한국식물병리학회지 12(2) : 255-265(1996)
Korean J. Plant Pathol. 12(2) : 255-265(1996)

총 설

*Gliocladium virens*를 이용한 식물병의 생물적 방제 및 유기합성농약의 분해

박용하* · 이용세[1]
한국환경기술개발원, [1]대구대학교 자연자원대학

Biological Control of Plant Diseases and Biodegradation of Pesticides by *Gliocladium virens*

Yong-Ha Park* and Yong-Se Lee[1]
Korea Environmental Technology and Research Institute, Seoul 135-090, Korea
[1]College of Natural Resources, Taegu University, Kyongbuk 713-714, Korea

Abstract : *Gliocladium virens* is an ubiquitous saprophytic soilborne fungus known for its biocontrol activity. Due to its unique activity, the fungus has been intensively studied as a potential biocontrol agent during the past few decades. Despite a few commercial applications, application of the fungus has shown as a powerful means for increasing yield by suppressing or destroying pathogen inoculum, protecting plants against infection, or increasing the ability to resist pathogens. *G. virens* biocontrol activity reducing the incidence of diseases caused by soilborne pathogens is believed to its antagonistic effect; antibiosis, mycoparasitism, survival and proliferation in rhizosphere, and root colonization. Amongst, antibiosis has been proven a significant mode of action due to the fungal production of gliotoxin, gliovirin, and/or viridin relating to the incidence of diseases caused by *Rhizoctonia solani* and/or *Pythium* spp. Also, survival and proliferation in rhizosphere and root colonization of *G. virens* have been shown a significant correlation with incidence of diseases. However, mycoparasitic activity of *G. virens* on mycelia of soilborne pathogens, such as a *R. solani*, has not been proved as its potential biocontrol activity. For increasing the biocontrol efficacy of *G. virens*, two independent strategies were employed. First, to achieve a higher antagonistic activity, selection and development of *G. virens* strains have been approached. Numbers of massive screening process of *G. virens* strains were carried out from various fields for the last decades. Also, introducing a gene of antagonistic activity into a chromosome of *G. virens* and its genetic expression have been studied since late 1980's. Second, for maximizing the fungal antagonistic activity and providing a convenience for farmers to use, numbers of delivery systems of *G. virens* have been developed. One of the developed systems, 'Glioguard' has been on the market of the United States these days. The research being continually developed would be a key step to commercialize the *G. virens* into a market. Biodegradation of the pesticides, aldicarb, metalaxyl, and atrazine is another activity of *G. virens*. Moreover, biodegradation of parathion was succeeded with a transgenic strain of *G. virens* inserted with organophosphate degrading (*opd*) gene originated from *Flavobacterium* sp. The research provides an increasing possibility to degrade a specific pesticide with higher efficacy by using the fungus. However, biodegradation of pesticides by *G. virens* is evaluated as an initial step with continuing need to demonstrate the applicability in a field.

***Key words* : *Gliocladium virens*, biological control, biodegradation, pesticides.**

현대 농업의 특성으로 소비자의 기호와 고품질화 요구에 따른 농민의 단일작목 및 단일 품종의 대량 재배, 무기질 비료의 사용, 경작지 및 경작 방법의 효율화에 의한 주년재배, 병해충 및 잡초방제를 위한 다량

*Corresponding author.

의 농약사용 등을 들 수 있다. 이러한 결과 농업산물의 수량증대 및 고품질화는 이루었으나, 이는 곧 자연생태계의 균형파괴를 초래하였다. 즉, 현대 농업의 발전은 극상의 복합 생태계(complex ecological system)를 단순 생태계(simple ecological system)로 바꾸었다. 이러한 단순 생태계에서 식물병의 대량발생(plant disease epidemic)은 예측되어져 왔으며, 실제 현대농업에 의존하는 우리나라를 포함한 세계각국에서 야기되었다(25). 그 중에서도 특히 진균에 의한 작물병의 만연은 작물이 각종 병, 해충 및 잡초에 의해 입는 전체 피해의 약 3/4을 초래할 정도로 매우 심각하다(26). 현재까지 이들 각종 병의 효과적인 방제는 주로 농약사용에 의존하여 왔으며, 이러한 농약 사용은 저가의 고품질 농산물의 생산을 가능케 하였다. 그러나 최근에는 환경친화형농업이 강조되면서 농약사용에 따른 생태계의 파괴 및 잔류독성문제 등 부정적인 면을 해결하기 위한 새로운 방제방법이 요구되고 있다.

식물병원균에 대한 길항미생물을 이용하는 생물적 방제(biological control or biocontrol of plant diseases; 이하 "생물적 방제"로 함)는 자연 생태계내에서 서로 다른 생물종간에 일어날 수 있는 경쟁, 기생, 포식관계 또는 항생작용 등의 개체간 또는 개체집단간의 상호작용을 이용하는 것으로서(15), 화학농약의 사용을 억제하고 자연생태계의 균형을 유지시키면서 식물병의 발생을 최소화시키는 데 그 목적이 있다. 이러한 생물적방제는 농약사용에 따른 문제점을 줄일 수 있는 등 장점이 있지만, 생태계의 균형을 토대로 병발생 억제를 시도하기 때문에 짧은 시간내에 목표를 달성할 수 없는 단점이 있다. 그러나 토양병해는 병의 발생 후에 전신적 병해를 초래하므로 효율적인 약제 방제가 불가능한 경우가 대부분이며, 예방위주의 약제방제도 사용약량에 따른 경제성 문제와 토양내 잔류독성 등의 환경오염문제를 초래하기 때문에 길항미생물을 이용하는 토양병원균에 대한 생물적방제에 관한 연구가 전 세계적으로 많은 연구자에 의해 수행되고 있다. 주로 경제성이 높은 작물의 연작이 행해지고 있는 우리나라에서도 토양병해가 연작장해의 80%에 달할 정도로 심각하기 때문에 이에 대한 생물적방제에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.

Rhizoctonia spp., *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Sclerotium* spp. 및 *Fusarium* spp. 등 주요 토양병원균에 의해 발생하는 토양병해에 대한 생물적 방제의 연구대상 활용미생물로서 *Gliocladium* spp., *Pseudomonas fluorescens* (Trevisan) Migula, *Enterobacter cloacae* (Jordan) Hormaeche & Edwards, *Bacillus* spp., *Erwinia herbicola* (Lohnis) Dye 및 *Trichoderma* spp. 등의 많은 미생물이 연구된 바 있다(1, 5, 44, 53).

토양미생물에 의한 유기합성농약의 생물적인 분해(pesticides biodegradation)는 특히 토양잔류농약에 의한 환경오염을 줄일 수 있는 가능성을 제시하는 것으로서 1948년 Brown과 Mitchell(11)에 의해 처음으로 보고되었다. 이후 monocrotophos(45, 46), carbofuran (12), metalaxyl 및 atrazine(4)이 *Pseudomonas* spp. 등의 토양미생물에 의해 분해됨이 보고되었다.

Gliocladium virens J. H. Miller, J. E. Giddens & A. A. Foster는 여러 종류의 토양에 걸쳐서 광범위하게 분포되어 있으며, 항생물질의 분비와 중복기생 등의 역할로 특히 토양병원진균에 의한 주요 작물의 잘록병에 대한 생물적 방제 활용균(biocontrol agent) 또는 길항균으로 1970년대 이후 미국 및 유럽에서 활발히 연구되어 왔다. 특히 일반적인 길항미생물과는 달리 항생물질의 분비에 의한 길항효과가 산성에서 왕성하며 (17, 54, 59, 67), 토양에서 독성이 강하고 비교적 잔류성이 긴 몇 가지 유기합성농약의 분해능력이 있는 것으로 1990년대에 보고되었다. 따라서 본 연구에서는 이 균의 생물적 특성과 현재까지의 연구결과를 분석하여 앞으로 국내에서의 활용가능성에 관해 기술하였다.

