

人蔘根腐病을 일으키는 *Pseudomonas fluorescens*에 관한 研究

李 敏 雄

(東國大學校 農林大學 農業生物學科)

Studies on the *Pseudomonas fluorescens* causing Root Rot of Ginseng

LEE, Min Woong

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

ABSTRACT

A rotting bacterium was isolated from decayed root of ginseng (*Panax ginseng* Meyer), cultured purely, and its pathogenicity was confirmed by reinoculation test.

The strain causing ginseng root rot was identified as *Pseudomonas fluorescens* biotype II. The strain was somewhat different from *P. marginalis* and *P. tolaasii*, considering the number of flagella, pathotype and ability of indole production.

The strain did not exhibit pathogenicity to other plants tested, such as red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.), soy bean (*Glycine max* Merc.), cucumber (*Cucumis sativus* L.), lettuce (*Lactuca sativa* L.) and cowpea bean (*Vigna sinensis* Savi.).

緒 論

오늘날 우리가 現在 栽培하는 人蔘(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 宿根性植物로 圃場에서 5~6年間 栽培되는데 이 기간동안 큰 문제로 되고 있는것의 하나는 土壤微生物에 의한 病害 특히 根腐病(筆者는 人蔘根에 腐敗를 일으키는 病害를 총칭함)에 의한 病害라고 생각된다. 이는 連作을 不可能하게 하는 主要原因의 하나로 지적되어 人蔘을 耕作栽培함에 있어 크게 영향을 미치는 것으로 알려져 왔으나 아직 이에대한 根本的 研究가 이루어지지 못하고 있는 實情이다.

現在까지 報告된 主要한 人蔘根腐病으로 上田(1909)은 人蔘根의 表面에 처음 赤褐色 또는 暗褐色의 病斑이 생기고 점차 확대 되면서 腐爛하고 나중에는 内部組織까지 腐敗

하게 하는 특징이 있는 細菌을 *Erwinia araliavorus*라고 하였고 또한 이에 隨伴하여 腐敗에 관계하는 2次細菌으로 *Pseudomonas koraiensis*와 *P. araliae* 및 *Bacillus fluorescens liquefaciens* 등을 分離하였으나 *Bacillus fluorescens liquefaciens* 만은 再接種結果 腐敗현상이 없다고 하였다. 金 등(1969)은 赤腐病菌을 分離하여 각종 榮養條件下에서의 生育상태를 조사하였고 李 등(1965) 및 李(1972)는 土壤中에서 赤腐病菌의 季節的 消長 및 生態에 관한 報告를 하였으며 Brann(1916)은 土壤을 蒸氣殺菌하여 根腐病에 대한 消毒效果를 實驗한 바 있다.

中田과 瀧元(1922)은 病發生이 주로 뿌리에 발생하나 때로 줄기에도 발생하며 根頭部に 發病하면 물에 던졌과 같이 水浸狀이 되고 나중에는 赤褐色 또는 靛빛색(靛色)으

로 점차 변화시키는 細菌病을 *P. panacis*에 의한다고 하고 이에 대한 각종의 形態 및 生理生化學的 諸性質을 실험하여 報告하였다.

細菌이외에 菌類로 根腐病을 이르는 微生物은 *Fusarium* sp.에 의한 病害報告(中田과 瀧元, 1922; 金, 1966; 松尾와 宮澤, 1967; Matuo와 Snyder, 1972; 李동, 1968; 金과 李, 1974)와 *Cylindrocarpon* sp.에 의한 根腐病的 發生과 이에 대한 각종 藥製防除 실험등의 報告(宮澤과 小林, 1967; 宮澤, 1970; Matuo와 Miyazawa, 1969; 鄭, 1969; 李와 鄭, 1974)가 있고 中田과 瀧元(1922)은 *Mucor* sp.에 의해서도 蔘根이 腐敗 된다고 하였으며 Zinssmeister(1918)은 *Ramularia* sp.에 의해서도 根腐현상이 일어난다고 하였다.

本實驗은 필자가 1973年 4월부터 京畿道 金浦郡과 江華郡 一帶의 人蔘圃場을 답사하였던 바 耕作面積中 상당히 많은 地域이 病害被害를 받아 문제된 바 있었고 어느 심한圃場은 거의 廢圃가 될 程度의 被害를 받았다.

그러므로 필자는 本病의 被害를 주는 主要 微生物이 어떤 종류인가를 究明하고자 당시 病發生이 심하였던 金浦郡 月串面 葛山里 金聖根氏 所有의 5年根 人蔘圃場에서 罹病이 된 蔘根을 4~6月 사이, 3회에 걸쳐서 採取하고 病原이 되는 細菌을 分離하고 아울러 病徵과 病原성을 調査함과 동시에 形態學的 性質과 染色性, 培養學的, 生理學的, 生化學的 및 榮養學的 諸性質을 實驗하고 이를 基礎하여 分類學的인 면에서 分類 및 同定한 결과 지금까지 研究報告된 人蔘根腐病細菌과는 다른 새로운 종류의 細菌이 人蔘根腐病을 일으킨다는 사실을 밝힐 수 있었으므로 보고 하는 바이다.

## 材料 및 方法

### 1. 病原菌의 分離 및 再接種

현재 人蔘圃場에서 罹病이 된 人蔘根을 4, 5, 6月 사이에 걸쳐 3회 동안 9根을 採取

하고 이를 材料로 하였다.

細菌의 分離方法은 明日山동(1962)의 方法으로 混和平板分離培養 및 平板分離法에 의하였고 再接種 실험은 人蔘根과 其他 植物에 再接種하였으리 다음과 같다.

人蔘根에 接種은 明日山동(1962)의 土壤接種法으로 大型試驗管接種과 化분接種法으로 각각 4根씩 심어 3회 反復處理하였다. 이들의 培養은 大型試驗管(15cm(高)×5cm(幅))에 接種한 처리구는 25±1°C의 定溫箱子內에서 20日동안 관찰하고 化분처리구(20cm(高)×15cm(幅))는 室外에서 약 3個月동안 관찰하여 罹病性 및 病徵등을 조사하였다.

