

최 종
연구보고서

선충 천적곰팡이를 이용한 친환경 생물농약 개발

Biocontrol of plant-parasitic
nematode using nematophagus fungi

연구기관

(주) 팜텍21(경북농업기술원, 대구가톨릭대학교)

농림수산식품자료실



0016230

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “선충 천적곰팡이를 이용한 친환경 생물농약 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008년 4월 23일

주관연구기관명 : 팜텍21

총괄연구책임자 : 황 형 규

연 구 원 : 최 영 연

연 구 원 : 박 경 자

연 구 원 : 이 경 락

연 구 원 : 김 희 정

협동연구기관명 : 대구가톨릭대학교

협동연구책임자 : 신 동 일

연 구 원 : 이 지 원

협동연구기관명 : 경북농업기술원

협동연구책임자 : 김 동 근

연 구 원 : 이 중 환

연 구 원 : 김 승 한

연 구 원 : 최 정 화

요 약 문

I. 제 목

선충 천적곰팡이를 이용한 친환경 생물농약 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

국내 시설재배지대에는 겨울동안에도 시설을 이용하여 채소류를 연중 재배함으로써 아열대지방에 적응하는 고구마뿌리혹선충(*M. incognita*)과 땅콩뿌리혹선충(*M. arenaria*)의 발생이 심한데, 예를 들어, 성주 참외재배 지역에서는 20년 이상의 연작으로 50% 이상의 포장에 뿌리혹선충이 감염되어있고 매년 약 300억원의 감수를 가져오는 것으로 추정하였다.

뿌리혹선충의 방제법으로는 담수, 휴경, 건토, 깊이갈이, 열처리(스팀, 건열, 온탕침법), 약제방제, 저항성 품종 이용, 비기주작물 윤작, 객토, 유인식물 재배, 태양열처리법, Chemigation 등 여러 가지가 알려져 있는데, 가장 환경친화적인 선충 방제법은 천적을 이용한 생물적 방제법이다.

식물기생성선충 방제용 생물농약 개발을 위해서는 우수한 천적이 선발되어야하고, 이 천적을 토양에 처리할 수 있는 제형의 개발, 제형의 효능 증대, 활성의 지속성, 보존기간, 처리의 용이성, 기존 농업장비와의 친화성, 비용 절감성, 시장성을 갖추어야한다. 개발된 기술은 국내 친환경농작물 생산에 이바지하고 나아가 생물적 방제제는 세계시장에 수출도 가능하다.

III. 연구개발 내용 및 범위

국내 원산의 포식성곰팡이를 분리하고 국내 온실 재배지 토양 환경에 적응하는 균주를 선발하며, 균주 대량 배양과 제제화 기술을 확립한다. 포식성곰팡이의 토양 내에서의 활성화를 위한 환경조절 메커니즘을 밝히고 토양미생물 농약의 가장 큰 과제중의 하나인

Fungistasis 해결에 도움이 되는 제제를 합성하고자 하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

선충 포식성곰팡이를 이용하여 식물기생성선충을 방제하기위해 이 과제를 수행하였다. 연구 분야는 1) 선충 포식성곰팡이 분리 및 균주 선발, 2) 선충 포식성곰팡이 배양 및 제제화, 3) 선충 포식성곰팡이 제제를 이용한 효능검증 및 이용방법 연구 등 3개 분야였다.

포식성곰팡이는 분리 배지에 따라 분리되는 포식성곰팡이의 종류가 달랐는데, Water agar에서는 *Cystopage sp.*, *Monacrosporium sp.* 등이 주로 발견되었고, CMA에서는 *A. oligospora*, *A. conoides*, *A. dactyloides* 등이 주로 발견되었는데 끈끈이그물을 형성하는 포식성곰팡이는 cornmeal agar 배지에 2배 정도 더 많은 포식성곰팡이가 분리되었다. 배지별 포식성곰팡이의 검출율은 Milk agar : Reynold's Medium : CMA = 54% : 84% : 53%로 Reynold's Medium에서의 검출율이 가장 높았다. 연구 결과에 의하면 토양으로부터 포식성곰팡이를 분리할 때에는 항생제를 첨가하지 않은 Reynold's Medium을 사용하는 것이 가장 효율이 높을 것으로 생각된다. 선충을 첨가한 Petri dish에서는 접종 약 6일후부터 포식성곰팡이 관찰 가능하였는데 이것은 일반처리보다 6일 이상 포식성곰팡이 검출 시기가 빨랐다.

토양 희석 농도별 포식성곰팡이 분리 효율을 시험한 결과, 가장 적은 양의 토양으로 포식성곰팡이의 밀도를 정확하게 검정할 수 있는 토양의 양은 10mg 정도였다. 만약 분리 토양 중에서 뿌리응애나 애지렁이의 발생이 예상되면 dichlorvos 2ppm, tebufenpyrad 20ppm을 사용할 수 있다.

이번에 개선된 포식성곰팡이 분리 방법은 잘 섞은 토양 20g에 증류수 380ml을 첨가하여 교반기에서 1분간 잘 섞은 다음, 피펫으로 그중 0.2ml을 취하여(실지 토양 10mg) 항생제를 첨가하지 않은 Reynold's medium위 4곳에 균일한 간격으로 두고 그 중앙에 부식성선충을 인공적으로 접종하는 것이다. 그 결과 일반적인 방법보다 2배정도 빠른 6일 만에 포식성곰팡이를 분리할 수 있었으며, 또한 상대적으로 적은 양의 토양이 사용됨으로서 빠르게 성장하는 포식성곰팡이의 출현을 줄이고 뿌리응애나 애지렁이의 발생도 줄일 수 있

었다. 결과적으로 자라는 속도가 느린 *A. dactyloides*, *A. robusta*, *A. vermicola* 등 다양한 포식성곰팡이의 출현율이 높아졌다. 이러한 방법을 이용한 결과, 국내 미기록 포식성곰팡이 2종, *Arthrobotrys amerospora*, *Dactylella pseudoclavata*과 신종 1종, *Monacrosporium ullum* n. sp.을 발견할 수 있었으며 각각 미기록종 및 신종으로 각각 학회에 보고하였다.

토양 중의 선충 포식성곰팡이는 토양 내의 이산화탄소의 농도가 높은 상태에서 주변에 항상 존재하는 세균과 경쟁을 하면서 농작물 재배시기상 저온 혹은 고온 상태에서 선충을 효율적으로 포식하여야한다. 이 연구에서는 1) 이산화탄소의 농도가 토양 상태와 비슷한 상황에서 포식성이 높은 포식성곰팡이 선발, 2) 토양 세균의 존재 하에서도 포식성이 높은 포식성곰팡이 선발, 3) 실지 온실 재배환경과 유사한 고온 및 저온 하에서 활성이 높은 포식성곰팡이 균주를 선발하였다.

포식성곰팡이 균주는 sucrose 등 대부분의 탄소원을 모두 잘 이용할 수 있으나, 균주별로 탄소원에 대한 성장 반응이 다르다. *Arthrobotrys oligospora*는 모든 탄소원을 잘 이용할 수 있었고, *Arthrobotrys musiformis*는 malto dextrin에서 가장 잘 자랐으며, *Dactylella pseudoclavata*는 malto dextrin과 sucrose를 첨가한 배지에서 가장 잘 자랐다. 포식성곰팡이 균주는 유기질소원은 잘 이용하나 무기질소원은 잘 이용하지 못하는데, 유기질소원 중에서도 yeast extract, soybean meal는 잘 이용하였다. 이번 시험에서는 값싼 탄소원으로 malto dextrin이 선발되었으며, 가장 경제적이면서 균체의 생산량이 많았던 배지 조합은 배지 1리터당 malto dextrin 6.0g, yeast extract 3.0g이었고 이 조합에서의 균사 생산량은 1.7g/리터였다.

포식성곰팡이 선발균주의 제제화에서 Vermiculate-starch formulation 등 모든 제제의 균생장과 포자형성은 양호하였다. Vermiculate-starch formulation은 입자에 공극이 많아 배양액과 혼합할시 수분조절이 용이하였다. 제제화중 Bentonite를 같이 혼합하여 시험하였는데, 균 생장은 양호하였으나 배양액과 혼합 조제시 덩어리 형태로 되어 사용이 불편하였다.

이번 시험에서 vermiculate-starch formulation, sodium alginate matrix formulation, BIODAC® formulation, pregelatinized starch stabilizer formulation, 유기체제화(싸레기, 밀) 등을 시험하였는데, 대부분의 제제들이 선충 방제 효과를 보였다. 그중

Pregelatinized Starch Stabilizer formulation에서는 Kaolin을 섞지 않았을 때는 점도가 너무 높아 제제하기가 곤란하였으며 약 10%의 Kaolin을 섞어 제제 하였을 때, 반죽, 국수기계 통과, 건조, 파쇄 등이 모두 용이하였다.

6종의 제제를 5°C와 25°C에 보관하였을 때, 제제의 활성은 30일 이내 급격히 저하하였는데, 25°C 보관에서는 보관기간이 2개월 이하였고, 5°C 보관에서는 활성이 90% 이상 떨어졌지만 4개월까지 생존은 가능하였다. 제제의 보관시 모두 30일 이내에 활성이 80-90%의 저하됨으로 앞으로 연구과제는 습윤제, 보호제 혹은 포식성곰팡이의 먹이가 될 수 있는 영양제를 첨가하던가, 최적 보관을 위한 제제화 적정습도를 파악하는 등의 연구를 통하여 30일 이내 활성저하를 막을 수 있는 연구가 시급히 필요하다.

포식성곰팡이 제제들을 이용하여 여러 번의 실내, 온실 시험을 실시한 결과, *Isolate F4*, *Isolate F5* 균주가 선발되었고, 이들 균주를 토양에 1-2%(w/w)정도 처리하였을 때 무처리에 비하여 70-90%의 방제효율을 보였다. 포식성곰팡이 제제의 처리량이 많아질수록 방제효과는 높아지고 제제의 처리량이 0.2% 정도로 낮아질수록 방제효과는 20%이하로 저하되었다. 처리 시기별 시험에서는 후처리나 동시처리에서는 효과가 미미하며 작물을 심기 최소 7-10일 전 처리에서 방제효과가 가장 우수하였다. 제제 중에서는 pregelatinized starch stabilizer formulation 보다 유기제제(싸레기제제, 밀제제)의 방제효과가 더 높았다.

포식성곰팡이 *Isolate F4*와 *Isolate F5* 제제들을 이용하여 오이, 고추, 참외 등 3개 작물을 대상으로 포장시험을 실시한 결과, 포식성곰팡이 처리구는 뿌리혹선충의 피해를 적게 받음으로 인하여 무처리에 비하여 식물의 성장(식물체 키, 무게)이 왕성하였다. 특히 수량에서 차이가 많았는데, 오이, 고추, 참외 등 모든 작물 처리에서 수량이 20% 이상 증수되었다. 그러나 뿌리혹선충 밀도는 반대로 나타났는데, 수확 후기에 토양 중 뿌리혹선충 밀도는 포식성곰팡이 처리구가 무처리와 비슷하거나 오히려 높았다. 이러한 결과는 포식성곰팡이 제제 처리에 의하여 초기에 토양중 뿌리혹선충 밀도가 억제되었고 이로 인하여 작물의 초기생육이 건전하였으며, 후기에 포식성곰팡이 제제 처리구에서 오히려 선충의 밀도가 높아진 이유는 작물의 생육과 뿌리의 발육이 좋아짐으로서 뿌리혹선충이 영양분을 더 많이 공급받을 수 있어서 번식력이 더 좋아진 것으로 보인다.

뿌리혹선충은 토양깊이 25cm 사이에 95% 이상 분포하고 있었다. 그러므로 천적을

이용하여 뿌리혹선충을 방제하기 위해서는 반드시 토양 깊이 25cm까지를 목표로 하여 생물적방제제를 처리를 하여야 할 것이며 포장 1000㎡당 천적곰팡이 1%를 토양 깊이 25cm까지 처리한다면, 약 2.5ton의 포식성곰팡이 제제가 필요하다.

