

Neobacillus sp. JC05 추출물을 처리한 오이 식물의 고구마뿌리혹선충에 대한 방어 반응 검정*

김유리** · 장화진*** · 상미경****

Defense Response of Cucumber Plants Treated with *Neobacillus* sp. JC05 Extract against *Meloidogyne incognita*

Kim, Yu-Ri · Jang, Hwajin · Sang, Mee Kyung

The effect of *Neobacillus* sp. JC05 extract on the defense response in cucumber plants against root-knot nematode (RKN) was evaluated. As a result of drench treatment of JC05-extract in cucumber plants, formation of egg mass per plants and disease severity were significantly decreased compared to untreated control plants; the malondialdehyde contents also decreased in JC05-extract treated plants. When eggs of *Meloidogyne incognita* were inoculated, cucumber plants treated with JC05-extract elevated pathogenesis-related gene expression such as chitinase and lipoxigenase, these are well known as inducing resistance in plants, in addition, peroxidase among antioxidant enzymes was significantly activated. Moreover, the JC05-extract enhanced FDAse activity in soils grown cucumber plants inoculated by eggs of *M. incognita*. Taken together, these results suggest that the JC05-extract could involve in activation of defense-related mechanisms of cucumber plants and result in decrease of disease occurrence caused by *M. incognita*.

Key words : *antioxidants*, *pathogenesis-related gene*, *Root-knot nematode*

* 본 연구는 국립농업과학원 연구개발사업(과제번호: PJ01494801)의 지원에 의해 수행되었음.

** 국립농업과학원 농업미생물과, 석사후전문연구원

*** 국립농업과학원 농업미생물과, 석사학연과정생, 현재 상주시 농업기술센터 연구원

**** Corresponding author, 국립농업과학원 농업미생물과 농업연구사(mksang@korea.kr)

I. 서 론

뿌리혹선충(*Meloidogyne* spp.)은 오이, 토마토, 콩, 감자와 같은 작물에 큰 피해를 주며 그로 인해 전 세계적으로 심각한 경제적 손실을 일으키고 있다 (Dahlin et al., 2019; Oka et al., 2000). 특히 오이 재배 시 선충에 의한 피해는 시설재배 규모의 대형화, 연작 등의 요인으로 인해 토양 내 선충 밀도가 높아져 피해가 더욱 심각하다(Hwang et al., 2014). 이러한 뿌리혹선충을 방제하기 위해 토양개량, 저항성 품종 윤작, 살선충제 등 다양한 재배적, 화학적 방법들이 이용되고 있으며(Molinari, 1995; Cho et al., 2000), 미생물을 활용한 환경친화적인 방제 방법도 연구되고 있다(Park et al., 2012; Oh et al., 2016).

식물체는 이동을 하여 위협으로부터 회피할 수 없기 때문에, 자체적으로 병원체에 대한 다양한 방어 기작을 가지고 있다. 뿌리혹선충 등의 병원체가 식물에 침입하게 되면 superoxide radical (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical ($\cdot OH$)와 같은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 많이 생성되고, 과도한 ROS의 생성은 식물체 내에 산화 스트레스 증가를 유발할 뿐만 아니라 정상적인 식물의 성장과 스트레스에 대한 반응에 영향을 주게 된다(Huang et al., 2019). 이와 같이 식물체 내에 과도하게 생성된 free radicals과 같은 활성산소종을 제거하여 스스로를 보호하기 위해, 항산화효소인 catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) 등을 생성하는 것으로 알려져 있다. 물리적인 방어로는 병원체에 의해 침입을 받게 되면, 세포벽을 두껍게 하거나 캘러스(callose)를 생성하는 등의 구조적 변형을 일으키기도 하고, 항균 활성이 있는 파이토알렉신을 생성하기도 한다(Varner and Lin, 1989). 한편, 식물은 병원체의 침입으로부터 민감하게 반응하여 효율적으로 방어하는데, pathogenesis-related (PR) 단백질의 발현이 유도되며, PR 단백질은 병원체뿐만 아니라 수분과 염 등의 스트레스, 미생물 등에 의해서도 유도된다(King et al., 1986).

토양에 서식하는 유용한 미생물 또는 이러한 미생물이 생성하는 물질은 직접적으로 병원체를 사멸시켜 밀도를 낮출 수도 있지만, 간접적으로 식물에 저항성을 유도할 수 있다고 알려져 있다. 대표적으로 유용 미생물에 의한 유도전신저항성(Induced systemic resistance, ISR)이 있으며, 주로 자스몬산(jasmonic acid, JA) 또는 에틸렌(ethylene, ET)이 관여하며, 병원체에 의한 전신획득저항성은 살리실산(salicylic acid, SA)과 관련이 있다고 보고되었다(Shoresh et al., 2005; Lin et al., 2019). 이러한 방어 관련 신호전달 과정에 관여하는 식물체의 유전자로, JA와 관련된 LOX와 SA와 연관된 PRI 등이 알려져 있으며(Martinez et al., 2001), 미생물을 처리할 때 식물 방어 관련 유전자의 발현이 영향을 받거나 항산화 활성이 증가하여 병이 감소되었다는 보고가 있다. Molinari와 Leonetti 등(2019)은 균근균, 길항진균과 근권세균을 혼합한 생물 방제제를 토마토에 처리했을 때, 식물에 저항성이 유도되어 PR 유전자의 발현이 증가하고, glucanase와 endochitinase가 더 활성화되어 뿌리혹선충에 대한 방제 효과를 가지는 것을 보고하였다. Zacheo 등(1987)은 선충에 대해 저항성인 식물은 감

수성인 식물에 비해 항산화효소가 활성화되어 선충의 감염으로부터 보호하여 피해를 줄이는 것으로 보고하였으며, 선충 감염에 대한 식물의 방어 메커니즘으로 항산화효소의 역할도 알려져 있다(El-Beltagi et al., 2010).

