

## 생물학적 선충 방제제를 이용한 고구마 뿌리혹선충 (*Meloidogyne incognita*)의 방제효과

박문현 · 김진광<sup>1</sup> · 최원호<sup>1</sup> · 윤민호<sup>1\*</sup>

(주)효성오앤비, <sup>1</sup>충남대학교 농업생명과학대학 생물환경화학과

## Nematicidal Effect of Root-knot Nematode (*Meloidogyne incognita*) by Biological Nematicide

Moon-Hyun Park, Jin-Kwang Kim<sup>1</sup>, Won-Ho Choi<sup>1</sup>, and Min-Ho Yoon<sup>1\*</sup>

Research Institute, HyosungONB Co.,Ltd., 461-68 Jeonmin-dong, Yuseong-gu, Daejeon, Korea

<sup>1</sup>Department of Bio-Environmental Chemistry, College of Agriculture and LifeSciences,

Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

An nematophagous fungi *Arthrobotrys thaumasia* Nema-1 and *Pseudomonas putida* C-5, which degrade the collagen and gelatin, was isolated from controlled horticultural soils in Seonnam-myun, Sungju-gun, Kyungpook and Woosung-myun, Gongju-shi, Chungnam to develop biological nematode pesticide. When 5,000 mL L<sup>-1</sup> of *A. thaumasia* Nema-1 culture was treated to *Meloidogyne incognita*, the nematicidal activity resulted in 55% at 72 hours after treatment. While the nematicidal activity increased to 65% by treating the culture mixture of 5,000 mL L<sup>-1</sup> Nema-1 and *P. putida* C-5 after 72 hours. Furthermore, the nematicidal activity of the mixture containing cinnamon extract 50 mg L<sup>-1</sup>, each 5,000 mL L<sup>-1</sup> of Nema-1 and C-5 culture was elevated to 89% at 72 hours after treatment, comparing to the result showed 17% and 57% of the nematicidal activity, respectively by the treatment of chemical nemato pesticide Fosthiazate 50 mg L<sup>-1</sup> and neem oil 2,000 mL L<sup>-1</sup>. These results suggested that the mixture of microorganisms and plant extract were more effective biological nematicide than the case of only microorganism or plant extract for nematode control.

**Key words:** *Meloidogyne incognita*, *Arthrobotrys thaumasia* Nema-1, *Pseudomonas putida* C-5, Biological nematicide

### 서 언

고구마뿌리혹선충 (*Meloidogyne incognita*)은 식물기생 성선충으로서 알에서 부화된 제2령 유충이 식물의 뿌리에 침입하고 식물체 내에서 3회 탈피하여 성충이 되며 제3령, 제4령 층은 구침이 없어졌다가 성충시에 다시 나타나는 특징을 가지고 있다. 식물의 뿌리 성장점 부근에 침입하여 영양분을 흡수함으로써 작물 생장에 피해를 주고 선충이 분비하는 호르몬의 작용으로 기생 부위의 식물 세포는 세포 수가 증가되고, 비대현상이 일어나 흑모양으로 변하게 된다 (Choi, 1982).

국내 시설원에 재배지에서 뿌리혹선충의 감염으로 매년 약 30~40%의 수량 감소를 가져오고 있다 (Lee, 2003). 이

러한 식물 기생 선충의 피해를 감소시키기 위해 윤작, 객토, 태양열 소독, 담수처리, 토양 훈증, 살선충제 처리 방법 등이 있지만, 사용의 편리성 때문에 유기합성 농약이 주로 사용되었다 (Choi, 1982). 그러나 최근에 Aldicarb, Fenamiphos, Methyl bromide, DBCP, EDB 등의 선충방제용 농약성분들이 인체 및 자연환경에 유해성이 있다고 밝혀지면서 살선충제 농약 등록이 취소됨으로써 물 추출물이나 미생물을 이용한 친환경 살선충제 개발에 관심이 집중되고 있다 (Karpouzias et al., 2004).

현재 농가에서 사용하고 있는 친환경 살선충제로는 님오일 (Kim et al., 2011), 계피추출물 (cinnamic acid, cinnamic aldehyde; Chanh, 2010)과 같은 식물 추출물이나 미생물 제제를 많이 사용하고 있지만, 방제가가 유기합성농약에 비해 많이 떨어지는 실정이다. 또한 대표적인 선충방제 미생물로 알려진 *Arthrobotrys* 속 (Lee, 2003; Zhang et al., 2010), *Drechlerella* 속 (Cho et al., 2008), *Monacrosporium* 속

접수 : 2011. 3. 16 수리 : 2011. 4. 1

\*연락처 : Phone: +82428216733

E-mail: mhyoon@cnu.ac.kr

(Braga et al., 2010), *Pseudomonas* 속 등이 보고되었다 (Abo-Elyousr et al., 2010). 선충포식곰팡이를 이용하여 방제하는 기술은 실내검정에서 우수한 결과를 나타내었으나 토양 적응성 문제로 인하여 방제가가 포트나 포장검정에서 감소하는 경향을 보인다. 이를 해결하기 위해 선충포식 능력이 뛰어난 곰팡이 분리와 선충 표피 성분인 collagen, 알집 성분인 gelatin을 분해하는 효소 생성균 (Tunlid et al., 1991)을 이용하여 선충 방제효과가 우수한 신규 미생물의 분리 뿐만 아니라, 이들 미생물들의 살선충 효과를 상승시키기 위하여 살선충 활성이 있는 천연추출물을 혼용한 환경친화적인 선충방제제의 개발이 요구되고 있다 (Huang et al., 2011).