본 론

길항균으로서 *Gliocladium virens*의 연구배경.

Rhizoctonia solani Kühn 및 다른 토양병원균의 생장에 *Trichoderma lignorum*(이후 *G. virens*으로 밝혀짐) (75)이 치명적인 항균물질을 생성한다는 1934년 Weindling(76)의 연구보고를 시발점으로, 1945년 *T. viride* (이후 *G. virens*으로 밝혀짐) (75)에서 gliotoxin의 생성을 연구한 Brian(8, 9, 10) 등 토양식물병의 생물적 방제에 대한 이 균의 이용 가능성이 꾸준히 제시되었다. 특히, 이 균은 *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Sclerotium rolfsii* Sacc. 및 *R. solani* 등, 토양병원진균에 의한 주요작물의 잘록병(damping-off)의 방제에 대해 많이 연구되었다(27, 41, 54, 55, 79, 84).

지속적인 이 균의 연구는 농민이 사용할 수 있는 제품으로 개발되었다. 상품명 'Glioguard(글리오가드)'는 *G. virens* 포자를 alginate 입자에 제형화한 것으로 미국 환경보호청(EPA)에 등록되어 있다. 이 제품은 미국 농무부 농업연구소 식물병의 생물적 방제 실험실(Beltsvilles, MD, USA)의 연구 성과이며, W. R. Grace Co.와의 합작으로 온실내의 채소를 비롯한 각종 작물의 잘록병 방제용으로 제품화되었다(44). 현재 이 균에 대한

연구가 활발히 진행되고 있는 것을 고려할 때, 향후 길항작용이 높은 *G. virens* 균주가 다양하게 상품화될 것으로 예측된다.

국내에서 *G. virens*를 이용한 생물적 방제에 관해서는 오이 덩굴쪼김병원균에 대한 길항효과가 있는 *G. virens*을 선발하여 오이 덩굴쪼김병의 생물적 방제 가능성 연구(14), *Fusarium oxysporum*에 의한 오이 시들음병과 *R. solani*에 의한 모잘록병 방제에 대한 연구(36)와 *G. virens*의 근권정착력 (34) 및 식물생육촉진효과에 관한 Jang 등(33)의 연구 등이 있으며 계속적인 연구가 수행되고 있다.

*G. virens*의 형태적 특성(*Trichoderma* spp.와의 비교). *G. virens*는 토양진균으로서 불완전균에 속하며, 유성생식 세대로는 담자균(Basidiomycetes)인 *Hypocrea sublutea* Doi(17) 이다. *G. virens*는 생태, 생리 및 형태 등이 *Trichoderma* spp.와 유사하여 Meyer와 Plaskowitz(47)는 이 균을 *Trichoderma* spp.에 속하는 *T. virens* (Miller *et al.*) von Arx로 분류하였고, Weindling(76, 77)은 *T. lignorum* (Tode) Harz 또는 *G. fimbriatum* Gilman et Abbott로, Brian(8)은 *T. viride* Persoon ex Fries 등의 이름으로 명명하는 등 분류학적인 혼란이 있었다(32, 5). *G. virens* 앞서 나열된 명칭을 일반적으로 포괄하고 대표하는 이름으로 본 연구에 이용하였다. 일반적으로 *Trichoderma* spp.와 *G. virens* 뚜렷한 생태적인 차이는 보고된 바 없으나, 형태적인 차이는 쉽게 구분될 수 있다. 특히 *Trichoderma* spp.의 포자는 건조한데 비해서 *G. virens* 포자는 수분을 많이 함유하고 있어 해부현미경(10 배율)을 이용하여 Petri dish의 배지 에서 직접 구분할 수 있다. 그러나 Petri dish의 배지 또는 외부의 수분이 *Trichoderma* spp.의 포자에 흡착되는 경우 두 미생물간의 구분이 용이하지 않으므로, 이때는 *G. virens*와 *Trichoderma* spp.의 분류체계(17)를 이용하여야 한다.

G. virens 생리 및 생화학적 특성(*Trichoderma* spp.와의 비교). *G. virens*와 *Trichoderma* spp.가 분비하는 배지상의 색소로는 개체간의 변이가 크므로 두 속의 구분이 가능하지 않으나, 분비하는 항생물질의 측정으로 그 구분을 부분적으로 명확히 할 수 있다(32). 즉, *Trichoderma* spp.는 항생물질인 gliotoxin을 분비하지 않으나 *G. virens*은 gliotoxin을 분비한다(75). 그러나 모든 *G. virens*가 gliotoxin을 분비하는 것은 아니며, gliotoxin을 분비하는 *G. virens*일지라도 배양기 및 배양조건에 따라 gliotoxin의 분비량이 달라지거나 전혀 분비하지 않을 수도 있다(32, 59). 이를 근거로 하여, Howell 등(32)은 gliovirin 및 heptelidic acid는 분비하나 gliotoxin 및 dimethylgliotoxin은 분비하지 않는 'P'group과, gliotoxin 및 dimethylgliotoxin을 분비하나 gliovirin 및 heptelidic acid(avocetin)는 분비하지 않는 'Q' group으로 *G. virens*을 분류하였다. 항생물질인 viridin과 식물독소물질(phytotoxin)인 viridiol의 분비는 두 group간 차이가 없음이 보고된 바 있으며, 두 groups의 유전자 변이를 관찰한 결과 group간 뚜렷한 차이가 있음이 밝혀졌다(57).

*Gliocladium virens*의 식물병 방제 작용기작. 토양병원균의 생물적 방제균으로 *G. virens*이 다양성 있게 실용화되기 위해서는 토양병원균의 생물적 방제에 직접 관여하는 이 균의 작용기작(mode of action)에 대한 이해가 우선되어야 할 것이다. 현재까지 보고된 *G. virens*의 작용기작으로 기생 또는 중복기생(mycoparasitism 또는 hyperparasitism) (7, 27, 54), 항생작용(antibiosis) (9, 10, 31, 37, 63, 76, 77, 78), 대상 식물의 근권토양에서 *G. virens*의 증식에 따른 근권토양의 선점 및 뿌리표면에서의 정착(root colonization) (34, 36, 54, 75) 등이다. 앞으로 기술되는 내용 중 기주의 세포를 분해하는 *G. virens* 효소분비는 기생 또는 항생작용으로 시각에 따라 분류될 수 있으나 본 연구에서는 항생작용에 포함시켰다.

기생은 진균 또는 세균 등의 미생물체에 다른 종류의 미생물이 기생하여 기주의 활성 및 생장(집단생장 및 개체생장)을 저해 또는 파괴하는 현상이다. *G. virens*는 *R. solani*에 의한 면화, 감자 및 흰콩의 유묘 잘록병의 발생을 감소시킨 바 있다(7, 30, 72). 실례로써 *R. solani*와 *G. virens*을 토양배지(soil medium)에 동시접종 하였을 때, *G. virens*이 *R. solani*의 세포 표면에 흡기(haustoria)를 부착하여 그 세포를 파괴시키는 것을 관찰할 수 있다(27, 72). 그러나, *G. virens*는 *P. ultimum*에는 기생하지 않으며 이 균이 *R. solani*에는 기생한다 하여도 이러한 성질에 의한 식물병의 뚜렷한 방제효과는 아직 보고된 바 없다(28, 63).