포식성곰팡이 서식지 토양의 환경 요인 분석한 결과, 곰팡이와 세균+방선균의 밀도는 정반대의 경향으로 나타났는데, 즉, 곰팡이의 밀도가 높으면 세균+방선균의 밀도가 낮았고, 곰팡이의 밀도가 낮으면 세균+방선균의 밀도가 높았다. 토양 이화학성이 토양내 선충잡이곰팡이의 서식에 미치는 영향을 조사한 결과는 pH가 가장 중요 요인으로 나타났는데, pH는 칼슘, 고토, 식물기생성선충 밀도, 부식선충 밀도, 곰팡이, 세균, 방선균 등 대부분의 요인과 상관관계가 높았고, 대부분 정의상관관계였으며 특히하게 곰팡이 밀도와는 부의 상관관계였다. 부식성선충이 많은 곳에 선충잡이곰팡이의 종류가 다양하였고 선충잡이곰팡이의 밀도가 높은 곳에는 식물기생성선충의 밀도가 낮았다.

포식성곰팡이 제제의 효율을 더 높이기 위한 환경 조절 처리(부식성곰팡이 첨가, 공기 주입, 토양 산소 공급을 위한 CaO₂ 처리)에서는 뚜렷한 효과를 얻지 못하였다. CaO₂ 처리에서는 오히려 제제를 단독으로 처리한 플롯에 비해 오히려 흑의 수, 난랑의 수, 유충의 밀도가 증가하였고 산소공급, 탄소공급의 효과에 있어서도 균주별로, 또 산소, 이산화탄소 처리별로 결과가 상이하여 일정한 경향을 찾기가 어려웠다.

3년간의 연구를 통하여 포식성곰팡이 제제의 포장 검정 시험을 수행한 결과, 국내의 온실재배지에 감염되어있는 뿌리혹선충에 대하여 *Isolate F4*와 *Isolate F5* 균주의 제제를 이용하여 충분히 초기 밀도 억제 및 수량 증수 효과를 볼 수 있을 것으로 평가되었다. 앞으로 대량 액체배양 중 균주의 활성을 높게 유지, 재배 기간 중 관주할 수 있는 관주용 제제 개발, 다른 작물에 발생되는 *Aphelenchoides*, *Pratylenchus*, *Heterodera* 속의 선충류에 대한 억제효과 시험, 살선충제와의 복합 처리효과 등도 검토할 필요가 있겠다.

SUMMARY

To develop biological control agents for the control of root-knot nematodes, the project investigated three research subjects. They were 1) isolation, identification and selection of predatory fungi, 2) mass production and formulation of predatory fungi, 3) evaluation of predatory fungi formulations in greenhouse and field for the control of root-knot nematodes, and increase their efficacy.

Different predatory fungi were isolated in different efficacy by different isolation media. *Cystopage* sp. and *Monacrosporium* sp. were mainly isolated from water agar and *A. oligospora*, *A. conoides* and *A. dactyloides* were mainly isolated from CMA. About two time more network forming predatory fungi were isolated from CMA than water agar.

When three media were compared for their isolation efficacy, Milk agar : Reynold's Medium : CMA was 54% : 84% : 53%. Reynold's Medium without antibiotics had the highest isolation efficacy among the three media. When free-living nematode, *Rhabditis* sp. were artificially inoculated at the center of isolation media, predatory fungi detected in less than 6 days, two times faster than normal method.

The newly developed dilution plate method could detect predatory fungi from soil as little as 10mg. Pesticides, 2ppm of dichlorvos or 20ppm of tebufenpyrad 20ppm could inhibit *Rhizoglyphus* sp. and Enchytraeid in isolation media. The improved isolation method are 1) add 380ml of water to 20g of soil and mix well for one min. 2) take four drops of 0.2ml(10mg) and place it on to the Reynold's medium in equally spaced locations, 3) add about 500 *Rhabditis* sp. per dish. The new method resulted more chance of detection of slow growing species of predatory fungi which was not possible isolated before with normal method. During the study, we isolated and reported two unrecorded species, *Arthrobotrys amerospora*(Kim et al., 2006), *Dactylella pseudoclavata*(Kim et al., 2007), and a new species *Monacrosporium ullum* n. sp.

Predatory fungi in soil should endure in the presence of high carbon dioxide,

soil bacteria, and low or high soil temperatures conditions. We tried to select predatory fungi which show high predacity despite of 1) high carbon dioxide concentration, 2) presence of soil *Pseudomonas* sp., 3) low or high temperatures conditions.

To develop an inexpensive medium for the mass production of predatory fungi, various carbon and nitrogen sources were evaluated. Predatory fungi utilizes a wide range of carbon and nitrogen sources. *Arthrobotrys oligospora* utilized most of carbon sources, *Arthrobotrys musiformis* grew better in malto dextrin, and *Dactylella pseudoclavata* utilized both malto dextrin and sucrose. As a nitrogen sources, yeast extract was selected. Liquid fermentation system containing 6.0g/L malto dextrin and 3.0g/L yeast extract was proposed and obtained approx. 1.7g mycelium/liter of medium in 50 hr.

Predatory fungi grew and sporulated well on vermiculate–starch formulation because it has many pores and was easy of controlling moisture. When vermiculate–starch formulation was mixed with bentonite, predatory fungi grew well but they become sticky and clustered and hard to handle. All formulations, vermiculate–starch formulation, sodium alginate matrix formulation, BIODAC[®] formulation, pregelatinized starch stabilizer formulation, organic formulation(rice, wheat) controlled root–knot nematodes when tested in lab and in greenhouse. Kaolin 10% was added to pregelatinized starch stabilizer formulation to improved handling.

In a long–term storage test, pregelatinized starch stabilizer formulation of six species of predatory fungi dropped their viability over 90% within 30 days and completely dead within two months when stored at 25°C. When formulation was stored at 5°C, it survived as long as four months.

During the series of greenhouse tests, *Isolate F4*, *Isolate F5* fungi were selected. These fungi controlled root–knot nematodes as much as 70–90% when treated 1–2%(w/w) formulations in soil. When treatment amount increased, control efficacy increased and the reverse is also true. Formulation treatments were the most effective when treated 7–10 days before–planting than at–planting treatment or after–planting

treatment. Among the formulations, organic formulation (rice, wheat) controlled root-knot nematodes better than pregelatinized starch stabilizer formulation.

When formulations of *Isolate F4* and *Isolate F5* were tested in microplot and in field with cucumber, pepper, oriental melon, the treatment significantly increased plant height, plant weight, and yield. Especially, yields increased over 20% from all three crops tested; but root-knot nematode population density was high in fungi treated soil. The possible reason is that fungi formulation killed nematodes in soil so plant escaped nematode infection in an early growing season, and grew better. Later in the season, the nematodes could produce more eggs in fungus treated plots because those roots grew better and provides more nutrients to the nematodes.

Over 95% of root-knot nematodes were distributed within soil depth of 25cm. Therefore, formulations should be treated to the depth of 25cm. When 1% formulation is treated to the soil depth of 25cm in a 1000m² field, it requires approx. 2.5ton of formulations.

The effects of biological and chemical soil factors on the distribution of nematophagous fungi were evaluated. Total fungal population densities including nematophagous fungi, *Cystopage* sp. and *Harposporium* sp. were more abundant in the plots with lower total bacteria population densities. pH appears to be one of the most important elements determining the presence of nematophagous fungi in soil. According to correlation analysis, Ca and Mg contents in soil and population densities of *Tylenchorhynchus* sp., saprophytic nematodes, actinomycetes, and bacteria were positively correlated with pH, but were negatively correlated with fungal population densities.

To enhance efficacy of formulations, several treatments, addition of free-living nematodes into soil, provide oxygen, CaO₂, and carbon dioxide were tested. CaO₂ treatment increased number of eggs and juveniles in soil. Oxygen and carbon dioxide treatment showed contradictory results or no enhancement.

During the three years of study in greenhouses and in fields, selected

predatory fungi, *Isolate F4* and *Isolate F5* increased plant growth and fruit yield over 20%. In future, improved mass production techniques, irrigation formulations for use during crop growing season, test the formulation against other plant-parasitic nematodes such as *Aphelenchoïdes*, *Pratylenchus*, *Heterodera*, and evaluate the effects of mixed application with nematicides, could make predatory fungi valuable biocontrol agent.

CONTENTS

Chapter 1. Outline of the Research

Section 1. Introduction

1. Characteristics of plant–parasitic nematodes and their damage
2. Biological characteristics of nematode predatory fungi

Section 2. Purpose

Section 3. Need

Section 4. Scope

1. Isolation and identification of domestic predatory fungi
2. Mass production and formulation of predatory fungi
3. Test for control efficacy and use of the predatory fungi

Chapter 2. Research Trends

Section 1. Overseas trends

Section 2. Domestic trends

Chapter 3. Research Details and Results

Section 1. Materials and methods

1. Isolation and identification of domestic predatory fungi
 - 3.1.1.1 Isolation and identification of domestic predatory fungi
 - 1) Selection of isolation media
 - 2) Isolation efficiency of predatory fungi by addition of *Rhabditis* sp.
 - 3) Soil dilution method to determine densities of predatory fungi
 - 4) Selection of pesticides to inhibit *Rhizoglyphus* sp. and Enchytraeid
 - 5) Identification and selection of predatory fungi
 - 3.1.1.2. Selection of predatory fungi

- 1) Response of predatory fungi to different oxygen contents
 - 2) Response of predatory fungi to different temperatures
 - 3) Response of predatory fungi to soil inhibiting *Pseudomonas* sp.
2. Mass production of fungal biomass and formulations
- 3.1.2.1. Liquid fermentation of predatory fungi
 - 3.1.2.2. Formulation of predatory fungi
 - 1) Vermiculate–starch formulation
 - 2) Sodium alginate matrix Formulation
 - 3) BIODAC[®] formulation
 - 4) Pregelatinized Starch Stabilizer formulation
 - 5) Grain formulation
 - (1) Rice formulation
 - (2) Wheat formulation
 - 3.1.2.3. Storage and soil adaptation of predatory fungi formulation
3. Test for control efficacy and use of predatory fungi
- 3.1.3.1. in vitro test of predatory fungi formulations
 - 3.1.3.2. Greenhouse pot test of predatory fungi formulations
 - 3.1.3.3. Field test of predatory fungi formulations
 - 1) Microplot test of predatory fungi formulations
 - 2) Field test of predatory fungi formulations
 - 3.1.3.4. Biological and environmental factors related to the control efficacy
 - 1) Distribution of root–knot nematodes in a field
 - 2) Analysis of soil environmental factors related to predatory fungi
 - 3) Control of soil environment to increase control efficiency
 - 3.1.3.5. Effective use of predatory fungi formulations

Section 2. Research Results

1. Isolation and identification of domestic predatory fungi
 - 3.2.1.1. Isolation and identification of domestic predatory fungi
 - 1) Selection of isolation media
 - 2) Isolation efficiency of predatory fungi by addition of *Rhabditis* sp.
 - 3) Soil dilution method to determine densities of predatory fungi
 - 4) Selection of pesticides to inhibit *Rhizoglyphus* sp. and Enchytraeid
 - 5) Identification and selection of predatory fungi
 - 3.2.1.2. Selection of predatory fungi
 - 1) Response of predatory fungi to different oxygen contents
 - 2) Response of predatory fungi to different temperatures
 - 3) Response of predatory fungi to soil inhibiting *Pseudomonas* sp.
2. Mass production of fungal biomass and formulations
 - 3.2.2.1. Liquid fermentation of predatory fungi
 - 3.2.2.2. Formulation of predatory fungi
 - 3.2.2.3. Storage and soil adaptation of predatory fungi formulation
3. Test for control efficacy and use of predatory fungi
 - 3.2.3.1. in vitro test of predatory fungi formulations
 - 3.2.3.2. Greenhouse pot test of predatory fungi formulations
 - 3.2.3.3. Field test of predatory fungi formulations
 - 1) Microplot test of predatory fungi formulations
 - 2) Field test of predatory fungi formulations
 - 3.2.3.4. Biological and environmental factors related to the control efficacy
 - 1) Distribution of root-knot nematodes in a field
 - 2) Analysis of soil environmental factors related to predatory fungi

- 3) Control of soil environment to increase control efficiency
- 3.2.3.5. Effective use of predatory fungi formulations

Chapter 4. Achievement and Contribution

Section 1. Achievement of the object

- 1. Isolation and identification of domestic predatory fungi
- 2. Mass production of fungal biomass and formulations
- 3. Test for control efficacy and use of predatory fungi

Section 2. Contribution to technological development of relative fields

Chapter 5. Plan to Applicate Research Results

- 1. Isolation and identification of domestic predatory fungi
- 2. Mass production of fungal biomass and formulations
- 3. Test for control efficacy and use of predatory fungi
 - 5.3.1. Journal publication
 - 5.3.2. International symposium
 - 5.3.3. Annual meeting
 - 5.3.4. Public information