또한 人蔘이외의 寄主植物에 대한 病原性實驗은 Misaghi와 Grogan(1969)의 方法에 의하여 강낭콩(*Phaseolus vulgaris* L.), 콩(*Glycine max* [L.] Merr.), 오이(*Cucumis sativus* L.), 상치(*Lactuca sativa* L.), 동부(*Vigna sinensis* [Torner] Savi.) 등에 대해 病原성을 조사하였다.

### 2. 純粹培養 및 保存

純粹分離한 菌株中에서 供試한 菌株는 稀釋平板法에 의해 純粹培養하고 이를 nutrient agar 斜面培地에 接種하여 菌株 保存用냉장고(5°C)에 保存하고 每 1個月 마다 계대배양하였다.

### 3. 菌株의 同定實驗

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

#### 1) 形態學的 特徵 및 染色性

普通染色은 Löffler's methylene blue, safranin, phenol fuchsin 등으로 染色하고 Gram 染色은 wright's modified Gram 染色法으로, 胞子는 Zieh!'s carbol fuchsin과 nigrosin 液으로, 包囊은 Tyler's crystal violet과 硫酸銅 20% 液으로 하였으며 鞭毛染色은 P.T.A. 2% 液으로 negative 染色하여 조사하였다.

染色에 쓰인 菌의 材料는 nutrient agar 斜面培地에 24~48시간 培養하고 이에 殺菌水를 加하여 懸濁液을 만들어 材料로 사용하였다.

形態學的 특징 조사는 菌의 모양, 크기, 鞭毛의 配列 및 數 등을 조사하였다.

培地의 pH는 金 등(1969)의 방법에 의했고 溫度는 Misaghi와 Grogan(1969) 및 Sands 등(1970)의 방법에 의해 실험한 결과 最適 pH는 6.5~7.0이고 最適溫度는 28~30°C의 범위였으므로 이하의 각종 실험에서 다른 附記事項이 없는 限 溫度와 pH는 위와 같이 조절하였고 이후 文章中 供試菌株라 함은 strain No.12의 菌株를 의미한다.

### 2) 培養學的 性質

각종의 培地조건하에 있어서 細菌생육의 상태를 2회씩 반복하여 조사하고 그 결과를 판정하였으며 다음과 같은 종류를 사용하였다.

Nutrient agar 培地(Difco)上에서 나타나는 각종 性質, beef extract broth 培地에서의 被膜形成如否 및 生育상태, *Pseudomonas* 選別培地(Masurovsky 등, 1963) King 등의 A 및 B培地(King 등, 1964), 螢光性 *Pseudomonas* 選別배지(Sands와 Rovira, 1970), Wahba와 Darrell 培地(Skerman, 1969)등에서 나타내는 Phenazine, fluorescence 및 pyocyanin 色素生産 등과 其他 色素生産의 각종 성질을 조사하였다.

### 3) 生理 및 生化學的 性質

각종의 生理 및 生化學的 性質을 조사하기 위하여 다음과 같은 실험을 하였다. 酸素의 要否性관계는 Klinge(1960)의 방법에 의하고 각종 酵素生産성에 관한 實驗으로서 protease, catalase는 Zehr(1970)의 方法으로, oxidase와 lipase는 Misaghi와 Grogan(1969)의 方法, arginine dihydrolase는 Thornley(1960)의 2A培地, lecithinase는 Billing과 Luckhurst(1957)의 egg emulsion 培地를 쓰고 Lelliott 등(1966)의 方法으로 판정 하였으며 pectinase는 Hildebrand(1971)의 方法으로 하고 extracellular esterase는 Stanier 등(1966)의 方法으로 조사하였다.

加水分解實驗으로서 aesculin은 Sneath(1956)의 培地에 接種하고 Lelliott 등(1966)

의 方法으로 판정하였으며, 澱粉은 太田(1956)이 提示한 方法, poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid는 Stanier 등(1966)의 方法에 의했다.

또한 寔酸鹽의 還元力은 Lelliott 등(1966) 方法, levan 生産性과 potato soft rot 현상은 Misaghi와 Grogan(1969)의 方法, hypersensitivity 反應性은 Sands 등(1970) 方法으로 接種하고 Klement 등(1964)의 판별법으로 조사하였다.

溫度의 實驗은 Misaghi와 Grogan(1969)의 溫度範圍를 참고하고 培地의 方法은 金 등(1969)의 方法으로 조사하였다.

Ethanol로 부터 acetic acid의 生産性與否와 carotenoids 色素의 有無는 金(1971)의 方法에 의했고, 牛乳, Litmus 牛乳培地에서의 生育현상, KCN添加培地에서의 生育與否등은 谷川과 坂井(1960)이 提示한 方法에 의해 조사하였다.

耐鹽性은 Zehr(1970)의 方法에 의하고 pH는 金 등(1969)의 方法에 따랐고, indole은 Salkowski-kitasato 法으로 실험하였다.

其他 糖類의 酸化 및 醱酵性與否는 Hugh와 Leifson(1953)의 基本培地에 Klinge(1960) 方法으로 조사하였다. 여기 사용된 糖類는 glucose, galactose, fructose, arabinose, xylose, mannitol, trehalose, inositol, rhamnose, sorbitol, sucrose, lactose, dulcitol, adonitol, salicin 및 starch등 이었다.

### 4) 營養學的 性質

Misaghi와 Grogan(1969)의 基本培地에 각종의 有機化合物을 基質(Substrate)로 添加하고 이들이 營養源으로 利用이 될 수 있는지의 利用性 與否를 실험하였다.

사용된 각종의 有機化合物은 Misaghi와 Grogan(1969) 및 Stanier 등(1966)이 사용한 종류의 化合物과 濃度로서 添加하여 실험하였으며 다음과 같다.