항생작용은 길항균이 독소물질 또는 대상 병원균의 세포를 분해할 수 있는 효소 및 이차대사산물을 분비하여 식물 병원균의 활성 및 생장(집단생장 및 개체생장)을 저해하는 현상이다. *G. virens*의 길항기작중에서 중요한 특성은 항생물질의 분비이다(20, 63, 82). *G. virens*이 분비하는 이차대사산물로 gliotoxin, gliovirin, gliocladic acid, heptelidic acid(avocetin), viridin, viridiol 및 valinotrocin 등이 보고된 바 있으며(70), 이들 물질 중 gliotoxin, gliovirin 및 viridin은 잘록병을 일으키는 *R. solani* 및 *Pythium* spp.의 생물적 방제에 중요한 역할을 하는 균독소로 보고되었다(30, 32, 84, 86).

Gliotoxin은 *G. virens*를 포함한 *Aspergillus fumigatus* 및 *Penicillium terlikowskii* 등에서 분비되는 독소로 epithioketopiperazine toxin에 속한다(6, 42). 생체내에서 phenylalanine과 serine의 합성으로부터 생성되고, 그 이후 중간대사산물을 포함한 생성과정은 밝혀지지 않았으나(69, 70), 인공적인 합성은 가능하다(22). Gliotoxin을 포함하는 epithioketopiperazines는 분자량이 작고(1000 이하), polysulfide bridge 구조를 갖는 비극성(nonpolar) 물질로서 항생효과는 piperazine 고리의 polysulfide bridge 구조로부터 발현된다(30, 69). 이 항생물질의 항균효과는 세균의 증식 억제, 진균의 포자발아 억제(9), 기주내의 바이러스 복제 억제(62) 등 광범위하며 기주에 치명적이다(LD_{50} < 25 mg/kg mouse/day)(69). 또한, 실험관내 인간의 혈청에서 gliotoxin은 백혈구의 식균성 및 면역조정활성력 등을 감소시킨다(49, 74). 세포에서 gliotoxin은 세포막의 thiol group에 영향을 끼쳐(38), mitochondria의 기능이 상실되고 단백질과 핵산의 합성 등 여러 가지 세포의 기능을 마비시킨다(19, 48). 배양기에서 gliotoxin은 20 μg/ml의 저농도에서도 *R. solani*와 *Pythium* spp.를 포함한 토양병원균의 생장을 억제시키는 등 항진균 효과가 매우 높다(60). 토양에 *G. virens*를 처리하였을 때, 토양 및 토양의 유기물에서 gliotoxin이 분비되며, 그 분비되는 시기 및 양에 따라 식물병의 방제 효과에 차이가 있으므로 생물적 방제에 gliotoxin이 직접 관여하는 것으로 추측되고 있다(44, 59, 85).

Gliovirin은 *Pythium* spp.에 의한 면화 유묘의 잘록병을, viridin은 *Pythium* spp.에 의한 white mustard의 잘록병을 줄일 수 있음이 보고된 것(29, 30) 이외에는, 이들 물질의 식물병 방제효과에 대해서는 연구자료가 부족하다. 따라서, *G. virens*의 생물적 방제효과를 높이기 위해서는 이들에 대한 집중적인 연구가 필요하다. 식물독소물질인 viridiol은 균독소인 viridin으로부터 만들어진다(37). Gliovirin, viridin 및 viridiol의 구조는 밝혀져 있으며(30, 37), gliovirin이 생체내에서 생성되는 과정은 Howell과 Stipanovic(USDA-ARS, College Station, TX, USA)에 의해 연구되고 있다.

대상 식물의 근권토양에서 길항균의 증식 및 근권경합(rhizosphere competition)을 연구하기 위해서는 식물병리학적인 측면에서 근권토양에 대한 이해가 선행되어야 한다. 식물의 뿌리가 생장하면서 다양한 종류의 활성 또는 비활성 화학물질의 체외분비 및 뿌리의 생장에 의한 뿌리 근접토양의 물리적 변형은 뿌리 주변 미생물의 생장변화를 야기시킨다. 근권토양이란 뿌리의 성장으로 인하여 뿌리 주변 토양미생물의 생장에 영향을 미치는 토양을 말한다(16, 65, 73). 토양병원균이 식물병을 야기시키기 위해서는 ①대상식물의 근권토양을 침입할 수 있어야 하며, ②뿌리로부터 분비된 유기물 또는 근권토양에 존재하는 유기물을 기주체 침입의 에너지지원으로 이용할 수 있어야 한다(16, 53, 65, 73). 근권토양에 길항균이 우선적으로 증식하여 기생력 및/또는 항생작용을 이용하여 근권에 병원체의 증식을 억제하거나 병원균의 활력을 감소시킴으로써 병원균으로부터 대상 식물을 보호할 수 있다. 면화의 유묘 생장시 근권토양 및 뿌리표면에 *G. virens*의 집단생장이 보고된 바 있으며(58), 성숙된 면화의 뿌리표면에서도 이 균의 생장이 관찰된 바 있다(Howell, personal communication).

*Gliocladium virens*의 길항력 증대에 대한 연구. 토양병원균의 생물적 방제효율(biocontrol efficacy)을 높일 수 있는 방법으로 ①*G. virens*의 길항효과를 높이는 직접적인 방법과, ②*G. virens*의 길항효과를 높일 수 있는 환경을 조성하는 간접적인 방법을 들 수 있다. 직접적인 방법으로는 ①대상 병원체에 대하여 가장 길항력이 높은 *G. virens* 균주의 선발, ②특정 길항효과를 발현하는 유전인자를 *G. virens* 균주에 도입하는 유전공학(genetic engineering) 기법이 있다.

G. virens 균주의 선발은 포장에서부터 시작된다. 토양중에 식물병원균이 있으나 작물의 발병력이 낮은 지역을 대상으로 이들 병원균에 길항력이 높은 *G. virens* 균주를 선발해야 한다. 이러한 *G. virens* 균주의 선발과정은 병원균의 존재여부, *G. virens* 균주의 존재여부, 병원균에 대한 작물의 감수성 정도, 환경조건에 따른 작물의 발병정도, 병원균에 대한 *G. virens* 균주의 길항력 등의 복합적인 조사를 통하여 이루어 질 수 있다. 이러한 과정은 장기간의 조사과정을 필요로 하는 기초작업이나 생물적 방제효율을 높일 수 있는 가장 직접적인 방법이다.

유전공학기법을 이용한 생물적 방제효율의 증대는 길항균, 대상 작물과 병원균간의 상호관계(plant-microbe interaction) 및 길항균의 작용기작이 정확히 확인된 후에 가능하다. 구체적인 방법으로, 환경에 무해하며 병원균에 가장 민감하게 영향을 끼치는 작용기작을 발현하는 유전자의 발견 및 분리, 선발된 길항균에 분리된 대상 유전자의 전이(DNA transformation), 유전자가 전이된 길항균(genetically engineered microorganism: GEM 또는 transgenic biocontrol agent)들 중에서 생물적 방제효과가 가장 우수한 균주를 선발해야 한다.

