

분자기법을 이용한 과채류 시설재배지 토양 내 분포하는 뿌리혹선충의 종 동정

김세종 · 유용만¹ · 황경숙*

목원대학교 미생물나노소재학과, ¹충남대학교 농업생명과학대학 응용생물학과

Molecular Identification of *Meloidogyne* spp. in Soils from Fruit and Vegetable Greenhouses in Korea

Se-Jong Kim, Yong-Man Yu¹ and Kyung-Sook Whang*

Department of Microbial & Nano Materials, Mokwon University, Daejeon 302-729, Republic of Korea

¹Department of Applied Biology, College of Agriculture & Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Republic of Korea

ABSTRACT: In this study, we analyzed the phylogenetic characterization of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in soils from fruits and vegetables greenhouses in Korea. Soil samples were collected from 12 greenhouse fields in which tomato, cucumber, watermelon, and Oriental melon were being cultivated. *Meloidogyne* spp. were detected in all the soil samples at an average number of 72 ± 6 nematodes/300 g of soil to $2,898 \pm 468$ nematodes/300 g of soil. Phylogenetic analysis using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism was attempted for the second-stage juveniles (J2) of *Meloidogyne* spp. collected from the greenhouse soils. Twelve *Meloidogyne* spp. from the greenhouse soils were classified into two groups by using *Hinf*I digestion of mitochondrial DNA, resulting in 900, 410, 290, and 170 bp fragments (group A) and 900, 700, and 170 bp fragments (group B). Phylogenetic analysis based on mitochondrial DNA sequences (1,483–1,521 bp) showed that nine group A isolates were identified as *Meloidogyne incognita* (99.73–99.93%) and three group B isolates showed 99.54–99.73% similarity to *Meloidogyne arenaria*.

Key words: Greenhouse soil, Root-knot nematode, PCR-RFLP, *Meloidogyne incognita*

조 록: 국내 과채류 시설재배지 토양 내 분포하는 뿌리혹선충의 계통학적 특성을 조사하였다. 토마토, 오이, 수박, 참외를 재배하는 12개 과채류 시설재배지 토양 내 뿌리혹선충의 밀도를 조사한 결과, 모든 시설재배지 토양에 광범위하게 분포하였으며 토양 300 g 당 평균 $72 \pm 6 \sim 2,898 \pm 468$ 마리로 검출되었다. 시설재배지 토양에서 수집한 뿌리혹선충 2령 유충을 대상으로 PCR-RFLP 계통분석을 수행하였다. 시설재배지 토양에서 분리한 12개 뿌리혹선충의 mtDNA PCR 증폭산물을 대상으로 제한효소 *Hinf*I을 처리한 결과 900, 410, 290 및 170 bp의 DNA 절편 양상을 나타내는 Group A와 900, 700 및 170 bp의 DNA 절편 양상을 나타내는 Group B로 분류되었다. 각 그룹에 속하는 뿌리혹선충의 mtDNA 유전자 염기서열(1,483~1,521 bp)을 결정하여 계통분석한 결과, Group A에 속하는 9개의 뿌리혹선충은 고구마뿌리혹선충(*Meloidogyne incognita*)과 99.73~99.93%의 상동성을 나타내었고 그리고 Group B에 속하는 3개의 뿌리혹선충은 땅콩뿌리혹선충(*Meloidogyne arenaria*)과 99.54~99.73%의 상동성을 나타내어 유사한 종으로 확인되었다.

검색어: 시설재배지 토양, 뿌리혹선충, 유전자 다형성 연구기법, 고구마뿌리혹선충

식물기생선충 중 피해가 가장 심각한 것으로 알려진 뿌리혹선충(*Meloidogyne* spp.)은 1850년대 영국의 온실에서 재배중

인 오이 뿌리혹에서 최초로 발견되어진 이래 현재 전 세계적으로 90종 이상이 보고되었다(Perry et al., 2009). 뿌리혹선충은 온도에 대한 적응력이 높아 분포가 매우 광범위하나 주로 한대 지방보다는 온도가 높은 아열대지방에서 피해가 심한 것으로 보고되고 있다(Kim et al., 1998). 뿌리혹선충은 토양에 서식하면서 식물 뿌리에 침입하여 뿌리 내부에 기생하며 영양분을 흡