炭水化合物과 糖誘導體는 glucose, rhamnose, galactose, fructose, sucrose, trehalose, maltose, lactose, starch, inulin 및 salicin 등이고 脂肪酸 종류는 sodium acetate, propionic acid, 및 caproic acid 등이고

dicarboxylic acids와 hydroxy acids로서는 sodium oxalate, sodium succinate, malonic acid, maleic acid, glutaric acid, adipic acid, pimelic acid, caproic acid, sodium potassium tartrate 등이었으며 其他 有機酸은 sodium citrate이었고 高級알콜類로서 mannitol, sorbitol, inositol, adonitol 등과 알콜類로서 methanol, ethanol, propanol 및 butanol 등을 각각 기본배지에 0.2%가 되게 添加하였다.

또한 窒素化合物中 각종 형태의 아미노산 종류는 0.1%가 되게 基本 培地에 첨가하였으며 다음과 같은 종류들이었다. glycine,  $\alpha$ -alanine,  $\beta$ -alanine, L-serine, leucine, valine, *p*-aminobenzoic acid, aspartic acid, DL-arginine, histidine, tyrosine, tryptophan, threonine, ethanolamine, Ca-pantothenate, creatine, cystine, nicotinate 등이었으며 無機窒素化合物로서  $KNO_3$ ,  $NaNO_3$  및  $Ca(NO_3)_2$  등은 0.1%씩,  $KNO_2$ 는 0.03%가 되게 基本培地에 첨가하였으며 이를 48時間 培養하고 對照區와 比較하여 利用性 與否를 조사하였다.

## 結 果

### 1. 被害狀況 및 罹病根의 病徵

1973年 京畿道 金浦郡과 江華郡 一帶의 人蔘栽培地域 中에서 筆者가 調査한 江華郡 江華面의 5萬餘坪과 金浦郡 月串面 一帶의 6萬餘坪中 약 10~20%의 해당되는 人蔘圃場이 根腐病 被害를 받았으며 一端 病發生이 된 圃場은 蔘根이 腐敗되어 거의 圃場은 廢圃가 될 정도로 극심한 피해를 받은 바 있다.

이 病의 發生은 越冬하여 처음 이른봄 부터 發生하는 것으로 처음 싹(芽)이 나오는 3월부터 發生하여 4~6月 사이에 극심하게 發病하나 8~9月 부터는 病發生率이 줄어들게 나타나고 있다(Fig. 1).

病徵狀의 특징은 처음 새싹(新芽)이 나오는 根頭部와 細根部에 主로 發生하며 때에 따라서는 줄기에도 發生한다.

根頭部에 發病이 되면 初期에는 軟한 黃

褐色으로 되고 나중에 이를 橫斷하여 보면 皮層部에서 부터 内部組織 속으로 향하여 엷은 汚褐色으로 變色되게 되며 中央部에 가까운 수록 거의 엷고 밝은 올리브 灰色(light olive gray)으로 되어 있다. 이때 이 組織을 解剖刀로 가볍게 누르면 쉽게 崩壞 解離되고 물렁 물렁하게 軟化되어 汚汁 내지는 透明에 가까운 淡褐色의 汁液을 낸다(Fig. 2). 病害末期가 되면 内部組織이 거의 消失되어 導管皮層部만 남으며 土壤色과 區分하기 어렵게 된다(Fig. 3). 또 春期 發芽가 되어 줄기가 나오게 되면 줄기 部位를 때로 칩해하여 軟化시키고 莖葉이 萎凋되어 暗綠色이 되며 진드르면 쉽게 倒伏한다.

### 2. 病原菌의 分離 및 再接種

3회에 걸쳐 모두 19株의 細菌을 分離하였으며 nutrient agar 培地에 나타나는 生育狀의 특징으로 區分해 보면 蒼白色을 나타내는 菌株가 19株中 7株, 黃白色을 나타내는 菌株가 4株, 汚白色菌株가 7株이고 其他 紅色細菌이 1株 등 모두 19株의 細菌을 分離하였다.

本 實驗에 供試한 菌株는 再接種 結果 罹病性을 나타낸 蒼白色細菌(豫備實驗으로 形態學的 特徵과 培地中에 나타나는 培養學의 特徵이 類似함) 중에서 1株(strain No.12)를 選定하여 이 菌株에 대한 分類와 同定을 目的으로 人蔘根 및 다른 植物體에 再接種 하였다.

人蔘根에 再接種하여 그 結果로 罹病性을 조사한 결과 試驗管培養에 의한 人蔘根은 12個의 試驗區에서 모두 罹病性을 나타내어 전체가 罹病되었으나 회분에 接種한 試驗區에서는 전체 12個의 試驗區中 6個 시험구가 완전한 罹病性을 나타내었고 나머지는 罹病性을 나타내지 않았다(Figs. 4, 5).

또한 人蔘이외의 寄主植物에 대한 病原性 조사실험에서 供試植物인 강낭콩, 콩, 오이, 상치, 동부 등에 대하여 病原性을 나타내지 않았다.

### 3. 菌株의 同定

供試한 菌株의 形態의 特徵 및 染色性, 培

養學的, 生理 및 生化學的, 榮養學的 諸特性을 實驗하여 조사한 결과 *Pseudomonas fluorescens* biotype II 에 속하는 菌株로 同定되었다.

1) 形態學的 特徵 및 染色性

供試菌株의 形態學的 特徵 및 染色性을 조사한 결과는 Table 1과 같다.

Table 1. Morphological characters of the strain isolated.

Capsule stain	-
Methylene blue stain	+
Safranin stain	+
Fuchsin stain	+
Gram stain	-
Spore stain	-
No. of flagella	6-8(polar)
Shape	rod-form
Size( $\mu$ )	0.7-0.9 $\times$ 1.9 -2.7

+: positive.  
-: negative.

Table 1에서와 같이 細菌의 모양은 길다란 桿狀形이고 菌體의 兩端은 橢圓形으로 되었다. 一般的으로 單個이나 때로는 2개씩 연결되는 경우도 있다. 크기는 0.7~0.9 $\times$ 1.9~2.8 $\mu$ 이고 孢子와 包囊의 形成은 관찰되지 않으나 培養이 4~5日 지난 후에 관찰하면 粘液을 分泌하여 菌體 주위에 偽包囊을 形成하기도 한다.