본 연구에서는 시설재배지 토양으로부터 선충 포식성 곰팡이와 선충 표피성분인 collagen과 gelatin 분해능이 뛰어난 세균을 분리하여 살선충 활성을 분석하고, 분리 미생물들과 계피추출물과 혼용 시 살선충 효과를 확인하여 친환경 선충방제제의 개발 가능성에 대해 조사하였다.

## 재료 및 방법

**뿌리혹선충의 분리 및 동정** 2010년 7월 경북 성주군 선남면 참외 농가와, 충남 공주군 우성면 토마토 농가 중 뿌리혹선충 피해가 극심한 하우스 10개동에서 각 4주 씩 기주식물과 토양을 직경 20 cm, 높이 30 cm인 포트에 옮겨와서 실험에 이용하였다. 선충 분리는 Bearmann의 깔때기법을 이용하였고 (Viglierchio and Schmitt, 1983), 2령 유충을 실험에 사용하였다. 선충 동정은 *Meloidogyne* 종 (species)의 유충의 길이만으로 동정이 가능하다는 기 결과에 따라 (Taylor and Sasser, 1978) 광학현미경  $\times 160$ ,  $\times 250$ ,  $\times 400$  배율로 유충의 전체 길이와 구침, 꼬리의 모양 등 형태적 관찰을 통하여 동정하였다.

**선충포식곰팡이의 분리와 배양** 선충포식 곰팡이를 순수분리하기 위하여 채집한 토양시료를  $10^{-1}$ ~ $10^{-3}$  농도로 희석하여 항생제 streptomycin sulfate salt (Sigma-Aldrich, USA)  $100 \text{ mg L}^{-1}$  첨가한 potato dextrose agar (PDA, Difco, USA) 배지를 이용하여 희석평판법에 의하여 곰팡이를 1차 순수분리 하였다. 분리균들의 살선충 활성 조사하기 위하여 96 well micro plate에 각 well당 선충 200마리를 넣은 후 1차 순수 분리된 곰팡이를  $1,000 \text{ mL L}^{-1}$ 의 농도로 접종하여 7일 후 살아있는 선충수를 계수하여 포식능력이 가장 우수한 곰팡이를 분리하였다. 분리한 선충 포식성 곰팡이의 동정은 18S rDNA의 ITS1, ITS4를 primer로 PCR 증폭한 후, ITS 부분의 PCR product의 염기서열을 NCBI/GENEBANK의 Blast 프로그램을 이용하여 계통학적인 특성

을 비교하였다.

선충포식곰팡이 배양을 위한 배지는 Difco사의 NB (Nutrient broth), PDB (Potato dextrose broth)와 YMB (Yeast malt broth)를 각각 이용하였고, 배지의 pH 6.0, 배양온도  $25^{\circ}\text{C}$ 에서 진탕배양 (회전수 150 rpm) 또는 정치배양 하여 7일 후 균사량을 검정하였다. 균사량 측정은 배양액 500 mL를 Whatman filter paper No.6으로 여과한 균사를 dry oven에서  $50^{\circ}\text{C}$ 로 24시간 건조 후 중량을 측정하였다.

**Collagenase 생성균 분리와 배양** Collagen 분해균은 2009년 5월~2010년 7월까지 전국 20지역으로부터 500여개의 근권토양 시료를 채집하여 nutrient skim milk agar (NSKA: nutrient broth 0.8%, agar 1.5%, skim milk 1%, Difco) 배지 상에서  $10^{-3}$ ~ $10^{-5}$ 의 농도로 희석평판하여  $30^{\circ}\text{C}$ 에서 24 hr 배양하여 colony 주변에 투명한 형성균을 1차 선발하였다. 1차 선발된 균주를 NSKA 배지에 희석을 갖고 동일조건에서 배양하여 투명한 크기를 측정하여 단백질 분해능이 우수한 2차 균주를 선발하였다. 2차 선발된 균주를 이용하여 선충 표피 구성성분인 collagen과 알집의 구성성분인 gelatin 분해능이 우수한 균을 선발하기 위해 nutrient collagen agar (NCA: nutrient broth 0.8%, agar 1.5%, collagen 1%)와 nutrient gelatin agar (NGA: nutrient broth 0.8%, agar 1.5%, gelatin type B 1%)을 이용해 2차 선발과 같은 방식으로 3차 균주를 선발하였다. Collagenase 생성균의 동정은 16S rDNA의 27F, 1492R을 primer로 PCR증폭하였으며, 염기서열을 NCBI/GENEBANK의 Blast 프로그램을 이용하여 비교하였다.

**계피 메탄올 추출** 공시 시료로 녹나무과 육계피 (*Cinnamomum cassia*, China)분말 50 g을 80% MeOH (v/v) 200 mL에 넣어 24시간 암실에서 추출한 후 추출액을  $40^{\circ}\text{C}$ 에서 감압농축 (Büchi, Rotavapor R-200, swiss)하여 계피 조추출물 5 g을 얻었다.