본 연구진은 이전 연구에서 미생물 *Neobacillus* sp. JC05의 추출물이 고구마뿌리혹선충의 알 부화율을 억제하고, 유충의 사멸률을 증가시키는 것을 보고하였다(Jang et al., 2021). 본 연구에서는 선발된 *Neobacillus* sp. JC05의 추출물을 오이 식물체에 처리하였을 때, 고구마뿌리혹선충에 의한 침입에 대해 식물의 병 저항성 유전자 발현, 항산화효소 활성 등의 방어 반응이 어떻게 영향을 받는지 확인하고, 토양 내 미생물의 활성 변화와 관련된 fluorescein diacetate (FDA) 가수분해 작용과 식물 성장과 연관성이 높은 인산가용화효소와 유리아제 활성에 주는 영향을 평가하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 식물체와 선발 미생물 추출물 처리와 고구마뿌리혹선충 접종

오이(‘조은백다다기’, 팜한농)를 상토(바로커, 서울바이오)가 채워진 50공 육묘 트레이에 파종하여 2주 동안 온실에서 재배한 후, 지름 14 cm 포트에 이식하여 *Neobacillus* sp. JC05 추출물과 고구마뿌리혹선충의 알을 접종하였다. *Neobacillus* sp. JC05 추출물 준비는 이전의 논문(Jang et al., 2021) 방법을 따라, *Neobacillus* sp. JC05 균주를 Tryptic soy broth (TSB, Difco, USA)에 접종한 후 72시간 동안 160 rpm, 28°C에서 진탕 배양하였다. 배양액은 6,000 rpm으로 20분 동안 원심분리한 후, 상등액을 0.45 µm syringe filter로 여과하였다. 여과한 배양액에 동량의 n-butanol을 넣고 160 rpm, 18시간 추출하고 유기 용매 층을 분리하였다. 분리한 n-butanol층은 60°C에서 감압 농축한 후 최종적으로 1 ml의 methanol에 녹이고 멸균수로 희석하여 실험에 사용하였다. 접종원은 고구마뿌리혹선충(*M. incognita*)에 감염된 토마토(‘서광’, 흥농)의 뿌리에서 알을 분리하였으며, 식물체 당 1,000 eggs 농도로 접종하였다.

2. 병평가

Neobacillus sp. JC05 추출물(100 µg/ml)과 고구마뿌리혹선충의 알(1,000 eggs/plant)을 접종한 6주 후 오이 뿌리에 있는 흙을 제거하고 Ferris 등(2012)의 방법에 따라 erioglucine disodium 용액(0.1 mg/L)에 30분간 침지 하여 염색된 난낭 수를 조사하였다. 또한, 난낭의 정도의 크기에 따라 5단계로 나누어 0=병 발생 없음, 1=1~10%의 뿌리에 난낭이 착생되며 비대 정도가 적고 서로 독립하여 존재, 2=11~30% 뿌리에 난낭이 착생되며 비대 정도가 비

교적 큼, 3=31~60% 뿌리에 난방이 착생 되며 비대 정도가 큼, 4=61% 이상의 뿌리에 난방이 착생 되며 비대 정도가 매우 큼으로 평가하였다(Kim et al., 2012). 처리구 당 10 반복으로 2회 반복하여 수행하였다.

3. Malondialdehyde (MDA) 측정

고구마뿌리혹선충 접종에 의한 오이 식물체의 피해 정도를 평가하기 위하여, 고구마뿌리혹선충 알(1,000 eggs/plant)을 접종한 2시간 후 *Neobacillus* sp. JC05 추출물(100 µg/ml)을 관주처리하였다. 2주 후 오이 식물체의 잎을 샘플링 하여 식물체 세포의 지질 산화도 (lipid oxidation)를 malondialdehyde (MDA) 함량으로 측정하였다. MDA는 Dhindsa 등(1981)의 방법에 따라 측정하였으며, 잎 조직(100 mg)을 0.1% (w/v)의 trichloroacetic acid (TCA) 용액 500 µl를 넣은 후 13,000 rpm, 4°C에서 10분 동안 원심분리하였다. 상등액 200 µl는 20% TCA에 0.5% 2-thiobarbituric acid (TBA)를 넣은 용액 600 µl과 혼합한 후 90°C에서 30분 동안 배양하였다. 반응은 얼음에 5분 동안 넣은 후 종료시켰으며, 흡광도(450, 532, 600 nm)를 측정한 후 Bao 등(2009)의 방법에 따라 MDA를 계산하였다. 처리구 당 5 반복으로 2회 수행하였다.

$$\text{MDA content (nM/g)} = \frac{6.45 \times (A_{532} - A_{600}) - 0.56 \times A_{450} \times \text{volume (L)}}{\text{fresh weight (g)} \times 1,000} \quad (1)$$

4. 식물병 저항성 관련 유전자 발현

Neobacillus sp. JC05 추출물과 고구마뿌리혹선충의 알 접종에 의한 오이 식물체의 병 저항성 관련 유전자가 전신적으로 어떻게 발현하는지 평가하기 위하여, JC05 추출물을 멸균수를 이용하여 100 µg/ml 농도로 희석하여 준비하였다. 2주간 생육한 오이에 고구마뿌리혹선충 알(1,000 eggs/plant)를 접종하고 2시간 후에 처리구 당 5주씩 control (증류수), JC05 추출물(100 µg/ml), fosthiazate 5% GR (positive control)를 관주하였다. 접종 7일 후 오이 잎(100 mg)을 샘플링하고, 액체질소에 넣은 후 실험 전까지 -80°C에서 보관하였다. 각 실험은 2회 반복 실시하였다. 샘플링한 오이 잎을 파쇄한 후 easy-spin™ Total RNA Extraction Kit (iNtRON Biotechnology, Korea)을 사용하여 RNA를 분리하였다. RNA는 nano drop을 사용하여 0.4 µg로 정량한 후 PrimeScript RT Master Mix (TaKaRa, Japan)를 사용하여 complementary DNA (cDNA)을 합성하였고 실험에 사용한 primer set은 Table 1과 같다. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR)을 위해, CFX96 Real-time PCR Detection system (Bio-Rad, USA)를 사용하였다. qPCR은 95°C에서 10분, 40 반복의 95°C에서 15초, 58°C에서 20초한 후 72°C에서 18초로 유전자의 증폭을 수행하였다. *csUBQ* 유전자를 정규화 하는 데 사용하였으

며, 상대적 발현 정도를 결정하기 위하여 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak and Schmittgen, 2001)을 사용하였다.