運動性を 보면 semi-solid agar 培地에서 24~48時間 동안 培養하면 擴散하는 것으로 보아 運動성이 있는 것으로 판단되었다.

染色은 methylene blue, safranin 및 phenol fuchsin과 같은 染色法에 쉽게 染色이 되며 Gram 染色은 陰性이고 鞭毛는 1極端에 6~8本을 가지는 極毛性 桿狀細菌의 특징이 있다(Fig. 6).

2) 培養學的 性質

供試한 菌株의 培養學的 特性을 조사하여 그 결과를 表示하면 Table 2와 같다.

Table 2에 의하면 培地上에 나타나는 集落의 性狀은 圓形, 全緣狀, 丘狀내지는 中

Table 2. Cultural characters of the strain isolated.

	Form	Elevation	Margin	Surface type	Color of colony	Growth	Other characters
Nutrient agar							
Plate	Circular	Convex	Entire	Wet-shining	Greenish gray	Good	
Slant	Filiform	Raised		Wet-shining	Greenish gray	Good	Semi-transparence
Beef extract broth							
				Granule	Thin yellow green		
<i>Pseudomonas</i>							
selective Medium	Circular	Convex	Entire	Wet-shining	Purplish characters red	Scanty	
King <i>et al.</i> Medium							
Medium A(production of penazine)				Negative			
Medium B(production of fluorescence)				Positive			
Sands & Rovira Medium							
(production of fluorescence)				Positive			
Wahba & Darell Medium							
(production of pyocyanin)				Negative			

Table 3. Physiological and biochemical characters of the strain isolated.

Test	Reaction
Relation to oxygen	Aerobic
Protease	+
Catalase	+
Oxidase	+
Arginine dihydrolase	+
Lecithinase	+
Pectinase	
pH 4.9-5.1	
Without supplements	--
0.5% Glucose	--
0.5% Succinate	--
0.5% $\beta$ -alanine	--
pH 6.9-7.1	
Without supplements	--
0.5% Glucose	+
0.5% Succinate	--
0.5% $\beta$ -alanine	--
pH 8.3-8.5	
Without supplements	+
0.5% Glucose	--
0.5% Succinate	--
0.5% $\beta$ -alanine	--
Extracellular esterase capable of depolymerizing poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid	--
Growth in KCN medium	+
Indole production	--
Toleration of salt	
1, 2, 3%	+
5, 10%	--
pH	
Minimum	4
Optimum	6.5-7.0
Maximum	9.5
Temperature	
Minimum	3
Optimum	28-30
Maximum	33
Aesculin hydrolysis	--
Starch hydrolysis	--
Poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid hydrolysis	--
Nitrate reduction	+
Production of levan	+
Potato soft rot	+
Hypersensitivity	--
Production of acetic acid from ethanol	--
Carotenoids pigment	--
Milk (coagulation of casein)	--
Litmus milk (alkaline)	-- (weakly acid)
Oxidation & fermentation of carbohydrate	
Glucose	O/F
Galactose, Mannit, Fructose, Trehalose,	O
Arabinose, Sucrose, Xylose	O
Rhamnose, Sorbitol, Lactose	None
Dulcitol, Adonitol, Salicin, Starch	W.O.

+ : positive reation.

none: no reaction.

- : negative reation.

w.O.: weakly oxidation.

O: oxidation.

F: fermentation.

高型이고, 集落表面의 형상은 濕潤狀을 나타냈다. 또한 beef extract broth 培養에서는 培養液 上面에 黃綠色帶의 水溶性色素를 生하고 *Pseudomonas* spp. 選別培地에서는 독특한 紫色~紅色에 가까운 色の 集落을 生하고 King 등의 KA培地에서는 penazine의 色素生産이 관찰되지 않았으나 KB培地

및 螢光性 *Pseudomonas* sp. 選別培地에서는 光色素生産이 陽性으로 나타났으며 Wahba와 Darrell의 培地에서는 pyocyanin의 生産은 관찰되지 않았다.

### 3) 生理 및 生化學的 諸性質

供試菌株에 대한 各種의 生理 및 生化學的 性質의 結果를 表로 나타내면 Table 3과

Table 4. Results of nutritional test on the strain isolated.

Carbohydrates and sugar derivatives		Polyalcohols and glycols	
Xylose	±	Mannitol	-
Arabinose	±	Sorbitol	+
Rhamnose	±	Inositol	+
Glucose	+	Adonitol	-
Mannose	+	Alcohols	
Galactose	+	Methanol	+
Fructose	±	Ethanol	+
Sucrose	+	Propanol	+
Trehalose	+	Butanol	+
Maltose	-	Amino acids	
Lactose	±	Glycine	+
Starch	±	α-alanine	+
Inulin	-	β-alanine	+
Salicin	+	Serine	+
Fatty, Dicarboxylic and Hydroxy acids	+	Leucine	+
Sodium acetate	±	Valine	+
Sodium oxalate	+	p-aminobenzoic acid	-
Sodium succinate	+	Arginine	+
Sodium potassium tartrate	+	Histidine	+
Propionic acid	+	Tyrosine	+
Malonic acid	+	Tryptophan	+
Maleic acid	-	Threonine	±
Glutaric acid	+	Amine	
Adipic acid	+	Ethanolamine	+
Pimelic acid	-	Miscellaneous nitrogenous compounds	
Caproic acid	+	Ca-pantothenate	-
Miscellaneous organic acid		Creatine	+
Sodium citrate	+	Cystine	+
Inorganic nitrogenous compounds		Nicotinate	-
KNO <sub>3</sub>	+		
NaNO <sub>3</sub>	+		
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	+		
KNO <sub>2</sub>	±		

+ : Substrates utilized by the strain.

- : Substrates are not utilized by the strain.

± : Substrates utilized weakly by the strain.

같다.