*Corresponding author: kswhang@mokwon.ac.kr

Received July 30 2013; Revised September 16 2013

Accepted October 7 2013

수하고 혹(gall)을 형성한다. 뿌리에 혹이 형성된 식물은 토양으로부터 수분과 양분의 흡수가 저하되고 영양결핍 증상이 나타나게 된다. 식물 지상부의 잎에서는 황화현상과 잎마름 증상이 나타나고 심할 경우 고사되며 각종 토양 병해와의 상호작용으로 2차적인 피해를 일으키는 것으로 알려져 있다(Shurtleff and Averre, 2000). 뿌리혹선충은 주로 노지나 시설재배지의 수박, 참외, 오이, 토마토, 멜론 등의 과채류와 당귀, 더덕, 인삼, 천궁과 같은 약용식물 등 넓은 범위의 경제작물에 큰 피해를 일으키고 있다(Choo et al., 1987; Lim et al., 2005). 농림축산식품부에 등록된 2011년도 통계자료에 의하면 국내에서 재배되고 있는 채소류의 재배면적(260,507 ha) 중 과채류의 재배면적은 54,012 ha로써 그 중 약 80%를 차지하는 43,664 ha가 시설재배를 하고 있다. 최근 시설재배 면적이 증가되면서 겨울 동안에도 연작 재배함으로써 아열대 지방에 적응하는 뿌리혹선충의 발생이 심하고 피해가 급증하고 있다.

국내에서 보고된 뿌리혹선충으로는 시설재배지에서 고구마 뿌리혹선충(*M. incognita*), 땅콩뿌리혹선충(*M. arenaria*), 자바뿌리혹선충(*M. javanica*), 당근뿌리혹선충(*M. hapla*)의 피해가 큰 것으로 보고되고 있으며, 그 외에 잔디뿌리혹선충(*M. marylandi*)과 양다래에서 분포가 확인된 *M. cruciani* 그리고 기주식물이 확인되지 않은 *M. hispanica* 등 7종의 뿌리혹선충이 보고되어 있다(Cho et al., 2000; Kang et al., 2002). 이들 뿌리혹선충의 분류 및 동정은 형태학적 특성과 암컷의 perineal 패턴 그리고 기주판별법이 주로 사용되고 있으나 뿌리혹선충의 동정에 많은 시간과 노력이 요구되며 종 동정에 많은 문제점이 제기되고 있다.

최근, 뿌리혹선충의 분류와 동정을 위해 이러한 문제점을 극복하고 정확한 동정을 위한 방법으로 유전자 염기서열 분석을 통한 동정법과 효소표현형을 이용한 동정법이 개발되어 널리 이용되고 있다. 선충에 대한 계통 연구에는 ribosomal DNA인 18S와 28S, internal transcribed spacer 1, 2 (ITS1, ITS2), intergenic spacer (IGS) 유전자와 모계 유전이 되는 미토콘드리아 단백질 암호 유전자 부위인 mitochondrial cytochrome c oxidase (COI, COII)의 유전자 염기서열을 분석하여 개체 간 다형성뿐만 아니라 종 분류 및 진단 연구에 많이 사용되어(Ferris et al., 1993; Hyman, 1996; Powers et al., 1997; Blaxter et al., 1998), 현재 NCBI GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에 뿌리혹선충 45종의 유전자 염기서열이 등록되어 있다. 특히 선충의 분류와 동정을 위한 유전자 다형성 연구기법 [Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Single Stranded Conformational Polymorphism (SSCP) 및 DNA 염기서열 해

석] 중 PCR-RFLP법은 현재에도 가장 널리 쓰이는 방법으로 국내에서는 고구마뿌리혹선충, 땅콩뿌리혹선충 그리고 당근 뿌리혹선충을 동정한 바 있으며(Han et al., 2004), 일본에서는 자국에서 분리한 10여종의 뿌리혹선충을 PCR-RFLP 방법을 이용하여 동정한 바 있다(Orui, 1998). 또한 PCR-RFLP 방법은 식물기생선충 중에서도 가장 피해가 심각한 뿌리혹선충의 주요 4종 뿐만 아니라 *Heterodera*, *Heterorhabditis*, *Globodera*, *Radopholus*, *Belonolaimus* 그리고 *Anguina* 등의 ribosomal DNA를 이용한 다양한 선충의 분류 및 동정에 사용된 바 있다(Harris et al., 1990; Powers and Harris, 1993; Joyce et al., 1994; Fallas et al., 1996; Orui, 1996; Cherry et al., 1997; Szalenski et al., 1997; Blok et al., 1998; Powers et al., 2001).

채소류 재배면적의 대부분을 차지하는 시설재배지 뿌리혹선충에 의한 피해에 대한 종합적인 방제대책 수립을 위해서는 지역별 또는 작물별 시설재배지 단지에 분포하는 뿌리혹선충의 정확한 분류와 동정 필요성이 제기되고 있다. 본 연구에서는 국내 주요 시설재배 작물인 토마토, 오이, 수박, 참외 시설재배지 토양에 분포하는 주요 뿌리혹선충(*Meloidogyne* spp.)의 계통분류를 위하여 각 토양으로부터 분리된 뿌리혹선충을 PCR-RFLP 분자기법에 의거하여 계통해석하였다.

