

생물학적 살선충제의 뿌리혹선충 (*Meloidogyne incognita*) 방제 효과

박문현¹ · Buddhi Charana Walpola² · 김선종² · 윤민호^{2*}

¹(주)효성오앤비, ²충남대학교 농업생명과학대학 생물환경화학과

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

Moon-Hyun Park¹, Buddhi Charana Walpola², Sun-Joong Kim², and Min-Ho Yoon^{2*}

¹Research Institute, HyosungONB Co., Ltd., 461-68 Jeonmin-dong, Yuseong-gu, Daejeon, Korea

²Department of Bio-Environmental Chemistry, College of Agriculture and LifeSciences,
Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

An nematophagous fungi *Arthrobotrys thaumasia* Nema-1 and *Bacillus subtilis* C-9, which degrade the collagen and gelatin, were isolated from horticulture plantation soil in Kyungpook Sungju-gun Seonnam-myun and Chungnam Gongju-gun Woosung-myun to develop biological nematode pesticide. When 5,000 mg kg⁻¹ of *A. thaumasia* Nema-1 nematicide powder (7.0×10^3 cfu g⁻¹) was treated to pot including *Meloidogyne incognita*, the number of nematode's egg mass, which is a index of nematicidal activity, decreased to 35% compared to control. While the number of nematode's egg mass decreased to 67% by treating the nematicide powder mixture of 5,000 mg kg⁻¹ Nema-1 and *B. subtilis* C-9 (8.5×10^5 cfu g⁻¹). Furthermore the number of nematode's egg mass of the mixture containing cinnamon extract 10 mg kg⁻¹, each 5,000 mg kg⁻¹ of Nema-1 and C-9 nematicide powder was decreased to 84%, comparing to the result showed the number of nematode's egg mass decreased to 24%, by the treatment of chemical nemato pesticide Fosthiazate 24 mg kg⁻¹. These results suggested the mixture of microorganisms and plant extract was more effective biological nematicide than the case of only microorganism or plant extract for nematode control.

Key words: *Meloidogyne incognita*, *Arthrobotrys thaumasia* Nema-1, *Bacillus subtilis* C-9, Biological nematicide

서 언

고구마뿌리혹선충 (*Meloidogyne incognita*)은 식물기생성 선충으로서 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 세포수가 증가되고, 비대현상이 일어나 흑모양으로 변하게 된다 (Choi, 1982).

국내 시설원에 재배지에서 뿌리혹 선충의 감염으로 매년 약 30~40%의 수량 감소를 가져오고 있다. 이러한 식물 기생 선충의 피해를 감소시키기 위해 윤작, 객토, 태양열 소

독, 담수처리, 토양 혼중, 살선충제 처리 방법 등이 있지만, 사용의 편리성 때문에 유기합성 농약이 주로 사용되었다. 그러나 최근에 Aldicarb, Fenamiphos, Methyl bromide, DBCP, EDB 등의 선충방제용 농약성분들이 인체 및 자연환경에 유해성이 있다고 밝혀지면서 살선충제 농약 등록이 취소됨으로서 천연물 추출물이나 미생물을 이용한 친환경 살선충제 개발에 관심이 집중되고 있다.

현재 농가에서 사용하고 있는 친환경 살선충제로는 님오일 (Kim et al., 2011), 계피추출물 (cinnamic acid, cinnamic aldehyde, Chanh, 2010)과 같은 식물 추출물이나 미생물제제를 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 (Braga et al., 2010), *Pseudomonas* 속 (Abo-Elyousr et al., 2010) 등이 보고되었다. 선충포식공파이를 이용하여 방제하는 기술은 실내검정에서 우수한 결과를 나타내었으나 토양 적응성 문제로 인하여 방제가가 포트나 포장검정에서 감소

접수 : 2012. 2. 13 수리 : 2012. 4. 2

*연락처 : Phone: +82428216733

E-mail: mhmoon@cnu.ac.kr

하는 경향을 보인다. 이를 해결하기 위해 선충포식능력이 뛰어난 곰팡이분리와 선충 표피 성분인 collagen, 알집 성분인 gelatin을 분해하는 효소 생성균 (Kim et al., 2011; 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).