Table 3에 의하면 供試菌株는 好氣性菌이며 酵素生産에 관한 性質중에서 protease, catalase, oxidase, arginine dihydrolase, lecithinase 등은 陽性으로 判定되며 pectinase는 pH 6.9~7.1에서 0.5%의 glucose을 加하였을 때와 pH 8.3~8.5에서 無添加한 조건하에서는 酵素의 生産성이 陽性으로 判定되었으나 기타의 조건에서는 陰性으로 判定되었다. 또한 poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid의 extracellular esterase 生産성은 陰性으로 判定되었다.

加水分解能實驗에서 aesculin, starch 및 poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid 등의 加水分解 현상은 陰性으로 判定되었다.

또한 窒酸鹽의 還元力은 뚜렷하게 陽性을 띠는 것으로 관찰되지 않으나 榮養學的 實驗區에서 窒酸鹽을 加한 조건하에서 利用성이 陽性으로 判定되었으므로 窒酸환원력은 陽性으로 判定된다(Table 4).

Levan生産과 potato soft rot 反應현상은 陽性으로 判定되었고 hypersensitivity 반응은 陰性이었다.

溫度는 最低가 3°C, 最適 28~30°C, 最高는 33°C이었다. Ethanol로 부터 acetic acid의 生産, carotenoids 色素生産 등은 陰性으로 判定되었다.

牛乳 및 Litmus 牛乳培地에서의 生育현상은 응고현상이 관찰되지 않았고 Litmus 牛乳培地에서는 거의 변화가 없었으나 培養이 오래 진행되면 약간 酸性化하는 특성이 있다.

KCN添加培地에서는 生育이 陽性으로 判定되었으며 indole의 生成은 관찰되지 않았다. 耐鹽性 조사에서 1~3%의 鹽을 加한培地에서는 生育현상이 관찰되나 5% 이상의 농도에서는 生育현상이 관찰되지 않았다.

pH는 最低가 4, 最適이 6.5~7.0이었고 最高는 9.5이었다.

각종 糖類의 酸化 및 醱酵에 관한 特性에 있어서 glucose는 酸化作用 및 醱酵作用을 나타내고 rhamnose, sorbitol, lactose 등

은 酸化 및 醱酵作用에 利用되지 않고 其他는 酸化作用을 왕성하게 하거나 혹은 弱하게 산화작용을 나타내는 경향이 있다(Table 3).

#### 4) 榮養學的 性質

榮養學的 性質의 結果와 利用性を 表示하면 Table 4와 같다.

Table 4에 의하면 일반적으로 炭水化合物中 單糖類와 複糖類의 利用성이 현저하고 窒素化合物中 amino-acid 계통과 窒酸鹽類의 利用성이 현저하였다.

대체로 供試菌株는 많은 종류에 基質을 榮養物로 利用하는 특성이 있다(Table 4).

#### 考 察

最近에 있어서 植物病原性 細菌을 分離하여 分類하고 同定하는 방법으로는 寄主植物體에 나타나는 病徵狀의 특징을 조사하고 分離菌株를 寄主植物體에 再接種하였을 때 나타나는 病原性의 特徵, 細菌體의 形態의, 生理 및 生化學的 諸性質과 榮養學的인면에서 관찰하고 實驗하여 同定하고 있다.

本 實驗에 供試한 分離菌株의 形態의 특징은 크기가 0.7~0.9×1.9~2.7 $\mu$ 이며 菌體의 幅이 1 $\mu$  이내이고 모양은 桿狀形이다. 또한 鞭毛는 1極端에 6~8本程度의 鞭毛를 가지는 極毛性 桿狀細菌이고 染色은 보통 染色에 용이하게 染色이 되며 Gram染色은 陰性이고 胞子와 包囊의 형성은 관찰되지 않았다(Table 1).

培養學的 性質로서 培地中에 螢光 및 黃綠色素를 生하는 특징이 있으며 *Pseudomonas* spp. 選別培地에서는 紅紫色의 독특한 색소를 生하는 특징이 있다(Table 2).

生理的 특징으로 公시균주는 5%이상의 鹽을 加한 培地中에서는 生育이 안되며 pH는 中性에 가까울때 生育이 현저하고, 또한 好氣性菌으로 糖類를 주로 酸化하는 특성이 있고 때에 따라서는 醱酵作用을 하는 특성이 있으며 ethanol에서는 acetic acid의 생산이 관찰되지 않았다(Table 3).

Bergey's Manual of Determinative Bac-



teriology(1957, 1974)에 따라 공시균주의 위와 같은 形態學的, 培養學的 및 生理生化學的 특징을 基礎하여 分類하면 order *Pseudomonadales*中 sub-order의 *Pseudomonadineae*에 속하며 family는 *Pseudomonadaceae*에, genus는 *Pseudomonas*屬에 속하는 一種의 세균임을 알 수가 있다.

또한 供試菌株는 單一種의 各種 炭素源을 첨가한 mineral 培地에서도 生育에 용이하며 poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid을 細胞內에 蓄積하는 특징과 이 物質을 加水分解하는 성질이 없으며 arginine dihydrolase가 陽性인 성질이 있다.

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology(1974)에 의하면 이와같은 특징을 가진 *Pseudomonas*을 分類하여 *Pseudomonas*의 section 1에 속하는 1a의 菌種이라고 하였으므로 供試菌株는 section 1에 속하는 1a에 속하는 *Pseudomonas*이었다.

供試菌株는 鞭毛의 數가 1個 以上이고 螢光色素를 가지며 pyocyanin과 carotenoids 色素形成은 陰性이고 41°C의 溫度에서는 生育이 안된다. 또한 sucrose로 부터 levan을 生産하고, arginine dihydrolase 및 oxidase의 反應이 陽性이며, gelatin 液化는 陽性이나 澱粉 및 poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid의 加水分解 현상은 陰性を 나타냈다.

Hypersensitivity 反應, aesculin의 加水分解 등은 陰性이고 pectinase 生産은 pH 6.9~7.1의 glucose 0.5% 添加區와 pH 8.3~8.5의 無添加培地 상태에서 陽性を 나타내나 기타의 조건하에서는 pectinase의 생산성이 陰性으로 나타났다(Table 3).