Table 1. Primer sets of defense-related genes of cucumber plants

Gene	Primers	Primer sequence	References
<i>PRI</i>	<i>csPRI-F</i>	5'-TGCTCAACAATATGCGAACC-3'	Pu et al., 2014
	<i>csPRI-R</i>	5'-TCATCCACCCACAACCTGAAC-3'	
<i>PAL</i>	<i>csPAL-F</i>	5'-ATGGAGGCAACTTCCAA-3'	Shoresh et al., 2005
	<i>csPAL-R</i>	5'-CCATGGCAATCTAGGACCT-3'	
<i>LOX</i>	<i>csLOX-F</i>	5'-AAGGTTTGCCTGTCCCAAGA-3'	Shoresh et al., 2005
	<i>csLOX-R</i>	5'-TGAGTACTGGATTAACTCCCAGCCAA-3'	
<i>CHIT</i>	<i>csCHIT-F</i>	5'-TGGTCACTGCAACCCTGACA-3'	Shoresh et al., 2005
	<i>csCHIT-R</i>	5'-AGTGGCCTGGAATCCGACT-3'	
<i>GLU</i>	<i>csGLU-F</i>	5'-TCAATTATCAAAACTTGTTTCGATGC-3'	Shoresh et al., 2005
	<i>csGLU-R</i>	5'-AACCGGTCTCGGATACAACAAC-3'	
<i>UBQ</i>	<i>csUBQ-F</i>	5'-GGTGCCAAGAAGCGTAAGAA-3'	Yang et al., 2012
	<i>csUBR-R</i>	5'-CACCAGCTTTGTTGTAAACGT-3'	

5. 항산화효소 활성 측정

Neobacillus sp. JC05의 추출물과 고구마뿌리혹선충의 알 관주 처리 2주 후 오이 식물체 잎을 샘플링하여, 전신적으로 병 억제와 관련한 항산화효소의 활성 변화를 측정하였다. Catalase (CAT) 활성을 측정하기 위해, 오이 잎 조직 1 g을 5 ml의 cold buffer (50 mM potassium phosphate, 1 mM EDTA, pH 7.0)에 넣고 마쇄한 후 12,000 rpm, 4°C에서 15분 동안 원심분리하여 상등액을 얻어 catalase assay kit (Cayman Chemical Company, USA)의 방법에 따라 측정하였다. Superoxide dismutase (SOD) 활성을 측정하기 위해 잎 조직 1 g에 5 ml의 cold buffer (20 mM HEPES와 1 mM EGTA 용액(pH 7.2), mannitol 210 mM, sucrose 70 mM)을 넣고 마쇄한 후 12,000 rpm, 4°C에서 15분 동안 원심분리하여 상등액을 얻어 superoxide dismutase assay kit (Cayman Chemical Company, USA)로 측정하였다. Peroxidase와 glutathione peroxidase는 각각 peroxidase assay kit (Abcam, USA)과 glutathione peroxidase assay kit (Cayman Chemical Company, USA)의 방법에 따라 측정하였다. 처리구 당 5 반복으로 2회 수행하였다.

6. 토양 효소 활성 측정

Neobacillus sp. JC05 추출물과 고구마뿌리혹선충의 알 접종 6주 후 근권 토양을 샘플링 하여 토양 효소 활성의 변화를 평가하였다. 총 토양 FDA hydrolase (FDAse) 활성은 토양 1 g에 60 mM의 sodium phosphate (pH 7.6)에 FDA를 혼합한 후 24°C, 160rpm에서 60분 동안 진탕 배양하였다. FDA의 가수분해는 acetone을 최종농도 50% (v/v)로 하여 넣고, 정성 여과지 No.2로 토양을 걸러낸 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 토양 уре아제 활성은 Kandeler와 Gerber (1988)의 방법으로 측정하였으며, 토양 (1 g)에 0.72 M urea 용액 0.5 ml과 borate buffer (pH 10.0) 4 ml을 넣고 37°C에서 2시간 동안 배양한 후 1 N KCl에 0.01 N HCl을 혼합하였다. 정성 여과지 No.2로 여과한 용액은 Na Salicylate 용액과 0.1% Na dichlorisocyanurate 용액과 혼합한 후 25°C에서 30분 동안 배양한 후 690 nm에서 흡광도를 측정하였다. уре아제 활성은 NH₄Cl로 정량하였다. 토양 인산 가용화 효소활성은 Tabatabai와 Bremner (1969)의 방법으로 측정하였으며, 토양(1 g)은 modified universal buffer (pH 6.5), 톨루엔과 p-nitrophenyl phosphate solution와 혼합한 후, 37°C, 160rpm에서 1시간 동안 배양한 후, 1 ml의 0.5 M calcium chloride와 4 ml의 0.5 M sodium hydroxide을 첨가하였다. 이후 정성 여과지 No.2로 토양용액을 걸러준 후 400 nm에서 흡광도를 측정하였으며, p-nitrophenol로 정량하였다. 처리구당 5 반복으로 2회 수행하였다.