Chapter 6. Information Collected from Overseas

Chapter 7. References

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요

1절 서론

1. 식물기생성선충의 특성 및 피해 상황
2. 선충 포식성곰팡이의 생물적 특성

2절 연구개발의 목적

3절 필요성

4절 연구 범위

1. 국내 유망 포식성곰팡이의 분리 및 동정
2. 포식성곰팡이의 대량 배양 및 제제화
3. 포식성곰팡이 제제의 효율 검정 및 효율적 이용방법 제안

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1절 국외 기술개발 현황

2절 국내 기술개발 현황

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

1절 연구 방법

1. 선충 포식성곰팡이 분리 및 균주 선발
 - 가. 선충 포식성곰팡이 분리 및 동정
 - 1) 배지 종류별 포식성곰팡이 분리효율 비교.
 - 2) 포식성곰팡이 분리시 부식성선충 첨가 효과.
 - 3) 토양 희석에 의한 포식성곰팡이 밀도 산출.
 - 4) 살선충제에 의한 배지내 발생하는 토양 미생물 억제.
 - 5) 포식성곰팡이 분류 및 동정
 - 나. 선충 포식성곰팡이 선발
 - 1) 포식성곰팡이의 산소농도에 따른 반응성
 - 2) 포식성곰팡이의 온도에 대한 반응성
 - 3) 포식성곰팡이의 세균에 대한 반응성
2. 선충 포식성곰팡이 배양 및 제제화
 - 가. 균사 액체배양
 - 나. 포식성곰팡이 고체 제제화
 - 1) 포식성곰팡이 제제화 I : Vermiculate-starch formulation
 - 2) 포식성곰팡이 제제화 II. : Sodium alginate matrix Formulation
 - 3) 포식성곰팡이 제제화 III. BIODAC[®] formulation
 - 4) 포식성곰팡이 제제화 IV: Pregelatinized Starch Stabilizer formulation
 - 5) 포식성곰팡이 제제화 VI: 싸래기 및 밀을 이용한 유기 formulation
 - 가) 싸래기 제제
 - 나) 밀 제제
 - 다. 천적곰팡이의 토양 정착능력 검정
3. 선충 포식성곰팡이 제제를 이용한 효능검증 및 이용방법 연구
 - 가. 포식성곰팡이 제제의 실내 검정
 - 나. 포식성곰팡이 제제의 풋드 검정

다. 포식성곰팡이 제제의 포장 시험

- 1) 마이크로프로트 시험
- 2) 포장 시험

라. 포식성곰팡이 제제의 살충력에 영향을 미치는 생물적·환경적 요인

- 1) 포장내 뿌리혹선충의 분포도
- 2) 포식성곰팡이 서식지 토양의 환경 요인 분석
- 3) 포식성곰팡이 살충력 제고를 위한 토양 환경 조절

마. 포식성곰팡이 제제의 효율적 이용방법 제안

2절 연구 내용 및 결과

1. 선충 포식성곰팡이 분리 및 균주 선발

가. 선충 포식성곰팡이 분리 및 동정

- 1) 배지 종류별 포식성곰팡이 분리효율 비교.
- 2) 포식성곰팡이 분리시 부식성선충 첨가 효과.
- 3) 토양 회석에 의한 포식성곰팡이 밀도 산출.
- 4) 살선충제에 의한 배지내 발생하는 토양 미생물 억제.
- 5) 포식성곰팡이 분류 및 동정

나. 선충 포식성곰팡이 선발

- 1) 포식성곰팡이의 산소농도에 따른 반응성
- 2) 포식성곰팡이의 온도에 대한 반응성
- 3) 포식성곰팡이의 세균에 대한 반응성

2. 선충 포식성곰팡이 배양 및 제제화

가. 균사 액체배양

나. 포식성곰팡이 고체 제제화 및 효과 검정

다. 천적곰팡이의 토양 정착능력 검정

3. 선충 포식성곰팡이 제제를 이용한 효능검증 및 이용방법 연구

가. 포식성곰팡이 제제의 실내 검정

나. 포식성곰팡이 제제의 풋드 검정

다. 포식성곰팡이 제제의 포장 시험

- 1) 마이크로프로트 시험
- 2) 포장 시험

라. 포식성곰팡이 제제의 살충력에 영향을 미치는 생물적·환경적 요인

- 1) 포장내 뿌리혹선충의 분포도
- 2) 포식성곰팡이 서식지 토양의 환경 요인 분석
- 3) 포식성곰팡이 살충력 제고를 위한 토양 환경 조절

마. 포식성곰팡이 제제의 효율적 이용방법 제안

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1절 연구개발 목표의 달성도

1. 선충 포식성곰팡이 분리 및 균주 선발
2. 선충 포식성곰팡이 배양 및 제제화
3. 선충 포식성곰팡이 제제를 이용한 효능검증 및 이용방법 연구

2절 관련분야 기술발전에의 기여도

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 선충 포식성곰팡이 분리 및 균주 선발
2. 선충 포식성곰팡이 배양 및 제제화
3. 선충 포식성곰팡이 제제를 이용한 효능검증 및 이용방법 연구
 - 가. 학술지 게재
 - 나. 국제 심포지움 발표
 - 다. 국내 학술회의 발표
 - 라. 신문 및 잡지 기사 게재

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 참고문헌

제 1 장 연구개발과제의 개요

1절 서론

1. 식물기생성선충의 특성 및 피해 상황

식물기생성선충은 주로 연작지 토양에서 대량 발생하여 작물에 막대한 피해를 주는 해충으로 전 세계적으로 해마다 78조 달러의 감수를 가져오고 있다. 뿌리혹선충에 의한 피해는 뿌리혹이 육안으로 관찰되기 때문에 쉽게 알 수 있으나, 뿌리혹선충 이외에 작물에 피해를 입히는 식물기생성선충의 종류가 수천종이고 섭식방법, 형태 및 기생하는 양상에 따라 뿌리썩이선충(*Pratylenchus* spp.), 위축선충(*Tylenchorhynchus* spp.), 침선충(*Paratylenchus* spp.), 환선충(*Criconemoides* spp.), 나선선충(*Helicotylenchus* spp.), 씨스트선충(*Heterodera* spp.), 줄기선충(*Ditylenchus* spp.), 잎선충(*Aphelenchoides* spp.) 등 다양하게 많다.

선충이 피해를 입히면 작물에 증상이 나타나는데, 토양에 수분상태가 충분한데도 불구하고 시들음 증세가 발생하거나, 특별한 이유 없이 작물이 생장을 하지 못하고 잎이 누렇게 변한다면 선충피해를 확인할 필요가 있다. 선충 피해는 그 특성상 가해부위가 토양에 묻혀 있는 뿌리에 발생됨으로 지상부의 국부적인 병과는 달리 식물전체를 죽게 하는 전신감염성의 병해를 초래하고, 또 발생부위가 지하부에 있으므로 지상부의 병해처럼 빨리 발견되지 않아 조기 발견이 매우 어렵고 식물체가 시드는 증상이 발견된다 하더라도 이미 병이 만연되어 방제하기에 이미 늦어 그 피해가 커지기 마련이다. 국내의 시설원에 재배지에는 뿌리혹선충의 감염으로(성주 약85% 재배농가 뿌리혹선충 감염) 매년 약 30-40%의 수량감소를 가져오고 있으며, 이 뿌리혹선충은 우리나라의 거의 모든 시설원예작물(오이, 수박, 참외, 토마토 등)에 피해를 주고 있다.

뿌리혹선충(*Meloidogyne* spp.)은 1850년대 영국의 온실에서 재배중인 오이 뿌리혹에서 처음 발견되었는데, 처음에는 *Heterodera radicolica* (Greef, 1872) Müller, 1884, *H. marioni* (Cornu, 1879) Goodey, 1932 등으로 불려지다가 1949년 Chitwood(1949)에 의하여 *Meloidogyne* 속으로 정립되었고, 세계적으로는 78종이 분포하고 있으며(Jepson, 1987), 국내에는 모두 6종의 뿌리혹선충이 서식하고 있다(Cho and Han, 1986; Cho *et al*, 2000). 그 중에서 국내 재배지에서 가장 문제가 되는 뿌리혹선충은 *M. arenaria* (땅콩뿌리혹선충), *M.*

hapla (당근뿌리혹선충), *M. incognita* (고구마뿌리혹선충) 등 3종이며, 이들 선충은 가지, 감자, 고추, 담배, 당근, 딸기, 땅콩, 무, 배, 상추, 수박, 시금치, 양파, 오이, 우엉, 인삼, 작약, 참깨, 참외, 콩, 토마토, 포도, 호박 등 많은 작물을 기주로 가지고 있다(Choi, 1978; Choi and Choi, 1982; Choi and Choo, 1978; Choo *et al.*, 1987).

뿌리혹선충에 의한 피해는 전 세계적으로 나타나는데, 한대지방보다는 온도가 높아 선충의 번식횟수가 많은 열대나 아열대지방에서 특히 더 심하다. 국내 시설재배지대에는 겨울동안에도 시설을 이용하여 채소류를 연중 재배함으로써 아열대지방에 적응하는 고구마뿌리혹선충(*M. incognita*)과 땅콩뿌리혹선충(*M. arenaria*)의 발생이 심하다. 예를 들어, 성주지역에서는 금싸라기은천 참외를 신토좌 대목에 접붙여 농가형 비닐하우스에서 재배하는데, 겨울인 1월에 심어 4월-5월까지 수확하고, 그 후 새로 순을 키워 6월-10월까지 연장재배를 한다. 성주지역에는 이러한 연장재배와 또한 제한된 경지면적으로 인한 20년 이상의 연작으로 50% 이상의 포장에 뿌리혹선충이 감염되어있어 매년 심각한 피해를 미치고 있다.

뿌리혹선충을 방제하는 방법 중에서 비기주작물을 이용한 윤작은 효과가 높고, 비용이 적게 들면서, 환경 친화적인 방법이다(Kinloch and Hinson, 1972; Rhoades, 1976). 그러나 뿌리혹선충은 기주범위가 매우 넓고, 또 뿌리혹선충의 종이나 레이스에 따라 저항성 품종에 대한 반응이 상이하기 때문에 윤작작물을 심기 전에 반드시 포장에 서식하고 있는 선충의 종과 레이스를 먼저 동정하여야 한다(Taylor and Sasser, 1978).

식물기생선충은 농작물에게 있어 만병의 근원이라 할 정도로 그 피해가 매우 심각하다. 왜냐하면 한번 감염된 지역에서 이들을 완전히 방제하기는 거의 불가능하며 선충피해를 입은 작물은 대부분 다른 질병에 감염되어 합병증이 유발되기 때문이다. 선충 피해를 감소시키는 관리 방법으로는 윤작, 객토, 태양열 소독, 담수처리, 토양 훈증, 살선충제 처리 등이 있다. 그러나 뿌리혹선충 같은 토양전염성 선충은 대부분의 생활이 토양에서 이루어짐으로 토양내 불량환경에 견딜 수 있는 내구체를 형성하므로 휴경이나 담전윤환의 재배적 방제로는 효과적인 방제가 어렵다. 이러한 선충 방제는 지금까지 쉽게 구할 수 있는 유기합성제 농약이 주로 사용되어왔었는데, 최근 유기합성농약들의 인체 및 자연 환경에 미치는 악영향이 밝혀지면서 Aldicarb, Fenamiphos, Methyl bromide, DBCP, EDB 등 효과 좋은 살선충제들의 등록이 취소됨으로서, 이러한 농약들을 대신할 수 있는 방법들이 절실히 요구되고 있는 실정이다. 효과적인 식물기생선충 방제를 위해서는 방제효과가 지속적이

고 환경에 안정적인 천적 미생물을 이용하는 생물학적 방제방법을 이용하는 것이 가장 효과적이라 할 수 있으나 현재 국내 뿐 아니라 전 세계적으로 선충을 방제할 수 있는 미생물 농약은 거의 없다.

