

*Meloidogyne incognita* 알을 제어하는 *Paecilomyces lilacinus*의 현미경적 관찰  
이광배

대구보건대학 임상병리과

Microscopic observation of *Paecilomyces lilacinus* that have  
control over *Meloidogyne incognita* eggs

Kwang-Bae Lee

Dept. of Clinical pathology, Daegu Health College

Abstract

*M. incognita* are plant-parasite nematode that cause severe damage to the crops. *P. lilacinus* are renowned for inhibition of development of *M. incognita*'s egg. We make a study for enzymatic examining the cause closely that *P. lilacinus* suppress development of *M. incognita*'s egg by parasiting. The research result is explained the place below.

1. The egg that is exposed to co-enzymes which are cultured in the broth culture starts to change the membrane of egg from 3days. And in 10days, that membrane completely disappear. These are observed through light microscope. Therefore, we know that *M. incognita* are controlled by extracellular lytic enzymes that are produced by *P. lilacinus*.

2. Through scanning electron microscope, we can find that the egg that is attacked by *P. lilacinus* loses its membrane gradually, and that loss of the membrane causes transform, which suppresses the development of egg

**Key words** : *P. lilacinus*, *M. incognita*, extracellular lytic enzyme

---

\*Corresponding author E-mail : scanerkr@hanmail.net

## I. 서론

농작물에 극심한 피해를 주는 뿌리혹선충은 전 세계적으로 광범위하게 분포되어 있으며, 기생범위가 매우 넓은 뿐만 아니라 곰팡이, 세균, 바이러스 등과 밀접한 관계를 가지고 있다.

뿌리혹선충에 감염된 농작물은 수량이 크게 감소시킬 뿐만 아니라 품질을 크게 저하시키므로 식물기생선충 중 매우 중요한 것의 하나이다. 뿌리혹선충은 1877년 브라질의 Rio de Janeiro에서 JOBERT가 발견한 이래 2007년 현재 전 세계적으로 41종이 알려져 있으며, 우리나라에서는 *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica*, *M. hapla* 등 4종이 알려져 있다<sup>1)</sup>. 특히 *M. incognita*는 전 세계적으로 열대와 온대지방에 있어서 매우 중요한 종이다. 이 선충의 기생숙주로서는 오이, 토마토, 수박, 콩, 작약 등 700여종이 알려져 있다. 식물의 뿌리에 *M. incognita*가 감염되면 흑이 형성되고, 흑은 1개씩 형성되거나 또는 여러 개의 흑이 합쳐져서 전형적인 증상을 나타낸다.

감염된 식물은 비경제적으로 되며, 생장이 감소되고, 시들며 결국 고사한다. 뿌리혹선충에 대한 피해를 방지하기 위해 넓은 영역에서 연구가 진행되어 왔지만 연구의 대부분은 화학적 살충제에 의존하고 있는 실정이다. 화학적 살충제의 사용은 제거하려는 해충뿐만 아니라 여러 가지 생물들에 대하여 비 선택적으로 작용하는 살충효과가 있어 이로 인한 심각한 생태계의 위협을 초래하기도 한다<sup>2)</sup>. 이와 같은 화학적 살충제 문제점 때문에 선충구제를 위한 새로운 방법의 일환으로 1900년 초부터 미생물에 의한 해충구제의 활발한 연구에 힘입어 뿌리혹선충에 대한 미생물에 의한 생물학적 방제연구가 시작되어 많은 성과를 얻고 있다<sup>3)</sup>. 뿌리혹선충방제에 우수성이 입증된 *Paecilomyces lilacinus*는 세계도처에 널리 분포되어 있는 토양 사상균으로 뿌리혹선충

에 대한 생물학적 제어수단으로 그 능력이 입증된바 있다<sup>4,5)</sup>. *Paecilomyces lilacinus*가 *M. incognita*의 알(卵)의 발생을 억제하는 능력을 효소학적 측면에서 검토되어야 한다고 Stirling과 Mankau 등이<sup>6,7)</sup> 보고한 바 있어, 본 연구에서는 *Paecilomyces lilacinus*가 *Meloidogyne incognita* 알에 기생할 수 있는 능력과 균사가 알의 내부로 침투하여 알의 발생을 방해하는 원인은 세포외로 분비한 extracellular lytic enzyme일 것이라는 연구보고에 따라<sup>8,11)</sup> *Paecilomyces lilacinus*에 의한 extracellular lytic enzyme 분비능력과 extracellular lytic enzyme에 의한 난각의 변화과정을 광학현미경으로 관찰하고 또 배지상에서 균사가 알에 침투하는 과정을 전자현미경(SEM)으로 관찰하고자 한다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 연구재료