7. *Neobacillus* sp. JC05의 유전체 분석

Next-Generation Sequencing (NGS)을 기반으로 *Neobacillus* sp. JC05의 전체 유전체를 분석하였다. 마크로젠에서 Illumina Hiseq와 PacBio RS II를 사용하여 전체 유전체의 시퀀싱을 수행하였다. Hierarchical genome assembly process (HGAP, ver. 10.0)을 사용하여 assembly를 수행하였고, 유전체의 단백질 암호화 유전자와 tRNA, rRNA의 annotation은 NCBI prokaryotic genome annotation pipeline (PGAP, ver. 6.0)을 사용하여 수행하였다.

8. 통계분석

통계분석은 Statistical Analysis System (SAS) (version 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC)를 사용하였으며, 모든 실험은 2회 반복하여 수행하였다. 실험 간 분산의 균일성을 Leven's test를 통하여 확인한 후 데이터를 풀링하였으며, ANOVA 분석 후 최소유의차 검정(least significant difference; LSD, $P < 0.05$)을 하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. *Neobacillus* sp. JC05에 의한 고구마뿌리혹선충 억제 효과

Neobacillus sp. JC05 추출물에 의한 고구마뿌리혹선충의 난낭 형성을 억제하는 효과를 평가하기 위해 포트 실험을 수행한 결과, *Neobacillus* sp. JC05 추출물을 처리했을 때 control에 비해 난낭의 수가 현저히 감소하는 것을 확인하였다(Table 2). 또한, 난낭의 정도와 크기를 평가한 결과, control은 2.65인 반면 *Neobacillus* sp. JC05 추출물을 처리했을 때 1.30, fosthiazate 5% GR은 1.00으로, JC05 추출물은 오이 식물체 뿌리에서 생성된 난낭의 정도와 크기를 현저히 감소시키는 효과가 있었다(Table 2). 고구마뿌리혹선충에 의한 오이 식물체의 피해 정도를 평가하기 위하여 세포 지질의 산화 정도를 MDA를 통해 측정하였다. *Neobacillus* sp. JC05 추출물, fosthiazate 5% GR을 처리할 경우, MDA 함량이 control에서 6.81 ± 1.76 nM/g 일 때 *Neobacillus* sp. JC05 추출물에서는 4.55 ± 2.26 nM/g로 유의하게 감소하였다. Fosthiazate 5% GR의 경우 6.4 ± 1.37 nM/g로 control와 비교하여 유의하게 감소하지는 않았다(Fig. 1). 이와 유사한 결과로 El-beltage 등(2012)는 고구마뿌리혹선충에 감염된 토마토는 선충에 감염되지 않은 식물에 비해 MDA 함량이 상당히 증가하는 것을 확인하였으며, 유기농 비료를 처리했을 때 control에 비해 MDA 함량이 유의하게 감소하고, 살충제로 사용된 nemacur의 경우 shoot에서는 통계적으로 차이가 없으며, root에서는 약간의 차이를 보였다고 제시하였다. 본 연구에서는 고구마뿌리혹선충 침입에 의한 전신적인 산화 스트레스에 대한 반응을 관찰하기 위해 잎으로 실험했기 때문에 fosthiazate 5% GR에서는 차이가 없었던 것으로 생각된다. 따라서, *Neobacillus* sp. JC05 추출물을 처리함으로써 고구마뿌리혹선충 침입을 억제해 오이 식물체의 산화 스트레스가 감소한 것으로 사료된다.

Table 2. Number of egg masses of *Meloidogyne incognita* and disease severity in cucumber plants

Treatments	Number of egg mass/plant	Disease severity (0-4)
Control	81.20 ± 3.52 a*	2.65 ± 0.15 a
JC05	46.70 ± 2.59 b	1.30 ± 0.11 b
Fosthiazate	7.85 ± 0.90 c	1.00 ± 0.10 c

* Mean \pm standard error (n = 20); the letter means significant differences based on LSD at $P < 0.05$.

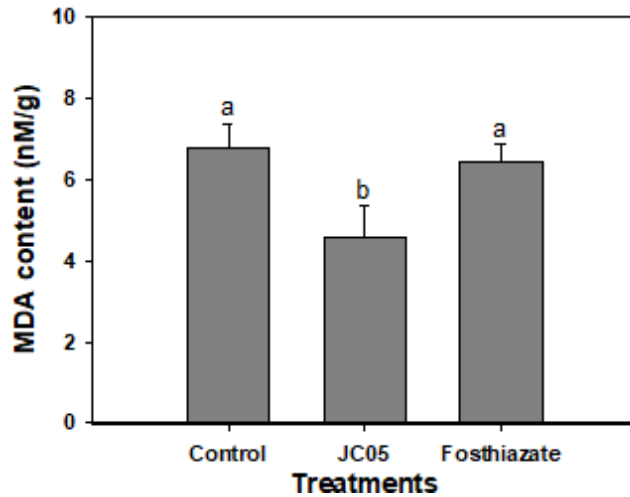


Fig. 1. Effect of *Neobacillus* sp. JC05-extract on malondialdehyde (MDA) content in RKN-inoculated cucumber plants. Small letters indicated statistical difference by LSD at $P < 0.05$ and error bars mean \pm standard error.

