

# 人蔘 赤腐病原에 관한 研究

李 敏 雄

(東國大, 農大, 農生物學科)

## Studies on the Etiology of Red Rot of Ginseng

Lee, Min Woong

(Dept. of Agrobiolgy, College of Agriculture & Forestry, Dongguk University)

### ABSTRACT

Rotting bacteria were isolated from decayed root rot of ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer), cultured purely, and it's pathogenicity was confirmed by reinoculation test. Two strains(E3, E7) were selected to be tested in more detailed study with respect to their morphological, cultural and biochemical characters.

The strains causing red rot of ginseng were identified as *Erwinia carotovora*.

### 緒 論

### 材料 및 方法

우리나라 人蔘(*panax ginseng* C.A. Meyer)의 赤腐病原에 관한 研究報告는 처음으로 上田(1909)에 의해 *Bacillus araliavorus* 라고 報告된 바 있으나 後日 *Erwinia araliavorus*(Uyeda) Magrow 라 變更記載되어 사용하였으며 또한 Rankin(1910)에 의해서도 이같은 細菌이 赤腐病과 類似한 疾病을 일으키는 것으로 報告된 바 있다.

그러나 Bergey's Manual of determinative Bacteriology(8版, 1974)에는 인정하기 어려 種이라 指摘되어 있다.

그러므로 本 研究는 赤腐病原의 分類同定을 再檢討할 필요가 있다고 생각되어 實驗하였다.

#### 1. 病原菌의 分離 및 再接種

1978年 6月과 7月 사이에 京畿道 金浦郡과 江華郡의 現地 人蔘圃場에서 細菌에 의해 罹病된 蔘根을 2회에 걸쳐 採集하였고 이를 材料로 하여 明日山等(1962)의 混和平板分離培養 및 平板分離法에 의하여 18種의 菌株를 分離하였으며 이들을 다시 Kado와 Heskett(1970)의 特殊選別培地에 옮겨 菌株의 特性을 調査하였다.

再接種은 3年根 人蔘에 明日山等(1962)의 土壤接種法과 李(1975)의 接種方法을 참고로 하여 罹病性 與否와 그 程度를 관찰한 결과 8種의 菌株가 강한 罹病性을 나타냈고 이중 특히 2 菌株(E3와 E7)가 현저한 강한 病原性을 나타냈으므로 이 두 菌株를 選定하여 實驗에 供試하였다.

또한 人蔘 이외에 植物根 및 저장기간에 대한

罹病性 與否를 調査하기 위하여 당근(*Daucus Carota* L.), 오이(*Cucumis sativus* L.), 호박(*Cucurbita moschata* Duch.), 감자(*Solanum tuberosum* L.), 고구마(*Ipomaea batatas* Lam.), 양파(*Allium cepa* L.) 및 토란(*Colocasia antiquorum* Scott.)과 무우(*Raphanus sativa* L.), 사탕무우(*Beta Vulgaris* L. Var. *Saccharifera* Alefeld.) 등에 대해서도 Lee(1975)의 接種方法을 參考로 하여 조사하였다.

### 2. 菌株의 保存 및 接種

供試菌株 E3와 E7은 nutrient agar 斜面培地에 接種하여 菌株保存用 冷藏庫(5°C)에 保存하고 每 1個月마다 繼代培養하였고 實驗에 쓰기전 YDC 培地(Dye, 1968)에 세로이 이식하여 2~7日 培養後 殺菌水로 조정하여 엷은 混濁液을 유지하게 한 뒤에 接種방법으로 옮겨 實驗하고 液體培地는 Pasteur 피펫으로 한방울씩 接種하여 實驗하였다.

### 3. 菌株의 同定實驗

供試한 菌株을 分類同定하고 그 特性을 밝히기 위하여 다음과 같은 實驗을 하였다.

#### 1) 形態學的 特徵 및 染色性

Gram染色은 Wright's modified染色法, 孢子染色은 Eiehl's carbol fuchsin과 nigrosine液으로, Capsule은 Tyler's crystal violet 液과 硫酸銅 20%液으로 하였으며 鞭毛染色은 Pelczar와 Reid(1958)의 方法을 참고로 하였다.