재료 및 방법

뿌리혹선충 이병토양 시료채취

뿌리혹선충에 의해 피해가 심각한 토마토, 오이, 수박, 참외 시설재배지에서 근권토양 시료를 2011년 3월 ~ 2012년 3월에 수집하였다. 토마토 작물은 춘천, 연기, 공주의 시설재배지 토양에서 채취하고, 오이 작물은 여주, 평택, 연기에서 채취하였다. 수박 작물은 논산에서 채취하였으며 참외 작물은 성주에서 채취하였다. 토양시료는 각 시설재배지별로 식물체 뿌리를 뽑아 뿌리혹선충의 감염상태를 육안으로 확인하고 뿌리혹이 다량으로 형성된 주변의 근권토양을 토양 채집기를 이용하여 2~3 m 간격으로 약 200 g씩 10 지점에서 약 1 kg 이상 채취하여 실험실로 운반한 후 4°C 냉장고에 보관하면서 토양 내 뿌리혹선충을 분리하는데 사용하였다.

뿌리혹선충 계수 및 분리

뿌리혹선충에 감염된 이병작물의 근권으로부터 채취한 토양 시료를 50 mesh체를 이용하여 유기물, 굵은 자갈 그리고 모래 등의 불순물을 골라내고 잘 혼합한 후 Sive & modified

Baermann funnel method를 이용하여 선충을 분리하였다. 토양 시료 300 g을 정량하여 증류수 3 L에 토양현탁액을 만든 후 200 mesh와 400 mesh체로 순서대로 거른 다음 체에 걸러진 선충을 베르만깔때기법(Baermann, 1917)을 변형한 깔때기법(Hooper, 1990)을 이용하여 48시간 동안 체에 올려둔 다음 선충을 분리하였다. 변형깔때기법으로 분리된 선충을 500 mesh체로 거른 후 15 ml 시험관에 모아 5시간 동안 침전시켰다. 선충의 종 구분과 원활한 계수를 위해 80°C로 가열한 TAF액을 처리하여 선충을 고정시키고 선충을 포함한 침전물 5 ml만 남기고 시험관내 물과 부유물을 제거하였다. 선충 고정액을 micro plate well에 1 ml씩 분주하고 해부현미경(DMIL, Leica) 하에서 50~100배로 확대해 가면서 총 선충수를 조사하고, 식물기생 선충도감(NAAS, 2001)을 참조하여 몸통은 둥글고 머리가 둥근 서양배 모양 또는 돌출된 원형의 형태를 띠며 구침과 구침절구를 지닌 형태학적 특징을 나타내는 선충을 뿌리혹선충으로 선별하여 계수하고 순수분리하였다.

뿌리혹선충 2령 유충으로부터 DNA 추출

뿌리혹선충의 DNA 추출은 Iwahori et al.(2000)가 고안한 파쇄법에 의거하여 수행하였다. 이병토양에서 분리한 뿌리혹선충 2령 유충 한 마리를 slide glass 위에 올려놓고 멸균된 filter paper 조각으로 짓눌러 유충의 체벽을 파괴하여 유출된 세포 구성성분을 문히고 protease K solution (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1% Nonidet p-40, 100 ng/μl Protease K) 5 μl가 담긴 microcentrifuge tube에 넣어 -20°C에서 3시간 동안 보관한 후 65°C 30분, 95°C 35분, 10°C 10분간 처리하여 genomic DNA를 추출하였다.

Mitochondrial DNA 유전자 PCR 증폭

뿌리혹선충 2령 유충 한 마리로부터 추출한 genomic DNA를 대상으로 mitochondrial DNA (mtDNA) 유전자 PCR 증폭을 위하여 Harris et al.(1990)가 제작한 forward primer 5-TAAATCAATCTGTTAGTGAA-3와 reverse primer 5-ATAAACCAGTATTTCAAAC-3를 이용하였다. PCR은 증폭은 0.2 ml PCR 반응 tube에 template DNA 5 μl, forward primer 1.5 μl, reverse primer 1.5 μl, EF-Taq polymerase (Solgent co., Korea) 0.25 μl, dNTP 1 μl, 10 × buffer 5 μl, 5 × band doctor 5 μl, H₂O 30.75 μl를 넣고 혼합한 후 94°C에서 2분간 반응한 다음 94°C에서 denaturation 1분, 48°C에서 annealing 2분, 68°C에서 extension 3분을 35회 반복하고, 72°C에서 5분간 final extension

의 조건으로 PCR 반응을 실시하였다. Thermal cycler는 Perkin Elmer (GeneAmp PCR system 9700, Applied Biosystems)를 이용하였다. Mitochondrial DNA를 확인하기 위해서 PCR 증폭 산물은 0.8% agarose gel, 0.5 × TAE buffer (0.045 M Tris-borate, 0.001 M EDTA)에서 100 V, 25 mA로 30분간 전기영동한 후 ethidium bromide (EtBr)에 15분간 염색하여 UV하에서 증폭 여부를 확인하였다(Gel documentation system, Bio-Rad).