2. 선충 포식성곰팡이의 생물적 특성

선충을 죽이는 곰팡이(nematophagous fungi)는 크게 기생성곰팡이(endoparasitic fungi)와 포식성곰팡이(Predacious fungi)로 나눌 수 있는데, 1) 균사가 기주 선충의 내부에만 존재하고 토양내에서는 포자 상태로 존재하는 것을 기생성곰팡이라고 하고, 2) 균사가 기주 선충의 외부로 뻗어 나오고, 균사에 선충을 잡을 수 있는 포식 기관을 형성하는 종류를 포식성곰팡이라고 한다. 포식성곰팡이를 부르는 명칭으로 영어권에서는 predacious fungi 혹은 nematode trapping-fungi라 부르고, 일본에서는 捕食菌 또는 捕捉菌, 중국에서는 捕食菌, 한국에서는 捕食菌 또는 捕獲菌이라고 부른다.

포식성곰팡이는 지금으로부터 약 145년 전 독일의 Fresenius에 의해서 *Arthrobotrys oligospora* 종이 처음 기록된 후 지금까지 10속 약 150여종이 알려져 있는데 대부분의 종들은 불완전균류에 포함되나 몇몇 종은 완전 세대가 알려져 있다. 완전세대 중에서는 느타리버섯 종류인 *Pleurotus ostreatus*은 끈끈이봉을, *Pleurotus tuberregium*은 독성 물방울을 형성하여(Hibbett et al., 1994) 선충을 죽이며, *Nematoctonus*의 완전세대는 담자균류(Basidiomycetes)중의 *Hohenbuehelia*(Barron, 1977)이며, *Arthrobotrys*의 완전세대는 반균강(discomycetes)인 *Orbilia*(Pfister, 1994)이다. 불완전균류인 *Monacrosporium*(=*Dactylella*) *lysipagum*의 완전세대는 아직 알려지지 않았으나, 균사 격막 사이에 woronin body가 존재함으로써 자낭균류(Ascomycetes)라고 생각되어지고 있다(Wimber, 1983).

Woronin(1870)은 이 곰팡이가 그물 모양의 포식 기관을 형성함을 관찰하였고, Zopf(1888)는 선충이 이 그물에 잡힘을 처음으로 관찰하였다. 그 당시에는 선충이 물리적으로 그물에 걸리는 것으로 생각하였으나 Drechsler(1933a, 1933b)에 의하여 끈끈한 물질이 그물에 존재함이 알려졌다. Nordbring-Herts(1972)는 이 물질을 전자현미경으로 촬영하였으며, Tunlid(1992)는 끈끈이 물질을 화학적으로 분석하였다. 선충이 끈끈이에 붙어 잡히는 것은 포식기관과 선충의 표면 사이의 lectin-carbohydrate 상호작용(Tunlid et al., 1992)

때문인데, 선충이 포식기관에 닿으면 포식기관 표면의 lectin이 선충을 인지하고 끈끈이 효소를 분비하게 된다. 끈끈이 효소가 분비되면 포식기관 외층의 fibrillar polymers 밀도가 높아지고 재 정렬되어 선충이 붙게 된다. 그 후 포식기관으로부터 여러 종류의 단백질 분해 효소가 분비되어 선충을 죽이게 된다(Persson & Friman, 1993; Tunlid et al., 1992). 포식기관 표면의 lectin은 적혈구 응고 작용이 있는 분자량이 36 kDa인 당단백질(dimeric glycoprotein)이고 pH 6.5에서 isoelectric point를 가지며 황산기의 아미노산은 없다.

포식성곰팡이는 선충이 없을 때는 포식기관을 만들지 않다가 선충을 접촉하면 만듦 시작하므로(Couch, 1937) 선충이 분비하는 어떤 물질이 포식기관 형성에 관여 할 것이라는 추측이 가능하다. 포식기관을 형성시킬 수 있는 물질로는 선충 배양 여과액, 사람의 혈청, 지렁이 추출물(Commandon & de Fonbrune, 1938), yeast extract, ammonium carbonate, 폭풍우 오기 전의 빗물, 눈 녹은 물, 1-2% 에틸알콜 등이 알려져 있다(Soprunov, 1958). 이러한 물질의 포식기관 형성 효과는 100°C에서 10분 정도 끓이면 없어지므로 필터로 걸러서 사용하여야 한다고 하며, Pramer & Stoll(1959)은 이 물질을 'Nemin'으로 명명하였다. 'Nemin'의 구조를 밝히기 위해 여러 종류의 단백질, peptides, 아미노산을 시험한 결과, valine, leucine, isoleucine등이 효과가 있었으며, D- L- leucine 0.01 mg/ml 혹은 valyl peptides(Nordbring-Hertz, 1973)가 가장 효과가 좋았다.

죽은 선충 1 마리 말린 것은 직경 1 cm에 포식기관을 만들 수 있다고 하는데, 선충 100,000 마리의 추출물을 이용하여 실험한 결과 곰팡이의 종류에 따라 반응의 정도가 다르게 나타났다. *Monacrosporium cionopagum*은 10^{-6} 희석액에, *M. bembicodes*는 10^{-2} 희석액에, *M. drechsleri*는 10^{-3} 희석액에 각각 반응을 보였으며 *M. ellipsosporum*은 전혀 반응을 보이지 않았다. 그러므로 곰팡이의 종류에 따라 또는 선충의 종류에 따라 반응 농도 및 반응물질이 다를 것이다.

곰팡이의 영양 상태도 포식기관 형성에 크게 관여하는데 *A. dactyloides*는 배지내에 영양분이 부족할 때, *A. conoides*는 탄산가스가 많을 때(10%), 더 많은 포식기관을 만든다. 또 *A. anchonia*의 포자는 선충이 있는 곳에서는 24시간 내 발아하여 올가미를 만드나, 선충이 없는 곳에서는 단지 균사만 발달한다. 일반적으로 토양내에는 탄산가스의 농도는 높고, 양분은 부족하며, 선충은 항상 존재하므로, 토양중의 선충 포식성곰팡이들은, 포식기관을 형성하여 선충을 잡아서, 대부분의 영양을 선충으로부터 섭취 할 것이다.

선충은 아주 활동적인 소동물이다. 하등 곰팡이인 *Gonimochaete horridula*(Oomycetes)에 침해당하였을 경우에는, 곰팡이의 균사가 선충 몸 안에 50%까지 번지어도 여전히 돌아다닌다(Drechsler, 1946). 그러나 선충 포식성곰팡이인 *Arthrobotrys oligospora*나 *Nematoctonus haptocladus*에 잡힌 경우에는 균사가 내부로 퍼지기도 전에 선충이 죽는다(Giuma & Cooke, 1971). 이러한 결과로 미루어 선충 포식성곰팡이류에서는 선충을 죽일 수 있는 독소가 분비된다는 추측이 가능하다.

수축성을가미를 가진 *A. dactyloides* 곰팡이의 액체 배양액에는 암모니아류의 독소가 포함되어 있는데 배양 9-11일째에 최대치에 달하였다(Balan & Gerber, 1972). 그러나 *A. oligospora*의 경우 액체배양액이나 균사 추출물에는 독소가 없었으며, 포식기관에 잡힌 선충 체내에만 독소가 존재하였다. *Nematoctonus haptocladus*의 경우에는 균사 추출물과 액체 배양액 모두에 독소 물질이 포함되어 있었는데, 독소 물질은 암모니아류가 아닌 열에 강한 다당류이다.

토양 미생물들은 제한된 영양분을 둘러싸고 토양 속의 여러 다른 미생물들과 상호 경쟁 관계에 있다. 그러므로 포식성곰팡이들은 오랜 세월의 경쟁을 통하여 선충이라는 독특한 먹이 선택성으로 진화하였을 것이다. 식물계인 곰팡이로서 동물계인 선충을 먹이로 하는 것은 독특한 방식으로 경쟁자도 적을 것이며, 또 선충은 유기물이 있는 지구상의 어디에나(75만 마리/m²) 존재함으로 풍부한 먹이 감이기도 하다.

부식성선충은 세균을 먹기 때문에 몸 안에 항상 세균을 가지고 있고, 그러므로 선충이 죽었을 때 선충의 몸속에서 세균이 먼저 증식할 수도 있다. 그러나 현재까지의 관찰에 의하면 포식성곰팡이에 잡혀 죽은 선충 내부에는 세균이 없고 포식성곰팡이만이 관찰된다. 이러한 사실로 미루어 포식성곰팡이의 항생제 분비 가능성이 제기되었는데, 실지 포식성곰팡이인 *Dactylaria* 또는 *Arthrobotrys*로부터 항생물질이 분리, 동정되었다.

*Dactylaria parvispora*의 배양여과액에서 분리한 항균성물질중 alpha-pyrone ring과 gamma-pyrone ring을 가진 것을 dactylfungins A 와 B로 명명하였으며, *Arthrobotrys oligospora*로부터 항생물질을 분리, 정제, 동정하여 oligosporol A, oligosporol B라고 명명하였다. 또 *Arthrobotrys oligospora*로부터 3가지 신 항생물질이 발견되었는데 그 구조는 4',5'-dihydro-oligosporon, hydroxyoligosporon, 10',11'-epoxyoligosporon였다(Anderson et al., 1995). 그 외 내부 기생성곰팡이인 *Harposporium*, *Meria*, *Paecilomyces*, *Verticillium*

등도 항생물질을 분비한다고 한다(Barron, 1977).

포식성곰팡이는 거의 모든 유기물이 있는 장소(=선충 서식 장소)에 존재하면서, 기주 특이성 없이 여러 종류의 선충을(기생성 선충도 포함하여) 무차별 포식한다. 포식성곰팡이를 이용한 식물 기생성 선충의 생물학적 방제 연구는 1937년 Linford(1937)에 의하여 하와이에서 실시되었는데, 그는 과인애플의 잎, 순들을 잘게 잘라 토양에 넣고, 토양내에서의 선충과 포식성곰팡이의 밀도 변화를 관찰하였다. 초기에는 유기물의 첨가로 인해 부식성선충의 밀도가 매우 높게 증가하였고, 그 후 이 선충들을 포식하기 위해 포식성곰팡이의 밀도가 증가하였는데, 증가된 포식성곰팡이들은 부식성선충뿐 아니라 기생성 선충까지도 포식하여, 결과적으로 시험구내 기생성 선충의 밀도가 원래보다 더 낮아졌다.

이러한 결과에 고무된 Linford 등은(Linford et al., 1938, 1939) 포식성곰팡이, *A. oligospora*, *A. musiformis*, *Monacrosporium thaumasium*, *M. ellipsosporum*의 포자를 직접 토양에 처리하였는데, 예상과는 달리 선충 방제 효과가 거의 없었다. 그 후 포자를 이용한 다른 학자들도 비슷한 부정적인 결과를 얻었는데, Duddington(1962)에 의하면 일반적으로 포식성곰팡이의 포자를 토양에 넣었을 경우에는 거의 효과가 없고, 많은 양의 유기물이나 녹비를 같이 넣었을 경우에는 효과가 있다고 하였다.

일반적으로 토양에 있는 곰팡이의 포자는 온도와 습도가 적당하여도 발아하지 않는데, 이것은 fungistasis 때문이다(Dobbs & Hinson, 1953). 거의 모든 토양에는 수용성인 포자 발아 억제 물질이 존재하고 있는데(Mankau, 1962), 실험에 의하면 15종의 포식성곰팡이중 *A. musiformis*를 제외한 14종은 토양내에서 균사의 성장 및 발아가 억제되었다. 이러한 결과로 보아 토양내에서 포식성곰팡이의 경쟁력은 아주 낮으며 포자의 인위 접종에 의해 그 밀도를 증가시키기는 힘들 것으로 생각된다.

반면에 포식성곰팡이 중 몇 종은 생물 농약으로 상품화되기도 하였는데 *Arthrobotrys robusta*를 이용한 버섯기생선충, *Ditylenchus myceliophagus* 방제를 위한 제품 'Royal 300', *A. irregularis*를 이용한 뿌리혹선충 방제용 제품, 'Royal 350' 등이 있다(Cayrol, 1983). Royal 350을 이용하여 토마토 뿌리혹선충 방제 시험을 하였을 때, 토양 pH가 높을수록, 토양의 유기물이 적을수록 효과가 높았다고 하였으며(Pelagatti & Piccolo, 1990), 최근 R-350을 개량한 'T-350'을 이용하여 키위 나무에서 뿌리혹선충 방제 시험을 실시한 결과, 가을에 한 나무 당 퇴비 600kg과 'T-350' 1kg을 처리하였을 때, 뿌리혹선충 유

충의 밀도가 감소하였다(Cayrol et al., 1991). 최근의 선충 천적 연구 동향은 선충의 유충을 공격하는 포식성곰팡이 대신에, 접종원이 되는 선충의 알이나 암컷을 직접 공격하는 기생성곰팡이(egg parasitic fungi)들이 주가 되고 있다(Kerry, 1980; Kim & Riggs, 1992; Sayre, 1986).