본 실험에 사용한 공시 곰팡이인 *Paecilomyces lilacinus*(Fungi)는 경상북도 농촌진흥원 식물병리 곤충계에서 분양받아 실험에 사용하였고, 뿌리혹선충인 *Meloidogyne incognita*의 알(卵)은 경북 칠곡군 낙동강 유역의 토마토 재배농가에서 수집하여 경북농촌진흥원 박소득 박사에게 의해 동정된 것을 실험재료로 사용하였다.

### 2. 연구방법

#### 2.1. 뿌리혹선충난 분리

뿌리혹선충에 감염된 토마토뿌리를 흐르는 물에서 세척하여 흙을 제거한 후 5mm정도 자른 다음 Mixer기에 Tap water 250ml을 넣고 상기시료 5g정도를 가한 후 15초 동안 저속운전으로 mixing하였다. Mixing후 현탁액울(상 : 1mm 하: 0.01~0.03mm) seive에서 여과한 다음 seive 하(下)에 남은 것은 세척 후 모아서 원심관에 넣고 약 1ml의 kaolin

을 가하여 혼합하였다. 혼합액을 3,000rpm에서 2분간 원심분리 한 다음 상등액을 버리고 sugar solution(비중 1.15 : 454g/l)을 가하여 3,000rpm에서 2분간 원심분리 하였다. 원심분리 한 상등액을 seive(0.01mm)에 부어 여과 후 흐르는 물에다 seive위에 모아진 선충난을 여러 번 수세하여 설탕액을 완전히 제거한 것을 채취병에 모은 다음 20℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

2.2. 균주의 배양과 Extracellular lytic enzyme 조제

Paecilomyces lilacinus가 생산한 extracellular lytic enzyme에 의한 난각의 변화과정을 관찰하기 위해 공기곰팡이를 Table.1과 같이 조성된 배지에 접종하여 25℃에서 6일간 진탕배양(150rpm)하였다.

배양액을 12,000rpm, 4℃에서 20분간 원심분리한 후 상등액 50ml에 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 350g을 가하여 100% 포화시킨 다음 4℃에서 하룻밤 방치하였다. 포화된 시료를 4℃에서 30분간 원심분리(15,000rpm)하였다. 상등액은 버리고 침전물에 phosphate buffer(pH 7.2) 5ml을 가하여 용해시킨 다음 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>가 완전히 제거될 때 까지 12시간 동안 4℃에서 투석시킨 후 그 투석액을 조정제 효소액으로 하였다.

조정제 효소액 5ml에 약 100개의 뿌리혹선충 알을 투여하고 실온에 보관하면서 날짜별로 난각의 변화 상태를 400배의 광학현미경으로 관찰하였으며, 대조실험군은 PBS buffer(pH 7.2) 5ml에 뿌리혹선충 알 약 100여개를 투여하여 실험 군과 비교하였다.

2.3. 뿌리혹선충란에 P. lilacinus접종

C,S,F변법에<sup>9)</sup> 따라 분리된 M. incognita의 알을 0.1% Sodium hypochlorite solution으로 멸균처리 한 다음 0.2μm nalgene 멸균 여과지를 이용하여 알을 회수하였다. 알을 다시 멸균수로 수세하고 여과지에서 알을 제거한 다음 Water agar에 넣어 agar표면에 알이 부착하도록 하였다. 알이 있는 water agar plates에 P. lilacinus 곰팡이를 중심부에 접종하여 1주일 동안 실온에서 배양한 다음 전자현미경으로 균사의 침투여부를 관찰하였다.