유전공학을 이용한 *G. virens*의 길항력 증진에 관한

연구는 *G. virens*의 protoplast를 생성시킨 후 항생물질인 hygromycin B를 분해하는 유전자 *hygB*(hygromycin B transferase)를 *G. virens* genomic DNA에 전이시키므로써 Thomas와 Kenerley(71)에 의해 시작되었다. Supak-Koslovsky와 Thomas(68)는 토양에서 잔류성이 비교적 긴 methyl parathion을 분해할 수 있는 *opd* 유전자 [organophosphate degrading gene: Mulbry와 Karan(50)에 의해 *Flavobacterium* sp.에서 분리해 내었음]를 *hygB*에 연결하여 *G. virens*에 전이시킨 후 그 유전자의 발현에 성공하였다. 즉, 유전공학을 이용하여 외부의 유전자를 *G. virens*의 genomic DNA에 전이 및 발현시킬 수 있는 방법을 통하여 *G. virens*의 생물적 방제효율을 높일 수 있는 기본적인 방법을 마련하였다. 앞으로는 길항미생물의 작용기작과 연관된 유전자를 찾아 분리하고 앞에서 기술한 방법 등을 이용하여 유용한 유전자가 전이된 *G. virens*의 생물적 방제의 증진 효과를 측정하는 것이다.

작용기작과 연관된 유전자를 찾는 방법으로는 두가지 방향에서 접근할 수 있다. 첫째, 작용기작과 연관된 유전자의 특정산물인 단백질을 확인하여 분리하고, 이 단백질을 markers로 이용하여 대상 미생물의 cDNA library 또는 genomic DNA library에서 해당 유전자를 찾는 방법이다(64). 실제로 Ridout 등(61)은 gliotoxin을 분비하는 균주와 gliotoxin을 분비하지 않는 *G. virens*의 균사에서 각각 추출한 용해성 단백질(soluble-polypeptide)을 비교하여, gliotoxin을 분비하지 않는 균주에는 존재하지 않으나 gliotoxin을 분비하는 균주에는 존재하는 단백질을 보고한 바 있다. 향후 연구과제로는, 이 특정단백질의 항체를 만든 후 marker로 western blot에 이용하거나, 또는 그 특정단백질의 일부 sequence를 이용하여 gliotoxin 분비를 조절하는 유전자를 *G. virens* 균주의 cDNA library 또는 genomic DNA library에서 찾는 방법이다. 둘째, 유전자 지도(genetic linkage map)에서 대상유전자를 찾는 방법이다(64). Gliotoxin의 생성 및 분비를 조절하는 유전자가 찾고자 하는 대상일 때, gliotoxin을 분비하는 *G. virens* 균주를 돌연변이 시킨 후 모균주와 돌연변이주의 restriction fragments length polymorphism (RFLP) 또는 random amplified polymorphic DNA (RAPD)(80, 81)를 이용하여 gliotoxin의 생성과 일치하는 gliotoxin 유전자 marker를 찾은 후, 유전연관분석을 이용하여 유전자 지도에서 그 marker간의 거리(genetic distance)를 추정하고 chromosome walking 등의 방법으로 gliotoxin 분비를 조절하는 유전자를 찾는 방법을 사용할 수 있다. 균주 선택시 참고사항으로, gliotoxin을 분비하거나 gliotoxin을 분비하지 않는 *G. virens*의 모균주간에는 유전적인 차이가 매우 크므로(57), gliotoxin을 분비하는 *G. virens*의 모균주와 그 유전자를 인위적으로 변이시킨 돌연변이주를 사용하므로써 본래의 유전적인 차이에서 발생하는 변이를 줄일 수 있다. 즉, 이러한 방법은 gliotoxin DNA marker를 찾을 수 있는 확률을 높일 수 있다. Park 등(56)은 gliotoxin을 분비하거나 또는 gliotoxin 유전자를 인위적으로 변이 시킨 두 *G. virens*균주의 random amplified DNA polymorphism을 관찰하므로써 유전적 거리(genetic distance)가 25 kb 내에 있는 2개의 RAPD marker를 분리하였다. 현재, 이 DNA markers 및 *G. virens*-cosmid DNA library를 이용하여 gliotoxin 유전자의 분리, 전이 및 발현에 관한 연구가 진행되고 있다.

유전공학 기법을 이용한 이 두가지 방법은 앞서 기술한 정확한 생물적 방제기작의 이해가 선행되어야 하며, 적합한 *G. virens* 균주의 사용이 필요하다. 미국 및 유럽 등에서는 1970년대 이후 이에 대한 연구자료가 축적되어 있으며 다양한 균주가 이미 선발되어 있으나, 초보단계인 국내의 경우는 우선적으로 식물병의 방제효과가 높은 균주의 선발이 필요하고, 선발된 균주의 정확한 작용기작이 규명되어야 한다. 국내 토양 및 환경조건에서 생태계의 일원으로 적응되어 있는 균주의 선발이 국내의 환경에서의 생물적 방제효용을 높일 수 있으며, 외국으로부터 새로운 균주가 도입되어 야기될 수 있는 여러가지 부작용을 방지할 수 있다. 또한, 국내에서 선발된 균주일지라도 자연 또는 작물포장에서의 대량 사용시 및 인위적으로 유전자가 변형된 *G. virens* 균주에 대해서는 환경 위해성의 검증이 반드시 선행되어야 한다.

변화하는 환경에서 식물병을 지속적으로 방제할 수 있는 구체적인 방법이 제시되어야 한다. 인간을 포함한 생물에게는 자연환경을 조절할 수 있는 능력이 없으며, 단지 변화하는 자연환경에 대처할 수 있을 뿐이다. 또한, 변화하는 환경에서 생물적 방제효과를 지속적으로 나타낼 수 있는 *G. virens*는 존재하지 않을런지 모른다. 그러나 생물적 방제효과를 지속시키거나 방제가 필요한 시간 및 장소에서 발현될 수 있도록 길항균의 미세환경(microsites)을 적절하게 조성하므로써 간접적으로 생물적 방제효과를 증대시킬 수 있다. Gliotoxin을 분비하는 *G. virens*의 균사생장 및 gliotoxin의 분비량은 토양 및 배지의 탄소원, 질소원 및 탄소/질소의 비율에 따라 달라진다(59, 67). 선발된 *G. virens* 균주의 특성발현 (예: 독소분비)에 필요한 영양원 및 물리적.화학적인 환경조건을 운송매체(delivery

vehicle/carrier)에 조성하고 이 균주를 접종하여 자연환경에서 이용하는 것이다. 즉, *G. virens*를 작물 또는 병원균에 정확하게 도달시킬 수 있는 매체가 개발되어야 하며, *G. virens*의 생물적 방제효율을 최대한으로 증대시키기 위한 영양원(nutrients)을 적절한 시기에 공급할 수 있어야 한다. 또한, 길항균의 운송매체는 농민이 편리하게 사용할 수 있도록 개발되어야 한다. 실험실에서 생물적 방제효과 및 지속성이 뛰어나더라도 포장에서 그 생물적 방제효과를 연결시켜 줄 수 있는 적절한 운송매체가 없다면 생물적 방제의 실용성은 없다.