PCR-RFLP band pattern 분석

뿌리혹선충의 종 분류를 위한 PCR-RFLP 분석은 증폭된 PCR 산물 4 μl를 microcentrifuge tube에 넣고 NE buffer 0.5 μl와 제한효소 *Hinf*I 0.5 μl를 넣고 잘 섞은 후 37°C에서 5시간 동안 처리하여 충분한 효소활성 시간을 유지시킨 후 3% polyacrylamide gel, 0.8 × TAE buffer (0.045M Tris-borate, 0.001M EDTA)에서 100 V, 25 mA로 50분간 전기영동한 후 EtBr에 20분간 염색하여 UV하에서 DNA 절편양상을 확인하였다(Gel documentation system, Bio-Rad).

뿌리혹선충의 mtDNA 염기서열 분석 및 계통도 작성

PCR 증폭된 mtDNA는 PCR Purification Kit (Qiagen Inc.)를 이용하여 정제하고 솔젠트(주) sequencing lab에 염기서열 분석을 의뢰하였다. MtDNA 유전자 분석을 통하여 염기서열을 결정된 후 NCBI/GeneBank database의 BLAST program을 이용하여 계통분류학적 유연관계를 분석하였다. 각 염기서열의 상동성은 Clustal X algorithm을 이용하여 병렬로 정렬하였다. 계통수는 Neighbor-Joining method에 의하여 작성하였으며, 계통수의 안정성은 bootstrap 분석(1000회 반복)을 통해 평가하였다(Saitou and Nei, 1987; Thomson et al., 1994).

결과 및 고찰

과채류 시설재배지 이병토양 내 뿌리혹선충의 밀도

국내 시설재배지에서 재배되고 있는 주요 과채류인 토마토, 오이, 수박, 참외 작물을 대상으로 뿌리혹선충에 의한 피해가 심각하게 발생한 12개 시설재배지에서 이병토양을 채집하여 총 선충수와 뿌리혹선충 수를 각각 계수하여 뿌리혹선충의 분포율을 조사하였다(Table 1).

토마토 시설재배지 이병토양으로부터 검출된 뿌리혹선충의 평균 밀도는 토양 300 g 당 72±6~2,898±468마리였으며, 4개

Table 1. Density of root-knot nematodes infecting soils from various fruit and vegetable greenhouses

| Crops | Locations | Soil samples | No. of nematode/300g soil | | |
|----------------|-------------|--------------|---------------------------|----------------------|---------|
| | | | Total (X) | RKN ^a (Y) | Y/X (%) |
| Tomato | Gongju | GGT | 4,650±369 ^b | 1,461±237 | 31.4 |
| Tomato | Chuncheon A | CCT1 | 3,645±261 | 1,395±204 | 38.2 |
| Tomato | Chuncheon B | CCT2 | 16,344±1,602 | 1,926±276 | 11.8 |
| Tomato | Chuncheon C | CCT3 | 1,596±192 | 138±24 | 8.6 |
| Tomato | Chuncheon D | CCT4 | 8,562±858 | 2,742±522 | 32 |
| Tomato | Chuncheon E | CCT5 | 4,842±354 | 2,898±468 | 59.8 |
| Tomato | Yeongi | YGT | 1,134±111 | 72±6 | 6.3 |
| Cucumber | Yeongi | YGC | 2,232±228 | 198±36 | 8.9 |
| Cucumber | Pyeongtaek | PTC | 2,577±294 | 558±87 | 21.6 |
| Cucumber | Yeosu | YJC | 3,651±321 | 1,167±171 | 31.9 |
| Oriental melon | Seongju | SJO | 4,356±357 | 2,295±429 | 52.7 |
| Watermelon | Nonsan | NSW | 2,955±372 | 1,536±228 | 52 |

^a RKN: root-knot nematodes. ^b Values are means±standard deviations of three replicates.