染色에 쓰인 菌株은 nutrient agar 斜面培地에서 24~48時間 培養 後에 이에 殺菌水를 加하여 懸濁液을 만들어 材料로 하였다.

#### 2) 培養學的 性質

Misaghi와 Grogan(1969) 및 Sands等(1970)의 方法으로 最適 pH와 溫度를 실험한 結果 각각 6.5의 pH와 27°C의 適溫범위가 가장 적합하였으므로 각 실험에 위와 같은 溫度와 pH를 조정하여 實驗하였다.

培養的 性質은 nutrient agar 培地, Kado와 Heskett(1970)의 選擇培地 및 YDC 培地(Dye, 1968)에서 나타나는 各種의 性질을 調査하였다.

#### 3) 各種 生理 生化學的 性質

Dye(1968)의 方法으로 YDC 培地에서 관찰되는 色素와, King等(1954)의 A, B 培地에서 色素의 生産 與否를 조사하였고, Dye(1968)의 培

地와 方法으로 炭素化合物의 利用性, 炭水化合物과 이에 關聯되는 其他 物質들로부터 酸의 生産 與否, M.R. 實驗, Sucrose로부터 還元物質의 生産有無, 有機酸 및 이들 鹽物質의 利用性 與否, 最高溫度, NaCl 濃度別에 따른 生長 關係, KCN에 대한 耐性有無, 生長素의 要求性 與否, Catalase 實驗, gelatin의 液化性, 牛乳에 대한 反應性, Indole 反應, acetoin 生産有無, Urease 實驗, 窒酸鹽의 還元性 與否, Cysteine으로 부터 H<sub>2</sub>S의 生産有無, 澱粉과 Aesculin에 대한 加水分解能, Levan 生産 및 Pectate의 液化能 與否를 調査하였다.

또한 Moeller(1955)의 方法으로 아미노酸에 대한 脫炭酸酵素의 有無를 實驗하고 Shaw와 Clarke(1955)의 方法으로 phenylalanine에 대한 脫아미노化 反應實驗과 gluconate의 酸化作用 與否를 實驗하였다. Misaghi와 Grogan(1969)의 方法에 의하여 감자의 軟腐實驗과 Lipase에 대하여 實驗하였으며, Graham와 Hodgikiss(1967)의 方法으로 Sympasmata의 形成有無를 調査하였다. 運動性은 Ewing(1962)의 方法에 따라 實驗하였고 Tyrosinase와 Lecithinase는 Billing와 Luckhurst의 培地에 Lelliott等(1966)의 方法으로 判定하였으며 金(1971)의 方法으로 phosphatase와 Carotinoid에 대하여 實驗했다. Wilson와 Miles(1964)의 方法으로 Ammonia의 生産與否를 實驗하였다.

Cytochrome oxidase 實驗은 Gaby와 Free(1958) 方法으로 하였으며, Dye와 Kemp(1977)의 方法으로 酸素의 要求性 與否, 炭素源과 窒素源으로 Asparagine의 利用性 有無를 實驗하였으며 其他 Haemolysis 有無와 抗生劑에 대한 感受性 反應 등은 常法에 준하여 實驗하였다.

## 結 果

人蔘 이외의 및가지 植物根 및 貯藏器管에 대한 罹病性을 調査한 結果 두 菌株 모두 人蔘, 당근, 토란等에 대하여 病原性을 나타냈고 감자에는 弱한 罹病性을 나타냈으나 其他에서는 病原性을 확인할 수가 없었다(Table 1).