### 살선충 활성 실내 검정

**선충포식곰팡이 단독 처리구** 배지조건에 따른 선충포식곰팡이의 포식능을 평가하기 위해 분리한 곰팡이를 NB, PDB, YMB 배지에 접종하여  $25^{\circ}\text{C}$ , pH 6 조건에서 7일간 진탕배양 또는 정치배양 하였다. Micro well plate의 각 well당 선충 200마리를 넣은 후 각 배지별로 배양된 곰팡이를 100, 500, 1,000, 2,000, 5,000  $\text{mL L}^{-1}$ 의 농도로 3반복 접종하여 24, 48, 72, 168시간 후의 살선충율을 측정하였다. 살선충율은 치사 선충수 / 전체 선충수  $\times 100$  (%)로 계산하였다.

Collagenase 생성균 단독 처리구 선발된 총 10종의 collagenase 생성균주를 YMB (pH 6)배지에 접종하여 30°C에서 48시간 진탕배양 (150 rpm)한 후 선충 200마리가 있는 각 well에 세균 배양액을 5,000 mL L<sup>-1</sup>와 10,000 mL L<sup>-1</sup> 농도로 각각 첨가하여 상기 1항과 같이 시간에 따른 살선충 활성을 관찰하였다.

선충포식곰팡이와 collagenase 생성균 혼합처리구 선충포식곰팡이와 collagenase 생성균을 함께 처리 했을 때의 살선충 효과를 검토하기 위하여 선발한 세균 배양여액을 멸균한 0.2 µm membrane filter를 이용하여 여과하였다. 각 well당 선충 200마리를 넣은 후 상기 1항에서 처럼 배지 종류별로 배양된 곰팡이를 5,000 mL L<sup>-1</sup>의 농도로 접종한 후, 이어서 collagenase 생성균주의 배양 여과액을 0, 5,000, 10,000, 20,000 mL L<sup>-1</sup> 농도로 추가 접종하여 동일방법으로 시간에 따른 선충 포획율을 측정하였다.

#### 계피 메탄올 추출물과 미생물 혼합처리 효과 비교

계피 메탄올 추출물 처리구 계피 추출물의 살선충 활성 비교는 80% MeOH 계피추출물을 멸균수를 이용하여 10, 20, 50, 100, 500, 1000 mg L<sup>-1</sup> 농도로 희석하여 동일 방법으로 살선충 효과를 검토하였다.

계피추출물과 선충포식곰팡이 혼합 처리구 계피추출물과 선충포식곰팡이 혼용 시의 살선충 효과 검증은 선충 포식곰팡이 배양액 5,000 mL L<sup>-1</sup>에 계피 추출물 10, 20, 50, 100 mg L<sup>-1</sup>을 첨가하여 동일방법으로 측정하였다.

계피추출물, 선충포식곰팡이, collagenase 생성균의 혼합 처리구 복합미생물과 계피추출물 혼합처리구의 살선충효과 비교는 선충포식곰팡이와 collagenase 생성균 배양액을 각각 5,000 mL L<sup>-1</sup>의 농도로 선충 200마리에 접종한 후, 추가로 계피 추출물 10, 20, 50, 100 mg L<sup>-1</sup> 농도로 첨가하여 같은 방법으로 측정하였다. 이상의 활성비교를 위한 대조약제로는 선충탄 (Fosthiazate) 100, 250, 500, 1,000 mg L<sup>-1</sup>과 님오일 500, 1,000, 2,000 mL L<sup>-1</sup>을 사용하였다.

## 결 과

**뿌리혹선충의 분리 및 동정** 경상북도 성주군 및 충청남도 공주시 시설재배지 토양에서 분리한 2령 선충의 유충을 광학현미경 ×160, ×250, ×400 하에서 관찰한 결과 유충의 길이는 약 350~400 µm 꼬리부분의 길이는 40~50 µm, 구침의 길이는 10~11 µm 이다. 형태적으로는 머리부

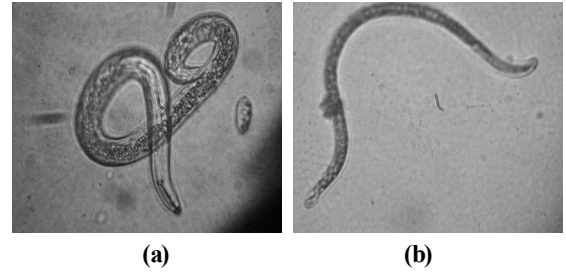


Fig. 1. Observation of *Meloidogyne incognita* by optical microscope (a) ×400 and (b) ×160.

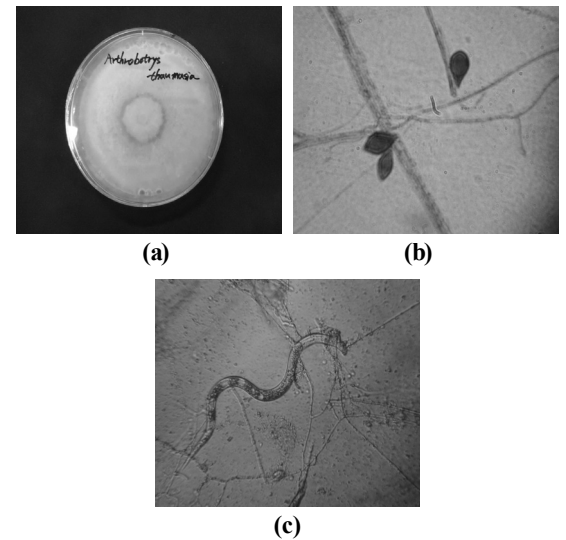


Fig. 2. (a) Morphological characterization of *Arthrobotrys thaumasia* Nema-1. (a) shape of hypha, (b) shape of conidia (×250), (c) nematode trapping by hypha of Nema-1 (×160).