선행연구에서 시설재배지 토양으로부터 선충 포식성 곰팡이와 선충 표피성분인 collagen과 gelatin 분해능이 뛰어난 세균을 분리하여 살선충 활성을 분석하고, 분리 미생물들과 계피추출물과 혼용 시의 살선충효과를 실내검정을 통하여 확인하였다 (Park et al., 2011). 본 연구에서는 선행연구의 결과를 토대로 분리 미생물들과 식물체 추출물의 살선충 효과를 토마토를 이용한 포트실험을 통해 선충방제제로서의 가능성을 확인코자 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

선충포식곰팡이의 분리와 배양 선충포식 곰팡이를 순수분리하기 위하여 채집한 토양시료를 $10^{-1} \sim 10^{-3}$ 농도로 희석하여 항생제 streptomycin sulfate salt (Sigma-Aldrich, USA) 100 mg kg^{-1} 첨가한 potato dextrose agar (PDA, Difco, USA) 배지를 이용하여 희석평판법으로 곰팡이를 1차 순수 분리 하였다. 분리균들은 PDB (Potato dextrose broth)에서, pH 6.0, 배양온도 25°C 에서 진탕배양 (회전수 150 rpm)하여 7일 후 배양액을 채취하여 살선충 활성을 조사하였다. 살선충 활성은 96 well micro plate에 각 well당 선충 200 마리를 넣은 후 분리균 배양액 $1.0 \times 10^3 \text{ cfu mL}^{-1}$ 의 농도로 접종하여 7일 후 살아있는 선충수를 계수하여 포식능력이 가장 우수한 곰팡이를 분리하였다. 분리한 선충포식곰팡이의 동정은 18S rDNA의 ITS1, ITS4를 primer로 PCR 증폭한 후, ITS 부분의 PCR product의 염기서열을 NCBI/GENEBANK의 Blast 프로그램을 이용하여 계통학적인 특성을 비교하였다.

선충포식곰팡이 배양을 위한 배지는 Difco사의 NB (Nutrient broth), PDB와 YMB (Yeast malt broth)를 각각 이용하였고, 배지의 pH 6.0, 배양온도 25°C 에서 진탕배양 (회전수 150 rpm)하여 7일 후 균사량을 검정하였다. 균사량 측정은 배양액 500 mL를 Whatman filter paper No.6으로 여과한 균사를 dry oven에서 50°C 로 24시간 건조 후 중량을 측정하였다.

Collagenase 생성균 분리와 배양 Collagen 분해균은 전국 20지역으로부터 500여개의 근권토양 시료를 채집하여 nutrient skim milk agar (NSKA: nutrient broth 0.8%, agar 1.5%, skim milk 1%, Difco) 배지 상에서 $10^{-3} \sim 10^{-5}$ 의 농도로 희석평판하여 30°C 에서 24 hr 배양하여 colony 주변

에 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*, 중국산)분말 50 g을 80% MeOH (v/v) 200 mL에 넣어 24시간 암실에서 추출한 후 추출액을 40°C 에서 감압농축 (B chi, Rotavapor R-200, swiss)하여 계피 추출물 5 g을 얻었다.

계피추출물 약해 검정 계피추출물 10, 20, 50, 100 mg L^{-1} 농도별로 페트리디쉬에 상추씨 30개에 대한 발아율과 초장을 측정하였다. 대조구로 증류수, 님오일 100, 500, 1000, 2000 mg L^{-1} , 선충탄 (a.i. Fosthiazate 5%) 400, 1000, 2000, 10000 mg L^{-1} 을 선정하여 실시하였다.