적절한 운송매체의 조건으로서는 ①실험실내에서 발현되는 식물병원체의 생물적 방제효과가 포장에서 지속적으로 발현될 수 있어야 하고, ②대량생산이 가능해야 하며, ③환경에 위해하지 않으며, ④농민이 쉽게 이용할 수 있어야 하며, ⑤경제적이어야 하는 등의 조건을 충족시켜야 한다. 현재까지 외국에서 *G. virens*의 운송매체로써 연구되어 왔거나 이용되어지는 방법으로 lignite granule(39, 41, 67), alginate prill(21, 43, 44), peat bran(27), millet을 종자표면에 *G. virens*와 함께 도말하는 방법(32) 등이 보고되어 있다. 국내에서는 methyl cellulose-용액에 *G. virens*의 포자현탁액을 만든 다음 종자에 도말하는 방법이 보고되어 있다(33).

유기농약의 생물학적 분해에 관한 연구배경. 미생물에 의한 유기농약의 생물적인 분해(pesticides biodegradation)는 1948년 Brown과 Mitchell(11)에 의해 처음으로 제시되었다. 이들은 살균되지 않은 토양에서는 2,4-dichlorophenoxyacetate(2,4-D)의 활성력 및 잔류량이 시간에 따라 줄어드나 살균된 토양에서는 2,4-D의 활성력 및 잔류량이 일정함을 보여주므로써 토양미생물에 의한 2,4-D의 생물적 분해 가능성을 제시하였다. 다음해, Audus(2, 3)는 2,4-D의 활성력 및 잔류량이 토양의 미생물에 의해 감소함을 증명하였으며, 2,4-D의 분해에 관련되는 것으로 추정되는 미생물을 토양에서 분리하였다. Jensen과 Peterson(35)은 2,4-D의 분해에 관련되는 두 종류의 토양미생물을 분리하였고, 이 두 종류의 미생물 중 한가지는 Audus가 분리한 미생물과 매우 유사함을 보고하였다.

이후 토양미생물에 의한 유기합성농약의 분해에 관한 연구는 Brown과 Mitchell이 사용하였던 실험방법과 유사한 방법으로 계속되었다. Megharaj 등(45, 46)은 monocrotophos가 비살균된 토양에서는 시간에 따라 그 활성력 및 잔류량이 감소하나, 살균된 토양에서는 그 활성력 및 잔류량이 일정함을 보여주고 monocrotophos의 분해에 관련되는 여러 종류의 세균을 토양에서 분리하였다. Chaudhry와 Ali(12)는 carbofuran을 분해할 수 있는 15종의 *Pseudomonas* spp. 및 *Flavobacterium* spp.를 토양에서 분리하였다. Bailey와 Coffey(4)는 토양에서 분리한 25종의 미생물 중에서 15종이 metalaxyl을 분해할 수 있으며, 특히 atrazine이 *Pseudomonas* sp.에 의해 분해됨을 발견하였다.

미생물에 의한 특정 농약의 분해는 유전공학 기법의 도입으로 농약분해에 관련된 유전자의 발견, 분리 및 전이 등으로 대상 농약에 따라 특이적으로 연구되고 있다. Munnecke와 Hsieh(52)는 parathion을 독성이 약한 *p*-nitrophenol 및 diethylthiophosphoric acid로 분해하는 집단의 미생물군을 발견하였으며, Sedar 등(66)은 plasmid pCMS1을 갖고 있는 *P. diminuta*가 paration을 분해하는 paration hydrolase(EC 3.1.3)를 분비함을 보고하였다. Mulbry 등(51)은 *Flavobacterium* sp.에서 plasmid pCMS1와 같은 작용을 하는 plasmid pPDL2를 분리하였으며, 이들 두 종류의 세균에서 독립적으로 분리된 plasmids의 DNA sequence를 비교하므로써 두종의 세균이 parathion을 분해하는 *opd* 유전자를 갖고 있음을 밝혔다. 이후 methyl parathion을 분해하는 *Pseudomonas* sp.에서 *Flavobacterium* sp.과 *P. diminuta*에서 발견된 *opd* 유전자와 동일한 DNA sequence가 발견되었다(12, 66).

2,4-D를 분해하는 유전자를 함유하는 plasmid pJP 4는 *Alcaligenes eutrophus*에서(18), pRC10는 *Flavobacterium* sp.에서(13) 앞서 기술한 *opd* 유전자가 분리된 유사한 방법으로 분리되었으며, plasmid pBS3에 의해서 DDT, kelthane(DDT analogue), naphthalene 및 salycylate 등이 분해됨이 보고되었다(23, 24).

***Gliocladium virens*에 의한 유기합성농약의 생물학적 분해.** *G. virens*의 유기합성농약의 생물적 분해능력은 토양병원균에 대한 길항효과와 더불어 *G. virens*의 중요한 특성중의 하나이다. *G. virens*는 유기합성농약에 대한 저항성이 비교적 높으며(60, 68), 적절한 탄소 및 질소원이 존재하는 자연환경에서 aldicarb, metalaxyl 및 atrazine 등의 농약을 분해할 수 있는 능력이 보고되었다(68). 또한, 유전공학 기법을 이용한 유기인계의 농약을 분해할 수 있는 *opd* 유전자를 *G. virens*로의 전이가 가능해 짐에 따라 *G. virens*에 의한 특정 대상농약의 분해범위를 농약분해 유전자에 따라 선택적으로 넓힐 수 있으며(68), 유전자조작기술을 이용하여 대상 농약의 분해효율성을 높일 수 있는 가능성이 많다(64).

농약의 분해미생물로 세균이 주요 연구대상으로 이

용되어져 왔으나 토양에서 진균인 *G. virens*를 이용할 경우 농약의 분해를 실용화 할 수 있는 가능성은 증진될 수 있다. 즉, *G. virens*는 세균과는 달리 균사의 성장으로 water potential이 낮은 토양에서 생장할 수 있으며 농약에 대한 저항성이 비교적 높다. 특히, 세균과 *G. virens*가 토양에서 공존할 때, 서로 다른 생태 환경(ecological niche)에서 농약의 전반적인 분해를 증가시킬 수 있는 가능성이 있다. 또한, 앞서 기술한 세균의 plasmids들이 농약의 분해능력이 없는 *G. virens*로 전이되어 발현될 수 있는 유전공학 기법이 가능하다. 실례로, methyl parathion의 분해 유전자는 이미 *G. virens*에 전이되어 발현되고 있다(68). 그러나, *G. virens*을 이용한 농약의 분해에 관한 연구는 극히 기초적으로 실험실에서 이루어진 상태로 포장에서 실용화되기 위해서는 향후 집중적인 연구가 필요하다.

***Gliocladium virens*의 향후 연구과제.** 향후 연구과제로, 토양병원균의 방제시, *G. virens*와 농약을 동시에 사용하는 상조적인 식물병의 방제효과(synergistic plant disease control effect)가 연구되어야 한다. 예를 들면, 농약과 같이 처리된 *G. virens*가 토양병원균을 일정기간 억제한 후 *G. virens*이 같이 사용된 농약을 분해한다면 농약의 사용에서 야기되는 환경오염을 방지할 수 있을 뿐만 아니라, 농약사용량을 줄일 수 있을 것이다. 이러한 이점을 얻기 위하여서는 ① 토양에서 *G. virens*이 대상농약을 분해할 수 있는 능력이 있어야 하며, ② 대상농약과 *G. virens*을 같이 토양에 처리하였을 때 처리한 농약과 *G. virens*의 상조작용에 의한 식물병 방제효과를 얻을 수 있어야 하며, ③ 동시에 처리한 농약이 *G. virens*의 생장에 미치는 영향을 최소화하여야 하며, ④ 토양에 존재하고 있는 병원균 이외의 다른 미생물집단과의 경쟁에 쓰여지는 *G. virens*의 에너지를 최소화하므로써 생물적 방제효과를 최대화하여야 하는 등 많은 어려운 과제들이 산재하여 있다. 이 밖에, 유전공학 기법에 의한 *G. virens*의 생물적 방제효율이나 자연환경에서의 지속성을 증대시키는 방향과, *G. virens*이 분해하지 않는 특정 농약의 유전자 전이에 의한 분해 및 그 효율을 최대화할 수 있는 연구가 필요하다.