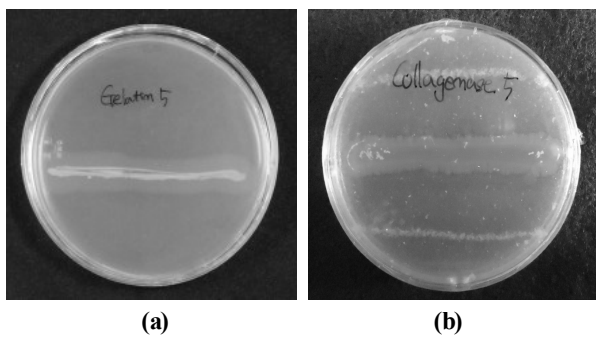
분은 넓고, 몸통과 구획되어 있지 않으며, 꼬리는 가늘어지면서 뾰족한 구조를 가지고 있다. 이러한 형태적인 측면으로 보았을 때 *Meloidogyne incognita*로 동정되었다 (Fig. 1).

**선충포식곰팡이의 분리와 배양** 항생제를 첨가한 PDA배지에서 20균주를 순수분리한 후 96 well plate에서 선충포식능력이 가장 우수한 곰팡이 Nema-1을 선발하여 18S rDNA의 ITS1과 ITS4 염기서열을 비교한 결과, *Arthrobotrys thaumasia*와 98%의 상동성을 보여 *Arthrobotrys thaumasia* Nema-1으로 동정되었다. *A. thaumasia* Nema-1의 형태적 특징은 균사의 지름은 2~8 µm이고, 총맥은 양털모양이며 색깔은 흰색이었다 (Fig. 2a). Fig. 2b처럼 분생포자병의 형태는 비측쇄형으로 길이는 250~450 µm, 기저부 지름은 4~8 µm, 말단부 지름은 1.5~3 µm, 말단형태는 팽창한 형태 (swollen)이었고, 또한 분생포자의 형태는 서양배 모양으로 크기는 30~45 µm × 15~20 µm, 격막은 1~4개, 격막위치는 5, 12, 85%, 분생포자 개수는 1~3개이고, 포식기관의 구조는 3차원 끈끈이 그물 구조로 선충을 포식하

**Table 1. Growth effect of *A. thaumasia* Nema-1 hypae based on the culture conditions.**

Treatment <sup>†</sup>	Weight <sup>‡</sup> (g L <sup>-1</sup> )							
	0 hr	24 hr	48 hr	72 hr	96 hr	120 hr	144 hr	168 hr
N-NB	0.14	1.05	3.95	5.95	8.50	9.50	9.55	9.57
N-PDB	0.16	1.24	4.25	6.33	9.20	10.11	10.15	10.20
N-YMB	0.17	1.30	4.50	6.55	9.85	10.55	10.60	10.70
S-NB	0.15	1.20	3.95	5.98	8.70	9.75	9.80	9.90
S-PDB	0.16	1.25	4.30	6.42	9.35	10.25	10.30	10.32
S-YMB	0.21	1.35	4.88	6.86	9.97	10.85	10.90	10.92

<sup>†</sup>N-: non-shaking incubation; S-: shaking incubation. <sup>‡</sup>The dry weight of *A. thaumasia* Nema-1 hypae was estimated after culturing in each culture conditions.



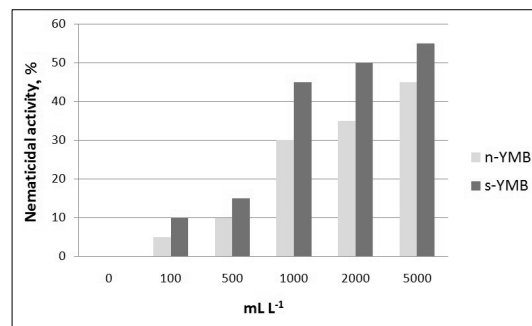
**Fig. 3. Hydrolysis activity of gelatin (a) and collagen (b) by *Pseudomonas putida* C-5.**

였다 (Fig. 2c). *Arthrobotrys* sp.의 성장특성은 온도 25°C, pH 6에서 최적조건으로 알려져 있어 (Lee, 2003) 동일조건에서 Nema-1의 배지종류별 성장 특성을 비교한 결과, YMB에서 배양 7일 이후 건조중량이 PDB 보다는 약 6%, NB 배양체에 비해서는 약 10% 수준으로 증가함을 보였다. 또한 배양방식의 경우 배양 7일 후 까지 정치배양보다 진탕배양 시 배양체 건조중량이 약 2% 높은 결과를 보였다 (Table 1).