살선충 방제제 제조

(1) 살선충 곰팡이 담체 선정 선충포식곰팡이 Nema-1의 배양을 위한 배지는 Difco사의 YMB (Yeast malt broth)를 이용하였고, 배지의 pH 6.0, 배양온도 25°C 에서 진탕배양 (회전수 150 rpm)하여 7일 후 배양액을 채취하여 Whatman filter paper No.6으로 여과한 후 균사가 서로 뭉쳐있는 것을 방지하기 위해 커터기로 분쇄한 균사를 이용하였다. 제제화를 위해 담체로서 물, 카오린, 벤토나이트, 제오라이트를 균사와 1:30의 중량비율로 고르게 혼합하여 25°C 와 40°C 에서 7일간 보관후 NA 배지에 희석평판하여 생균수를 측정하여 가장 생균수가 많은 담체를 선정하였다.

(2) Collagenase 생성균 담체 선정 Collagenase 생성균 C-9의 배양을 위한 배지는 Difco사의 YMB를 이용하였고, 배지의 pH 6.0, 배양온도 30°C 에서 진탕배양 (회전수 150 rpm)하여 48시간 배양액을 원심분리 (10,000×g, 5분)한 농축 균주를 이용하였다. 제제화를 위해 담체로서 물, 카오린, 벤토나이트, 제오라이트를 균사와 1:30의 중량비율로 고르게 혼합하여 25°C 와 40°C 에서 7일간 보관후 NA에 희석평판하여 생균수를 측정하여 가장 생균수가 많은 담체를 선정하였다.

(3) 계피추출물 제제 제조 계피 조추출물 1 g을 에탄올로 희석하여 100 mL stock solution을 만든 후 1 mL를 제오라이트 999 g에 혼합하여 계피추출물 제제를 100 mg kg⁻¹의 농도로 만든다.

살선충 활성 포트 재배시험 육묘는 1개월간 플러그 포트(3×3×5 cm)에 원예용 경량상토를 이용하여 진행하였다. 토마토 종자는 서광품종을 이용하였고 본엽 3~4매 일 때 이식하였다. 포트 실험은 2개월간 충남대학교 농업생명과학대학 유리온실에서 진행되었고 시험 토양은 충남대학교 노지 밭 토양을 이용하였으며 토성, 유기물 함량, pH, 전기전도도, 전질소, 유효인산, 치환성 칼륨, 무기태 (질산태, 암모니아태) 질소 함량 등의 토양분석 (농촌진흥청고시 토양분석법)을 하였다. 시험 포트는 직경 10 cm, 높이 20 cm 포트를 이용하였고, 비료 처리는 농촌진흥청 고시 토마토 표준시비량에 따라 처리하였다. 모든 실험구에는 고구마뿌리혹 선충 (*Meloidogyne incognita*, 한국화학연구소 분양) 2령 유충 1000 마리 접종하였다. 실험처리구는 무처리구, 대조약제 처리구, 선충포식 곰팡이 단독처리구, collagenase 생성균 처리구, 계피 추출물 처리구로 나누어 처리농도별로 분리하여 3반복 처리하였다.

시험처리구

- (1) 무처리구
- (2) 대조약제 처리구 (선충탄 a.i. Fosthiazate 5%, 표준시비량 6 kg 10a⁻¹)
 - 대조약제 포스치아제이트 24 mg kg⁻¹ 처리 (작토층 20 cm, 토양밀도 1.25 kg L⁻¹ 기준으로 토양 무게환산)
- (3) 살선충 곰팡이 제제 단독 처리구
 - 살선충곰팡이 Nema-1 제제 농도별 2500, 5000, 10000 mg kg⁻¹ 처리
- (4) Collagenase 생성균 C-9 제제 단독 처리구
 - Collagenase 생성균 C-9 제제 농도별 2500, 5000, 10000 mg kg⁻¹ 처리

(5) 계피 추출물 제제 단독 처리구

- 계피 추출물 제제 10, 20, 50, 100 mg kg⁻¹ 처리

(6) 살선충 곰팡이 제제, Collagenase 생성균 제제 혼합 처리구

- 살선충곰팡이 Nema-1 제제 5000 mg kg⁻¹ + Collagenase 생성균 C-9 제제 농도별 2500, 5000, 10000 mg kg⁻¹ 처리