榮養學的으로 供試菌株는 糖類中 trehalose, glucose, inositol의 利用성이 현저하고 아미노산중  $\beta$ -alanine, serine, arginine, tyrosine, valine 및 leucine 등의 利用성이 현저한 특징을 가졌다(Table 4).

Sands 등(1970)은 植物病原性 *Pseudomonads*의 分類에서 螢光을 發하고 protease, lecithinase, oxidase 反應이 陽性이고 榮養實驗에서 특히 trehalose, glucose, inositol

과 valine,  $\beta$ -alanine, 및 arginine 등의 利用성이 현저한 특징이 있는 균을 分類해서 group II로 分類시키고 여기에는 9株의 菌株가 예측되며 이中 6株는 病原性を 나타내는 螢光性 *Pseudomonads*라고 하였으며, 또한 溫度, pyocyanin 生成 및 榮養利用性を 실험하여 細分하였는데 供試菌株는 이들의 分類 방법에 따르면 *P. fluorescens*에 속하는 균이라고 생각된다.

Misaghi와 Grogan(1969)은 levan 生産, potato soft rot, arginine dihydrolase, protease 등의 反應성이 陽性이며 hypersensitivity 反應과 病原性 등은 陰性を 나타내며 trehalose, succinate, malonic acid,  $\beta$ -alanine, leucine, serine, valine, histidine, tyrosine과 ethanolamine을 잘 이용하는 菌株를 分類해서 *P. marginalis*,와 *P. fluorescens*에 특성이 된다고 하였다.

Misaghi와 Grogan(1969)의 分類方法에 의하면 供試菌株는 *P. marginalis*와 *P. fluorescens*와 유사한 菌株이었다. 또한 Lelliott 등(1966)과 Hildebrand와 Schroth(1972)의 分類기준에 따르면 *P. marginalis*와 *P. fluorescens*와 유사하였다.

또한 Stanier 등(1966)은 최근 group의 특징을 정하는 중요한 指標로서 螢光의 發生與否, poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid의 細胞內蓄積與否 및 이 物質의 exogenous substrate로서의 利用성 등이 음성이고 glucose,  $\alpha$ -keto-gluconate, pelargonate, benzoate,  $\beta$ -alanine, arginine, betaine 등 榮養基質이 陽性으로 利用되고 cellobiose, starch, norleucine 등 基質이용성이 陰性으로 나타나는 *Pseudomonas*을 fluorescent group에 속하는 *Pseudomonas*속 균의 특징이 된다고 하여 *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* 및 *P. putida*가 예측된다고 하고 炭水化合物과 窒素化合物의 利用성 관계를 실험하여 이 fluorescent *Pseudomonas*을 細分하였는데 供試菌株는 Stanier 등(1966)의 分類기준에 따라 比較하면 *P. fluorescens*와 같고 이중 여러개의 biotype이 있는데 특히 biotype B와

유사한 菌이었다.

供試菌株는 여러 학자들(Sands 등, 1970; Misaghi와 Grogan, 1969; Lelliott 등, 1966; Hildebrand와 Schroth, 1972; Stanier 등, 1966)의 分類基準에 따라 分類하면 *P. marginalis*와 *P. fluorescens*와 같은 군주이나 새로운 Bergey's Manual(1974)에 보면 *P. marginalis*는 *P. fluorescens* 內에 예속되는 biotype의 一種으로 記載되었으므로 供試菌株는 새로운 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology(1974)에 따라 分類同定하면 *Pseudomonas fluorescens* biotype II에 속하는 植物病原性 細菌이라고 생각된다.

현재 人蔘根腐病을 일으키는 細菌으로서 *Pseudomonas*屬에 속하며 病徵狀의 特徵, 再接種, 形態的, 生理 및 生化學的인 면에서 供試菌株와 가까운 細菌은 *P. panacis*가 報告(中田과 龍元, 1922)되었으나 이 細菌은 Bergey's Manual(1974)에 보면 *P. syringae*

의 synonyms로 記載되어 있어 서는 다른 세균이다.

또한 *P. fluorescens* biotype II에는 植物病原細菌으로 *P. marginalis*와 *P. tolaasii*가 報告되었으나 *P. marginalis*는 形態적으로 1—3本の 鞭毛를 가지며 牛乳培地中에서 casein을 凝固시키고 澱粉을 加水分解하며 最適溫度가 26°C이고 寄主植物이 상치라는 점 등에서 供試菌株와 다르고, *P. tolaasii*는 1—5本の 鞭毛를 가지고 indole을 生産하고 澱粉을 加水分解하며 最適溫度가 25°C이며 寄主植物이 양송이라는 점등이 서로 다르다.

이와 같은 여러가지 점으로 보아 筆者가 分離하여 實驗에 供試한 菌株는 *Pseudomonas fluorescens* biotype II에 속하는 菌株로서 寄主植物體로서 人蔘에 새로운 形態의 細菌性根腐病을 일으키는 人蔘根腐病細菌이라는 것을 새로이 同定하여 報告하는 바이다.

## 摘 要

人蔘根腐病을 일으키는 病原體를 究明하기 위하여 罹病된 人蔘根으로 부터 細菌을 分離하여 純粹培養하고 再接種實驗을 통하여 病原體임을 확인하였으며 菌株의 形態學的, 生理生化學的, 營養學的 諸性質을 조사하여 同定하고 그 特性을 究明하였다.