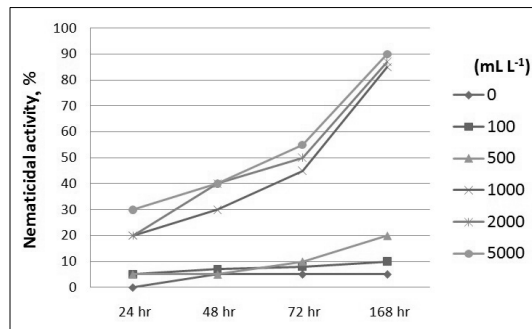
**Collagenase 생성균 분리과 배양** NSKA 배지 상에서 단백질 분해능이 우수한 10개 균주를 1차 선발하여 선충 표피 구성성분인 collagen과 알집의 구성성분인 gelatin 분해능이 우수한 균을 halozone 크기로 확인하였다 (Fig. 3). 이 중 gelatin과 collagen 기질 모두에 분해활성이 나타낸 C-5를 최종 선발하여 16s rDNA 염기서열을 비교한 결과 C-5 균주는 *Pseudomonas putida*와 99%의 상동성을 보였다. 분리균 C-5의 생육은 Nema-1과 같이 YMB배지에서 가장 생육이 우수하였으며 48시간 배양시의 생균수는 2.0 × 10<sup>6</sup> cfu mL<sup>-1</sup> 수준이었다 (data not shown).

**살선충 활성 실내 검정**

선충포식공팡이 단독처리구 *A. thaumasia* Nema-1의 최적배지인 YMB 배지에서 배양방법에 따른 배양액의



**Fig. 4. Comparison on the nematocidal activity of *A. thaumasia* Nema-1 based on the culture method. The nematocidal activity was assayed 72 hr after culture at 25°C. n-: non-shaking incubation, s-: shaking incubation.**



**Fig. 5. Comparison on the nematocidal activity of *A. thaumasia* Nema-1 based on the inoculating concentration. The nematocidal activity was assayed at 25°C for 7 days after inoculating the shaking culture of Nema-1.**

농도별 살선충활성을 비교한 결과, 5,000 mL L<sup>-1</sup> 농도에서 정치배양액은 45%, 진탕배양액은 55%의 활성 차이를 보였다 (Fig. 4). 또한 동일배지에서 배양시간별 진탕배양액의 살선충 활성은 500 mL L<sup>-1</sup> 이하의 농도에서는 배양 168시간 까지 20%이하의 낮은 수준이었지만, 1,000 mL L<sup>-1</sup>의 농도로 접종된 처리구에서 24시간 경과 후에는 살선충율이 20% 정도에서 72시간 경과후에는 45%, 168시간 경과 후에는 85%까지 상승하는 결과를 보였다 (Fig. 5). 이 결과는 선충포식공팡이의 진탕배양 시 군사 말단에서 생성되

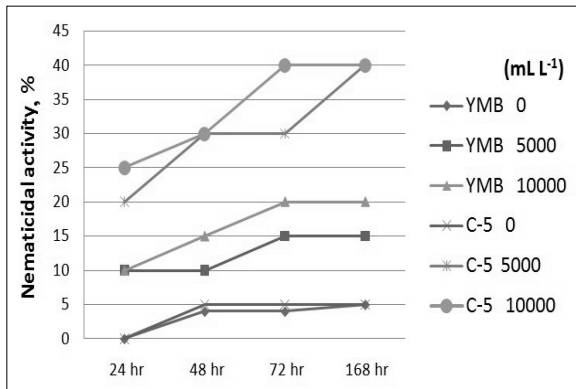


Fig. 6. Comparison on the nematicidal activity of *P. putida* C-5 based on the inoculating concentration. The nematicidal activity was assayed at 25°C for 7 days after inoculating the shaking culture of C-5.

는 protease와 같은 2차 대사산물의 생성이 촉진되어 균사의 선충 내 침입이 용이해지기 때문이라 여겨지며 (Tunlid et al., 1991), 선충포식곰팡이는 균사에서 생성되는 끈끈이 봉 및 끈끈이 그물을 이용하여 선충을 포식하기 때문에 균사생장이 살선충 활성에 큰 영향을 미친다. 따라서 Nema-1에 의한 살선충효과는 균사생장을 위해 적어도 3일 이상의 배양기간이 요구된다는 결과를 나타내었다.

**Collagenase 생성균주 단독처리구** 선충 표피 및 알집구성성분인 collagen과 gelatin 분해능이 우수한 *P. putida* C-5의 살선충 효과를 확인하기 위하여 YMB에서 48시간 배양한 배양액을 농도별 (5,000 mL L<sup>-1</sup>과 10,000 mL L<sup>-1</sup>)로 선충에 접종하여 시간에 따른 살선충율을 조사하였다. 접종 후 72시간에는 5,000 mL L<sup>-1</sup>에서는 30%, 10,000 mL L<sup>-1</sup>에서는 40%의 살선충활성을 보였으나, 168시간 후에는 두 농도 간 차이가 없었다 (Fig. 6). 배지성분이 선충의 치사에 영향을 미치는지를 확인한 결과 YMB 10,000 mL L<sup>-1</sup>에서 약 20%의 치사효과를 나타냄으로서 실제 C-5에 의한 살선충 효과는 20% 정도임을 알 수 있었다. 이러한 결과는 Nema-1 곰팡이 처리구에 비해 C-5가 상대적으로 낮은 살선충 활성을 보여줌으로서 C-5 세균 배양액에 의한 살선충 효과를 증진시키기 위해서는 식물추출물이나 곰팡이를 함께 이용하는 방법에 관한 실험이 필요하다고 판단되었다.