(7) 살선충 곰팡이 제제, 계피 추출물 제제 혼합 처리구

- 살선충곰팡이 Nema-1 제제 5000 mg kg⁻¹ + 계피 추출물 제제 농도별 10, 20, 50, 100 mg kg⁻¹ 처리

(8) 살선충 곰팡이 제제, Collagenase 생성균 제제, 계피 추출물 제제 혼합 처리구

- 살선충곰팡이 Nema-1 제제 5000 mg kg⁻¹ + Collagenase 생성균 C-9 제제 5000 mg kg⁻¹ + 계피 추출물 제제 농도별 10, 20, 50, 100 mg kg⁻¹ 처리

살선충 효과는 60일후 뿌리를 조사하여 뿌리에 달린 난낭수를 확인하였다. 난낭조사는 뿌리를 물로 깨끗이 씻고 Phloxin B (15 mL L⁻¹) 용액에 15분간 염색하였으며 잔뿌리 부분 1g을 채취하여 바닥이 흰색인 용기에서 붉게 염색된 난낭의 숫자를 육안으로 계수하였다.

결 과

선충포식곰팡이의 분리와 배양 항생제를 첨가한 PDA 배지에서 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 동정 (Park et al., 2011)되었고, 포식기관의 구조는 3차원 끈끈이 그물 구조로 선충을 포식하였다 (Fig. 1-a, b). *Arthrobotrys* sp.의 성장특성은 온도 25°C, pH 6에서 최적조건으로 알려져 있어 (Lee, 2003) 동일조건에서 Nema-1의 배지종류별 성장 특성을 비교한 결과, YMB에서

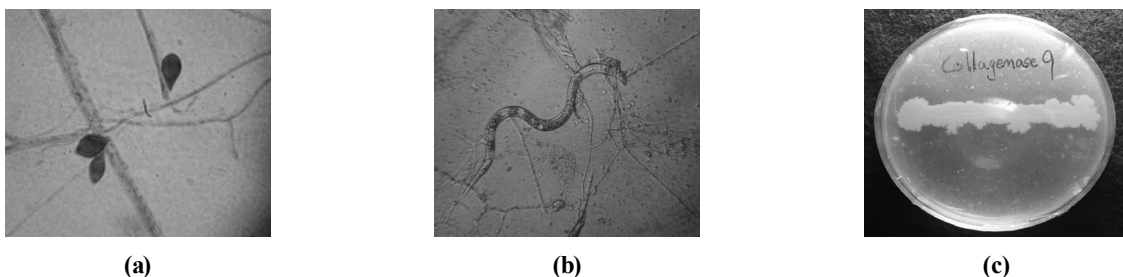


Fig. 1. Morphological characterization of *Arthrobotrys thaumasia* Nema-1 (a), nematode trapping by hypha of Nema-1 (b), hydrolysis activity of collagen by *Bacillus subtilis* C-9 (c).

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

Treatment	Weight							
	0 hr	24 hr	48 hr	72 hr	96 hr	120 hr	144 hr	168 hr
	----- g L ⁻¹ -----							
NB	0.15	1.20	3.95	5.98	8.70	9.75	9.80	9.90
PDB	0.16	1.25	4.30	6.42	9.35	10.25	10.30	10.32
YMB	0.21	1.35	4.88	6.86	9.97	10.85	10.90	10.92

Table 2. Comparison of lettuce's germination rate and length by cinnamon extract, fosthiazate, and neem oil.

Treatment	Concentration	Germination rate	Length
	mg L ⁻¹	%	cm
Cinnamon extract	0	100	6.6 ± 0.8 [†]
	10	100	5.7 ± 1.3
	20	86.7	4.2 ± 1.8
	50	23.3	1.9 ± 1.3
	100	20.0	0.4 ± 0.2
Fosthiazate a.i. 5%	0	100	6.6 ± 0.8
	400	100	5.8 ± 2.3
	1000	100	4.2 ± 1.6
	2000	90.0	3.3 ± 2.4
Neem oil	10000	6.7	0.9 ± 0.5
	0	100	6.6 ± 0.8
	100	90.0	5.8 ± 3.2
	500	90.0	3.2 ± 2.3
	1000	43.3	0.7 ± 0.5
	2000	0	0

[†]Data represents the mean ± standard deviations of three replications.