形態學的 特徵으로 供試한 두 菌株은 Gram 染色反應이 陰性이고, 캡슐染色과 孢子染色反應

**Table 1.** Pathogenicity of strains isolated to the various plant root.

Strains Host plant	E3	E7
Ginseng	+	+
Carrot	+	+
Onion bulb	-	-
Cucumber	-	-
Potato	±	±
Pumpkin	-	-
Sweet potato	-	-
Taro	+	+
Turnip	-	-
Sugar beet	-	-

**Table 2.** Morphological characters of the strains isolated.

Strain Reaction	E3	E7
Capsule stain	-	-
Gram stain	-	-
Spore stain	-	-
Flagella stain	peritrichous	peritrichous
Shape	rod-form	rod-form
Size( $\mu$ )	1.6~2.5×0.7~0.9	1.5~2.4×0.7~0.9

이 陰性이 었으며 鞭毛는 周毛性 鞭毛를 가지는 桿狀型 細菌이며 크기는 E3 가 1.6~2.5×0.7~0.9 $\mu$  이고 E7 은 1.5~2.4×0.7~0.9 $\mu$  이었다 (Table 2).

**Table 3.** Cultural characters of the strains isolated.

Media	Form	Elevation	Margin	Surface type	Color of colony	Growth
Nutrient						
Plate	Circular	Convex	Entire	Wet-shining	Thin grayish white	Good
Slant	Filiform	Raised		Wet-shining	Thin grayish white	Good
YDC agar						
Slant	Filiform	Convex		Wet-shining	Yellowish white	Good
Plate	Circular	Convex	Entire	Wet-shining	Yellowish white	Good
Kado & Heskett						
medium(plate)	Punctiform or circular	Convex	Entire	Wet-shining	Pale red purple	Moderate

各種 培地上에 나타나는 培養의 特性으로 nutrient agar 平板培地에서 두 菌株는 거의 같이 集落의 性狀은 圓形, 全緣狀, 丘狀 내지는 中高型에 가까운 隆起를 나타내고, 表面集落의 형상은 濕潤狀을 띠며 集落의 色은 옅은 灰白色을 띠었다. 또한 斜面培地에서도 糸狀型의 生長과 丘狀의 隆起를 하며 生長은 좋았고 기타의 性질은 平板培養과 같다 (Table 3).

YDC 斜面培地에서 菌의 生長은 糸狀이고 隆起는 丘狀 내지는 中高型이며 集落表面의 形상은 濕潤狀을 나타냈고 色素는 黃白色을 내며 生育은 좋았다 (Table 2). 또한 Kado와 Heskett (1970)의 選別 分離培地에서는 集落은 點狀 내지는 圓型이며 周緣은 全緣狀이었으며, 隆起 상태는 丙狀 내지 中高狀이었다. 또한 集落表面은 濕潤狀을 띠고 色은 옅은 赤紫色의 生育이 조금 느린 集락의 特性을 나타냈다 (Table 3).

生理 및 生化學的인 各種 特性에 관한 結果는 다음과 같다 (Table 4).

色素 生産能에 있어서 두 菌株 모두 螢光性을 微弱하게 나타내나 기타 pyocyanine pink, blue 및 carotinoid 등의 色素는 관찰되지 않았다. 酸素의 要求性은 條件的 嫌氣性菌이며 glucose 와 lactose 의 O/F 實驗에서 glucose 만이 醱酵性을 나타냈다.

M.R. 실험은 陰性이고 sucrose 의 還元性에 있어서는 E3 는 . . ., E7 는 陽性이었다.

最高溫度 범위는 38~40°C 이며 耐鹽性은 E3 가 7% 濃度에서 生長이 되나 E7 은 6%에서만 生長하는 약간에 차이가 있었다. KCN 대한

**Table 4.** Biochemical characters of the strains isolated.

Strains Tests	E3	E7
<b>Pigment</b>		
Pyocyanine	+	+
Fluorescent	--	--
Pink diffusable	--	--
Blue	--	--
Oxygen requirements	facultative	anaerobes
Mode of utilization of carbon compounds		
Glucose	F	F
Lactose	O	O
Methyl Red test	--	--
Reducing substance from sucrose	--	+
Maximum temperature(°C)	38~40	38~40
Effect of NaCl concentration		
1~6%	+	+
7%	+	--
8~10%	--	--
Tolerance of KCN	+	+
Growth factors requirements	--	--
Utilization of asparagine as sole source of carbon and nitrogen	+	+
Amino acid decarboxylases		
Lysine HCl	±	±
Arginine HCl	±	±
Glutamic acid	--	--
Phenylalanine diaminase	--	--
Growth at 36°C	+	+
41°C	--	--
Catalse	+	+
Oxidase	+	+
Lipase	--	+
Gelatin hydrolysis	±	+
Action on milk		
Reduction of purple milk	+	+
Peptonization	+	+
Casein hydrolysis	+	+
Indole production	--	--
Acetoin production	+	+
Urease production	--	--
Nitrate reduction	+	+
H <sub>2</sub> S production	+	+
Hydrolysis of starch	±	--
Hydrolysis of aesculin	+	+
Levan production	+	+