2. 병 저항성 관련 유전자 발현과 항산화효소 활성

오이 식물에 *Neobacillus* sp. JC05 추출물과 고구마뿌리혹선충 접종 7일 후, 병 저항성 관련 유전자 중 *CHIT*와 *LOX*의 발현량이 상대적으로 대조구 대비 현저히 증가하였고, *PAL*, β -1,3 *glucanase*, *PR1* 유전자는 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 2). 이전의 연구에서 슈도모나스 등 많은 미생물이 높은 살선충 활성을 갖는 것으로 밝혀졌으며(Samaliiev et al., 2000), 이들 미생물은 선충을 죽일 수 있는 독소나 가수분해 효소, 이차대사산물을 생성함으로써 다양한 기작을 통해 선충을 죽이는 것으로 알려졌다. 선충의 egg shell은 주로 chitin으로 이루어져 있는데 chitin을 분해하는 chitinase는 선충을 죽이는데 중요한 요인으로 작용한다(Yang et al., 2013). 따라서, *Neobacillus* sp. JC05 추출물은 식물체가 고구마뿌리혹선충의 침입으로부터 스스로를 보호하기 위한 방어 기작 중에 선충의 주요 구성 성분을 분해하는 효소를 생성하는 유전자 발현을 증가시킴으로써, 고구마뿌리혹선충에 의한 피해를 줄이는데 기여하는 것으로 생각된다. 한편, *LOX* 유전자는 lipoxigenase를 인코딩하며, 식물의 생장과 발달을 조절하고, 식물의 생물적, 비생물적 스트레스에 대한 저항성과 관련이 있는 것으로 알려져 있다(Akram et al., 2008; Song et al., 2016). 한편, *LOX* 유전자는 식물의 스트레스에 대한 반응으로 발현이 증폭되고, 식물 체내에 JA의 농도를 증가시킨다(Melan et al., 1993). *LOX* 유전자는 JA 생합성 경로에서 첫 번째 효소 역할을 하며, 리놀레산으로부터 JA를 생성한다고 보고되어 있다(Shoresh et al., 2005). *LOX* 유전자의 발현을 줄인 형질전환 애기장대에서는 JA의 생합성이 감소하는 것으로 볼 때(Bell et al., 1995), *LOX* 유전자는 JA 생

합성에 필수적이라고 할 수 있다. 또한, *Lipoxygenase (LOX)* pathway는 식물체가 병원체의 침입에 대해 방어 반응을 하는 동안 일어나는 지질의 peroxidation에 중요한 역할을 하고 있는데, 이는 *Neobacillus* sp. JC05 추출물을 처리했을 때 항산화효소 활성 중 POD가 증가하는 것과 관련이 있을 수도 있다(Fig. 3). 선충 접종 14일 후 POD 활성을 측정했을 때 control에서 69.09 ± 5.56 mM/min/mg이었고 *Neobacillus* sp. JC05 추출물과 fosthiazate 5% GR에서 각각 165.59 ± 24.90 mM/min/mg, 48.62 ± 7.28 mM/min/mg로, *Neobacillus* sp. JC05 추출물을 처리했을 때 특히 POD 활성이 현저히 증가하였다(Fig. 3). POD 활성의 증가는 선충에 대한 저항성과도 관련이 있는데, Chandrawat 등(2020)은 선충 접종 10일 후에 POD 활성을 측정했을 때 저항성 토마토 품종이 건전 식물체보다 5배 증가하는 것을 관찰하였다. POD 활성에 비해 CAT와 SOD, GPx 활성은 대조구와 통계적으로 유의적인 차이를 보이지 않았다(Fig. 3). 따라서, *Neobacillus* sp. JC05 추출물은 peroxidation과 관련한 유전자 발현과 항산화효소의 활성을 전신적으로 증가시키고, 이로 인하여 고구마뿌리혹선충에 의한 피해를 줄이는 것으로 생각된다. 이외에도 이전의 여러 연구에서 SA와 JA는 뿌리혹선충에 대한 식물의 저항성 조절에 관여한다고 알려져 있는데(Molinari 등, 2014; Fan 등, 2015), 본 연구에서는 Bhattarai 등(2008)의 연구 결과와 유사하게 SA와 관련이 있는 PR1과 PAL 유전자의 발현량은 유의적인 차이가 없었다(Fig. 2).

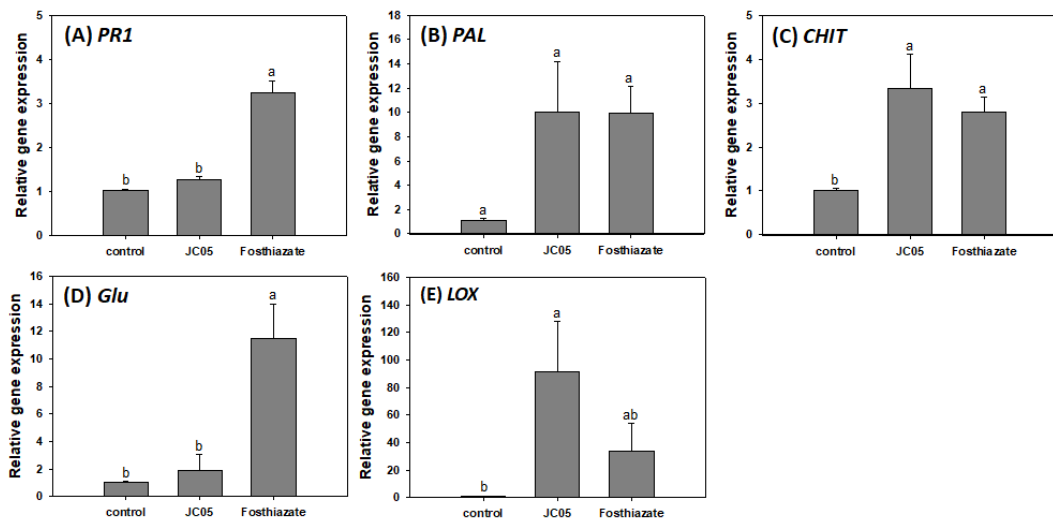


Fig. 2. Relative gene expression in leaves of RKN-inoculated cucumber plants. (A): *PR1* (pathogenesis-related protein 1), (B): *PAL* (encoding phenylalanine ammonia lyase), (C): *CHIT* (chitinase), (D): *Glu* (β -1,3-glucanase), (E): *LOX* (lipoxygenase). Small letters indicated statistical difference by LSD at $P < 0.05$ and error bars mean standard error.