진탕배양하여 7일후 건조중량이 PDB 보다는 약 6%, NB 배양체에 비해서는 약 10% 수준으로 증가함을 보였다 (Table 1).

Collagenase 생성균 분리와 배양 NSKA 배지 상에서 단백질 분해능이 우수한 10개 균주를 1차 선발하여 선충 표피 구성성분인 collagen과 알집의 구성성분인 gelatin 분해능이 우수한 균을 halozone 크기로 확인하였다. 이 중 gelatin과 collagen 기질 모두에 분해활성이 나타낸 C-9를 최종 선발하여 16s rDNA 염기서열을 비교한 결과 C-9 균주는 *Bacillus subtilis*와 99%의 상동성을 보였다 (Fig. 1-c). 분리된 C-9의 생육은 Nema-1과 같이 YMB배지에서 가장 생육이 우수하였으며 48시간 배양시의 생균수는 5.3×10⁷ cfu mL⁻¹ 수준이었다 (data not shown).

계피추출물 약해 검증 계피추출물 (cinnamic acid, cinnamic aldehyde, Chanh, 2010)은 살선충 활성을 보이거나 식물의 지하부에 약해가 있다고 알려져 있다. 포트 재배 실험에 앞서서 상추 발아율과 초장을 측정한 결과 계피추출물은 100 mg L⁻¹에서 20%, 님오일은 100 mg L⁻¹에서 90%, 선

충탄은 1000 mg kg⁻¹에서 100%의 발아율을 보여 계피추출물은 다른 추출물에 비해 낮은 농도에서도 발아를 억제하였다 (Table 2).

살선충 방제제 제조

(1) **살선충 곰팡이 담체 선정** 선충포식곰팡이 Nema-1의 균주 보존을 위한 담체 선정을 위해 물, 카오린, 벤토나이트, 제오라이트를 각각 여과한 균사 1:30의 중량비율로 고르게 혼합하여 25°C와 40°C에서 7일간 보관후 NA (Nutrient agar plate medium)에 희석평판하여 생균수를 측정한 결과 카오린, 벤토나이트, 제오라이트를 담체로 사용하였을 시 급격한 수분손실로 물에 비해 많은 생균수의 감소를 일으킨다. 그 중에서 제오라이트가 타 광물질에 비해 생균수가 많이 보존되어 있어서 담체로서 제오라이트를 선정하였다. 특이한 점은 Nema-1 균주는 온도 변화에 민감하여 보관온도가 40°C에서 모두 사멸하는 결과를 보였다 (Table 3).

(2) **Collagenase 생성균 담체 선정** Collagenase 생성균 C-9의 균주 보존을 위한 담체 선정을 위해 Nema-1 담체

Table 3. Adaptive effect of *A. thaumasia* Nema-1 in mineral matters during 7 days.

Treatment	Temperature	Number of microorganism
	°C	cfu g ⁻¹
Culture solution	25 [†]	2.7 × 10 ⁶
Culture filtrate	25 [†]	2.6 × 10 ⁹
D.W.	25	3.0 × 10 ⁶
	40	0
Kaolin	25	2.1 × 10 ³
	40	0
Bentonite	25	2.9 × 10 ³
	40	0
Zeolite	25	7.0 × 10 ³
	40	0

[†]Hyphen represents that the treatment was not stored 7 days.

Table 4. Adaptive effect of *B. subtilis* C-9 in mineral matters during 7 days.

Treatment	Temperature	Number of microorganism
	°C	cfu g ⁻¹
Culture solution	25 [†]	5.3 × 10 ⁷
Cultured cell	25 [†]	8.6 × 10 ⁹
D.W.	25	3.0 × 10 ⁸
	40	8.3 × 10 ⁸
Kaolin	25	2.1 × 10 ⁵
	40	3.3 × 10 ⁵
Bentonite	25	2.8 × 10 ⁵
	40	4.3 × 10 ⁵
Zeolite	25	8.5 × 10 ⁵
	40	9.1 × 10 ⁵

[†]Hyphen represents that the treatment was not stored 7 days.