1. 人蔘根腐病을 일으키는 細菌性病原體는 *Pseudomonas fluorescens*이었다.
2. 供試한 菌株는 *P. marginalis* 및 *P. tolaasii*와는 서로 다른 特性이 있으며 *P. fluorescens* biotype II에 속하는 菌株이었다.
3. *P. marginalis*와 *P. tolaasii*는 *P. fluorescens* biotype II에 속하는 植物病原細菌이나 供試菌株와는 다음과 같은 차이점이 있다. *P. marginalis*은 形態적으로 1~3本の 鞭毛를 가지며, casein 凝固 및 澱粉加水分解 현상이 나타나고 最適溫度가 26°C이며 寄主植物이 양치(*Cucumis sativus* L.)라는 점등에서 차이가 있다. *P. tolaasii*는 1~5本の 鞭毛를 가지며 indole을 生하고 澱粉을 加水分解하는 特徵이 있으며 最適溫度가 25°C이며 寄主植物이 양송이(*Agricus bisporus* [Lange] sing.)라는 점등이다.
4. 供試한 菌株는 人蔘이외에 다른 植物體에 接種한 결과 강낭콩(*Phaseolus Vulgaris* L.), 콩(*Glycine max*[L.] Merr.), 오이(*Cucumis sativus* L.), 상치(*Lactuca sativa* L.), 동부(*Vigna sinensis* [Torner] Savi)등, 病原性を 나타내지 않았다.

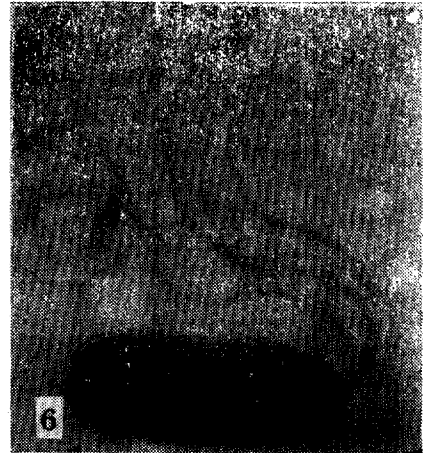
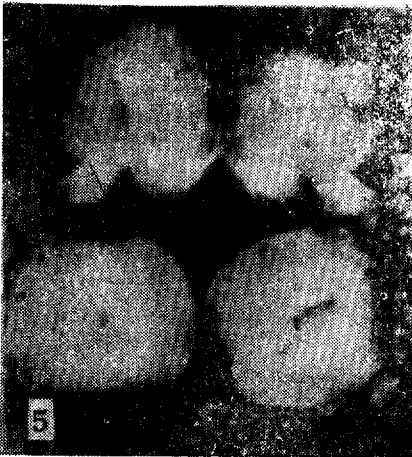
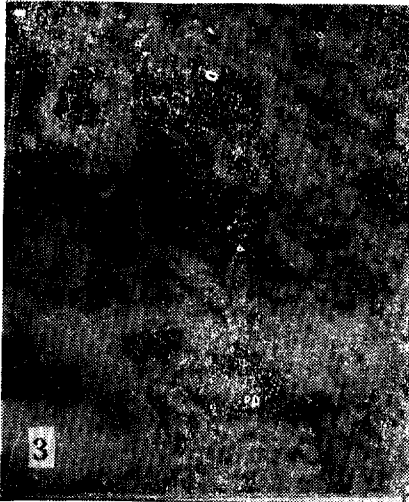
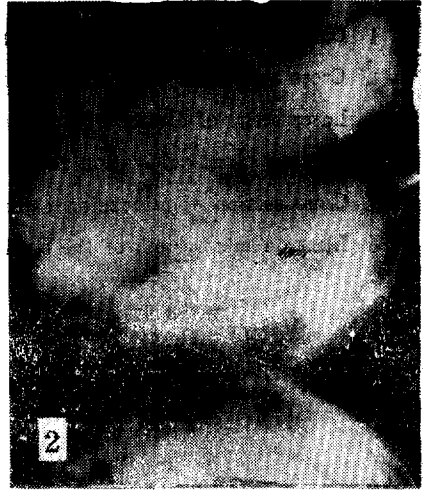
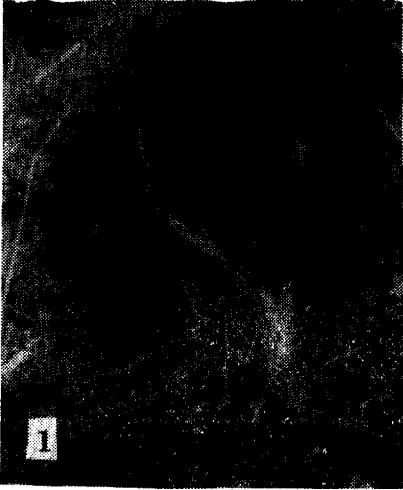
## 謝 辭

이 論文을 完成하는 데 있어 간곡한 指導와 校正에 勞苦를 아끼지 않은 金倬熙博士, 李培威博士, 李永祿博士님들께 眞心으로 感謝를 드리고 또한 實驗을 수행하는 데 協助해 준 Dr. Palleroni께 감사사를 드립니다.