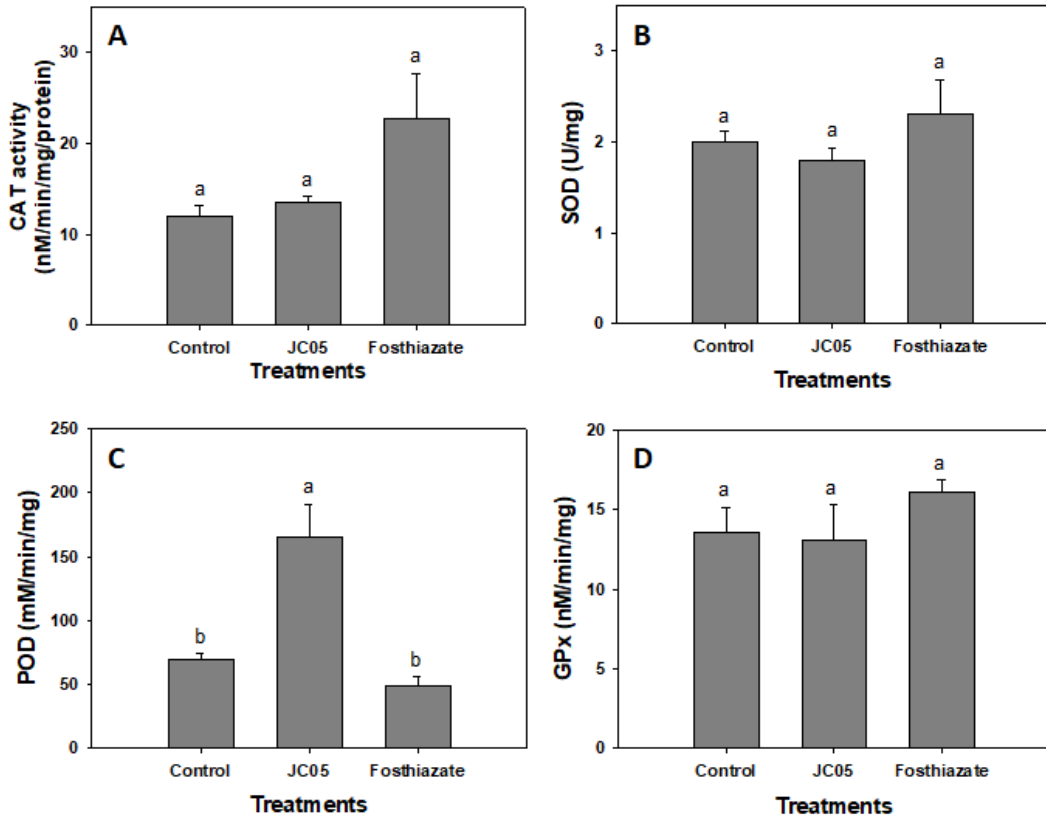


Fig. 3. Antioxidant enzyme activities in RKN-inoculated cucumber plants. A: catalase (CAT); B: superoxide dismutase (SOD); C: peroxidase (POD); D: glutathione peroxidase (GPx) of antioxidant enzyme activity. Error bars represent standard errors. Small letters indicate significant differences based on LSD test ($P < 0.05$).

3. 토양 효소 활성

Neobacillus sp. JC05 추출물이 작물 성장과 관련이 있는 토양 효소활성에 미치는 영향을 분석하기 위하여 토양 건전성의 지표로 사용되는(Karaka et al., 2010) FDAse와 acid phosphatase, urease의 토양 효소활성을 측정하였다. FDAse의 활성은 control에서 3.52 ± 0.66 일 때 *Neobacillus* sp. JC05 추출물과 fosthiazate 5% GR에서 각각 4.18 ± 0.67 , 3.31 ± 0.33 로 JC05 추출물에서 활성이 증가하는 것을 확인하였고(Fig. 4), 반면, acid phosphatase와 urease의 경우 control과 비교하여 유의적인 차이가 없었다(Fig. 4).

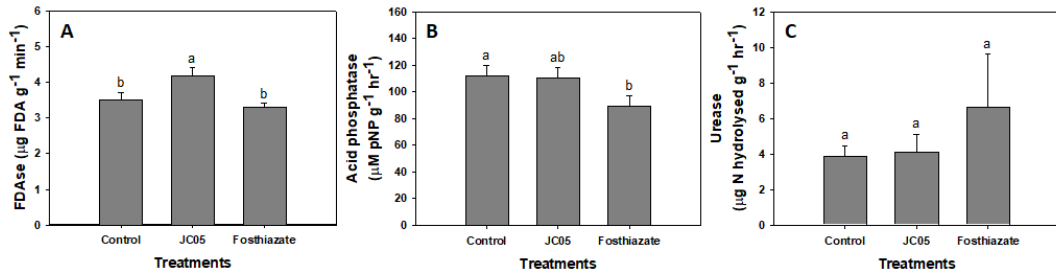


Fig. 4. Effects of *Neobacillus* sp. JC05-extract on soil enzyme activities in RKN-inoculated cucumber plants. A: fluorescein diacetate hydrolase (FDase); B: acid phosphatase; C: urease. Bars represent standard errors. Small letters indicate significant differences based on LSD test ($P < 0.05$).

4. *Neobacillus* sp. JC05 유전체 분석

Neobacillus sp. JC05의 유전체 염기서열을 통해 유전자 구성을 파악하여 고구마뿌리혹선충 억제 기작을 이해하고자 유전체 분석을 실시하였다. *Neobacillus* sp. JC05 전체 유전체의 길이는 6,255,529 bp, 39.3 % G+C값을 가지며, 총 5,904개의 유전자를 가지고 있으며, 유전체의 구성은 5,689개의 단백질 암호화 유전자와 146개의 transfer RNA, 60개의 ribosomal RNA, 그리고 9개의 non-coding RNA의 유전자로 구성되었다(Table 3). *Neobacillus* sp. JC05의 유전자에는 살선충활성과 관련된 여러 유전자가 포함되어 있는데, egg shell 분해를 통해 선충을 죽이고 cuticle을 가수분해하는 chitinase (locus tag, L1999_25875)로 예상되는 유전자와 cuticle과 관련한 단백질을 분해하여 선충을 죽이는데 중요한 도움을 주는 serine protease (locus tag, L1999_26240)를 가지고 있는 것을 확인하였다(Yang et al.,2013; Geng et al., 2016).