선정과정과 같은 방식으로 진행하였다. 다른점은 C-9균주의 경우 filtrate 대신에 원심분리기를 이용하여 균주를 농축하였다. C-9균주의 경우도 제오라이트가 타 광물질에 비해 생균수가 많이 보존되어 있어서 담체로서 제오라이트를 선정하였다. C-9 균주는 바실러스 속으로서 그람 양성균으로 내열성이 강하고 주변 환경 악화시 아포를 형성하여 Nema-1 균주와는 다르게 40°C에서도 25°C에서 보관된 균주와 비슷한 균수를 보였다 (Table 4).

살선충 활성 포트 재배시험 기존의 살선충 활성 실험 내검정 결과 (Park, 2011)를 바탕으로 토마토를 이용한 포트 재배시험을 실시하였다. 공시 토양인 충남대학교 노지

밭 토양의 토성은 식양토이며, 유기물 함량, pH, 전기전도도, 전질소, 유효인산, 치환성 칼륨, 무기태 (질산태, 암모니아태) 질소 함량분석 결과 포트재배 시험을 실시하는데 큰 문제가 없는 토양으로 생각되었다 (Table 5). 처리구별로 60일후 뿌리를 조사하여 뿌리에 달린 난낭수를 확인한 결과 Table 6에서 처럼 뿌리 1 g당 난낭수는 선충방제제 농도에 따라 유의차를 보였다. 또한 선충포식 곰팡이 단일 균주를 처리했을 때보다 선충포식 곰팡이와 collagenase 생성균을 혼합 처리했을 때 난낭수의 감소율이 최고 35%로, 이 결과는 C-9균주가 생성하는 단백질분해 효소가 선충 표피의 구성성분인 콜라겐, 알부민, 케라틴, 젤라틴 등의 단백질 성분을 일부 분해하여 균사의 선충 내 침입을 도와주는 결과로 사료된다. 그러나 초장, 지하부 생체중의 경우 처리구에 따른 유의차는 보이지 않으나 계피추출물의 농도에 따른 초장과 뿌리의 생체중이 감소하였고 이는 계피추출물이 식물 뿌리생장 저해를 일으킨다는 결과와 일치하였다 (Paik et al, 1998). 또한, 뿌리의 생장저해로 지상부의 초장 역시 생장이 저해된 것으로 사료된다. 계피추출물 중 cinnamic aldehyde 또는 cinnamic acid 성분의 살선충 활성이 보고 되어 있고 (Chanh, 2010) 포트 재배시험 결과에서도 계피추출물 제제 100 mg kg⁻¹의 낮은 농도로도 무처리대비 75% 난낭수 감소 효과를 보였으나 식물체의 지상부, 지하부 생육저하 현상이 발생하기 때문에 반드시 사용농도에 대한 약해실험이 동반되어야 한다. 계피추출물 제제 10 mg kg⁻¹와 살선충 곰팡이 Nema-1 제제 (7.0 × 10³ cfu g⁻¹), Collagenase 분해균 C-9 제제 (8.5 × 10⁵ cfu g⁻¹) 각각 5000 mg kg⁻¹의 농도로 혼용처리 한 결과는 대조약제로 사용한 대표적 유기합성 살선충제인 선충탄 (Fosthiazate) 표준사용량 24 mg kg⁻¹ 처리시 난낭수 55.7개보다 적은 19개로서 무처리 대비 약 84% 이상의 난낭수 감소효과를 나타내었고 낮은 계피추출물 농도로 지상부와 지하부 생육저하 없이 효과적인 생물학적 방제제제의 가능성을 제시하였다 (Table 6).

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 시설재배지 토양으로부터 분리한 선충포식성 곰팡이 *Arthrotrichys*

Table 5. Chemical properties of soil used for nematocidal pot test.

pH	EC	NO ₃ ⁻ -N+NH ₄ ⁺ -N	Avail. P ₂ O ₅	Exch. K	Organic matter
1:5	dS m ⁻¹	mg kg ⁻¹	mg kg ⁻¹	cmol _c kg ⁻¹	g kg ⁻¹
6.6	0.95	150	476	1.53	20

Table 6. Nematicidal effect on the powder mixture of *A. thaumasia* Nema-1, *B. subtilis* C-9 and cinnamon extract.