**선충포식곰팡이와 collagenase 생성균 혼합처리구** 선충포식곰팡이 Nema-1과 collagenase 생성균 C-5를 함께 처리했을 때의 살선충효과를 확인하였다. Nema-1 5,000 mL L<sup>-1</sup>만을 단독처리 시 72시간 경과후의 살선충율은 55%이었지만, 동일 농도로 Nema-1과 C-5 혼합처리구는 65%, 또한 Nema-1 5,000 mL L<sup>-1</sup>와 C-5 10,000 mL L<sup>-1</sup> 혼합 처리구에서는 70%로 단독처리구 보다 혼합처리 시 약 10%이

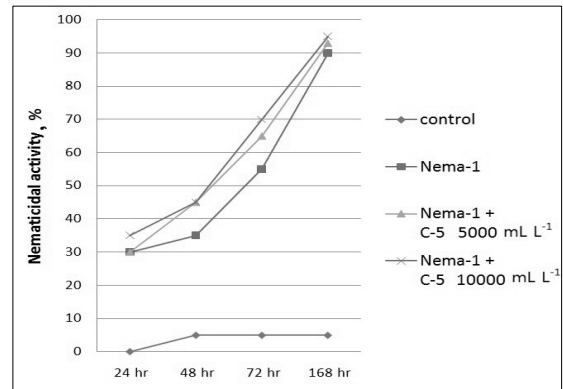


Fig. 7. Comparison on the nematicidal activity of *P. putida* C-5 based on the inoculating concentration. The nematicidal activity was assayed at 25°C for 7 days after inoculating the shaking culture of C-5.

상의 살선충 상승효과를 나타냈다 (Fig. 7). 이는 C-5균주가 생성하는 단백질분해 효소가 선충 표피를 일부 분해하여 균사의 선충 내 침입을 도와주는 결과로 생각된다.

#### 계피 메탄을 추출물과 미생물 혼합처리 효과 비교

**계피 메탄을 추출물 처리구** 계피 추출물 중 cinnamic aldehyde 또는 cinnamic acid 성분의 살선충 활성이 보고되어 있어 (Chanh, 2010), 80% MeOH 추출물의 농도별 살선충 활성을 실험한 결과, 접종 72시간 경과 후 20 mg L<sup>-1</sup> 이하의 농도 처리구에서는 12% 이하의 낮은 선충치사 효과를 보였으나, 50 mg L<sup>-1</sup> 처리구는 86%, 100 mg L<sup>-1</sup> 처리구는 100%의 강한 살선충 활성을 나타냄으로서 미생물과 혼용 시 살선충 효과를 증진시킬 수 있는 식물추출물로 판단되었다 (Table 2).

**계피추출물과 선충포식곰팡이 혼합 처리구** 선충포식곰팡이를 이용한 선충방제법의 가장 큰 단점은 곰팡이의 균사 성장 속도가 늦기 때문에 적어도 76시간 경과 후이나 방제효과를 나타낼 수 있다. 따라서 초기의 방제 효율을 높여주는 물질의 첨가가 필요하므로 살선충활성이 높은 계피추출물을 적용하면 선충포식곰팡이의 단점을 보완해줄 수 있으리라 기대되어 Nema-1 배양액 5,000 mL L<sup>-1</sup>와 계피추출물 50 mg L<sup>-1</sup> 혼합 처리 시의 살선충효과를 비교한 결과, 살선충율은 24시간 경과 후에는 86%, 72시간 경과 후에는 88%, 168시간 경과 후에는 96%로 Nema-1 단독처리구보다 약 10% 이상 살선충효과를 높여주었다 (Table 2).

**계피추출물, 선충포식곰팡이, collagenase 생성균의 혼합 처리구** 곰팡이 Nema-1균주와 세균 C-5균주가 계피추출물 100 mg L<sup>-1</sup> 이하의 농도에서 생존이 가능한 것을 확인한 후 계피추출물, 곰팡이와 세균을 혼합하여 농도와 시간에 따른 살선충 효과를 검토하였다. 계피추출물 50 mg

**Table 2. Nematicidal effect of the mixture of *A. thauwasia* Nema-1, *P. putida* C-5 and cinnamon extract.**

Treatment <sup>†</sup>	Dilution (mg L <sup>-1</sup> )	Nematicidal activity (%) ± SD <sup>‡</sup>			
		24 hr	48 hr	72 hr	168 hr
Cinnamon extract	0	0	5 ± 2.1	5 ± 2.3	5 ± 2.7
	10	5 ± 2.1	5 ± 2.4	5 ± 2.3	8 ± 2.9
	20	7 ± 2.5	8 ± 2.8	12 ± 2.7	20 ± 3.1
	50	85 ± 3.4	85 ± 3.1	86 ± 3.7	88 ± 3.7
	100	100	100	100	100
Cinnamon extract +Nema-1	0	31 ± 3.5	43 ± 3.9	62 ± 3.9	91 ± 3.8
	10	34 ± 4.1	43 ± 3.8	63 ± 4.0	93 ± 3.7
	20	35 ± 4.9	45 ± 3.8	63 ± 4.3	93 ± 4.7
	50	86 ± 4.7	87 ± 4.2	88 ± 4.8	96 ± 5.1
	100	100	100	100	100
Cinnamon extract +Nema-1 +C-5	0	33 ± 4.1	47 ± 4.6	64 ± 4.3	92 ± 3.9
	10	34 ± 4.8	48 ± 4.9	65 ± 4.8	94 ± 3.8
	20	36 ± 4.6	48 ± 4.3	72 ± 4.5	95 ± 3.9
	50	88 ± 3.7	88 ± 3.3	89 ± 3.4	98 ± 3.7
	100	100	100	100	100
Fosthiazate	0	0	5 ± 2.8	5 ± 2.6	5 ± 2.9
	20	0	5 ± 2.4	5 ± 2.3	5 ± 2.8
	50	11 ± 3.5	15 ± 3.2	17 ± 3.8	21 ± 4.3
	100	25 ± 3.7	100	100	100
	500	100	100	100	100
Neem oil	0	0	5 ± 2.1	5 ± 2.1	5 ± 2.1
	100	5 ± 4.3	7 ± 4.8	11 ± 4.2	16 ± 3.9
	500	7 ± 4.9	29 ± 5.6	32 ± 5.3	35 ± 5.4
	1000	13 ± 4.2	31 ± 5.3	36 ± 5.5	38 ± 4.9
	2000	53 ± 5.8	56 ± 5.7	57 ± 5.1	59 ± 6.0