또 최근에는 가축에 기생하는 동물 기생성선충을 포식성곰팡이를 이용하여 방제하려는 실험이 성공적으로 실시되었는데, 그 원리는, 동물에게 포식성곰팡이를 먹이면 그 동물의 배설물 속에 포식성곰팡이가 존재하게 되고, 이 포식성곰팡이들이 배설물 속에 들어있는 동물 기생성선충의 유충을 죽이는 것이다. 보리에 포식성곰팡이를 증식시키고 그것을 4-5일간, 매일 200g씩 송아지에게 먹인 다음, 소의 소화 기관을 통과하여 나온 소똥 속에서 곰팡이의 생존 여부를 조사한 결과, 10중 8, 9는 살아 있었으며, 이 곰팡이들은 소똥 속에 감염되어 있는 소 기생선충, *Ostertagia ostertagi*, 유충을 평균 85%(61-93%) 방제하였다. 소외에 양, 말 등 다른 가축을 대상으로 하여 비슷한 실험이 실시되고 있다(Larsen et al., 1992; Nansen et al., 1995).

국내 포식성곰팡이 연구역사는 약 20여년으로 외국의 150년에 비해 매우 짧다. 저자의 문헌 고찰에 의하면, 국내 첫 연구 논문은 1981년 발표되었다. 유관희, 최영희, 이형환등(Yoo et al., 1981)은 경기도 김포군 김포읍 통리 인삼밭에서 선충을 원심분리와 깔때기법으로 분리하여 Six strains of *Arthrotrys* sp., three strains of *Harposporium* sp.를 보고하였다. 1981년 보고가 국내 처음이라는 간접적 증거로는, 1982년 "균학. 버섯 재배 (page 123-125)" 내용 중 '우리 나라에는 아직 연구가 안되고 있다'고 하였다(이지열, 1982).

그 후 1984년 박진숙등(1984)의 "*Arthrotrys conoides*에 의한 선충포획의 전자현미경적 연구"에서 포식성곰팡이의 종명이 처음 나타나며, 1987년 정미정(1987)의 석사 학위 논문에 분류특징과 함께 *A. arthrotrysoides*, *A. oligospora*, *Dactylella lobata*, *Monacrosporium elliposporum*등 4종이 기록되었다. 그 후 *A. dactyloides*, *A. brochopaga*(한상찬등, 1990), *M. cionopagum*, *M. gephyropagum*(김지인등, 1992), *M. (=Arthrotrys). thaumasium*(박소득 등, 1993), *A. vermicola*(Kim et al., 1997)등의 이름이 나타나, 현재 국내에는 총 6종의 *Arthrotrys*, 5종의 *Monacrosporium* 등 총 11종의 포식성곰팡이가 있다. 그러나 몇몇 종들은 출처, 특징 등이 전혀 기록되지 않아 재확인 필요하다. 김희규 등(1988) 정미정 등 (1988, 1993)은 포식성곰팡이를 이용하여 선충방제

실험을 실시하였다.

우리나라와 육지로 붙어 있는 이웃 중국에는 *Arthrobotrys*, *Dactylella*, *Monacrosporium* 등 총 24종의 포식성곰팡이가 보고 되었으므로(Liu et al., 1992), 국내에도 더 많은 종류의 포식성곰팡이가 서식하고 있을 것으로 생각되며, 또 지난 10년간 전 세계적으로 약 210편의 포식성곰팡이 관련 논문이 발표되었는데(CAB) 국내에는 모두 합하여 9편이다. 이러한 여러 가지로 볼 때 국내 포식성곰팡이 연구는 미개척 연구 분야로서 흥미 있는 연구 재료가 많을 것이다.

2절 연구개발의 목적

국내 시설재배지대에는 오랫동안의 연작으로 뿌리혹선충 포장 검출율이 50% 이상이며 뿌리혹선충에 의하여 매년 약 300억 원 이상의 감수를 가져오고 있다(Kim et al., 2001; Kim and Ferris, 2002). 이러한 뿌리혹선충의 방제법으로 농업인들이 가장 많이 사용하는 방법은 작물 정식전에 살선충제 입제를 살포하는 것이다. 그러나 살선충제는 효과가 부정확하고 유용 미생물에 해로움으로 가장 친환경적인 방법은 생물적방제제를 이용하는 것이라고 할 수 있다. 식물기생성선충 방제용 생물농약 개발을 위해서는 우수한 천적이 선발되어야하고, 이 천적의 배양과, 토양에 처리할 수 있는 제형의 개발과 이 제형의 효과를 포장 상태에서 검증되어야한다. 이러한 기술이 개발되어 국내기업에 이양되고 생물적방제 제품이 생산된다면 국내 친환경농산물 생산에 이바지하고 세계시장에 수출되어 외화 획득에 기여할 수 있을 것이다.

3절 필요성

미생물농약은 Niche market로 현재의 농약으로 방제가 어려운 병해충을 대상으로 하여야 개발후 성공 가능성이 높는데, 이러한 예로서 *Trichoderma spp.*이용한 *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Phytophthora capsici*와 *Pythium spp.*의 방제와 *Pseudomonas fluorescens*를 이용한 *Gaeumannomyces graminis* 와 *Pythium*에 의한 사탕무우 모잘록병의 방제 등을 들수 있다. 그러므로 토양 서식 해충중 가장 방제가 어려운 선충 방제를 위한 생물농약의 개발은 앞으로도 성공할 가능성이 매우 높은 분야이다.

살선충제로 개발된 생물적방제제로는 Abbot에서는 *Myrothecium verrucaria* 배양액을 이용한 항생물질을 DiTera라는 상표로 제품화하였고, 미국 플로리다에서는 순환물기생균으로서 지금까지 인공배양이 불가능하였던 *Pasteuria penetrans*를 토양 세균인 *Enterobacter cloacae*와 동시에 배양함으로써 대량증식에 성공하여 특허를 등록 중이며, 중국에서는 *Paecilomyces linacinus*를 이용하여 'Soybean Root Bio-Protectant'를 생산하고 있다. 포식성곰팡이 중에서는 *Arthrobotrys robusta*를 이용한 버섯기생선충, *Ditylenchus myceliophagus* 방제를 위한 제품 'Royal 300', *A. irregularis*를 이용한 뿌리혹선충 방제용 제품, 'Royal 350' 등이 있다. 또 필리핀에서는 *Paecilomyces linacinus*를 이용하여, 일본에서는 *Monacrosporium* spp., *Pasteuria penetrans*를 이용하여, 영국에서는 *Pochonia(=Verticillium) chlamydosporium*을 이용하여 각각 선충 방제제를 생산하고 있다.

식물기생성선충 억제에 효과가 있는 것으로 언급된 미생물제제들이 국내 시장에 많이 소개되어있으나 정식 미생물농약으로 등록되지 않았으며 그 정확한 효과에 대해서는 잘 알 수 없다. 이들 미생물제의 포장지에는 작물체 생육촉진, 토양환경 개선, 퇴비 부숙 및 촉진을 명기하고 있으며 다양한 선충억제 효과를 표기하고 있음으로 이러한 미생물제제의 오용이나 남용이 우려된다. 이러한 상황에서 선충천적 미생물농약 개발은 시급한 과제이다.

미생물농약을 개발, 실용화하기 위해서는 실험실 안에서 수행한 생물검정만으로는 포장에서 유효한 방제효과를 단정할 수 없으므로 포장조건에서 방제효과를 검정할 필요가 있으며, 포장에서 발생한 데이터를 종합적으로 분석하여 살충력에 영향을 미치는 다양한 요인을 조사하고 이를 바탕으로 처리방법을 등을 결정함으로써 효율적인 처리 방법을 제시하고자 하였다.

4절 연구 범위

본 연구는 효율적인 연구 수행을 위하여 3개의 세부 및 협동과제로 구성되어 있다. 주관기관인 팜텍21에서는 1개의 세부과제로 천적 대량 생산 조건과 기술을 확립하는 것이고, 제1협동과제는 시험 천적곰팡이의 활력을 높이고 안정적이면서 작물에 약해가 없도록 제제화하는 기술을 확립하는 것이며, 제2협동과제는 선충 천적곰팡이의 분리와 선발, 제

제의 살충력을 검정하여 효율적인 이용 방법을 개발하는 것이 주요 내용이다.

단계별 연구범위는 다음과 같다.

단계별	주요 개발 내용 및 범위
1단계(기초연구)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 국내 유망 토종의 선충 천적 분리 동정, 선발 ○ 실험실 및 온실에서 방제 효율 비교 및 선발 ○ 액체배지 및 고체배지를 이용한 대량번식법 확립 ○ 제제화를 위한 보조제 선발
2단계(응용연구 및 시제품 제작)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 포자 대량생산 및 제제화 기술 확립 ○ 제제화된 균주의 방제효과 조사(살선충제와 비교한 효율) ○ 식물기생성선충 종류별 방제 효율 검정
3단계(시제품 완성)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 생물적방제제의 효율 검정 및 시제품 완성 ○ 시제품의 시설하우스 내 방제효과 및 이용법 ○ 살균토양 및 포장 상태에서의 상호 비교

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1절 국외 기술개발 현황

선충의 천적으로는 톡토기, 응애, 세균, 포식성곰팡이, 기생성곰팡이 등 많은 종류가 알려져 있으며 포식성곰팡이(Predatory fungi or Trapping fungi)는 종류가 다양하고 대량 인공 배양이 용이한 장점이 있고, *Pasteuria penetrans*, *Pochonia chlamydosporium* 등은 식물기생선충의 내부로 침투하여 생식기능을 교란시키거나 기생함으로써 선충의 밀도를 감소시키는 작용을 한다. 세계 농약의 20%를 생물농약으로 대체하자는 1992년 UN 환경개발회의의 리우 선언 이후 세계적으로 화학농약 사용을 줄이려는 추세가 뚜렷해지고 있는 현실에서, 조만간 탁월 세계의 미생물 특허장벽에 대비한 국내 미생물농약 개발의 필요성이 더욱 커지고 있다. 세계적으로 등록된 생물농약 276여종 중에서 살충제가 172종(62%), 살균제가 49종(18%), 살선충제가 4종(1.4%), 제초제가 16종(6%), 식물 성장조절제와 기타가 각각 14종(5%)과 21종(7.6%)을 차지하고 있다.

살선충제로 개발된 제품으로서는 Abbot에서는 *Myrothecium verrucaria* 배양액을 이용한 향생물질을 DiTera라는 상표로 제품화하였고, 미국 플로리다에서는 순환물기생균으로서 지금까지 인공배양이 불가능하였던 *Pasteuria penetrans*를 토양 세균인 *Enterobacter cloacae*와 동시에 배양함으로써 대량증식에 성공하여 특허를 등록 중이며, 중국에서는 *Paecilomyces linacinus*를 이용하여 'Soybean Root Bio-Protectant'를 생산하고 있다. 포식성곰팡이 중에서는 *Arthrotrrys robusta*를 이용한 버섯기생선충, *Ditylenchus myceliophagus* 방제를 위한 제품 'Royal 300', *A. irregularis*를 이용한 뿌리혹선충 방제용 제품, 'Royal 350' 등이 있다. 또 필리핀에서는 *Paecilomyces linacinus*를 이용하여, 일본에서는 *Monacrosporium* spp., *Pasteuria penetrans*를 이용하여, 영국에서는 *Pochonia(=Verticillium) chlamydosporium*을 이용하여 각각 선충 방제제를 생산하고 있다.

지금까지 식물기생선충의 피해는 주로 살선충제를 이용하여 방제를 하였다. 그러나 Aldicarb, Fenamiphos, Methyl bromide 등 많은 효과적인 살선충제들이 환경과 인체에 대한 고독성으로 인하여 폐기됨에 따라, 식물기생선충의 천적에 대한 연구가 본격적으로 시작되게 되었다. 선충의 천적은 100여 년 전부터 알려진 포식성곰팡이를 비롯하여 최근의

연구를 통하여 많은 중요한 천적들이 알려졌다.