결 론

공해 없는 농산물, 농약의 부작용으로 부터의 자연생태계의 보존, 더 나아가서는 깨끗한 환경, 깨끗한 지구는 현재 생태계의 일부분으로 살아가고 있는 인류가 해결해야 할 과제이다. 현대농업의 특성에 의해 파괴되고 있는 농업생태계를 보존하는 방법중의 하나는 유기합성농약의 제한적인 사용이며, *G. virens*을 이용한 생물적 방제가 부분적으로 그 역할을 담당할 수 있다. 또한, *G. virens*은 식물병의 생물적 방제에 관한 연구 이외에도 일부 유기합성농약을 분해할 수 있으므로 생물적 방제효과 및 잔류성이 비교적 길거나 독성이 강한 유기농약의 분해에도 동시에 사용할 수 있는 이점이 있다.

*G. virens*를 이용한 국내 식물병의 생물적 방제 및 합성유기농약의 분해에 관한 연구와 실용 가능성은 무한하다고 할 수 있다. 특히, 국내토양의 대부분이 산성이며(40), *G. virens*의 생장 및 항생물질분비에 의한 길항효과가 산성에서 왕성하다는 점을 고려한다면 개발 가능성은 더욱 희망적이다. 그러나, 집약적이며 지속적인 연구와 이에 대한 투자 없이는 결과를 기대하기 어렵다.

요 약

토양에 존재하는 진균인 *Gliocladium virens*는 식물병을 감소 또는 방제할 수 있는 생물학적 특성이 있다. 이러한 생물학적인 특성에 의하여 *G. virens*는 지난 수십년간 실용가능성이 큰 생물학적 방제균(또는 길항균)으로 집중적으로 연구되었다. 이 균이 식물병의 발생을 감소시키는 생물적 방제효과는 항생작용, 중복기생, 근권에서의 생존과 집단번식, 뿌리표면에서의 정착 등에 의한 것으로 분류되고 있다. 특히, 항생물질인 gliotoxin, gliovirin, viridin 등은 *Rhizoctonia solani* 및/또는 *Pythium* spp. 등에 항생효과가 뚜렷하고, 식물병의 발생과 직접적인 상관관계를 나타내고 있어 *G. virens*의 식물병의 방제에 관련된 중요한 작용기작으로 제시되어 있다. 또한, 근권에서 이균의 생존과 집단증식 및 뿌리표면에서의 정착은 식물병의 방제와 상관관계를 나타낼 수 있는 중요한 작용기작으로 제시되고 있다. 그러나 이균이 *R. solani* 등에 기생하는 현상은 식물병의 생물적 방제의 직접적인 연관관계를 나타내고 있지 않다.

*G. virens*을 이용의 생물적 방제효과를 증진시키기 위한 방법으로 다음과 같은 두 가지 방법을 들 수 있다. 첫째, 길항효과가 높은 *G. virens* 균주의 선발 및 개발이다. 이러한 *G. virens* 균주를 선발하기 위하여 여러 종류의 토양에서 길항력이 높은 *G. virens*의 선발이 지난 수십년간 진행되고 있다. 또한, 특정 길항효과를 발현하는 유전자를 *G. virens*의 염색체에 도입하고 이를 발현시킴으로써 생물적 방제효과를 증진시키

는 것으로 이러한 방법은 1980년 후반부터 진행되고 있다. 둘째, *G. virens*의 길항효과가 최대의 효율로 발현될 수 있도록 최적의 미세환경을 갖추고 있으며 농민이 편리하게 사용할 수 있는 *G. virens*의 운송매체의 개발이 중요하다. 운송매체의 개발에 의한 'Glioguard'는 *G. virens*의 포자를 alginate 입자에 제형화한 것으로서 미국에서 시판되고 있다.

Aldicarb, metalaxyl, atrazine 등의 농약을 분해할 수 있는 능력은 *G. virens*의 다른 생물적 특성중의 하나이다. 특히, parathion을 분해할 수 있는 *Flavobacterium* sp.의 유전자(*opd*)가 *G. virens*의 염색체에 도입되여 발현될 수 있는 방법이 제시되었으며, 이는 *G. virens*을 이용한 토양에서의 특정한 농약의 분해효율을 증진시킬 수 있는 가능성을 제시한 것이다. 그러나, *G. virens*를 이용한 농약의 생물적 분해에 관한 연구는 기초단계로 평가되고 있으며, 포장에서 이를 실용화하기 위해서는 향후 지속적인 연구가 필요하다.

참고문헌

1. Aluko, M. O. and Hering, T. F. 1970. The mechanism associated with the antagonistic relationship between *Corticum solani* and *Gliocladium virens*. *Tran. Br. Mycol. Soc.* 55 : 173-179.
2. Audus, L . J. 1949. The biological detoxification of 2,4-dichlorophenoxy-acetate acid in soil. *Plant and Soil* 2 : 31-36.
3. Audus, L . J. 1950. Biological detoxification of 2,4-dichlorophenoxyacetate acid in soils: Isolation of an effective organism. *Nature* 166 : 356.
4. Bailey, A. M. and Coffey, M. D. 1986. Characterization of microorganisms involved in accelerated biodegradation of metalaxyl and metolachlor in soils. *Can. J. Microbiol.* 32 : 562-569.
5. Baker, R. 1983. State of the art: Plant diseases. In: *Proc. Natl. Interdisciplinary Biological Control Conf.*, ed. by S. L. Battenfield, pp. 14-22. Las Vegas, NV CDR/USDA, Washington DC.
6. Branon, D. R., Mabe, J. A., Molly, B. B. and Day, W. A. 1971. Biosynthesis of dithiodiketopiperazine antibiotics: comparison of possible aromatic amino acid precursor. *Biochem. Biophysic. Res. Comm.* 43 : 588-594.
7. Beagle-Ristaino, J. E. and Papavizas, G. C. 1985. Biological control of *Rhizoctonia* stem canker and black scurf of potato. *Phytopathology* 75 : 560-564.
8. Brian, P. W. 1944. Production of gliotoxin by *Trichoderma viride*. *Nature* (*London*) 154 : 667-668.
9. Brian, P. W. and Hemming, H. G. 1945. Gliotoxin, a fungistatic metabolic product of *Trichoderma viride*. *Annal. Appl. Biol.* 132 : 214-228.
10. Brian, P. W. and McGowan, J. C. 1945. Viridin: A highly fungistatic substance produced by *Trichoderma viride*. *Nature* 156 : 144-145.
11. Brown, J. W. and Mitchell, J. W. 1948. Inactivation of 2,4-dichlorophenoxy-acetate acid in soil as affected by soil moisture, temperature, the addition of manure and autoclaving. *Bot. Gaz.* 109 : 314-323.
12. Chaudhry, G. R. and Ali, A. N. 1988. Bacterial metabolism of carbofuran. *Appl. Envir. Microbiol.* 54 : 1414-1419.
13. Chaudhry, G. R., Ali, A. N. and Wheeler, W. B. 1988. Isolation of a methyl parathion-degrading *Pseudomonas* sp. that possesses DNA homologous to the *opd* gene from a *Flavobacterium* sp. *Appl. Envir. Microbiol.* 54 : 288-293.
14. Cho, C. T., Moon, B. J. and Ha, S. Y. 1989. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerium* causing cucumber wilt by *Gliocladium virens* and *Trichoderma harzianum*. *Korean J. Pl. Pathol.* 5 : 239-249.
15. Cook, R. J. and Baker, K. F. 1983. *The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens*. The Amer. Phytopathol. Soc. Pub. St. Paul, USA.
16. Curl, E. A. 1982. The rhizosphere: Relationship of pathogen behavior and root diseases. *Plant Dis.* 66 : 624-630.
17. Domsch, K. H., Gams, W. and Andeson, T.-H. 1980. *Compendium of Soil Fungi Vol. 1*. Academic Press. New York, Tokyo, Sydney, San Francisco.
18. Don, R. H. and Pemberton, J. M. 1985. Genetic and physical map of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degradative plasmid pJP4. *J. Bacteriol.* 161 : 466-468.
19. Eichner, R. D., Waring, P., Geue, A. M., Braithwaite, A. W. and M bacher, A. 1988. Gliotoxin causes oxidative damage to plasmid and cellular DNA. *J. Biol. Chem.* 263 : 3771-3777.
20. Fravel, D. R. 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26 : 75-91.
21. Fravel, D. R., Marois, J. J., Lumsden, R. D. and Connick, W. J., Jr. 1985. Encapsulation of potential biocontrol agents in an alginate-clay matrix. *Phytopathology* 75 : 774-777.
22. Fukuyama, T., Nakatsuka, S. and Kishi, Y. 1981. Total synthesis of gliotoxin, dehydrogliotoxin and hyalodendrin. *Tetrahedron* 37 : 2045-2078.
23. Golovleva, L. A., Pertsova, R. N. and Travkin, V. M. 1987. Degradation of kelthane in soil by *Pseu-*