Pectate lequifaction	±	±
Potato soft rot	±	±
Gluconate oxidation	±	+
Symplasmata	-	-
Motility	+	+
Tyrosinase	-	-
Phosphatase	-	-
Carotinoid pigment	-	-
Ammonia production	±	+
Lecithinase	-	±
Gas from glucose	+	+
Cytochrome oxidase	-	±
Haemolysis	-	±
Antibiotic sensitivity		
Erythromycin	-	-
Chloromycin	-	-
Kanamycin	+	+
pH		
Optimum	7.0	6.5
Minimum	4.0	4.0
Maximum	8.3	8.5
Temperature(°C)		
Optimum	27	27
Minimum	5	5
Maximum	38~40	38~40

F; fermentation. O;oxidation.

耐性は陽性이고 生長素의 要求性 興否에 있어서는 陽性이었다.

아미노酸에 대한 脫炭酸酵素의 有無實驗에 있어서 Arginine HCl은 陽性反應을 나타냈고 Lysine HCl은 弱한 陽性反應을 나타냈으나 glutamic acid는 陰性反應을 나타냈다.

두 菌株은 또한 Catalase 實驗은 陽性, oxidase 陰性, Lipase에 있어서 E3는 陰性, E7은 陽性이며, gelatin의 液化는 陽性에 가깝고, 牛乳의 反應은 purple milk를 還元시키고, 牛乳를 peptonize하였다.

Indole 生産, Urease는 陰性이며, Acetoin 生産窒酸의 還元力과 Cysteine으로 부터 H<sub>2</sub>S의 生産등은 陽性反應이었다.

澱粉의 加水分解能은 거의 일어나지 않으며 Aesculin 加水分解能은 陽性反應이었다.

또한 Levan의 生産은 陽性이고 pectate의 液

化性, 감자의 軟腐현상 및 gluconate의 酸化作用등에 있어서는 弱한 陽性反應을 나타냈으며, Symplasmata 形成, Tyrosinase 및 Phosphatase 등의 反應性은 陰性으로 判定되었다.

其他 glucos로 부터 gas가 生成되고 抗生劑에 대한 感受性 反應에 있어서 Erythromycin과 Chloromycin에 대해서는 陰性反應을 나타냈으나 Kanamycin에 대해서는 陽性反應으로 判定되었고, 生長에 미치는 最適 pH는 6.5~7.0이며, 溫度는 27°C 범위에 속하였다(Table 4).

炭水化合物과 이에 類似한 物質의 利用에 의한 酸의 生産實驗에서 adonitol과 innulin에서 두 菌株가 약간의 차이를 나타냈으나 其他의 종류에서는 同一하였고 單糖類와 複糖類에서 酸의 生産이 현저하였다(Table 5).

有機酸과 이들의 鹽化合物에 利用性에 있어서

**Table 5.** Production of acid from carbohydrates and related carbon sources of the strain isolated.

strain Sources	E3	E7
Arabinose	+	+
Rhamnose	±	+
Xylose	+	+
Glucose	+	+
Fructose	+	+
Galactose	+	+
Mannose	+	+
Lactose	+	+
Sucrose	+	+
Maltose	+	+
Trehalose	+	+
Raffinose	+	+
Dextrin	-	-
Glycerol	+	+
Adonitol	-	+
Mannitol	+	+
Sorbitol	+	+
Dulcitol	±	±
Inositol	+	+
Starch	±	±
Inulin	-	+
Salicin	+	+
Aesculin	+	+
Cellobiose	+	+
Methanol	-	-
Ethanol	-	+
Propanol	+	+
Butanol	-	+

두菌株 모두 同一한 利用性 關係를 나타냈다 (Table 6).

