, Fe · EDTA 1 mg, cephalixin 20 mg, Evan blue (0.1%) 1.5 ml, bromcresol purple (0.1%) 2.5 ml, cycloheximide 100 mg and agar 15.0 g per liter. Colonies of *X. c.* pv. *oryzae* were 4~5 mm in diameter, smooth, round, blue (darker center) and convex after 6 days incubation at 28°C. The recovery of 6 isolates of *X. c.* pv. *oryzae* on the XOC medium ranged from 81% to 120% (mean 98.2%) in comparison to Wakimoto's medium. The number of saprophytic bacteria from 10 rice seed lots on XCO medium was reduced to 70.4% of that on Wakimoto's medium. The recovery of *X. c.* pv. *oryzae* added to rice seed on XOC medium ranged from 67% to 87% (mean 75.6%) of that on Wakimoto's medium.

Key words: Selective medium, bacterial blight, *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*.

Xanthomonas campestris pv. *oryzae*에 의한 벼 흰 잎마름병은 주요 벼 재배지인 아시아에서 발병되고 있으며(14), 오스트레일리아, 아프리카, 미국 등지에서도 보고되어 있다(2, 6, 8, 16). 벼 흰잎마름병은 종자에 의해서 전염된다는 보고(1, 3, 5, 7, 10)와 수확 후 벼 껍질에 병원균이 수개월 동안 생존하면서 벼의 발아를 억제 시키거나 유묘기에 피해를 준다는 보고가 있다(12, 13, 19). 최근 선택배지를 이용하여 종자에서 병원체의 분리 및 검정에 관한 실험이 Di 등에 의해서 이루어져 있을 뿐이다(4). 본 연구는 특이성이 있고 간단하게 종자로부터 병원체를 분리, 검정할 수 있는 선택배지를 선발하고자 실시하였다.

재료 및 방법

공시균주. 본 실험에 사용된 균주는 Table 1과 같으며 균주는 잎과 종자에서 분리 하였다. 비교

균주로 NP-2는 미국에서 분양받았고, 한국에서 분리한 OK-7, OK-16, OK-21, OK-22, OK-30 6개 균주를 본 실험에 사용하였다.

선택배지 선발. 공시한 6개의 균주를 대상으로 Wakimoto 배지(14)와 nutrient glucose broth 배지(17)에 배양하면서 선택배지를 선발하였다. 접종원은 스펙트로포토미터 Vis. 600 nm에서 0.1로 세균 농도를 조절하여 0.85% 생리식염수에 10⁻⁶으로 희석하여 실험에 사용하였다.

배지선발은 기존배지(9, 18, 20~22)를 참고하여 *X. c.* pv. *oryzae*의 생장에는 좋은 영향을 주고, 범사에 부생하는 세균은 이용성이 적은 영양원을 선발하였다. 영양원으로는 NH₄H₂PO₄, (NH₄)₂HPO₄, NH₄Cl, Ca(NO₃)₂ · 4H₂O, NaNO₃, cystine, glycine, glutamic acid, methionine, sodium glutamate, proline, FeSO₄ · 7H₂O, Fe · EDTA, MgCl₂ · 6H₂O, MgSO₄ · 7H₂O, K₂HPO₄, KH₂PO₄, NaHPO₄ · 12H₂O, arabinose, fructose, glucose, galactose, glycerin, maltose, lactose, dextrin, starch, sucrose, xylose, beef extract, yeast

*Corresponding author.

extract, peptone, tryptone 33종을 대상으로 하였다.

억제물질로는 ampicillin-Na, bacitracin, boric acid, cefuroxime, cephalixin, erythromycin, 5-fluorouracil, gentamycin sulfate, homoserine, kanamycin, kasugamycin, lithium chloride, lithium hydroxide, lithium nitrate, nalidixic acid, neomycin sulfate, nitrofurantoin, novobiocin, penicillin G., sodium azide, sodium borate, sodium glutamate, streptomycin sulfate, tellurite sol., tobramycin, vancomycin 26종을 사용하였고, 염색액으로는 acid fuchsin, acridine orange, aniline blue, brilliant blue R, brilliant cresyl blue, brilliant yellow, bromcresol purple, bromphenol blue, bromthymol blue, crystal violet, Evan blue, methylene blue, methyl green, methyl green zinc, methyl violet 2B, phenol safranin, safranin, trypan blue, xylene cyanide 2F 18종을 사용하였다.