domonas aeruginosa BS827 carrying plasmid pBS3. *Pest. Sci. Biot. Proc. Sixth Int. Cong. Pest. Chem.* 1986 : 421-424.

24. Golovleva, L. A., Zyakun, A. M., Baskunov, B. P., Pertsova, R. N. and Skryabin, G. K. 1980. The condition of DDT and its analogues' decomposition by *Pseudomonas aeruginosa* 640X. *Izvestiva Akad. Nauk SSSR* 2 : 243-253.
25. Harlan, J. 1976. Diseases as a factor in plant evolution. *Annu. Rev. Phytopathol.* 14 : 31-51.
26. Heitefuss, R. 1987. *Pflanzenschutz Grundlagen der Praktischen Phytomedzin.* Thieme-Verlag, Stuttgart 2, Auft.
27. Howell, C. R. 1982. Effect of *Gliocladium virens* on *Pythium ultimum, Rhizoctonia solani* and damping-off of cotton seedlings. *Phytopathology* 72 : 496-498.
28. Howell, C. R. 1987. Relevance of mycoparasitism in the biological control of *Rhizoctonia solani* by *Gliocladium virens. Phytopathology* 77 : 992-994.
29. Howell, C. R. 1991. Biological control of *Pythium* damping-off of cotton with seed-coating preparations of *Gliocladium virens. Phytopathology* 81 : 738-741.
30. Howell, C. R. and Stipanovic, R. D. 1983. Gliovirin, a new antibiotic from *Gliocladium virens* and its biological control of *Pythium ultimum. Can. J. Microbiol.* 29 : 321-324.
31. Howell, C. R. and Stipanovic, R. D. 1995. Mechanisms in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*-induced cotten seedling disease by *Gliocladium virens*: antibiosis. *Phytopathology* 85 : 469-472.
32. Howell, C. R., Stipanovic, R. D. and Lumsden, R. D. 1993. Antibiotic production by strains of *Gliocladium virens* and its relation to the biocontrol of cotton seedling diseases. *Biocontrol Sci. Tech.* 3 : 435-440.
33. Jang, S. S., Han, J. K., Park, C. S. and Kim, H. K. 1993. Plant growth enhancement induced by strains of biocontrol agents *Trichoderma* spp. and *Gliocladium* sp. *Korean J. Plant Pathol.* 9 : 149-155.
34. Jang, S. S., Jeong, M. J., Park, C. S. and Kim, H. K. 1993. Significant attribute of biocontrol agents for colonizing ability at corresponding-infection site of soil-borne plant pathogens. *Korean J. Plant Pathol.* 9 : 7-11.
35. Jensen, H. L. and Petersen, H. I. 1952. Detoxification of hormones herbicides by soil bacteria. *Nature* 170 : 39-40.
36. Jeong, M. J., Park, C. S. and Kim. H. K. 1993. Compatibility and synergism of *Gliocladium virens* and *Pseudomonas putida* and their improved competitive potential with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum. Korean J. Plant Pathol.* 9 : 12-18.
37. Jones, R. W. and Hancock, J. G. 1987. Conversion of viridin to viridiol by viridin-producing fungi. *Can. J. Microbiol.* 33 : 963-966.
38. Jones, R. W. and Hancock, J. G. 1988. Mechanism of gliotoxin action and factors mediating gliotoxin sensitivity. *J. Gen. Microbiol.* 134 : 2067-2075.
39. Jones, R. W., Pettit, R. E. and Taber, R. A. 1984. Lignite and stillage: Carriers and substrate for application of fungal biocontrol agents to soil. *Phytopathology* 74 : 1167-1170.
40. Jung, Y. S. and Eom, K. C. 1992. Changes and problems in soil management for agricultural production and their countermeasures in Korea. In: *Present Situation, Problem, Prospect and Practical Implementation Program of Education and Research on Problem Soils for Agricultural Production and Their Countermeasures*, pp. 31-43. University of Tsukuba Press.
41. Kenerley, C. M. and Stack, J. P. 1987. Influence of assessment methods on selection of fungal antagonists of the sclerotium-forming fungus, *Phymatotrichum omnivorum. Can. J. Microbiol.* 33 : 632-635.
42. Kirby, G. W. and Robin, D. J. 1980. The biosynthesis of gliotoxin and related epipolythiodioxopiperazines. In: *The Biosynthesis of Mycotoxins.* ed. by P. S. Stern. pp. 301-326. Academic Press, New York.
43. Lewis, J. A. and Papavizas, G. C. 1985. Characteristics of alginate pellets formulated with *Trichoderma* and *Gliocladium* and their effect on the proliferation of the fungi in soil. *Plant Pathol.* 34 : 571-577.
44. Lumsden, R. D., Locke, J. C., Adkins, S. T. and Ridout, C. J. 1992. Isolation and localization of the antibiotic gliotoxin produced by *Gliocladium virens* from alginate prill in soil and soilless media. *Phytopathology* 82 : 230-235.
45. Megharaj, M., Venkateswarlu, K. and Rao, A. S. 1987. Metabolism of monocrophos and quinalphos by algae isolated from soil. *Bull. Eniviron. Contam. Toxicol.* 39 : 251-256.
46. Megharaj, M., Venkateswarlu, K. and Rao, A. S. 1988. Microbial degradation and algal toxicity of monocrophos and quinalphos in flooded soil. *Chemosphere* 17 : 1033-1039.
47. Meyer, R. J. and Plaskowitz, J. S. 1989. Scanning electron microscopy of conidia and conidial matrix of *Trichoderma. Mycologia* 8 : 312-317.
48. Middleton, M. C. 1974. Effects of the mycotoxin sporidesmin on swelling and respiration of rat liver mitochondria. *Biochem. Pharmacol.* 23 : 801-810.
49. Mülbacher, A., Waring, P. and Eichner, R. 1985. Identification of an agent in culture of *Aspergillus fumigatus* displaying anti-phagocytic and immuno-

modulating activity *in vivo*. *J. Gen. Microbiol.* 131 : 1251-1258.