### 考 察

供試 菌株 E3와 E7은 다음과 같은 공통된 특징을 가졌다. 즉 Gram 陰性的 桿狀細菌으로 周毛性 鞭毛를 가지고 運動性을 나타내며 條件的 嫌氣性菌으로 Glucose를 醱酵하는 특징이 있다.

또한 Catalase 反應, 窒酸의 還元反應, V.P.

**Table 6.** Utilization of organic acids and salts of the strains isolated.

Strain Sources	E3	E7
Acetate	+	+
Citrate	+	+
Gluconate	+	+
Lactate	+	+
Malonate	+	±
Tartrate	±	±
Benzoic acid	±	±
Malic acid	±	±
Propionic acid	±	±
Succinic acid	+	+
Fumaric acid	+	+

實驗, KCN에 대한 耐性等이 陽性이며 M.R. 實驗, Phenylalanine의 脫 아미노化 反應 및 Urease等 反應이 陰性이었고 最適溫度 범위가 27~28°C이었다.

Bergey's manual of Determinative Bacteriology (1974)에 의하면 이같은 특징을 가지는 細菌을 Enterobacteriaceae의 Tribe V에 예측되는 *Erwinieae*라고 하였다. 供試菌株들은 *Erwinieae*에 속하는 것으로 생각된다.

또한 供試한 菌株들은 Fructose, glucose, galactose, sucrose, mannose와 같은 糖類等에서 酸을 生産하나 adonitol과 Dulcitol등에서는 酸의 生産이 弱하게 나타났으며 有機酸 및 이들 鹽物質의 利用性에 있어서 acetate, gluconate, formic acid, succinic acid 등은 잘 利用이 되나 benzoic acid, propionic acid 등은 잘 이용이 되지 않으면 澱粉의 加水分解能이 微弱하다. 또한 아미노酸의 脫 炭酸酵素는 Arginine HCl와 Lysine HCl에서는 弱한 陽性을 띠나 glutamic acid는 반응이 음성이었다. 其他 Lipase와 Urease 反應實驗도 陰性을 나타냈다.

Bergey's manual of Determinative Bacteriology에는 이와같은 특징을 가지는 細菌을 *Erwinia*屬으로 分類하였다.

다른 특징으로 供試 菌株는 條件的 嫌氣性菌으로 生長素를 特別히 要求하지 않는 점과 Cystine으로 부터 H<sub>2</sub>S를 生産하지 않는 점 pectate

의 液化性이 弱한 陽性反應을 나타내는 점, gelatin의 液化性이 陽性이며 glucose로 부터 gas를 생산하는 것과 Casein의 加水分解能이 陽性이며 5%의 NaCl濃度에서 細菌의 生長이 잘 되며 Lecithinase가 陰性 反應에 가깝고 Erythromycin에 대한 感受性 反應이 陰性이며 Phosphatase가 陰性으로 판정되었다.

이러한 특징을 가지는 세균을 *Carotovora* group

에 속하는 것으로 供試 菌株은 *Erwinia*, *Carotovora* group에 속하는 세균으로 생각된다.

또한 供知 菌株을 Dye(1969)의 報告와 比較할 때 培養學的 및 生化學的 면에서 比較해보면 變種으로 *Carotovora*와 같은 細菌으로 생각이 되나 앞으로 더욱 比較 檢討해 봐야 할 것이다.

## 摘 要

人蔘 赤腐病을 일으키는 病原體를 再究明하기 위하여 1978년 6월과 7월 사이에 京畿道 金浦郡과 江華郡의 人蔘圃場에서 罹病人 人蔘根으로 부터 18種의 菌株을 分離하고 純粹培養하여 再接種 實驗을 통하여 이 중 8菌株가 強한 病原性을 나타냈으며 이 중 다시 2菌株인 E3와 E7을 選定하여 菌株의 形態學的, 培養學的, 生理生化學的 諸性質을 조사하여 同定하였다.

人蔘 赤腐病을 일으키는 細菌性 病原體는 *Erwinia*, *Carotovora* 이었다.