선발된 물질의 최적농도를 선발하고, 상호 조합하여 최적배지를 결정하였다. 곰팡이를 억제하기 위하여 11당 cycloheximide 100 mg을 사용하였다.

종자에서 *X. c. pv. oryzae*의 회수. 종자 1,000립 중에 해당하는 범씨 30 g을 수돗물로 10분 정도 수세하여 종자에 흡착된 이물질을 제거한 후 실험재료로 사용하였다. 범씨는 품종, 재배조건이 다른 10개 포장에서 수집하여 실험에 사용하였다. 종자에서 *X. c. pv. oryzae*의 추출은 범씨 30 g을 멸균된 50 ml의 0.1 M 인산완충액에 넣어 4°C에서 24시간 보관하여 추출하였으며, *X. c. pv. oryzae*의 배양에 이용되는 Wakimoto배지, Di 등(4)에 의해서 개발된 XOS 선

택배지 및 본 실험에서 새로 개발한 XCO 선택배지 등에 접종하여 출현한 집락의 숫자를 비교하여 회수율을 조사하였다.

결과 및 고찰

선택배지 선발. 선택배지 선발은 선택배지 및 종자에서 *X. c. pv. oryzae*의 회수율, 배지에서 집락의 특성 및 부생세균의 억제력 등을 Wakimoto 및 XOS배지와 비교하면서 선택배지를 선발하였다. 실험결과 새로 선발된 배지를 XCO배지라 하였다. XCO배지는 yeast extract 1.0 g, peptone 2.0 g, sucrose 5.0 g, sodium glutamate 1.0 g, FeSO₄·7H₂O 0.5 g, Fe-EDTA 1 mg, 억제물질로는 cephalixin 20 mg, 염색액으로 Evan blue(0.1%) 1.5 ml, bromcresol purple(0.1%) 2.5 ml로 조성되었다.

새로 선발된 XCO 배지에서의 *X. c. pv. oryzae*의 집락의 특징은 Fig. 1과 같이 형태는 원형, 주변부는 매끄러운형, 용기상태는 불록형, 색깔은 중앙이 진한 청색으로 크기는 4~5 mm였다. 새로 선발된 XCO 배지는 *X. c. pv. oryzae*의 생장에 억제현상이 낮으면서 부생세균의 생장에는 억제력은 높은 선택배지의 특징을 나타냈다.

특이성이 있는 억제물질과 염색액의 선발은 *X. c. pv. oryzae*와 부생하는 세균을 Wakimoto배지에 분무

Table 1. Source and percentage recovery of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* on the XCO selective medium compared to Wakimoto's medium

Isolate	Source	Mean recovery (%) ^a
OK-7	leaf, Korea	100
OK-16	leaf, Korea	108
OK-21	leaf, Korea	92
OK-22	seed, Korea	88
OK-30	seed, Korea	81
NP-2	seed, USA	120
Mean		98.2

^aMean recovery=(the number of colonies recovered on XCO selective medium/the number of colonies on Wakimoto's medium)×100. Figures were calculated from the mean colony numbers per plate, from 5 plates per strain.

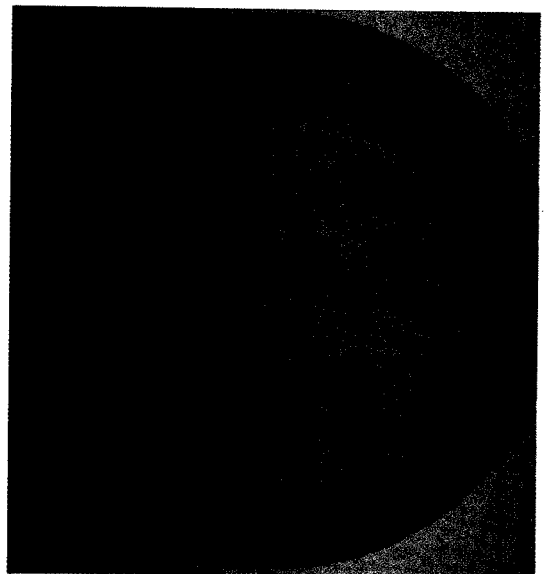


Fig. 1. Colonies of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* growing on the XCO selective medium after 6 days at 28°C.