Table 3. Genome features of *Neobacillus* sp. JC05

Genome features	Chromosome
Genome size (bp)	6,255,529
G+C content (%)	39.3
Genes (total)	5,904
Protein coding genes (CDSs)	5,689
tRNAs	146
rRNAs	60
ncRNAs	9
GeneBank accession No.	CP091110

IV. 적 요

본 논문에서는 *Neobacillus* sp. JC05의 추출물을 처리한 오이 식물체에서 고구마뿌리혹선충 감염에 대한 식물의 방어 반응을 조사하였다. *Neobacillus* sp. JC05의 추출물을 처리한 오이 식물체에서는 고구마뿌리혹선충에 의한 감염이 감소하여 control에 비하여 병 발생이 감소하였으며, 식물이 받는 피해도 줄어들었다. 이때 *Neobacillus* sp. JC05 추출물을 처리한 오이 식물체의 병 저항성 유전자의 발현량을 관찰한 결과, chitinase와 lipoxygenase 유전자의 발현량이 상대적으로 증가하였으며, 식물체 내 산화 스트레스를 감소시키는 항산화효소 중 peroxidase의 활성이 현저히 증가하는 것을 관찰하였다. 또한, *Neobacillus* sp. JC05 추출물을 처리한 오이 식물체의 토양 FDase 활성이 증가하였으며, 반면 인산가용화효소와 유레아제 활성은 control에 비해 유의하지 않았다. 그러므로, 이전의 연구 결과와 종합하면, *Neobacillus* sp. JC05의 추출물은 직접적으로 고구마뿌리혹선충의 알 부화율을 억제하고 유충의 사멸률을 높여 토양 내 고구마뿌리혹선충의 밀도를 감소시키기도 하지만 본 연구의 결과에 따르면, 오이 식물체의 고구마뿌리혹선충에 대한 방어 반응을 증가시켜 저항성을 유도하며, 이를 통해 고구마뿌리혹선충병 발생을 감소시키는데 기여하는 것으로 사료된다.

[Submitted, May, 4, 2022; Revised, May, 30, 2022; Accepted, May, 31, 2022]

References

1. Akram, A., M. Ongena, F. Duby, J. Dommes, and P. Thonart. 2008. Systemic resistance and lipoxygenase-related defence response induced in tomato by *Pseudomonas putida* strain BTP1. *BMC Plant Biol.* 8(1): 1-12.
2. Bao, A. K., S. M. Wang, G. Q. Wu, J. J. Xi, J. L. Zhang, and C. U. Wang. 2009. Overexpression of the *Arabidopsis* H⁺-PPase enhanced the salt and drought tolerance in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Sci.* 176: 232-240.
3. Bell, E., R. A. Creelman, and J. E. Mullet. 1995. A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92(19): 8675-8679.
4. Bhattarai, K. K., Q. G. Xie, S. Mantelin, U. Bishnoi, Girke. T, D. A. Navarre, and I. Kaloshian. 2008. Tomato susceptibility to root-knot nematodes requires an intact jasmonic acid signaling pathway. *Mol Plant Microbe Interact.* 21(9): 1205-1214.

5. Chandrawat, B. S., A. U. Siddiqui, S. S. Bhati, and V. Saharan. 2020. Response of defence related enzymes in tomato treated with oil-cakes against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 9(11): 1100-1111.
6. Cho, M. R., S. Y. Na, and M. S. Yiem. 2000. Biological Control of *Meloidogyne arenaria* by *Pasteuria penetrans*. J. Asia-Pac. Entomol. 3(2): 71-76.
7. Dahlin P., R. Eder., E. Consoli., J. Krauss, and S. Kiewnick. 2019. Integrated control of *Meloidogyne incognita* in tomatoes using *fluopyram* and *Purpureocillium* strain 251. J. Crop Prot. 124: 104874.
8. Dhindsa, R. S., P. A. M. E. L. A. Plumb-Dhindsa, and T. A. Thorpe. 1981. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. J. Exp. Bot. 32(1): 93-101.
9. EL-Beltagi, H. S., A. A. Mohamed, and M. M. Rashed. 2010. Response of antioxidative enzymes to cadmium stress in leaves and roots of radish (*Raphanus sativus* L.). Not. Sci. Biol. 2(4): 76-82.
10. EL-Beltagi, H. S., A. A. Farahat, A. A. Alsayed, and N. A. Mahfoud. 2012. Response of antioxidant substances and enzymes activities as a defense mechanism against root-knot nematode infection. Not. Bot. Horti. Agrobot. Cluj. Napoca. 40(1): 132-142.
11. Fan, J. W., C. L. Hu, L. N. Zhang, Z. L. Li, F. K. Zhao, and S. H. Wang. 2015. Jasmonic acid mediates tomato's response to root knot nematodes. J. Plant Growth Regul. 34(1): 196-205.
12. Ferris, H., L. Zheng, and M. A. Walker. 2012. Resistance of grape rootstocks to plant-parasitic nematodes. J. Nematol. 44: 377-386.
13. Geng C., X. Nie, Z. Tang, Y. Zhang, J. Lin, M. Sun, and D. Peng. 2016. A novel serine protease, Sep1, from *Bacillus firmus* DS-1 has nematicidal activity and degrades multiple intestinal-associated nematode proteins. Sci. Rep. 6(1): 1-12.
14. Huang, H., F. Ullah, D. X. Zhou, M. Yi, and Y. Zhao. 2019. Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses. Front. Plant Sci. 10: 800.
15. Hwang, S. M., K. S. Jang, Y. H. Choi, J. C. Kim, and G. J. Choi. 2014. Development of efficient screening methods for resistant cucumber plants to *Meloidogyne incognita*. Plant dis. res. 20(2): 119-125.
16. Jang, H., S. T. Kim, and M. K. Sang. 2021. Suppressive effects of crude extracts of *Bacillus* sp. CT16 and *Neobacillus* sp. JC05 against egg hatch of *Meloidogyne incognita*. Plant Dis. 27: 61-65.
17. Kandeler, E. and H. Gerber. 1988. Short-term assay of soil urease activity using colorimetric