50. Mulbry, W. W. and Karan, J. S. 1989. Parathion hydrolase specified by the *Flavobacterium* opd gene: Relationship between the gene and protein. *J. Bacteriol.* 171 : 6740-6746.
51. Mulbry, W. W., Karan, J. S., Kearney, P. C., Nelson, C. S., McDaniel and Wild, J. R. 1986. Identification of a plasmid-borne parathion hydrolase gene from *Flavobacterium* sp. by Southern hybridization with opd from *Pseudomonas diminuta*. *Appl. Envir. Microbiol.* 51 : 926-930.
52. Munnecke, D. M. and Hsieh, D. P. H. 1974. Microbial decontamination of parathion and *p*-nitrophenol in aqueous media. *Appl. Envir. Microbiol.* 28 : 212-217.
53. Nelson, E. B. 1988. Biological control of *Pythium* seed rot and preemergence damping-off of cotton with *Enterobacter cloacae* and *Erwinia herbicola* applied as seed treatments. *Plant Dis.* 72 : 140-142.
54. Papavizas, G. C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* 23 : 23-54.
55. Papavizas, G. C. and Collins, D. J. 1990. Influence of Gliocladium virens on germination and infectivity of sclerotia of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 74 : 1171-1175.
56. Park, Y., Howell, C. R. and Kenerley, C. M. (in preparation). Application of random amplified polymorphic DNA to identify molecular markers of a gene for gliotoxin production in *Gliocladium virens*.
57. Park, Y., Howell, C. R., Kenerley, C. M. and Stipanovic, R. D. (in preparation) Genetic variation of gliotoxin producing and non-producing strains of *Gliocladium virens* detected by random amplified polymorphic DNA.
58. Park, Y., Kenerley, C. M. and Stack, J. P. 1992. Inoculum dynamics of *Gliocladium virens* associated with roots of cotton seedlings. *Microb. Ecol.* 23 : 169-179.
59. Park, Y., Stack, J. P. and Kenerley, C. M. 1991. Production of gliotoxin by *Gliocladium virens* as a function of source and concentration of carbon and nitrogen. *Mycol. Res.* 95 : 1242-1248.
60. Park, Y., Stack, J. P. and Kenerley, C. M. 1992. Selective isolation and enumeration of *Gliocladium virens* and *G. roseum* from soil. *Plant Dis.* 76 : 230-235.
61. Ridout, C. J., Lumsden, R. D. and Hruschika, W. R. 1992. Identification of mycelial polypeptides associated with gliotoxin-producing strains of the biocontrol fungus *Gliocladium virens*. *Phytopathology* 82 : 479-484.
62. Rightsel, W. A., Schneider, H. G., Sloan, B. J., Graf, P. R., Miller, F. A., Bartz, Q. R., Ehrlich, J. and Dixon, G. J. 1964. Antiviral activity of gliotoxin and gliotoxin acetate. *Nature* 204 : 1333-1334
63. Roberts, R. D. and Lumsden, R. D. 1990. Effect of extracellular metabolites from *Gliocladium virens* on germination of sporangia and mycelial growth of *Pythium ultimum*. *Phytopathology* 80 : 461-465.
64. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
65. Schroth, M. N. and Hildebrand, D. C. 1964. Influence of plant exudates on root-influencing fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2 : 101-132.
66. Serdar, C. M., Murdock, D. C. and Rohde, M. F. 1989. Parathion hydrolase gene from *Pseudomonas diminuta* MG: Subcloning, complete nucleotide sequence, and expression of the mature portion of the enzyme in *Escherichia coli*. *BioTechnology* 7 : 1151-1155.
67. Stack, J. P., Kenerley, C. M. and Pettit, R.E. 1987. Influence of carbon and nitrogen sources, relative carbon and nitrogen concentrations, and soil moisture on the growth in nonsterile soil of soilborne antagonists. *Can. J. Microbiol.* 33 : 626-631.
68. Supak-Koslovsky, J. M. and Thomas, M. D. 1991. Sub-cloning using simplified adapter addition. *BioTechniques* 12 : 652-654.
69. Taylor, A. 1971. The toxicity of sporodesmins and epipolythiadioxo-piperazines. In: *Microbial Toxin, VII*, ed. by S. Kadis, A Ciegler and S. J. Ajl, pp. 337-376. Academic Press. New York.
70. Taylor, A. 1986. Some aspects of the chemistry and biology of the genus *Hypocrea* and its anamorphs, *Trichoderma*, and *Gliocladium*. *Proc. NS Inst. Sci.* 36 : 27-58.
71. Thomas, M. D. and Kenerley, C. M. 1989. Transformation of the mycoparasite *Gliocladium*. *Curr. Genet.* 15 : 415-420.
72. Tu, J. C. and Vaataja, O. 1980. The effect of the hyperparasite (*Gliocladium virens*) on *Rhizoctonia solani* and on *Rhizoctonia* root rot of white beans. *Can. J. Bot.* 54 : 518-532.
73. Vancura, V. and Stotzsky, G. 1976. Gaseous and volatile exudates from germination seeds and seedlings. *Can. J. Bot.* 54 : 518-532.
74. Waring, P., Eichner, R. D. and Mullbacher, A. 1988. The chemistry and biology of the immunomodulating agent gliotoxin and related epipolythiodioxopiperazines. *Med. Res. Rev.* 8 : 499-524.
75. Webster, J. and Lomas L. 1964. Does *Trichoderma viride* produce gliotoxin? *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 46 : 535-540.

76. Weindling, R. 1934. Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 24 : 1153-1179.
77. Weindling, R. 1941. Experimental consideration of the mold toxins of *Gliocladium* and *Trichoderma*. *Phytopathology* 31 : 991-1003.
78. Weindling, R. and Emerson, O. H. 1936. The isolation of a toxic substance from the culture filtrate of *Trichoderma*. *Phytopathology* 26 : 1086-1070.
79. Weindling, R. and Fawcett, H. S. 1936. Experiments in the control of *Rhizoctonia* damping-off of citrus seedlings. *Hilgardia* 10 : 1-6.
80. Welsh, J. and McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.* 189 : 7213-7218.
81. Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18 : 6351-6535.
82. Williams, S. T. and Vickers, J. C. 1986. The ecology of antibiotic production. *Microb. Ecol.* 12 : 43-52.
83. Wright, J. M. 1952. Production of gliotoxin in unsterilized soil. *Nature* (*London*) 170 : 673-674.
84. Wright, J. M. 1956. Biological control of a soilborne *Pythium* infection by seed inoculation. *Plant Soil* 8 : 132-140.
85. Wright, J. M. 1956. The production of antibiotics in soil. III. Production of gliotoxin in wheatstraw buried in soil. *Ann. Appl. Biol.* 44 : 461-466.
86. Wright, J. M. 1956. The production of antibiotics in soil. IV. Production of antibiotics in coats of seeds sown in soil. *Ann. Appl. Biol.* 44 : 561-566.