<sup>†</sup>Nema-1 5,000 mL L<sup>-1</sup> and C-5 5,000 mL L<sup>-1</sup> was used with each concentration of cinnamon extract to compare the nematicidal effect. <sup>‡</sup>Data represents the mean ± standard deviations of three replications.

L<sup>-1</sup>과 Nema-1 또는 C-5 각각 5,000 mL L<sup>-1</sup> 혼합처리구에 살선충율은 24시간 경과 후 88%, 72시간 경과 후 89%, 168시간 경과 후 98%로 4-2항의 계피추출물과 Nema-1 처리구에 비해 다소 높았으나 큰 차이가 없었다 (Table 2). 이상의 계피추출물은 물론 미생물들과 혼용처리 한 결과는 대조약제로 사용한 대표적 유기합성 살선충제인 선충탄 (Fosthiazate) 50 mg L<sup>-1</sup>의 72시간 경과 후 살선충율 17%, 친환경성분인 님오일 2,000 mL L<sup>-1</sup>의 57% 보다 높은 약 89% 이상의 살선충 활성을 나타냄으로서 효과적인 생물학적 방제제로의 가능성을 제시하였다 (Table 2).

## 고 찰

지금까지 뿌리혹선충 방제를 위하여 살선충 미생물과 식물추출물을 이용한 생물 방제제가 제품으로 출시되었지만, 유기합성 농약의 효과에 비해 상대적으로 효과가 적어 친환경 방제제로서의 활용도가 낮았다. 본 연구를 통해 보다 효과적인 생물학적 살선충제를 개발하기 위하여 국내 시설배지 토양으로부터 선충포식성 곰팡이 *Arthrobotrys thauwasia* Nema-1을 분리하고, 살선충곰팡이의 포식기관에서는 선충

을 포획하고 침입할 수 있도록 collagenase와 gelatinase 등 다양한 protease를 생성하여 선충의 치사를 돕는다는 보고 (Tunlid et al., 1991)에 근거하여 collagen 분해균 *Pseudomonas putida* C-5와 살선충효과가 알려진 계피추출물의 혼용 시 살선충활성의 상승효과를 함께 비교하였다. 포식성곰팡이 Nema-1의 생육 및 살선충 활성은 YMB 배지에서 진탕배양 시 NB나 PDB 배지에서 정체배양 보다 높아 배지조건에 따라 영향이 있음을 확인 하였다. 분리균에 의한 살선충효과는 Nema-1 단용 미생물로 사용하는 것보다 C-5균주를 혼용 사용 시 활성이 증진되는 결과를 보였는데 이는 C-5에 의해 생성된 collagenase 및 gelatinase가 선충포식성 곰팡이 Nema-1의 선충내 침투력을 향상시킨 결과로 요인으로 보여진다. 또한 살선충효과가 우수하다고 알려진 계피추출물을 첨가한 Nema-1과 C-5 혼합물을 사용 시에는 처리 후 24시간 이후 부터 85% 이상의 선충치사 효과를 보임으로서 미생물과 식물추출물을 함께 사용하는 복합제 형태가 생물학적 선충방제로서 더 효과적일 수 있다는 가능성을 제시하였다. 현재 이들 곰팡이 Nema-1균주와 세균 C-5균주, 계피 추출물을 이용한 뿌리혹선충 감수성 토마토 품종을 이용하여 포트실험 및 포장실험을 진행하고 있으며, 차후 선발된 *Arthrobotrys thauwasia* Nema-1의 선충포식능

에 관한 추가실험과 단백질 분해능이 우수한 *Pseudomonas putida* C-5균주에서 collagenase를 분리, 정제와 분리된 효소의 대량생산을 위해 유전자 복제 기술을 이용한 gene cloning 실험을 계획하고 있다.