Number	Treatment	Concentration	Number of egg mass	Length of leaf	Weight of root
		mg kg ⁻¹	ea g ⁻¹	cm	g
Control	Control	0	75.0 ± 2.5 [†]	112.0 ± 3.5	42.2 ± 3.3
Fosthiazate	Fosthiazate	24	55.7 ± 4.1	112.0 ± 2.5	21.1 ± 3.5
1	Nema ⁻¹	2500	58.0 ± 3.5	104.0 ± 3.9	26.0 ± 3.2
2		5000	48.7 ± 4.1	105.0 ± 3.8	25.6 ± 4.0
3		10000	47.3 ± 4.9	113.7 ± 2.8	24.9 ± 4.3
4	Nema ⁻¹ (5000 mg kg ⁻¹) + C-9	2500	34.7 ± 4.1	114.3 ± 4.6	28.9 ± 4.3
5		5000	32.3 ± 4.8	110.3 ± 4.9	21.0 ± 4.8
6		10000	31.7 ± 4.6	99.3 ± 4.3	21.0 ± 4.5
7	C-9	2500	37.2 ± 2.8	99.7 ± 1.8	30.0 ± 2.6
8		5000	36.5 ± 2.4	109.3 ± 1.4	29.8 ± 2.3
9		10000	35.7 ± 3.2	112.7 ± 1.2	29.6 ± 3.8
10	Nema ⁻¹ (5000 mg kg ⁻¹) + cinnamon extract	10	26.7 ± 3.8	121.3 ± 2.2	40.0 ± 2.6
11		20	21.0 ± 1.4	117.3 ± 2.4	39.5 ± 2.3
12		50	14.3 ± 1.2	109.3 ± 3.1	31.9 ± 3.8
13		100	13.0 ± 3.2	100.0 ± 3.5	31.6 ± 3.4
14	cinnamon extract	10	33.0 ± 2.8	112.5 ± 3.8	40.7 ± 2.7
15		20	22.0 ± 2.4	100.0 ± 3.4	26.4 ± 2.9
16		50	21.0 ± 3.2	90.0 ± 3.8	17.2 ± 3.2
17		100	19.0 ± 2.2	80.0 ± 3.1	17.0 ± 3.4
18	Nema-1, C-9 (5000 mg kg ⁻¹) + cinnamon extract	10	13.0 ± 5.1	130.0 ± 2.1	39.5 ± 1.1
19		20	12.0 ± 4.3	114.3 ± 4.8	38.0 ± 4.2
20		50	6.0 ± 4.9	106.7 ± 4.6	28.7 ± 5.3
21		100	5.0 ± 4.2	105.0 ± 5.3	27.0 ± 5.5

[†]Data represents the mean ± standard deviations of three replications.

thaumasia Nema-1과 collagenase와 gelatinase등 다양한 protease를 생성하여 선충의 치사를 돕는 *Bacillus subtilis* C-9, 그리고 살선충효과가 알려진 계피추출물 혼용물의 살선충효과를 비교하였다. 포식성 곰팡이 Nema-1의 생육 및 살선충 활성은 YMB 배지에서 진탕배양 시 NB 나 PDB 배지에서 정체배양 보다 높아 배지조건에 따라 영향이 있음을 확인 하였다. 포트시험 결과 분리균에 의한 뿌리혹 선충 난당수 감소효과는 Nema-1 단용 미생물로 사용하는 것보다 C-9균주를 혼합 사용 시 활성이 증진되는 결과를 보였는데 이는 C-9에 의해 생성된 collagenase 및 gelatinase가 선충 포식성 곰팡이 Nema-1의 선충내 침투력을 향상시킨 결과로 요인으로 보여진다 (Tunlid et al., 1991). 또한, Nema-1과 C-9 미생물에 살선충 효과가 우수하다고 알려진 계피추출물을 첨가한 혼합물을 사용한 실험에서는 처리 후 무처리구에 비해 84% 이상의 뿌리혹 선충 난당수 감소 효과를 보임으로서 미생물과 식물추출물을 함께 사용하는 복합제 형태가 생물학적 선충방제로서 더 효과적 일 수 있다는 가능성을 제시하였다. 그러나 선충피해가 발생한 초기에 성주 참외 하우스와 공주 오이 하우스에서 포트실험과 동일한 처리구로 포장실험을 진행하였으나 뿌리혹선충이 뿌리 안으