## REFERENCES

1. Bergey, 1974. In "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" 8th ed., (Ed.) R.E. Buchanan and N.E. Gibbons. William & Wilkins Co., Baltimore.
2. Billing, E. and E.R.L. Luckhurst, 1957. A simplified method for preparation of egg yolk media. *J. Appl. Bact.* **20**, 90.
3. Dye, D.W., 1968. A taxonomic study of the genus *Erwinia*.- I. The *Amylovora* group. *N. Z. Jl. Sci.* **11** (4), 590~607.
4. Dye, D. W., 1969. A taxonomic study of the genus *Erwinia*.- II The *Carotovora* group. *N.Z. Jl. Sci.* **12** (1), 81~97.
5. Dye, D. W., 1969. A taxonomic study of the genus *Erwinia*.- III The *Herbicola* group. *N.Z. Jl. Sci.* **12**, 228~236.
6. Dye, D.W., and W.J. Kemp, 1977. A taxonomic study of plant pathogenic *Corynebacterium* species. *N.Z. Jl. Agri. Res.* **20**, 563~582.
7. Ewing, W.H., 1962. Biochemical methods for group differentiation. U.S. Dept. of Health, Education & Welfare, Public Health Service. No. 734.
8. Gaby, W.L., and E. Free, 1958. Differential diagnosis of *Pseudomonas*-like microorganisms in the Clinical Laboratory. *J. Bacteriol.* **76**, 442~444.
9. Graham, D.C. and W. Hodgikiss, 1967. Identification of Gram negative, yellow pigmented, fermentative bacteria isolated from plants and animals. *J. Appl. Bact.* **30** (1), 175~189.
10. Kado, C.I., and M.G. Heskett, 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas* *Phytopathology* **60**, 696~676.
11. Kim, J.W., 1971. Studies on the plant pathogenic *Corynebacterium*.- I - Morphological, cultural and physiological specific characteristics of the plant pathogenic *Corynebacterium*. Tokyo Univ. Agri. M.S. Thesis. 1~133.
12. King, E.O., M.K. Ward, and D.E. Raney, 1954. Two simple media for the demonstration of Pyocyanine and Fluorescin. *J. Lab. Clin. Med.* **44**, 301~307.
13. Lee, M.W., 1975. Studies on the *Pseudomonas fluorescens* causing root rot of ginseng. *Kor. Jour. Microbiol.* **13**, 143~156.
14. Lelliott, R.A., E. Billing, A.C. Hayward, 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonads*. *J. Appl. Bact.* **29**, 470~489.
15. Misaghi, I., and R.G. Grogan, 1969. Nutritional and biochemical comparisons of plant pathogenic

- and saprophytic fluorescent *Pseudomonads*. *Phytopathology* **50**, 1436~1450.
16. Moeller, V., 1955. Simplified tests for some amino acid decarboxylases and for the arginine dihydrolase system. *Acta. Path. Microbiol. Scand.* **36**, 158~172.
  17. Pelczar, M.J. Jr., and R.O. Reid, 1958. Laboratory exercises in Microbiology Mc raw-Hill Book Co. London.
  18. Rankin, W.H., 1910. End or red rot of ginseng (*Bacillus araliavorus*). *Special Crops* (N.S.) **9** (94), 356.
  19. Sands, D.C., M.N. Schroth, and D.C. Hildebrand, 1970. Taxonomic of phytopathogenic *Pseudomonads*. *J. Bacteriol.* **101**, 9~23.
  20. Shaw, C., and P.H. Clarke 1955. Biochemical classification of *Proteus* and providence culture. *J. gen. Microbiol.* **13**, 155~161.
  21. Wilson, G.S., and A. Miles, 1964. Principles of bacteriology, Virology and immunity. Butler & Tanner Ltd. London.
  22. 明日山秀文, 向秀夫, 鈴木直治. 1962. 植物病理學實驗. 日本植物防疫協會. 日本.
  23. 上田榮次郎. 1909. 本邦及韓國にける人蔘赤腐病の研究成績. 農試報. **35**, 61~104.