지난 20년 동안 많은 종류들이 알려져 있으나, 그중 대표적인 것들은 *Paecilomyces linacinus*, *Pochonia (=Verticillium) chlamydosporium*, *Lecanicillium (=Verticillium) lacanii*, *Hirsutella* spp., *Dactylella oviparasitica*, *ARF18*, *Fusarium* spp., *Pasteuria* spp., *Bacillus* spp., 포식성곰팡이류, 생육조장세균류(PGPR) 등이다. 최근의 선충 천적 연구 주류는 선충의 접종원이 되는 선충의 알이나 암컷을 직접 공격하는 기생성곰팡이(egg parasitic fungi) 연구가 주가 되고 있는데, 영국에서는 밀씨스트선충의 발육이 부진한곳에서 *Pochonia(=Verticillium) chlamydosporium*과 *Nematophthora gynophila*를 발견하였고, 미국에서는 김 등에 의하여 콩씨스트선충에 기생하는 ARF18(Kim and Riggs, 1991), Jaffee 등은(1993) 복숭아나무로부터 *Dactylella oviparasitica* 등을 발견 연구하고 있다.

그 외 *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium* 등에서 추출된 여액은 유충 살충효과가 있으며, *Chaetomium globosum*은 유충의 부화 억제, 균근균(Mycorrhizal fungi)은 식물과 공생관계에 있는 유익한 곰팡이로 식물을 튼튼하게 하고 건강하게 해주는 역할을 한다.

토양에 처리되는 미생물들은 대부분 짧은 기간밖에 생존하지 못함으로 토양 전면에서 미생물을 골고루 처리하기 위하여 엄청난 양의 미생물을 투입하고도 선충 방제효과는 일시적인 경우가 많았다. 따라서 생물학적 방제효율을 높이기 위해서는 살충효과 뿐만 아니라 토양내 생존력이 우수한 천적 미생물의 분리와 천적미생물의 직접 처리시 자연생태계 내에서 정착증식 할 수 있는 처리방법이 가장 중요하다. 때문에 천적미생물을 이용하는 생물학적 방제연구의 주요 과제는 기생능력이 우수한 천적미생물을 토양에 직접 처리하면서 동시에 이 천적미생물의 생존력을 높이는 제형화 방법의 확립이 가장 중요하다고 하겠다.

생물적방제는 기생력이 높은 천적균을 병해충이 발생하는 장소에 시기적절하게 처리하는 것이 매우 중요한데, 처리 방법으로는 유기물 처리(Linford and Yap, 1939; Duddington et al., 1956;), 균사체나 포자를 토양에 직접 처리(Mankau, 1961), 유기물과 균사체를 섞어서 처리(Duddington et al., 1956; Ham and Wilkins, 1961; Mankau, 1961, 1962), 미생물을 종자에 처리(Oostendorp and Sikora, 1989), 그리고 유기 혹은 무기 부차제

를 이용한 미생물의 제제화 방법 등이 있다(Lackey et al., 1993; Meyer, 1994).

Mankau(1961)는 뿌리혹선충 방제에 포식성곰팡이의 균사체를 직접 이용하기도 하였고, Oostendorp and Sikora(1989)는 rhizobacteria를 이용하여 종자 처리를 시도하였다. 일반적으로 종자처리는 토양처리에 비해 효과가 낮으며, 균사체를 직접 이용하는 것은 토양의 Fungistasis로 인하여 효과가 떨어진다. 최근에는 천적 미생물의 토양내 활성을 증진시키기 위하여 여러 가지 유기 및 무기 부자재를 이용한 미생물 제제화 시험들이 수행되고 있는데, alginate 등을 이용한 pellet화 연구가 대표적이며, 균주의 특성에 따라 균체 배양액을 부재에 흡착하여 조제하는 방법, sodium alginate 제제화, 당밀에 담근 10% 규조토 등을 이용하기도 하였다.

지금까지 선충방제에 이용된 제제는 액체 배양 및 반고체 배양을 통하여 미생물을 대량 배양하고, 그 후, 제제화로는 Alginate-clay pellet & 균사체, 배양 여액 독소 이용, 목화씨 껍질, 옥수수 가루 및 액체 배양, 종자 침지, Alginate 가루 이용 등이 있다.

2절 국내 기술개발 현황

국내의 미생물농약에 대한 연구는 1980년을 전후로 기초적인 연구가 시작되어 80년대 중반부터 실질적인 식물병 방제기술이 도입되었다. 인삼뿌리썩음병 방제연구를 시작으로 주요 작물의 모잘록병, 역병, 잣빛곰팡이병, 무배추 무사마귀병 등의 방제를 위한 연구가 대학교, 국가 연구기관 및 기업체 등에서 수행되어 왔는데, 1987년에는 인삼뿌리썩음병을 방제하기 위해 바이코나, 1994년에는 역병방제용 AC-1, 흰가루병 천적곰팡이 *Ampelomyces quisqualis* 등 여러 종류의 길항 미생물들이 개발되어 소개되었다. 2000년 미생물농약의 등록시험방법 및 기준이 정해짐에 따라 국내 최초의 미생물농약이 (주)그린바이오텍에 의해 등록된 이래, (주)케이아이비씨, 동부한농화학(주) 등에서 7종의 품목이 등록되었으며, 기존의 화학농약법에 따라 등록된 Bt 7개 품목이 추가로 인정되었다. 그 밖에도 생물농약으로 등록되지 않았지만 살충, 살균 효과가 있다고 알려져 있는 미생물계통(토양미생물제제로 등록)과 추출물계통(미량요소복합비료로 등록)이 제품화 되어 약 50여개의 회사로부터 약 100개 정도의 품목이 미생물 비료로 등록, 판매되고 있다.

미생물농약은 Niche market로 현재의 농약으로 방제가 어려운 병해충을 대상으로 하여야 개발후 성공 가능성이 높는데, 이러한 예로서 *Trichoderma spp.*이용한 *Rhizoctonia*

solani, *Sclerotium rolfsii*, *Phytophthora capsici*와 *Pythium spp.* 의 방제와 *Pseudomonas fluorescens*를 이용한 *Gaeumannomyces graminis* 와 *Pythium*에 의한 사탕무우 모잘록병의 방제 등을 들수 있다. 그러므로 토양 서식 해충중 가장 방제가 어려운 선충 방제를 위한 생물농약의 개발은 앞으로도 성공할 가능성이 매우 높은 분야이다.

국내에서 선충에 관한 생물적방제 연구역사는 20여년으로 매우 짧으며, 국내 첫 연구 논문은 1981년 발표되었다. 유관희 등(1981)은 경기도 김포군 김포읍 통리 인삼밭에서 선충을 원심분리와 깔데기법으로 분리하여 *Arthrobotrys* 6종, *Harposporium* 3종을 보고하였으며 현재 국내에는 총 6종의 *Arthrobotrys*, 5종의 *Monacrosporium* 등 총 11종의 포식성곰팡이가 있으며 김희규등(1988) 정미정등 (1988, 1993)은 포식성곰팡이를 이용하여 선충 방제 실험을 실시하였다. 지난 10년간 전 세계적으로 약 2,000여편의 선충천적 관련 논문이 발표되었는데(CAB) 국내에는 모두 합하여 20편 정도이다.

김 등은(2001) 전국 8 개도, 113개 지점의 토양으로부터 선충 포식성곰팡이를 분리하여 9종의 포식성곰팡이와 2종의 기생성곰팡이를 분리하였다. 대부분이 끈끈이그물을 이용하여 선충을 포식하였으며 *A. dactyloides* 는 수축성 올가미를 가지고 있었다. 검출률은 산에서는 38%였고, 밭과 시설재배지에서는 거의 100% 선충잡이곰팡이가 검출되었다. 우점종은 *Arthrobotrys oligospora* 이었고 선충잡이 도구 중에서는 끈끈이그물(Adhesive nets)을 이용하여 선충을 포식하는 종류가 전체의 72.5%로 가장 많았으며, 다음은 수축성올가미를 가진 *A. dactyloides*(10.0%), 끈끈이균사를 가진 *Cystopage lateralis* 7.8%, 내부기생성곰팡이 5.0%, 끈끈이봉을 가진 *Monacrosporium ellipsosporum* 4.8% 순이었다. 선충잡이곰팡이의 종이나 밀도는 서식 지역에 따라 다른데 토양이 비옥한 시설재배지 토양에서 선충잡이곰팡이의 종과 밀도가 높은 것으로 나타났다.

토성과 선충잡이곰팡이의 상관관계 조사에서 pH가 선충잡이곰팡이의 서식에 가장 중요한 것으로 나타났다. 이 등은 (2000) 52균주의 선충 포식성곰팡이를 이용하여 실내 및 온실에서 부식성선충과 뿌리혹선충을 이용하여 포식력을 비교하였는데, 실내검정에서 부식성선충에 대하여 91%이상의 포식력을 보인 균주는 51균주였고, 뿌리혹선충에 대하여는 26균주였으나, 온실 검정에서는 81%의 포식력을 보인 균주가 3균주였다. 선발된 3균주는 부식선충 및 뿌리혹선충에 대하여 실내 및 온실 실험에서 모두 높은 포식력을 나타내었다. 순환물기생세균인 *Pasteuria*도 국내에서 발견되었는데, 뿌리썩이선충(*Pratylenchus sp.*), 콩

씨스트선충(*Heterodera glycines*), 환선충(*Criconema* sp.) 등에서 *Pasteuria*의 감염이 확인되었고 충주의 콩씨스트선충의 씨스트 내에는 평균 $1.7 \pm 1.1 \times 10^5$ 개의 세균 포자가 들어 있었고 유충 한 마리에 최대 58개의 포자가 붙어있었다. 세균 기생율은 7월이 가장 높았으며 (75%) 토양 깊이 11-20cm에서 가장 높았다.

식물기생선충 억제에 대하여 언급된 미생물제제들이 시장에 소개되어있으나 정식 미생물농약으로 등록되지 않은 것이 그 정확한 효과에 대해서는 잘 알 수 없다. 이들 미생물제의 포장지에는 작물체 생육촉진, 토양환경 개선, 퇴비 부숙 및 축진을 명기하고 있으며 다양한 선충억제 효과를 표기하고 있음으로 이러한 미생물제제의 오용이나 남용이 우려된다.

이와 더불어 천적곰팡이에 대한 화학농약의 영향 및 이들 균주를 화학농약과 복합 처리하거나 산소발생제를 보조제로 첨가하여 살충력을 증진시키고자 하는 연구도 수행되었다. 이와 같은 IPM 요소들 간의 상호작용에 대한 기작과 복합처리 기술은 향후에도 많은 연구가 수행되어 미생물농약의 이용 효율을 높이고 생태계의 안전성을 강화시킬 수 있도록 추진되어야 할 것이다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

1절 연구 방법

1. 선충 포식성곰팡이 분리 및 균주 선발

가. 선충 포식성곰팡이 분리 및 동정

경상북도 성주 및 고령의 과채류 재배 하우스에서 채집된 토양을 시험에 사용하였다. 토양 채집방법은 표토 5cm 정도를 제거하고 깊이 15cm까지 약 2kg을 채집하였으며, 채집된 토양은 비닐봉투에 넣고 즉시 실험실로 운반하여 5°C 냉장고에 보관하면서 시험에 사용하였다.

1) 배지 종류별 포식성곰팡이 분리효율 비교.

배지 선발시험은 1차와 2차로 2회에 걸쳐 시험하였다. 1차는 배지의 농도 시험으로 cornmeal agar(CMA)와 water agar(WA)를 이용하였으며 배지의 농도는 1배와 0.5배로 하였다. 시험은 성주와 고령의 온실에서 채집된 2지역의 토양으로 하였으며, 채집된 토양을 잘 섞어 그중 토양 20g을 취하고 여기에 증류수 20ml을 첨가한 후 교반기를 이용하여 1분간 혼합하였다. 혼합된 토양은 피펫을 이용하여 직경 15cm Petri dish에 들어있는 배지 위 4곳에 균일한 간격으로 0.2ml씩 두었다(Fig. 4). 토양을 둔 후 미리 배양시켜둔 부식선충이 50마리 정도 들어있는 배양액 0.2ml을 Petri dish 중앙에 접종하였고 Petri dish는 실온(18-25°C)에 보관하였다. 접종 3일 후부터 1일 간격으로 15일간 선충 포식성곰팡이의 출현을 관찰하였다. 토양 종류 및 배지별로 각 5반복을 두었으며 검출율은 Petri dish 내에 있는 토양 1점에서의 포식성곰팡이 검출율을 조사하고, 4점을 평균하여 한개 페트리디쉬 당 전체 평균으로 하였다.