집종 1시간 후, 0.1 ml 용량의 흡습지에 억제물질 및 염색액을 흡습시켜 배지상에 놓고 균의 성장저지대를 측정하여 *X. c. pv. oryzae*의 성장에는 영향을 주지않고 부생세균에만 강한 억제작용이 있는 물질을 선발하고자 하였다. 그 결과 억제물질로는 cephalixin이 효과적였고, *X. c. pv. oryzae*는 Evan blue와 bromcresol purple에 의해 청색으로 염색이 되어 다른 부생세균과 쉽게 구별되었으며 부생세균의 성장을 억제하는 특이성이 있었다. 영양원으로는 yeast extract, peptone, sucrose, sodium glutamate, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $Fe \cdot EDTA$ 가 본 실험에서 공시한 타 영양원보다 생장이 좋고 부생세균은 억제하였다. 배양 6일 후 Wakimoto 배지와 비교한 집락의 회수율은 Table 1과 같이 98.2%의 높은 회수율을 나타냈다. Cephalixin, Evan blue, bromcresol purple이 첨가된 XCO 배지는 *X. c. pv. oryzae*의 성장에는 영향을 크게 주지 않는 것으로 생각된다. Yuan(20)은 peptone이 *X. c. pv. oryzae*의 성장에 좋은 영양원이라고 했으며, Kar-

ganilla 등(9)은 $FeSO_4$ 는 생장에 필수적인 영양원이라고 하였다. Watanabe(21, 22)는 무기염류, 탄소원, 질소원이 생장에 미치는 영양에서, $FeSO_4$ 가 생장을 촉진시키고 좋은 영양원이 된다고 했으며, Suwa(18)는 Na-glutamate와 $FeSO_4$ 를 첨가한 배지에서 균의 생장이 좋다고 하였다. 본 실험에서도 $FeSO_4$, Na-glutamate 및 peptone 등이 다른 영양원 보다 생장에 좋은 영향을 미쳤다.

XCO 선택배지에서 범씨에 부생하는 세균의 억제는 Table 2와 같다.

10개의 포장에서 수집한 범씨를 대상으로 실험한 결과 XCO배지에서는 세균을 70.4% 억제하였고, 기존 XOS배지는 70.1%의 억제하였다. 이들 두 선택배지에서 세균의 억제현상은 비슷하였다. 앞으로 보다 효과적인 선택배지 선발을 위해서는 *X. c. pv. oryzae*에는 성장억제 작용이 없고 부생세균에는 억제작용이 강한 억제물질을 선발하여야 할 것으로 사료된다. Poon 등(15)은 *Bacillus subtilis*와 같은 부생세균이 *X. c. pv. oryzae*의 성장을 억제하는 현상을 나타낸다고 하였다. 본 실험에서 다른 부생세균과 배양될 경우 *X. c. pv. oryzae*는 부생세균과 경쟁력이 낮아 회수율이 낮은 결과의 요인으로 생각된다.