2.4. 전자현미경 관찰을 위한 시료고정

뿌리혹선충 알과 P. lilacinus균사가 들어있는 agar를 dry oven기에서 35℃를 유지하면서 2시간 동안 건조시켰다. 수분이 증발된 배지를 1cm<sup>2</sup>로 잘라 styrofoam capsule에 보관하였다. 1cm<sup>2</sup> 크기로 절단된 agar에 2.5% glutaraldehyde를 가하여 25℃에서 4시간 동안 고정한 후 0.1% phosphate buffer(pH 7.2)로 10분씩 2회, 20분씩 1회 수세하고 2% OsO<sub>4</sub>와 0.1M phosphate buffer(pH 7.2)가 등량 희석된 액에서 4℃를 유지하면서 90분 동안 방치하였다. 0.1M phosphate buffer(pH 7.2)로 3회 수세한 후 ethanol 농도구배 50%, 70%, 80%, 90%, 100%에서 각각 10분씩 탈수시켰다. 탈수된 시료에 isoamyl acetate solution을 가하여 하룻밤 방치하고, CO<sub>2</sub>로 3시간 고정하고 난막을 코팅처리 한 다음 전자현미경(Scanning electron microscope)로 균사의 침투과정을 관찰하였다.

Table 1. Media composition for production extracellular lytic enzyme

Glucose	10g
NH <sub>4</sub> Cl	1g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.9g
MgSO <sub>4</sub>	0.25g
Trace element solution	5ml
Chitin(sigma, practical grade)	20g
Chitosan(sigma, practical grade)	20g
D.W	1000ml

### Ⅲ. 결과 및 고찰

#### 1. Extracellular lytic enzyme에 의한 난각의 변화

*Paecilomyces lilacinus*가 *Meloidogyne incognita* 생물학적방제인자로 입증된 것은 1979년 Jatala 등에<sup>12)</sup> 의해서이다. *P. lilacinus*의 뿌리혹선충제어 능력은 단순히 선충란을 포획하여 부화를 억제한다는 정도만 보고된 실정이지만, 최근 *P. lilacinus*에 대한 뿌리혹선충란 제어능력은 extracellular lytic enzyme 측면에서 검토할 필요성이 있다는 보고<sup>8,11)</sup>에 따라 *P. lilacinus*를 액체 배양하여 조정제 효소액을 조제한 다음 조정제 효소액 5ml에 약 100개의 충란(卵)을 투여하고 실온에 보관하면서 날짜별로 난각의 변화상태를 광학현미경으로 관찰하였다.

효소액에 노출된 충란(卵)은 2일간은 충란 막에 아무런 변화를 관찰할 수 없었지만, 3일 후 부터는 충란 막의 일부가 변형되는 것을 관찰할 수 있었다(Photo 2). 효소액에 노출된 4일부터는 난 막의 일부가 분해되어 할구가 밖으로 흘러나오는 것이 관찰되었고(photo 3, 4, 5, 6, 7) 10일이 경과되는 시점에서 난 막은 완전히 소실됨이 관찰되었다(Photo 8).

뿌리혹선의 난 막은 ascarioside라고 불리는 glycosides의 혼합물과 chitin으로 구성되어 있어<sup>13)</sup> *P. lilacinus*에 의한 난막의 분해는 extracellular lytic enzyme의 일종인 chitinase일 가능성이 높다. 따라서 *P. lilacinus*에 의한 뿌리혹선의 제어능력은 단순히 선충란 포획이 아니라 extracellular lytic enzyme에 의해 난 막이 파괴되어 부화가 억제됨을 본 실험을 통해서 알 수 있었다.



Photo 1. control  
(Light microscope.400X)



Photo 2. After 3days  
(Light microscope.400X)



Photo 3. After 4days  
(Light microscope.400X)



Photo 4. After 5days  
(Light microscope.400X)

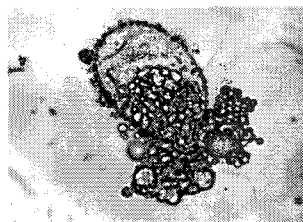


Photo 5. After 6days  
(Light microscope.400X)

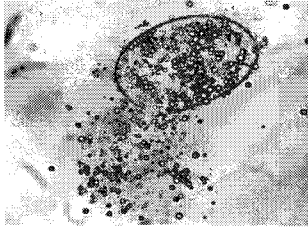


Photo 6. After 7days  
(Light microscope.400X)