2차 시험은 배지 종류와 항생제 첨가 시험으로 배지의 종류는 Milk agar(가루우유 2.0g, 증류수 1리터, Agar 20g), Reynolds medium (K₂HPO₄ 0.7g, KH₂PO₄ 0.3g, MgSO₄•7H₂O 0.5g, FeSO₄•7H₂O 0.01g, ZnSO₄ 0.001g, 증류수 1 리터, Agar 20g), Cornmeal agar(Difco) 3종이었다(Stukus, 1997). 항생제는 Tetracycline(4mg/L)을 각 배지 제조후 Petri dish에 분기 직전에 배지에 첨가하였다. 기타 시험방법은 1차 시험과 동일하게 수행하였다.

2) 포식성곰팡이 분리시 부식성선충 첨가 효과

시험은 성주온실에서 채집된 토양을 이용하였으며, 배지는 위 시험에서 선발된 Reynold's medium을 사용하였고, 분리방법은 sprinkle분리법과 dilution분리법을 사용하였다. sprinkle분리법은 채집된 토양을 잘 섞고 그중 50mg을 배지위에 흩뿌렸으며(Fig. 4), dilution법은 토양 20g에 증류수 20ml을 첨가하여 교반기를 이용하여 1분간 혼합하고 혼합된 토양은 피펫을 이용하여 직경 15cm Petri dish에 들어있는 배지 위 4곳에 균일한 간격으로 약 0.2ml씩 두었다(Fig. 4). 선충 미접종구는 분리 배지에 선충을 접종하지 않았으며, 부식선충 접종구는 미리 배양시켜둔 부식선충이 50마리 정도 들어있는 배양액 0.2ml을 각 분리방법별 Petri dish 중앙에 접종하였다. 각 분리 방법별로 5반복으로 하였으며 처리된 Petri dish는 실온(18-25℃)에 보관하면서, 접종 3일 후부터 1일 간격으로 15일간 선충 포식성곰팡이의 출현을 관찰하고 포식성곰팡이의 동정은 위의 시험에서와 같은 방법으로 동정하였다.

3) 토양 희석에 의한 포식성곰팡이 밀도 산출

토양중 포식성곰팡이의 밀도를 정확하게 추정하기 위하여 성주지역 온실에서 채집된 토양 10g에 증류수를 넣어 혼합후 그중 0.2ml을 취하면 실지 토양의 양이 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15mg 되도록 증류수를 첨가하였다. 혼합된 토양은 피펫을 이용하여 직경 15cm Petri dish에 들어있는 배지 위 4곳에 0.2ml씩 두었다. 토양을 둔 후 미리 배양시켜둔 부식선충이 50마리 정도 들어있는 배양액 0.2ml을 Petri dish 중앙에 접종하였고 Petri dish는 실온(18-25℃)에 보관하였다. 접종 3일 후부터 1일 간격으로 15일간 선충 포식성곰팡이의 출현을 관찰하였다. 토양의 희석 배수별로 각 5반복을 두었으며 검출율은 Petri dish 내에 있는 각 토양 1점에서의 포식성곰팡이 검출율을 조사하고, 4점을 평균하여 1 페트리디쉬 당 전체 평균으로 하였고 포식성곰팡이의 동정은 위의 시험과 같은 방법으로 동정하였다.

4) 살선충제에 의한 배지내 발생되는 토양 미생물 억제

포식성곰팡이 분리시 가장 문제가 되는 뿌리응애와 애지렁이의 발생을 억제하면서 부식선충과 포식성곰팡이의 발생에는 피해가 없는 살충제를 선발하기 위하여 국내 시판 농약중 각기 다른 계통의 살충제를 선정하여 시험에 사용하였다. 실험에 사용된 살충제는 나토프퀴논계의 acequinocyl액상수화제(15% a.i.), 벤조닐우레아계의 diflubenzuron액상수화제(14% a.i.), 유기인계의 dimethoate유제(46% a.i.), 유기인계인 dichlorvos유제

(50% a.i.), 치아니코틸계의 thiamethoxam입상수화제(10% a.i.), 클로로니코티닐계의 thiocloprid액상수화제(10% a.i.), 테트로닉에시드계통의 spirodiclofen수화제(22% a.i.), 피라졸계의 tebufenpyrad수화제(10% a.i.), 항생제계통의 abamectin유제(1.8% a.i.) 등 9종이었다. 1차 시험은 9종의 약제에 대한 뿌리응애, 애지렁이, 부식성선충, 포식성곰팡이 반응시험으로 cornmeal agar 배지에 약제 반량, 기준량, 배량을 넣고 굳힌 후, 각 Petri dish 당 부식성선충 200마리 뿌리응애 2마리, 애지렁이 11마리를 첨가하고 2반복으로 하여 10일후 각 종류별 밀도를 조사하였다.

2차 조사에서는 1차에서 뿌리응애와 애지렁이에 대한 억제효과가 있는 유망한 약제 2종, dichlorvos유제(50% a.i.)와 tebufenpyrad수화제(10% a.i.)를 대상으로 dichlorvos유제는 2.5ppm, 5ppm, 10ppm으로, tebufenpyrad수화제는 5ppm, 10ppm, 20ppm으로 희석하여 희석배율에 따른 각 종별 발생억제효과를 검정하였다. 부식성선충, 뿌리응애, 애지렁이, 포식성곰팡이는 1차와 동일하게 접종하였고, 각 5반복으로 시험하였다.

5) 포식성곰팡이 분류 및 동정

해부현미경(Olympus PROVIS) 관찰시 선충잡이곰팡이가 발견되면 400배 광학현미경(Nikon DXM1200F)으로 옮겨 동정하였고, 직접적인 동정이 어려운 곰팡이는 순수 분리하여 cornmeal agar (Difco; CMA)에 옮기고 25°C에서 배양한 후 관찰하였다. 동정에 사용된 특성은 선충잡이 기관의 형태 및 크기, 분생포자의 형태 및 크기, 분생포자병의 길이, 너비, 형태, 분생포자병의 가지 형성 유무 및 node의 존재여부, node의 개수 등이었고 chlamydospore는 동정에 참고하지 않았다(Cooke and Satchuth., 1966; Kim *et al.*, 1997). 동정은 원 기록자의 논문을 기준으로 하고(Cooke and Satchuth., 1966; Drechsler, 1937, 1944), 그 외 Barron(1977), Cooke and Godfrey(1964)의 동정색인을 참고하였다. 전자현미경 관찰을 위해서는 CMA에서 배양된 포식성곰팡이를 고정하고, 알코올 탈수과정을 거쳐 critical point drying후 코팅을 하였으며, 주사전자현미경(Leo 1450VP, Carl Zeiss)으로 관찰하였다(15 kV).

DNA 분리와 PCR reaction: 신규로 발견된 포식성곰팡이의 분자생물학적 동정을 위하여 포식성곰팡이를 MY medium (2% malt extract, 0.2% yeast extract)에 배양하였다. DNA 분리는 CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide)로 하였고, 분리된 DNA는 TE buffer(10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0)에 넣었다. Nuclear ribosomal DNA의

inter transcribed spacer(ITS) I II 및 5.8S 영역을 증폭하기 위해서 사용된 primer는 White등의 rDNA region primer를 참조하여 표 와 같이 oligo primer를 제작하여 사용하였다.

PCR기기는 Biometra사의 TGradient를 사용하였으며 PCR reagent는 TaKaRa ExTaq premix를 사용하였으며 증폭조건은 초기 denaturation으로 94℃에서 4분간 실시한 후, 29cycle의 증폭(94℃ 2분, 56℃ 1분, 72℃ 2분)이 이루어진 다음 마지막 extension으로 72℃에서 5분간 실시하였다. PCR product는 Nusieve 3:1 agarose(TaKaRa, Japan) 2% gel, 0.5×TBE buffer하에서 전기 영동한 다음 단일 밴드로 나타나는 것을 정확히 잘라내어 gel purification(Bioneer Gel purification Kit, Korea)을 실시하였다. 정제된 PCR product는 pGEM-T easy vector system(Promega, USA)으로 ligation(ligation mixture : 2× buffer 5 µl, vector 1µl, purified PCR product 2µl, T-4 ligase 1µl, ddH₂O 1µl, ligation condition : 4℃, 16hrs)한 후 *E. coli* strain DH5a에 transformation하여 white colony를 선발한 다음 plasmid를 추출하여 다시 제한효소(*EcoR* I)를 처리하여 PCR product size와 일치하는 plasmid를 DNA sequencing용으로 사용하였다. DNA sequencing은 Applied Biosystems Inc.의 ABI3700기종으로 ABI Prism[®] BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit를 사용하였다.

결정된 DNA염기배열은 NCBI blastn을 이용하여 ribosomal DNA ITS영역과의 상동성을 확인하였고 Clustal X(ver. 1.8, Thompson 등, 1997) 프로그램을 이용하여 관련 DNA sequence를 alignment하였으며 *Monacrosporium*속의 ITS영역에 대한 phylogram은 neighbor joining method(Saitou and Nei, 1987)를 사용하여 1,000회의 bootstrap을 실시하여 phylogenetic tree를 작성하였다(URL: <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html>).

Table 1. Oligo primer in ribosomal DNA amplification

primer name	sequence	size(bp)	remark
ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	19	ITS I
ITS2	GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC	20	5.8S rDNA
ITS3	GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC	20	
ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	20	ITS II

나. 선충 포식성곰팡이 선발

1) 포식성곰팡이의 산소농도에 따른 반응성

시험에 사용한 포식성곰팡이는 국내에서 분리된 10종 38 균주로, 이 곰팡이를 CMA배지에 보관하고 한달에 한번씩 이식하면서 25℃ 항온기에 보관하여 시험에 사용하였다. Water agar를 직경 9 cm Petri dish에 부어 굳힌 후, 미리 배양시켜둔 부식선충이 50마리 정도 들어있는 배양액 0.2ml을 Petri dish 중앙에 접종하였고, 선충 접종 1~3일 후 포식성곰팡이를 그 중앙에 접종하였다. 접종된 Petri dish는 산소의 농도가 0%, 10%, 21%로 조절된 밀폐된 플라스틱 박스(락앤락, L x R x H = 295 x 230 x 84mm)에 넣고 실온(18-25℃)에 보관하였다. 접종 10일 후 박스를 열고 각 처리별로 포식성곰팡이의 선충 포식 정도, 포자 발생 정도 및 균사생육 정도를 조사하였다. 시험은 각 균주별로 3반복으로 처리하였다.

2) 포식성곰팡이의 온도에 대한 반응성

시험에 사용한 포식성곰팡이는 국내에서 분리된 10종 38 균주로, 이 곰팡이를 CMA배지에 보관하고 한달에 한번씩 이식하면서 25℃ 항온기에 보관하여 시험에 사용하였다. Water agar를 직경 9 cm Petri dish에 부어 굳힌 후, 미리 배양시켜둔 부식선충이 50마리 정도 들어있는 배양액 0.2ml을 Petri dish 중앙에 접종하였고, 선충 접종 1~3일 후 포식성곰팡이를 그 중앙에 접종하였다. 접종된 Petri dish는 플라스틱 박스(락앤락, L x R x H = 295 x 230 x 84mm)에 넣고 온도(5℃, 20℃, 30℃) 처리별로 각각 보관하였다. 접종 10일 후 박스를 열고 각 처리별로 포식성곰팡이의 선충 포식 정도, 포자 발생 정도 및 균사생육 정도를 조사하였다. 시험은 각 균주별로 3반복으로 처리하였다.

3) 포식성곰팡이의 세균에 대한 반응성

시험에 사용한 포식성곰팡이는 국내에서 분리된 10종 38 균주로, 이 곰팡이를 CMA배지에 보관하고 한달에 한번씩 이식하면서 25℃ 항온기에 보관하여 시험에 사용하였다. Water agar를 직경 9 cm Petri dish에 부어 굳힌 후, Nutrient broth에서 미리 배양시켜둔 *Pseudomonas* sp.와 부식선충이 50마리 정도 들어있는 배양액 0.2ml을 Petri dish 중앙에 접종하였고, 세균의 배지내 정착을 위하여 세균 접종 1~3일 후 포식성곰팡이를 그 중앙에 접종하였다. 접종된 Petri dish는 플라스틱 박스(락앤락, L x R x H = 295 x 230 x 84mm)에 넣고 실온(18-25℃)에 보관하였다. 접종 10일 후 박스를 열고 각 처리

별로 포식성곰팡이의 선충 포식 정도, 포자 발생 정도 및 군사생육 정도를 조사하였다. 시험은 각 균주별로 3반복으로 처리하였다.