증자에서 *X. c. pv. oryzae* 회수. 범씨에 인위적으로 *X. c. pv. oryzae*를 혼합시킨 후 선택배지에서의 회수율은 Table 3과 같다. 회수율은 Wakimoto배지에

Table 2. Reduction in the number of saprophytic bacteria isolated from different lots of rice seeds on selective media relative to Wakimoto's medium

Cultivar	Mean number of saprophytic bacteria		
	Wakimoto ^w	XOS ^x	XCO ^y
Chucheongbyeo	250	40(84.0) ^z	42(83.2)
Daechongbyeo	180	60(66.7)	58(67.8)
Dongjinbyeo	200	55(72.5)	50(75.0)
Milyang 23	150	60(60.0)	65(56.7)
Nagdongbyeo	160	55(65.6)	52(67.5)
Pungsanbyeo	190	52(72.6)	50(73.7)
Samgwangbyeo	230	60(73.9)	63(72.6)
Seomjinbyeo	178	52(70.8)	50(71.9)
Seogwangbyeo	220	62(71.8)	60(72.7)
Unbongbyeo	170	62(63.5)	64(62.5)
Mean	192.8(100) ^a	55.8(70.1) ^b	55.4(70.4) ^b

^wWakimoto's culture medium for *X. c. pv. oryzae*.
^xDi Ming's selective medium for *X. c. pv. oryzae*.
^yNew developed selective medium for *X. c. pv. oryzae*.
^zFigures in parentheses are percent reduction determined as follows:

$$100 - \frac{\text{No. of saprophytic bacteria colonies on selective media}}{\text{No. of saprophytic bacteria colonies on Wakimoto's medium}} \times 100$$

Means followed by the same letter are not significantly different from one another at 0.5% level using Duncan's multiple range test.

Table 3. Percentage recovery of *Xanthomonas campestris pv. oryzae* from artificially inoculated seeds on selective media compared to Wakimoto's medium

Cultivar	Wakimoto	XOS	XCO
Chucheongbyeo	100 ^a	75	70
Daechongbyeo	100	67	67
Dongjinbyeo	100	60	67
Milyang 23	100	70	80
Nagdongbyeo	100	69	73
Pungsanbyeo	100	67	72
Samgwangbyeo	100	87	83
Seomjinbyeo	100	74	76
Seogwangbyeo	100	75	81
Unbongbyeo	100	84	87
Mean	100	72.8	75.6

^aMean recovery = the number of colonies on the test medium per colony forming unit on Wakimoto's medium $\times 100$.

*Artificially inoculated 30 g seeds were suspended into 50 ml of 0.1 M K_2HPO_4 plus 0.02% Tween #20 and incubated for 24 hrs at 4°C.

비교하여 새로 개발된 XCO배지에서는 67~87%(평균 75.6%)이었으며, XOS배지에서는 72.8%로 나타났다. 이와 같이 두 선택배지에서 다소 낮은 회수율을 보이는 것은 범씨 껍질에 많은 박테리아가 기생하기 때문인 것으로 생각된다.

요 약

벼 흰잎마름병에 이병된 종자에서 *X. c.* pv. *oryzae*의 분리를 위한 선택배지를 개발하였다. 배지는 yeast extract 1.0g, peptone 2.0 g, sucrose 5.0 g, Na-glutamate 1.0 g, FeSO₄·7H₂O 0.05 g, Fe·EDTA 1 mg, cephalixin 20 mg, Evan blue(0.1%) 1.5 ml, bromcresol purple(0.1%) 2.5 ml, cycloheximide 100 mg, agar 15 g으로 조성되었다. 선택배지에서 28°C에 6일 배양할 때 집락의 크기는 4~5 mm였으며, 원형으로 주변부는 매끄러운형이며, 용기형태는 볼록형이고, 중앙이 진한 청색이었다. 선택배지에서 *X. c.* pv. *oryzae*의 집락수는 Wakimoto배지에 비교하여 98.2%의 회수율을 보였으며, 부생세균의 집락수는 70.4%가 감소되었고, 종자에서 회수율은 75.6%였다.

감사의 말씀

이 논문은 1991년도 교육부지원 한국학술진흥재단의 지방대육성과제 학술연구조성비에 의하여 연구된 결과임.