- determination of ammonium. *Biol. Fertil. Soils.* 6(1): 68-72.
18. Karaka A., S. C. Cetin., Q. C. Turgay, and R. Kizilkaya. 2010. Soil enzymes as indication of soil quality. In *Soil Enzymology*, Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 119-148.
 19. Kim, S. H., J. E. Shin, K. J. Lee, S. J. Xu, and B. S. Kim. 2012. Evaluation of disease resistance of cucurbit cultivars to powdery mildew and root-knot nematode. *Plant dis. res.* 18(1): 29-34.
 20. King, G. J., C. E. Hussey, and V. A. Turner. 1986. A protein induced by NaCl in suspension cultures of *Nicotiana tabacum* accumulates in whole plant roots. *Plant Mol. Biol.* 7: 441-449.
 21. Lin, D., Y. Xu, H. Wu, X. Liu, L. Zhang, J. Wang, and Q. Rao. 2019. Plant defense responses induced by two herbivores and consequences for whitefly *Bemisia tabaci*. *Front. Physiol.* 10: 346.
 22. Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *methods.* 25(4): 402-408.
 23. Martinez, C., F. Blanc, E. Le Claire, O. Besnard, M. Nicole, and J. C. Baccou. 2001. Salicylic acid and ethylene pathways are differentially activated in melon cotyledons by active or heat-denatured cellulase from *Trichoderma longibrachiatum*. *Plant Physiol.* 127(1): 334-344.
 24. Melan, M. A., X. Dong, M. E. Endara, K. R. Davis, F. M. Ausubel, and T. K. Peterman. 1993. An *Arabidopsis thaliana* lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate. *Plant Physiol.* 101(2): 441-450.
 25. Molinari, S. 1995. Difference in isoperoxidase activities of tomato roots susceptible and resistant to root-knot nematodes. *Nematol. Mediterr.* 23(2): 271-281.
 26. Molinari, S., E. Fanelli, and P. Leonetti. 2014. Expression of tomato salicylic acid (SA)-responsive pathogenesis-related genes in *Mi-1*-mediated and SA-induced resistance to root-knot nematodes. *Mol. Plant Pathol.* 15(3): 255-264.
 27. Molinari, S. and P. Leonetti. 2019. Bio-control agents activate plant immune response and prime susceptible tomato against root-knot nematodes. *PLOS ONE.* 14(12): e0213230.
 28. Oka, Y., H. Koltai, M. Bar-Eyal, M. Mor, E. Sharon, I. Chet, and Y. Spiegel. 2000. New strategies for the control of plant-parasitic nematodes. *Pest Manag. Sci.* 56: 983-988.
 29. Oh, M., J. W. Han, J. S. Choi, Y. H. Choi, K. S. Jang, G. J. Choi, and H. Kim. 2016. Nematicidal activity of *Streptomyces flavogriseus* KRA15-528 to *Meloidogyne incognita*. *Plant Dis.* 22(4): 227-235.
 30. Park, M. H., B. C. Walpola, S. J. Kim, and M. H. Yoon. 2012. Control effect of rood-knot

- nematode (*Meloidogyne incognita*) by biological nematicide. Korean J. Soil Sci. Fert. 45(2): 162-165.
31. Pu, X., B. Xie, P. Li, Z. Mao, J. Ling, H. Shen, J. Zhang, N. Huang, and B. Lin. 2014. Analysis of the defence-related mechanism in cucumber seedlings in relation to root colonization by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* CS-20. FEMS Microbiol. Lett. 355: 142-151.
 32. Samaliev, H. Y., F. I. Andreoglou, S. A. Elawad, N. G. Hague, and S. R. Gowen. 2000. The nematicidal effects of the bacteria *Pseudomonas oryzihabitans* and *Xenorhabdus nematophilus* on the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. Nematology. 2: 507-514.
 33. Shores, M., I. Yedidia, and I. Chet. 2005. Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. Phytopathology. 95(1): 76-84.
 34. Song, H., P. Wang, C. Li, S. Han, J. Lopez-Baltazar, X. Zhang, and X. Wang. 2016. Identification of lipoxygenase (*LOX*) genes from legumes and their responses in wild type and cultivated peanut upon *Aspergillus flavus* infection. Sci. Rep. 6(1): 1-9.
 35. Tabatabai, M. A. and J. M. Bremner. 1969. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. Soil Biol. Biochem. 1(4): 301-307.
 36. Varner, J. E. and L. S. Lin. 1989. Plant cell wall architecture. Cell. 56: 231-239.
 37. Yang, X. J., W. J. Jiang, and H. J. Yu. 2012. The expression profiling of the lipoxygenase (*LOX*) family genes during fruit development, abiotic stress and hormonal treatments in cucumber (*Cucumis sativus* L.). Int. J. Mol. Sci. 13: 2481-2500.
 38. Yang, J., L. Liang, J. Li, and K. Zhang. 2013. Nematicidal enzymes from microorganisms and their applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 97: 7081-7095.
 39. Zacheo, G., T. Blevé-Zacheo, and G. Pricolo. 1987. Metabolic changes in enzyme levels in potato roots infested by potato cyst nematodes, *Globodera pallida* (Pa3) and *Globodera rostochiensis* (Ro1). Nematol. Mediterr. 15(2): 293-302.