지역(공주, 춘천 A, 춘천 D, 춘천 E)은 토양 내 총 선충수의 30% 이상이 뿌리혹선충으로 높은 분포율을 나타내었다. 충남 연기, 경기도 평택, 여주지역의 오이 시설재배지 토양 300 g 당 뿌리혹선충은 198±36~1,167±171마리였으며, 토양 내 총 선충 9~32%의 분포를 나타내었다. 경북 성주지역의 참외 시설재배지 토양 300 g 당 뿌리혹선충 밀도는 2,295±429마리로 약 53%의 분포율을 보였다. 충남 논산지역의 수박 시설재배지 토양 300 g 내에는 1,536±228마리로 52%의 분포율을 나타내었다.

과채류 시설재배지 토양 내 뿌리혹선충은 지역별, 작물별로 광범위하게 분포하고 있는 것으로 나타났다. 뿌리혹선충의 발육에 적당한 온도는 25~30°C 로 약 30일 전후에 한 세대를 완료하여 증식이 가능하다. 국내에서 재배되고 있는 과채류의 재배면적 중 시설재배가 약 80%를 차지하며, 시설재배지 환경은 뿌리혹선충에 유리한 온도조건을 제공하고 대부분의 시설재배 작물이 뿌리혹선충의 세대기간을 넘어 재배되고 겨울철에도 연작재배로 인해 토양 내 뿌리혹선충의 밀도가 급격히 증가하게 되어 피해가 큰 것으로 사료된다.

뿌리혹선충 2령 유충으로부터 mtDNA 추출 및 PCR 증폭

토마토, 오이, 수박, 참외 시설재배지 12곳에서 채집한 이병 토양(300 g)으로부터 선충을 분리하고 해부현미경 하에서 뿌리혹선충의 형태를 관찰하면서 각 토양시료 당 무작위로 뿌리혹선충 20마리씩 순수분리하여 표준집단으로 선정하였다. 각 토양시료별로 수집한 뿌리혹선충 표준집단(n=20)으로부터 각각 DNA를 추출하고 PCR 증폭한 결과, 모든 시료에서 약 1.7 kb의 증폭산물을 성공적으로 획득하였다. 이들 뿌리혹선충의 PCR 증폭산물 50 µl의 농도는 78~135 ng/µl 로 RFLP 분석에 충분

한 양을 얻었다.

PCR-RFLP 분석에 의한 뿌리혹선충의 계통분류

시설재배지 12곳 토양시료로부터 분리한 뿌리혹선충 표준 집단(n=20) 내 종 다양성을 확인하기 위하여 PCR 증폭산물에 *HinfI* 제한효소를 처리한 후 전기영동으로 DNA band pattern을 확인한 결과, 12개 토양시료 모두 표준집단(n=20) 내 뿌리혹선충은 동일한 DNA 절편양상을 나타내어 토양시료 내 뿌리혹선충은 동일 종임을 알 수 있었다(자료 미제시). 각 시설재배지 토양으로부터 분리된 대표 뿌리혹선충의 PCR-RFLP 분석을 수행한 결과, 크게 2개의 그룹으로 분류되었다. Group A는 900, 410, 290 및 170 bp의 4개 단편으로 확인되었고, 9개 지역으로부터 분리된 뿌리혹선충(CCT1, CCT2, CCT3, CCT4, CCT5, YGC, PTC, YJC 및 NSW)이 Group A에 속하였다. Group B는 900, 700 그리고 170 bp의 3개 단편이었으며 3개 지역으로부터 분리된 뿌리혹선충(GGT, YGT 및 SJO)이 속하였다(Fig. 1). Harris et al.(1990)의 보고에 의하면 *Meloidogyne incognita*는 4개의 단편(900, 410, 290, 170 bp), *Meloidogyne arenaria*는 3개의 단편(900, 700, 170 bp), *Meloidogyne javanica*는 2개의 단편(1,600, 170 bp)으로 분류되어 종 동정이 가능함을 제시하였다. 이상의 12개 시설재배지 토양으로부터 분리한 대표 뿌리혹선충의 PCR-RFLP 분석 결과를 Harris et al.(1990)의 보고와 비교 하면, Group A에 속하는 뿌리혹선충은 *Meloidogyne incognita*로 추정되었으며, Group B에 속하는 뿌리혹선충은 *Meloidogyne arenaria*로 추정되었다.