## 引用文獻

1. Billing, E., and E.R.L. Luckhurst, 1957. A simplified method for preparation of egg yolk media. *J. Appl. Bact.* **20**, 90.
2. Brann, J. W., 1916. Steaming of soil for control of root rot of ginseng. *Phytopathology* **6**, 101 (abs.).
3. Buchanan, R.E., and N.E. Gibbons, 1957. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (7th ed.). The Williams and Wilkins Co., Baltimore, U.S.A.
4. Buchanan, R.E., and N.E. Gibbons, 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (8th ed.). The Williams and Wilkins Co. Baltimore, U.S.A. 30. 1960.
5. Hildebrand, D.C., 1971. Pectate and Pecting gels for differentiation of *Pseudomonas* sp. and other bacterial plant pathogens. *Phytopathology* **61**, 1430—1436.
6. Hildebrand, D.C., and M.N. Schroth, 1972. Identification of fluorescens *Pseudomonas*. *Third Int. Conf. Plant path. bacteria Proc. Wageningen*. p.281—287.
7. Hugh, R., and E. Leifson, 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrate by various gram negative bacteria. *J. Bacteriol.* **66**, 24—26.
8. Kim, J.H., 1966. *Fusarium* sp. causing root rot of Korean ginseng. The eleventh Pacific Sci. Cong. Tokyo. *Plant Protection*. 5: 23(abs.).
9. Kim, J.H., and M.W. Lee. 1974. Study on the root rot of ginseng(I), Isolation and Identification of *Fusarium* sp. *Kor. Jour. Microbiol.* **12**, 94—98.
10. Kim, J.W., 1971. Studies on the plant pathogenic *Corynebacterium*. 1. Morphological cultural and physiological specific characteristics of the plant pathogenic *Corynebacterium*. Tokyo Univ. Agri. M.S. Thesis. p.1—133.
11. King, E.O., M.K. Ward, and D.E. Raney, 1954. Two simple media for the demonstration of Pyocyanin and fluorescin. *J. Lab. Clin. Med.* **44**, 361—367.
12. Klement, Z.C., L. Farkas, and Lourekovich, 1964. Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in tobacco leaf. *Phytopathology* **54**, 474—477.
13. Klinge, K., 1960. Differential techniques and methods of isolation of *Pseudomonas*. *J. appl. Bact.* **23**, 442—462.
14. Lee, J.W., and H.S. Chung, 1974. Production and inhibition of cellulolytic and pectolytic enzymes by *Cylindrocarpum destructans* (Zins.) Scholten. causing root rot of ginseng. *Kor. J. Pl. Prot.* **13**, 19—23.
15. Lee, S.C., K.W. Lee, and H.W. Chung, 1965. Studies on the soil borne disease of ginseng, in research report for 1965. *Inst. Plant Env. O.R.D.* Suwon, Korea. p.487—500.
16. Lelliott, R.A., E. Billing, and A.C. Hayward, 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonads*. *J. appl. Bact.* **29**, 470—489.
17. Masurovsky, E.B., S.A. Goldblith, and J. Voss, 1963. Differential medium for selection and enumeration of members of the genus *Pseudomonas*. *J. Bacteriol.* **85**, 722—723.
18. Matuo, T., and Y. Miyazawa, 1969. *Cylindrocarpum penacis*. nov. causing root rot of ginseng. *Trans. Mycol. Soc. Japan.* **9**, 109—122.
19. Matuo, T. and W.C. Snyder, 1972. Host virulence and *Hypomyces* stages of *Fusarium solani* f. sp. *pisii*. *Phytopathology* **62**, 731—735.
20. Misaghi, I., and R.G. Grogan, 1969. Nutritional and biochemical comparisons of plant pathogenic and saprophytic fluorescent *Pseudomonads*. *Phytopathology* **59**, 1436—1450.
21. Sands, D.C., and A.D. Rovira, 1970. Isolation of fluorescent *Pseudomonas* with a selective medium. *J. Appl. Microbiol.* **20**, 513—514.

22. Sands, D.C., and M.N. Schroth, and D.C. Hildebrand, 1970. Taxonomic of phytopathogenic *Pseudomonads*. *J. Bacteriol.* **101**, 9—23.
23. Skermann, V.B.D., 1969. Abstracts of Microbiological methods. John Wiley and Sons. inc. U.S.A.
24. Sneath, P.H.A., 1956. Cultural and biochemical characteristics of the genus *Chromobacterium*. *J. Gen. Microbiol.* **15**, 70—98.
25. Stanier, R.Y., N.J. Palleroni, and M. Doudoroff, 1966. The aerobic *Pseudomonads*, A taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* **43**, 159—271.
26. Thornley, M.J., 1960. The differentiation of *Pseudomonas* from other gram negative bacteria on the basis of arginine metabolism. *J. appl. Bact.* **23**, 37—52.
27. Zehr. E.I., 1970. Cultural, Physiological and biochemical properties of isolates of Philippine *Pseudomonas solanacearum*. *Philippine Phytopathology* **6**, 29—43.
28. Zinssmeister, C.L., 1918. *Ramularia* root rot of ginseng. *Phytopathology* **8**, 557—571.
29. 明日山秀文, 向秀夫, 鈴木直治, 1962. 植物病理學實驗法, 日本植物防疫協會, 日本.
30. 谷川英一, 坂井稔, 1960. 水産微生物學, 恒星社, 厚生閣版, 日本.
31. 松尾卓見, 宮澤洋一, 1967. ヤクヨウニンソッフサリウム病の病原菌 *Fusarium solani* f. sp. *panacis* n.f. *F. solani* f. sp. *pisi* について. 日植病報 **33**, 346.
32. 宮澤洋一, 小林孝平, 1967. 薬用ニンジン根腐病防除に関する研究, 農業および園芸 **42**, 89—90.
33. 宮澤洋一, 1970. ヤクヨウニシンの根腐病を基因する *Cylindrocarpum panacis* の死滅温度と本病防除への適用, 農業および園芸 **45**, 1279—1280.
34. 中田賞五郎, 瀧元清透, 1922. 人蔘の病害に関する研究, 鞠模報 **5**, 1—81.
35. 太田達男, 1956. 微生物學實驗書. 廣川書店, 日本.
36. 上田樂次郎, 1909. 本邦及韓國に於ける人蔘赤腐病の研究成績, 農試報 **35**, 61—104.
37. 金倬熙, 李敏雄, 李榮俊, 1969. 人蔘赤腐病菌의 樂養生理學的 研究, 東國大, 農林科學 論文集 **3**, 143—156.
38. 李敏雄, 1972. 人蔘圃土壤中에서 赤腐病菌의 生態學的研究, 東國大, 研究論集 **2**, 105—110.
39. 李成煥, 鄭厚燮, 崔承允, 羅瑤俊, 1968. 人蔘苗圃의 病虫害研究, 文教部 研究報告, 農學系, (1), 1—35.
40. 鄭厚燮, 1969. 主要人蔘病의 生態 및 防除法에 관한 研究, 文教部 研究報告, 農學系 1—25.



**Explanation of plate**

- Fig. 1** Diseased plant from which the strain (strain No.12) of bacteria was isolated.
- Fig. 2** Cross section of diseased plant root.
- Fig. 3** Later stage of diseased plant root.
- Fig. 4** Ginseng plant cultivation reinoculated with the strain isolated.
- Fig. 5** Cross section of reinoculated ginseng plant root with the strain isolated.
- Fig. 6** Electron micrograph of the strain isolated (X15,000).