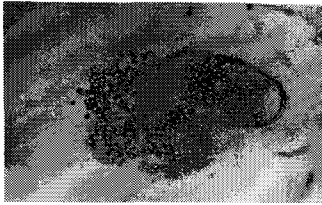


Photo 7. After 8days  
(Light microscope.400X)

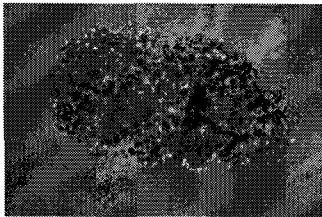


Photo 8. After 10days  
(Light microscope.400X)

난 막이 소실됨에 따라 모양이 변형되어졌으며(photo 12, 13 14 15), 난 막의 파괴로 일부의 할구가 밖으로 흘러나옴도 관찰되었다(photo 3. 4. 5. 6. 7). 따라서 *P. lilacinus*에 감염된 충란은 부화되지 않는다는 연구보고와<sup>14)</sup> 그 현상이 일치함을 알 수 있었다.

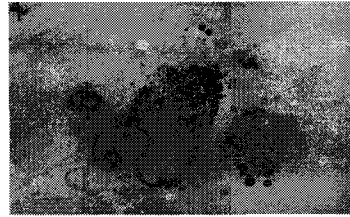


Photo 9. Egg trapping fungi  
(Light microscope.400X)

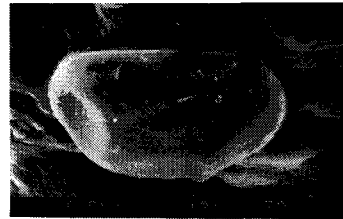


Photo 10. Not infected egg  
(Scanning electron microscope)

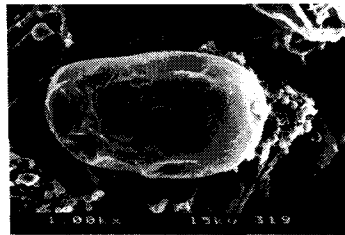


Photo 11. infected egg  
(Scanning electron microscope)

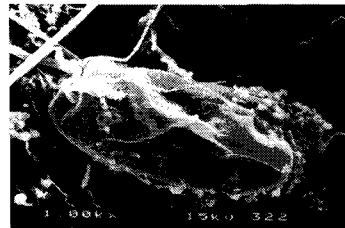


Photo 12. infected egg  
(Scanning electron microscope)

## 2. 뿌리혹선충란 균사침투

본 연구에서는 *P. lilacinus*균사가 선충란에 침투하여 난(卵)의 부화를 억제하는지를 확인하기 위해, water agar plates에 선충란과 *P. lilacinus*(Fungi)를 동시에 접종하여 실온에서 1주일간 배양하였다. Agar에서 배양된 *P. lilacinus*와 선충란을 dry oven기에서 35℃를 유지하면서 2시간 동안 건조시켜 수분을 증발시켰다. 수분이 증발된 agar를 1cm<sup>2</sup> 크기로 절단한 후 전자현미경시료 고정방법에 따라 시료를 조제하여 전자현미경(SEM)으로 균사의 침투정도를 관찰하였다. 그 결과 Photo 11, 12, 13, 14, 15, 16에서 보는 것처럼 선충란에 *P. lilacinus*균사가 침투하는 과정을 관찰할 수 있었다. 곰팡이 균사가 침투한 충란은 점차

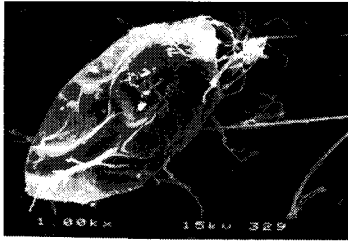


Photo 13. infected egg  
(Scanning electron microscope)

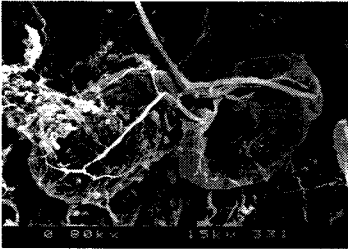


Photo 14. infected egg  
(Scanning electron microscope)

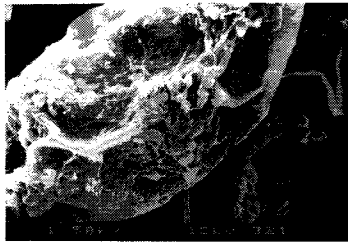


Photo 15. infected egg  
(Scanning electron microscope)