참고문헌

- Agarwal, P. C., Motensen, C. N. and Matgur, S. B. 1989. *Seed-borne disease and seed health testing of rice*. Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries, Denmark. pp. 58-63.
- Aldrik, S. J., Buddenhagen, I. W. and Reddy, A. P. K. 1973. The occurrence of bacterial leaf blight in wild and cultivated rice in northern Australia. *Austral. J. Agric. Res.* 24: 219-229.
- 정후섭, 이순구, 문유연, 조용섭. 1981. 벼 흰빛잎마름병의 종자전염 증명. Proceeding of seed pathology workshop 209 pp.
- Di, M., Ye, H., Schaad, N. W. and Roth, D. A. 1991. Selective recovery of *Xanthomonas* spp. from rice seed. *Phytopathology* 81: 1358-1363.
- Eamchit, S. and Ou, S. H. 1970. Some studies on the transmission of bacterial blight of rice through seed. *Philippine Agriculturist* 54: 33-45.
- Gonzalez, C. F., Xu, G. W., Li, H. L. and Cosper, J. W. 1991. *Leesia hexandra*, an alternative host for *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* in Texas. *Plant Dis.* 75: 159-162.
- Goto, M., Zeigler, R. S. and John, V. T. 1988. Rice seed health: Progress in seed health research on seedborne and contaminant bacteria, viruses, and nematodes. Inter. Rice Res. Inst., Manila, Philippines. pp. 131-150.
- Jones, R. K., Barnes, L. W., Gonzalez, C. F., Leach, J. E., Alvarez, A. M. and Benedict, A. A. 1989. Identification of low virulence strains of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* from rice in the United States. *Phytopathology* 79: 984-990.
- Karganilla, A., Paris-Natural, M. and Ou, S. H. 1973. A comparative of culture media for *Xanthomonas oryzae*. *Philippine Agriculturist* 57: 141-152.
- Kauffman, H. E. and Reddy, A. P. K. 1975. Seed transmission studies of *Xanthomonas oryzae* in rice. *Phytopathology* 65: 663-666.
- Lozano, J. C. 1977. Identification of bacterial leaf blight in rice caused by *Xanthomonas oryzae* in America. *Plant Dis. Rep.* 61: 644-648.
- Mizukami, T. and Wkimoto, S. 1969. Epidemiology and control of bacterial leaf blight of rice. *Annu. Rev. Phytopathol.* 7: 51-72.
- Muty, V. S. and Devadath, S. 1984. Role of seed in survival and transmission of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* causing bacterial blight of rice. *Phytopatol. Z.* 110: 15-19.
- Ou, S. H. 1985. *Rice Diseases*. Commonw. Mycol. Inst./Assoc. Appl. Biol., Kew, Surrey, England. 380 pp.
- Poon, E. S., Huang, T. C. and Kuo, T. T. 1977. Possible mechanism of symptom inhibition of bacterium isolated from rice. *Bot. Bull. Academia Sinica* 18: 61-70.
- Reckhaus, P. M. 1983. Occurrence of bacterial blight of rice in Niger, west Africa. *Plant Dis.* 67: 1039.
- Schaad, N. W. 1988. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria (2nd edition)*. The Amer. Phyto. Soc. St. Paul, Minnesota. 164 pp.
- Suwa, T. 1962. Studies on the culture media of *Xanthomonas oryzae* (Uyeda et Ishiyama) Dowson. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 27: 165-171.
- Tagaml, Y., Kuhara, T., Fujii H., Sekiya, N., Yoshimura, S., Sato, T. and Watanabe, B. 1963. Epidemiological studies on the bacterial leaf blight of rice, *Xanthomonas oryzae*. *Bull. Kyushu Agric. Exp. Stn.* 9: 89-122.
- Yuan, W. 1990. Culture medium for *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*. *J. of Appl. Bact.* 69: 798-805.

21. Watanabe, M. 1963. Studies on the nutritional physiology of *Xanthomonas oryzae* (Uyeda et Ishiyama) Dowson. I. Effects of mineral salts and vitamin on multiplication of bacteria. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 28 : 175-181.
22. Watanabe, M. 1963. Studies on the nutritional physiology of *Xanthomonas oryzae* (Uyeda et Ishiyama) Dowson. II. Effects of carbon and nitrogen sources on multiplication of bacteria. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 28 : 201-208.