로 침입하여 뿌리혹 생성이 시작되었을 때에는 이미 선충 개체수가 급격히 증가한 시점이기 때문에 어떠한 처리구에서도 선충피해 진전을 막지 못하였다. 따라서 친환경 방제제를 이용한 뿌리혹 선충의 방제에는 방제시점이 중요하였고, 효과증진을 위해서는 고농도의 미생물과 토양 내 적응성을 위한 제형화 기술개발이 향후 과제이다.

요 약

친환경 선충 방제제 개발을 위해 경북 성주군 선남면 및 충남 공주군 우성면의 시설원에 재배지 토양으로 부터 선충 포식성이 뛰어난 곰팡이 *Arthrobotrys thaumasia* Nema-1과 선충 표피성분인 collagen과 알집 주성분인 gelatin 분해 능이 뛰어난 *Bacillus subtilis* C-9를 분리 하였다. 이들 분리균을 대상으로 포트실험을 통해 선충치사 효과의 지표인 난당수 감소를 검토한 결과, 균밀도가 7.0×10^3 cfu g⁻¹ 인 *A. thaumasia* Nema-1 곰팡이 제제 5,000 mg kg⁻¹을 처리 시 뿌리혹 선충의 난당수가 무처리 대비 35% 감소하였다. 포식성 곰팡이 Nema-1 제제와 균밀도가 8.5×10^5 cfu g⁻¹ 인 *B. subtilis* C-9 세균 제제 각각 5,000 mg kg⁻¹ 혼합 처

리구에서는 난낭수가 무처리 대비 67% 감소하였다. 또한 선충치사효과를 증진시키기 위하여 살선충 활성이 있다고 보고된 계피추출물 제제 10 mg kg⁻¹을 5,000 mg kg⁻¹의 Nema-1과 C-9 제제와 혼합하여 처리 하였을 때 난낭수가 무처리 대비 84%이상 감소하였으며, 대표적 살선충제인 선충탄(Fosthiazate) 24 mg kg⁻¹은 난낭수가 26% 감소한 결과와 비교해 볼 때 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 nematocidal 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 nematocidal 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, *Drechlerella brochopaga* Kan-23. *Kor. J. Microbiol.* 44(1):63-68.
- Choi, Y.H., 1982. *Phytonematology*. Hyang-moon-sa, p. 58-69. 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 nematocidal activity against *Meloidogyne incognita*. *J. Plant Pathol.* 126(3):417-422.
- 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.
- Kim, S.S., S.I. Kang, J.S. Kim, Y.S. Lee, S.H. Hong, K.W. Naing, and K.Y. Kim. 2011. Biological Control of Root-knot Nematode by *Streptomyces sampsonii* KK1024. *Korean J. Soil Sci. Fert.* 44(6):1150-1157.
- 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. and R.H. Estey. 1963. A nematotoxin produced by the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora* Fresenius. *Nature.* 197:514-515.
- Paik, S.B., S.C. Sim, H.M. Ku, and W.G. Yoe. 1998. Screening for antifungal medicinal plants against brown patch and large patch diseases of turfgrass. *Kor. Turfgrass Sci.* 12(3):183-194.
- Park, M.H., J.K. Kim, W.H. Choi, and M.H. Yoon. 2011. Nematicidal effect of root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) by biological nematicide. *Korean J. Soil Sci. Fert.* 44(2):228-235.
- Stadler, M., H. Anke, and O. Sterner. 1993. Linoleic acid-the nematocidal 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. 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.
- 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.
- 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.