## 요 약

친환경 선충 방제제 개발을 위해 경북 성주군 선남면 및 충남 공주시 우성면의 시설원에 재배지 토양으로부터 선충 포식성이 뛰어난 곰팡이 *Arthrobotrys thaumasias* Nema-1과 선충 표피성분인 collagen과 알집 주성분인 gelatin 분해능이 뛰어난 *Pseudomonas putida* C-5를 분리 하였다. 이들 분리균의 선충치사 효과를 검토한 결과, *A. thaumasias* Nema-1 곰팡이 배양액 5,000 mL L<sup>-1</sup>을 처리 시 방제효과는 72시간 후에 55%이었으나, 포식성 곰팡이 Nema-1과 *P. putida* C-5 세균 배양액 각각 5,000 mL L<sup>-1</sup> 혼합 처리구에서는 65%로 상승하였다. 또한 선충치사효과를 증진시키기 위하여 살선충 활성이 있다고 보고된 계피추출물 50 mg L<sup>-1</sup>을 5,000 mL L<sup>-1</sup>의 Nema-1과 C-5 배양액과 혼합하여 처리 하였을 때 72시간 경과 후의 치사율은 89%로 상승되었으며, 대표적 살선충제인 선충탄 (Fosthiazate) 50 mg L<sup>-1</sup>의 방제가 17%와 님오일 2,000 mL L<sup>-1</sup>의 방제가 57% 보다 훨씬 높은 수준이었다. 이상의 결과는 생물학적 선충방제제는 미생물 또는 식물체 추출물 단계 보다는 혼합물 형태로 사용하는 것이 더 효과적이라는 결과를 제시하였다.

## 인 용 문 헌

Abo-Elyousr, K.A., Z. Khan, M.E. Award, and M.F. Abedel-Moneim. 2010. Evaluation of plant extracts and *Pseudomonas* spp. for control of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on tomato. *Nematropica*. 40(2):289-299.

Anke, H., M. Stadler, A. Mayer, and O. Sterner. 1995. Secondary metabolites with nematicidal and antimicrobial activity from nematophagous fungi and Ascomycetes. *Can. J. Bot.* 73:932-939.

Balan, J., L. Križžkova, P. Nemeč, and V. Voller. 1974. Production of nematode-attracting and nematicidal substances by predaceous fungi. *Folia Microbiol.* 19:512-519.

Barron, G.L. and R.G. Thorn, 1987. Destruction of nematodes by species of *Pleurotus*. *Can. J. Bot.* 65:774-778.

Braga, F.R., A.R. Silva, R.O. Carvalho, J.V. Araújo, P.H.G. Guimarães, R.T. Fujiwara, and L.N. Frassy. 2010. In vitro predatory activity of the fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium*, *Monacrosporium sinense* and *Arthrobotrys robusta* on *Ancylostoma ceylanicum* third-stage larvae. *Vet. Microbiol.* 146:183-186.

Chanh, N.D.M. 2010. Nematicidal activity of compounds extracted from cinnamomum cassia against root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. M.S. Thesis, Chonnam National University, Gwangju, Korea.

Cho, C.H., D.S. Kang, Y.J. Kim, and K.S. Hwang. 2008. Morphological and phylogenetic characteristics of a nematophagous fungus, *Drechslerella brochopaga* Kan-23. *Kor. J. Microbiol.* 44(1):63-68.

Choi, Y.H., 1982. *phytonematology* p. 58-69. Hyang-moon-sa, Korea.

Huang, Y., C.K. Xu, L. Ma, K.Q. Zhang, C.Q. Duan, and M.H. Mo. 2010. Characterization of volatiles produced from *Bacillus megaterium* YFM3.25 and their nematicidal activity against *Meloidogyne incognita*. *J. Plant Pathol.* 126(3):417-422.

Karpouzias, D.G., P. Hatziapostolou, E. Papadopoulou-Mourkidou, I.O. Giannakou, and A. Georgiadou. 2004. The enhanced biodegradation of fenamiphos in soils from previously treated sites and the effect of soil fumigants. *Environ. Toxicol. Chem.* 23(9):2099-2107.

Kim, J.H., S.M. Seo, and I.K. Park. 2011. Nematicidal activity of plant essential oils and components from *Gaultheria fragrantissima* and *Zanthoxylum alatum* against the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Nematology* 13(1):87-93.

Lee, J.G. 2003. Occurrence, ecology and control of root-knot nematodes under greenhouse cultivation system. Ph.D. Thesis, Chungnam National University, Daejeon, Korea.

Olthof, T.H.A. and R.H. Estey. 1963. A nematotoxin produced by the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora* Fresenius. *Nature*. 197:514-515.

Stadler, M., H. Anke, and O. Sterner. 1993. Linoleic acid-the nematicidal principle of several nematophagous fungi and its production in trap-forming submerged cultures. *Arch. Microbiol.* 169:401-405.

Taylor, A.L. and J.N. Sasser. 1978. Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* Species). North Carolina State Univ. Graphics, North Carolina, p. 111.

Tunlid, A. and S. Jansson. 1991. Proteases and their involvement in the infection and immobilization of nematodes by the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2868-2872.

Tunlid, A., H.B. Jansson, and H.B. Nordbring. 1992. Fungal attachment to nematodes. *Mycol Res.* 96(6):401-412.

Veenhuis, M., W.C. Van, U. Wyss, and H.B. Nordbring. 1989. Significance of electron dense microbodies in trap cells of the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Antonie van Leeuwenhoek.* 56:251-261.

Veenhuis, M.W. Harder, and H.B. Nordbring. 1989. Occurrence and metabolic significance of microbodies in trophic hyphae of the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*.

- Antonie van Leeuwenhoek.56:241-249.
- Viglierchio, D.R. and R.V. Schmitt. 1983. On the methodology of nematode extraction from field samples: Baermann Funnel Modifications. J. Nematol. 15(3):438-444.
- Zhang, Y., M. Qiao, E. Weber, H.O. Baral., G. Hagedorn, K. Zhang., and Z. Yu. 2010. *Arthrobotrys scaphoides* from China and Europe with a phylogenetic analysis including the type strain. Mycotaxon. 111:291-300.