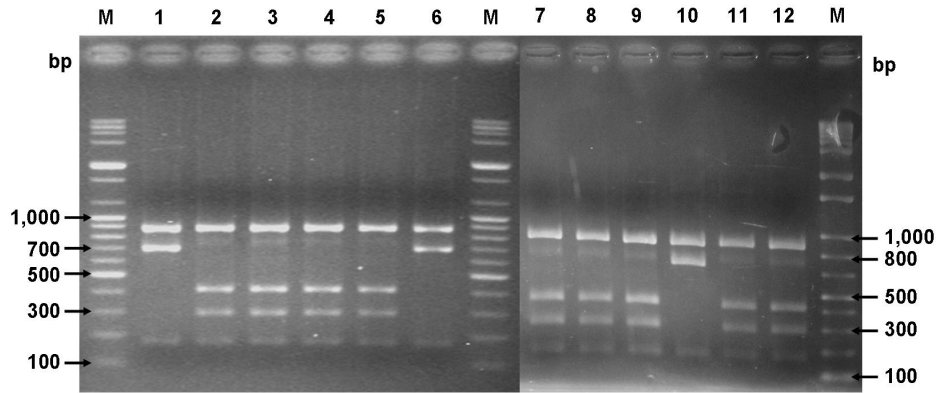


Fig. 1. PCR-RFLP band patterns on 3% polyacrylamide gel after restriction enzyme (*Hinf*I) digestion of mitochondrial DNA amplified from a single juvenile of *Meloidogyne* spp. M; DNA marker, 1; GGT, 2; CCT1, 3; CCT2, 4; CCT3, 5; CCT4, 6; YGT, 7; CCT5, 8; YGC, 9; PTC, 10; SJO, 11; YJC, 12; NSW.

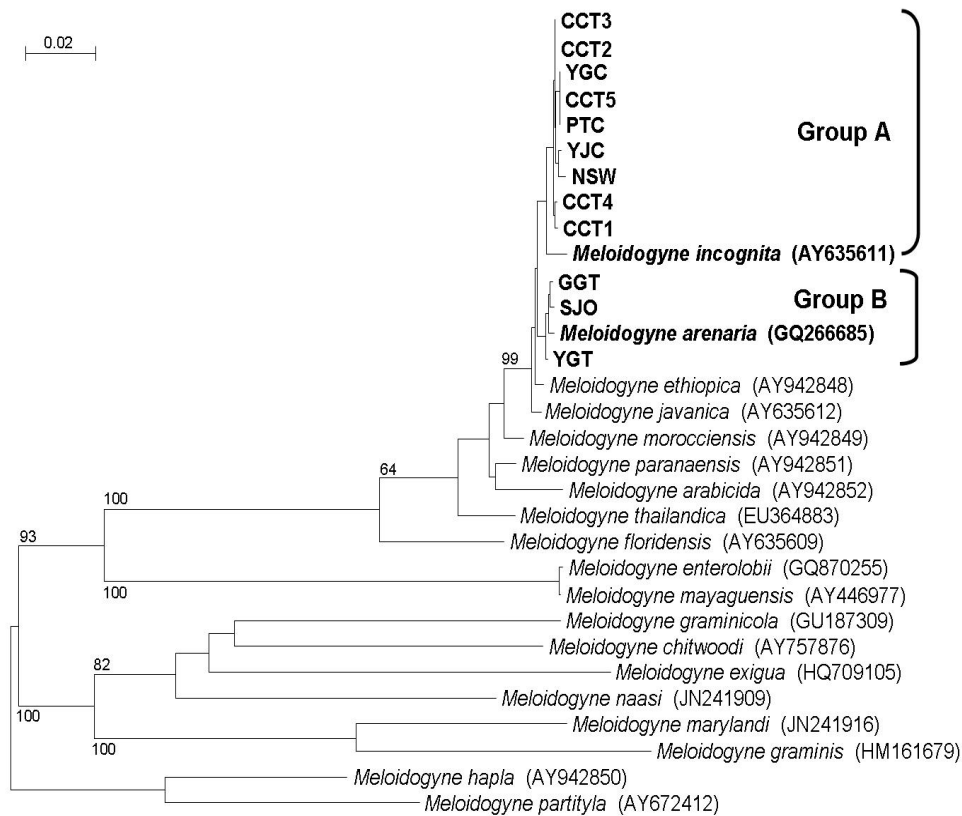


Fig. 2. A phylogenetic tree based on the mitochondrial DNA sequence of different species and isolates of *Meloidogyne*. The tree was constructed using the CLUSTAL X and the neighbor-joining method. The GenBank accession numbers of the sequences are shown within parentheses. Bootstrap values, expressed as a percentage of 1000 replications, are provided at branching points when >50%. Scale bar corresponds to 0.01 substitution per nucleotide position.