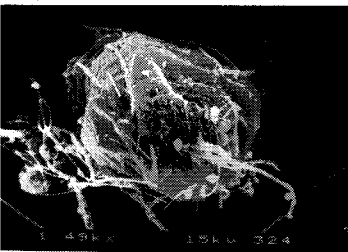


Photo 16. infected egg  
(Scanning electron microscope)

#### IV. 결 론

농작물에 극심한 피해를 입히고 있는 *M. incognita*에 대한 생물학적 방제 agent로

알려진 *P. lilacinus*(Fungi)의 extracellular lytic enzyme 분비능력과, extracellular lytic enzyme에 의한 난 막의 변화상태, 균사의 침투과정을 광학현미경과 전자현미경으로 관찰한 결과는 다음과 같다.

1. 액체배지에서 배양된 조효소액에 노출된 충란은 노출3일부터 난 막에 변화가 나타나 10일이 경과된 시점에서는 완전히 소실됨이 광학현경으로 관찰되어 *P. lilacinus*(Fungi)에 의한 *M. incognita*의 제어는 곰팡이가 생성한 extracellular lytic enzyme에 의한 것이라는 것을 알 수 있었다.
2. 또한 *P. lilacinus*(Fungi)에 공격을 받은 *M. incognita*의 알은 점차 난 막이 소실됨에 따라 그 형태가 변형되어졌으며, 난 막의 파괴로 일부 알구가 밖으로 흘러나옴이 관찰되었다. 따라서 *P. lilacinus*(Fungi)에 감염된 *M. incognita*의 알은 부화되지 않음을 확인할 수 있었다.

#### 참고문헌

1. 최영연, 추호열.1978. 경제작물에 영향을 미치는 뿌리혹선충에 관한 연구
2. Williams., "Third Generation pesticides" in man and Ecosphere, Reading from Scientific American. W.H. freeman Co., San Francisco, calif.,1971
3. Kerry, B.R. 1990. An assessment of progress toward microbial control of plant-parasitic nematode. Supplement to J. Nematol. 22(4S) : 621~631
4. Zari, E. A.and D.S. Bhatti.1990. In vivo parasitism of *Meloidogyne javanica* by an oviparous Fungus, *Paecilomyces lilacinus*. nematol medit.18 :141-143.
5. Zaki, F. A.,and D.S bhatti. 1988. Economical method for mass culturing of

- P.lilacinus* A-267. J.Chem.Soc.Commun., 94-96
6. Stirling, G.R. 1984, Biological control of with *Bacillus penetrans*. Phytopathology 74:55-60 *Meloidogyne incognita*
  7. Stirling, C.R and Mankau, R. 1979. Mode of parasitism of *Meloidogyne* and other nematode eggs by *Daetyrella oviparasitica*. J. Nematol. 11:82-288
  8. Dunn, M.T., R.M Sayre A. Carrell, and W. P. Wergin 1982. Colonization of nematode egg by *P.lilacinus* observed with microscope. SEM. 11:1(1)
  9. Caveness, F.E and Jensen H.J. 1955. Modification of the centrifugal floatation technique for the isolation and concentration of nematode and their egg from soil and plant tissue. Proc. Helminth. Soc. Wash.
  10. Parasad, S.V., B.R Tilak and K.G. Gollaakota. 1972. Role of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* on the larval survival and egg hatching of *Meloidogyne* spp., the causative agent of root-knot disease. J. Invertebr. Pathol. 20:377-378.
  11. Domsch K.H., Gams W. and Anderson T.H., (Eds) 1980. Compendium of soil fungi. Vol.1. London Academic Press.
  12. Jatala P., Katenback and M. bocangel. 1979. Biological control of *Meloidogyne incognita* acrita and *Globodera pallida* on potatoes. j. Nematol. 11 :303
  13. J. S. Price and R. Storck 1975. Production, Purification, and Characterization of an Exteracellular Chitosanase from *P. lilacinus*.
  14. Jatala, P., Franco, A. Gonzalez. Journal of Nematology. Vol.17(4) 1985. hatching Stimulation and inhibition of *Globodera pallida* egg by the enzymatic and exopathic toxic compound of some biocontrol fungi