뿌리혹선충의 mtDNA 염기서열 해석

토마토, 오이, 수박, 참외 시설재배지의 이병토양에서 분리한 Group A에 속하는 뿌리혹선충과 Group B에 속하는 뿌리혹선충의 계통해석을 위하여 mtDNA 유전자 염기서열을 분석하

였다. 뿌리혹선충의 mtDNA 유전자 염기서열(1,483~1,521 bp)을 해석한 후 NCBI/GeneBank의 database에 등록된 45종의 뿌리혹선충 유전자 염기서열 중 mtDNA 유전자 염기서열이 등록된 19종의 뿌리혹선충과 상동성을 검색한 결과, Group A에 속하는 뿌리혹선충 중 평택 오이(PTC), 여주 오이(YJC)와 논산

수박(NSW) 시설재배지의 뿌리혹선충은 *Meloidogyne incognita* (AY635611)와 99.73%의 상동성을 나타내었고, 연기 오이 (YGC)와 춘천 토마토(CCT1, CCT5) 뿌리혹선충은 99.80%의 상동성을, 춘천 토마토(CCT2, CCT3 그리고 CCT4) 뿌리혹선충은 99.93%의 상동성을 나타내어 *Meloidogyne incognita*와 유사하였다. Group B에 속하는 뿌리혹선충 중 연기 토마토(YGT) 뿌리혹선충은 *Meloidogyne arenaria* (GQ266685)와 99.54%의 상동성을 나타내었고, 공주 토마토(GGT) 뿌리혹선충은 99.66%의 상동성을, 성주 참외(SJO) 뿌리혹선충은 99.73%의 상동성을 나타내어 *Meloidogyne arenaria*와 유사하였다(Fig. 2).

이상, 국내 과채류 시설재배지 토양에 분포하는 뿌리혹선충을 PCR-RFLP 분자기법에 의거하여 계통분류를 수행한 결과, 토마토(CCT1, CCT2, CCT3, CCT4 그리고 CCT5), 오이, 수박 시설재배지로부터 분리한 뿌리혹선충의 대부분이 *M. incognita*와 유사한 종으로 나타났으며, 토마토(YGT, GGT)와 참외 시설재배지로부터 분리된 뿌리혹선충은 *M. arenaria*와 유사한 종으로 확인되었다. 특히 조사한 12 지역의 시설재배지 중 9 지역의 시설재배지 토양으로부터 분리된 뿌리혹선충은 고구마뿌리혹선충(*Meloidogyne incognita*)으로 추정되었으며, 국내 과채류 시설재배지에 우점 분포하는 주요 뿌리혹선충 종임을 확인할 수 있었다.

본 연구를 통하여 확인된 뿌리혹선충의 종 분류와 계통해석을 위한 PCR-RFLP 분자기법은 향후 과채류 작물뿐만 아니라 다양한 기주작물과 광범위한 지역에 분포하는 뿌리혹선충의 분류 및 동정에 쉽게 이용될 수 있으며, 경제적으로 큰 피해를 일으키는 뿌리혹선충의 종합적 방제대책 수립을 위한 기초 자료로 활용될 것으로 기대한다.

사 사

본 연구는 교육과학기술부와 한국연구재단의 지역혁신인력 양성사업(과제번호: M-02-20080704171810)으로 수행되었으며, 분자기법 연구에 도움을 주신 큐슈오키나와 농업연구센터의 Hideaki IWAHORI 박사님께 감사의 뜻을 표합니다.

Literature Cited

- Baermann, G., 1917. Eine einfache methode zur auffindung von anklyostomum (Nematoden) larven in Erdproben. Geneesk. Tijdschr. Ned-Indie. 57, 131-137.
- Blaxter, M.L., Ley, P.D., Garey, J.R., Liu, L.X., Scheldeman, P., Vierstraete, A., Vanfleteren, J.R., Mackey, L.Y., Dorris, M., Frisse, L.M., Vida, J.T., Thomas, W.K., 1998. A molecular evolutionary framework for the phylum nematode. Nature 392, 71-75.
- Blok, V.C., Malloch, G., Harrower, B., Phillips, M.S., Vrain, T.C., 1998. Intraspecific variation in ribosomal DNA in populations of the potato cyst nematode *Globodera pallida*. J. Nematol. 30, 262-274.
- Cherry, T., Szalenski, A.L., Todd, T.C., Powers, T.O., 1997. The internal transcribed spacer region of *Belonolaimus* (Nemata: Belonolaimidae). J. Nematol. 29, 23-29.
- Cho, M.R., Lee, B.C., Kim, D.S., Jeon, H.Y., Yiem, M.S., Lee, J.O., 2000. Distribution of plant-parasitic nematodes in fruit vegetable production areas in Korea and identification of root-knot nematodes by enzyme phenotypes. Korean J. Appl. Entomol. 39, 123-129.
- Choo, H.Y., Kim, H.K., Park, J.C., Lee, S.M., Lee, J.I., 1987. Studies on the patterns of plastic film house, their growing conditions, and diseases and pests occurrence on horticultural crops in southern part of Korea. Insects and nematodes associated with horticultural crops and effect of nursery soil conditions on the infection of root-knot nematode. Korean J. Plant. Prot. 26, 195-201.
- Fallas, G.A., Hahn, M.L., Fargette, M., Burrows, P.R., Sarah, J.L., 1996. Molecular and biochemical diversity among isolates of *Radopholus* spp. from different areas of the world. J. Nematol. 28, 422-430.
- Ferris, V.R., Ferris, J.M., Faghihi, J., 1993. Variation in spacer ribosomal DNA in some cyst-forming species of plant parasitic nematodes. Fundam. Appl. Nematol. 16, 177-184.
- Han, H.R., Cho, M.R., Jeon, H.Y., Lim, C.K., Jang, H.I., 2004. PCR-RFLP identification of three major *Meloidogyne* species in Korea. J. Asia-Pacific Entomol. 7, 171-175.
- Harris, T.S., Sandall, L.J., Powers, T.O., 1990. Identification of single *Meloidogyne* juveniles by polymerase chain reaction amplification of mitochondrial DNA. J. Nematol. 22, 518-524.
- Hooper, D.J., 1990. Extraction and processing of plant and soil nematodes, In: Luc, M., Sikora, R.A., Bridge, J. (Eds.), Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. CAB International, Wallingford, London, pp. 45-68.
- Hyman, B.C., 1996. Molecular systematic and population biology of phytonematodes: some unifying principles. Fundam. Appl. Nematol. 19, 309-313.
- Iwahori, H., Kanzaki, N., Futai, K., 2000. A simple, polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism-aided diagnosis method for pine wilt disease. For. Pathol. 30, 157-164.
- Joyce, S.A., Burnell, A.M., Powers, T.O., 1994. Characterization of *Heterorhabditis* isolates by PCR amplification of segments of mtDNA and rDNA genes. J. Nematol. 26, 260-270.
- Kang, S.J., Park, B.Y., Choi, D.R., Han, S.C., 2002. First report of *Meloidogyne marylandi* (Tylenchida : Heteroderidae) in Korea. Korean J. Soil Zool. 7, 45-49.
- Kim, H.H., Choo, H.Y., Park, C.G., Lee, J.J., Jeong, D.Y., 1998.

- Antagonistic plant survey for the biological control of root-knot nematodes in greenhouses. *Korean J. Appl. Entomol.* 37, 91-95.
- Lim, J.R., Hwang, C.Y., Kim, J.Y., Park, C.B., Kim, D.H., Choi, J.S., Choo, B.K., 2005. Occurrence of plant parasitic nematodes in *Codonopsis lanceolata* field and its damaged by *Meloidogyne hapla*. *Korean J. Appl. Entomol.* 44, 317-323.
- National Academy of Agriculture Science, 2001. An illustrated plant parasite nematode book. RDA, Suwon, Korea.
- Orui, Y., 1996. Discrimination of the main *Pratylenchus* species (Nematoda: Pratylenchidae) in Japan by PCR-RFLP analysis. *Appl. Entomol. Zool.* 31, 505-514.
- Orui, Y., 1998. Identification of Japanese species of the genus *Meloidogyne* (Nematoda: Meloidogynidae) by PCR-RFLP analysis. *Appl. Entomol. Zool.* 33, 43-51.
- Perry, R.N., Moeus, M., Starr, J.C., 2009. Root-knot nematodes. CAB International, Wallingford, London, pp. 488.
- Powers, T.O., Harris, T.S., 1993. A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* species. *J. Nematol.* 25, 1-6.
- Powers, T.O., Todd, T.C., Burnell, A.M., Murray, P.C.B., Fleming, C.C., Szalanski, A.L., Adams, B.A., Harris, T.S., 1997. The rDNA internal transcribed spacer region as a taxonomic marker for nematodes. *J. Nematol.* 29, 441-450.
- Powers, T.O., Szalanski, A.L., Mullin, P.G., Harris, T.S., Bertozzi, T., Griesbach, J.A., 2001. Identification of seed gall nematodes of agronomic and regulatory concern with PCR-RFLP of ITS1. *J. Nematol.* 33, 191-194.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
- Shurtleff, M.C., Averre, C.W., 2000. Diagnosing plant diseases caused by nematodes. APS Press, St Paul, Minnesota, USA, pp. 187.
- Szalanski, A.L., Sui, D.D., Harris, T.S., Powers, T.O., 1997. Identification of cyst nematodes of agronomic and regulatory concern with PCR-RFLP of ITS1. *J. Nematol.* 29, 255-267.
- Thomson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.