2. 선충 포식성곰팡이 배양 및 제제화

가. 군사 액체배양

시험에 사용한 포식성곰팡이는 시험 기간 중에 분리된 포식성곰팡이를 이용하였는데, 이 곰팡이들을 CMA배지에 보관하고 한달에 한번씩 이식하여 25℃ 항온기에 보관하여 시험에 사용하였다. 균주의 액체배양은 Malt dextrin-Yeast extract 액체배지를 기본으로 제조되었으며, 그 외 값싼 Carbon source를 대체하기 위하여 glucose, 요리당 등이 시험되었고, 질소원으로서는 탈지분유, casamino acid 등이 이용되었다. Casamino acid는 액체 배양중 군사로부터 포자 혹은 내생포자의 발생을 촉진시키는 효과가 있다고 알려져 있다. 배양전 접종원을 만드는 방법은 CMAY에서 배양한 포자를 멸균수로 수확하여 포자현탁액 (3.4×10^4 conidia/ml) 농도로 접종하여 진탕배양기(28 °C, 140rpm)에서 6일간 배양한 후 사용하였으며, 배양후 균체량은 배양액을 진공펌프를 사용하여 No. 2 fiber filter로 걸러 여과액을 버리고 filter에 걸러진 군사체를 수분을 제거한 후 실험에 사용하였다.

대량배양을 위해서는 액체배양용 MY배지(60g malto dextrin, 30g Yeast extract 1.82g NaNO₃, 0.25g KH₂PO₄, 0.05g MgSO₄·7H₂O, Tracer 1ml, 1 L 증류수)를 20-L 용량의 자체 제작된 발효조(Fig. 1)에 Glucose-Yeast extract배지를 3 L 넣고 고압멸균(121℃, 20분)하여 미리 배양된 균주의 접종원을 150ml(5%) 접종하였다. 발효조 배양시 공기주입은 어항용 air pump를 개조하여 사용하였고 (0.5 L/vvm), 배양 온도는 25℃이었으며 pH는 6.5±0.2로 조정하였다. 배양후 균체량은 배양액을 진공펌프를 사용하여 No. 2 fiber filter로 걸러 여과액을 버리고 filter에 걸러진 군사체를 수분을 제거한 후 실험에 사용하였다.

Basal medium of composition(g/L),

KH₂PO₄ 0.25

MgSO₄·7H₂O 0.05g.

One-ml of trace element(MnSO₄·4H₂O 0.005g/L, FeSO₄·7H₂O 0.002g/L, and ZnSO₄·4H₂O 0.002g/L)



Fig. 1. Fermentation. A. Flask culture, B. filtering system, C. 20 liter fermenter

나. 포식성곰팡이 고체 제제화

곰팡이 천적의 직면한 큰 제약 가운데 하나는 곰팡이 포자 (분생포자, 병자각, 후막포자)와 기타 영양 휴면 곰팡이 증식체를 생산하는 문제이며 액체배양에서 곰팡이 포자를 배양하고 건조하여 사용 전까지 보관 가능한 제형으로 보존하는 방법을 찾는데 집중되었다. 그러나 균사를 이용할 경우에는 액체 배양후 포자를 따로 분리하지 않고 균사와 포자를 함께 섞어 알지네이트 (alginate)로 만들기도 하고, 흡수성 전분 옥수수유, 당, 규토로 이루어진 ‘스타빌레즈 (Stabilize)’라는 새로운 제형으로 만들기도 하는데, 이 실험에서는 스타빌레즈 (Stabilize) 방법을 이용한 균사제제를 만드는 방법을 포함하였다.

시험에 사용한 포식성곰팡이는 국내 시설재배지 토양으로부터 분리된 포식성곰

광이 11종 52균주 중에서 포식능력이 우수한 균주를 선발하여 사용하였다. 2005년 1차 선발을 실시하였으며, 2006년에는 토양 환경(세균저항성, CO₂, O₂ 적응성)에 대한 반응 및 fermentation, 제제의 효율성 등을 고려하여 정밀 재선발을 실시하여 우수한 균주를 선발하여 재검토하였다. 이들 곰팡이들의 균주는 -70℃에 cryopreservation 보관하였으며 실험에 사용할 균주는 CMA배지에 한달에 한번씩 이식하여 25℃ 항온기에 보관하면서 시험에 사용하였다.

1) 포식성곰팡이 제제화 I : Vermiculate-starch formulation

제제는 액체 배양된 균사 배양액 100ml(건조 균사 무게 = 1.2 g)를 질석 400g, 생육분 40g과 잘 섞은 후, 사각 플라스틱 용기에 5cm 두께로 얇게 펴고 25±1℃에서 3일간 배양하였다. 배양시 수분함량은 55-60%로 조절하였다. 3일후 제제를 수확하여 실내에서 선풍기를 이용하여 3일간 서서히 건조시켰고, 건조된 제제는 2mm체를 통과시켜 비닐봉투에 넣고 시험 전까지 4℃ 냉장고에 보관하였다.

장기 보관 시험을 위해서는 만들어진 Vermiculate-starch formulation을 비닐봉투에 넣어두고 각각 5℃ 냉장고 및 25℃ 상온에서 보관하면서 1개월 간격으로 4개월간 Vermiculate-starch formulation의 활성을 조사하였다. Vermiculate-starch formulation의 활성은 각 온도 처리마다 1g의 제제를 취하여 1.5% water agar가 담긴 배지위에 두고 약 1주일간 포자 발생정도 및 균사 생육 정도를 조사하였다.

2) 포식성곰팡이 제제화 II. : Sodium alginate matrix Formulation

배양된 곰팡이의 균사는 깔데기와 filter paper를 이용하여 진공으로 filter 하였으며 증류수로 3번 씻어 배양여액은 제거하였다. 곰팡이 균사는 미리 고압살균 시켜 둔 1.5% sodium alginate(low viscosity 250cP) 용액과 섞어서 높이 50cm에서 관을 통하여 아래의 calcium chloride(0.1M)용액으로 떨어지게 하였다. calcium chloride(0.1M)용액에 떨어진 곰팡이균사+sodium alginate용액은 즉시 bead화 되었으며, 이 상태로 약 5분간 두었다가 수거하여 clean bench 하에서 서서히 건조시켜 사용하였다.

장기 보관 시험을 위해서는 비닐봉투에 넣어두고 각각 5℃ 냉장고 및 25℃ 상온에서 보관하면서 1개월 간격으로 4개월간 bead의 활성을 조사하였다. Bead의 활성은 각 온도마다 10개의 bead를 취하여 1.5% water agar가 담긴 배지위에 두고 약 1주일간 포자 발생정도 및 균사 생육 정도를 조사하였다.

3) 포식성곰팡이 제제화 III. BIODAC® formulation

Biodac®은 재활용 휴지로 만든 입제형으로(Kadant GranTek Inc) 화학농약 등을 흡수시켜 입제로 만들 때 사용하기도하는 새로운 타입의 흡수제이며 토양 중에서 자연 분해 됨으로 환경친화적인 제형이다. 또 GranTeK의 특허기술로서 입자의 크기를 균일하게 하여 사용자에게 공급하고 있다. Biodac®은 현재 모기의 항공방제시, 제초제 및 비료 살포 시에도 이용되고 있으며, 균일한 크기로 먼지가 나지 않음으로서 농약의 분산을 억제하면서 균일하게 살포되는 특징이 있다.

포식성곰팡이 Biodac 제제를 만드는 방법으로는 1) 살균을 위하여 Biodac 입제 (size 12/20 mesh)를 80도 오븐에서 3일간 가열하였다. 2) sticker로 사용하기 위하여 1% sodium alginate 용액을 고압 살균하여 준비, 3) 400ml 비커에 Biodac 30g과 sodium alginate 용액 45ml, 곰팡이 균사 2.5g을 같이 넣고 잘 저었다. 4) 혼합된 제제는 알루미늄 호일에 올려두고 하룻밤 동안 clean bench 안에서 말렸다.

장기 보관 시험을 위해서는 만들어진 Biodac를 비닐봉투에 넣어두고 각각 5℃ 냉장고 및 25℃ 상온에서 보관하면서 1개월 간격으로 4개월간 Biodac의 활성을 조사하였다. Biodac의 활성은 각 온도 처리마다 10개의 bead를 취하여 1.5% water agar가 담긴 배지위에 두고 약 1주일간 포자 발생정도 및 균사 생육 정도를 조사하였다.

4) 포식성곰팡이 제제화 IV: Pregelatinized Starch Stabilizer formulation

곰팡이의 균사를 포함한 제제를 만들기 위해서는 급속한 건조로 인한 곰팡이 균사의 파괴를 막기 위한 stabilizer가 필요하며, 가장 많이 사용되고 있는 stabilizer로서는 변성전분(pregelatinized starch, 삼신케미칼, 경북 영주)과 oil을 들 수 있다. 본 제형에서는 곰팡이의 균사와 변성전분, corn oil, kaolin을 혼합한 제제를 만들어 시험에 사용하였다.

곰팡이 균사는 malt dextrin-yeast extract 배지에서 5일간 배양된 균사를 진공 필터하여 사용하였다. 제제화의 방법은 1) 곰팡이 균사 10g을 물 50ml, 식용유 50ml과 잘 섞은 후 변성녹말(pregelatinized starch) 50g을 첨가하고 믹서기(신일, SFM-500DSI)로 30초간 혼합한다. 2) 반죽을 실온에서 1시간 동안 둔다. 3) 반죽에 고압 살균된 Kaolin 100g을 넣고 섞은 후 국수기계(Fig. 2)를 5번 통과하여 잘 혼합한다. 4) 혼합되어 얇게 펴진 반죽은 알루미늄 호일에 담아 clean bench 안에서 하룻밤 동안 말린다. 5) 하룻밤

말린 제제를 믹서기(신일, SFM-500DSI)를 이용하여 잘게 간다. 6) 잘게 갈린 제제를 20mesh 채를 이용하여 채로 치고 채를 통과한 균일한 크기의 제제를 시험에 사용하였다.

장기 보관 시험을 위해서는 만들어진 변성녹말 제제를 비닐봉투에 넣어두고 각각 5°C 냉장고 및 25°C 상온에서 보관하면서 1개월 간격으로 4개월간 변성녹말 제제의 활성을 조사하였다. 변성녹말 제제의 활성은 각 온도 처리마다 0.1g의 제제를 취하여 1.5% water agar가 담긴 배지위에 두고 약 1주일간 포자 발생정도 및 균사 생육 정도를 조사하였다.



Fig. 2. Apparatus used to formulate predatory fungi

5) 포식성곰팡이 제제화 VI: 싸래기 및 밀을 이용한 유기 formulation

가) 싸래기 제제

1) 싸래기를 물로 씻은 다음, 3시간 동안 물에 담가 두었다. 2) 싸래기를 채에 받혀 물기를 뺀 후 500g의 싸래기에 5g의 미강을 섞었다. 3) 이들을 고압살균용 비닐봉투에 넣고 121°C에서 1시간 고압 살균하였으며, 1일후 2차로 고압 살균하였다. 4) 고압 살균된 싸래기+미강 혼합체에 5일전 미리 배양 시켜둔 포식성곰팡이 균사를 무균적으로 접종하였다. 5) 접종후 25도에서 보관하면서 1-2일 간격으로 비닐 봉투를 잘 흔들어 섞어주면서 곰팡이를 배양하였다. 6) 약 30일후 곰팡이가 충분히 배양된 후 알루미늄

호일에 배양된 싸래기를 얇게 펴고 clean bench 내에서 3일간 충분히 말렸다. 7) 충분히 마른 후 믹서기(신일, SFM-500DSI)를 이용하여 잘게 갈았으며, 8) 잘게 갈린 제제는 20mesh 체를 이용하여 치고 체를 통과한 균일한 크기의 제제를 시험에 사용하였다.

장기 보관 시험을 위해서는 만들어진 싸래기 제제를 비닐봉투에 넣어두고 각각 5°C 냉장고 및 25°C 상온에서 보관하면서 1개월 간격으로 4개월간 싸래기 제제의 활성을 조사하였다. 싸래기 제제의 활성은 각 온도 처리마다 0.1g의 제제를 취하여 1.5% water agar가 담긴 배지위에 두고 약 1주일간 포자 발생정도 및 균사 생육 정도를 조사하였다.

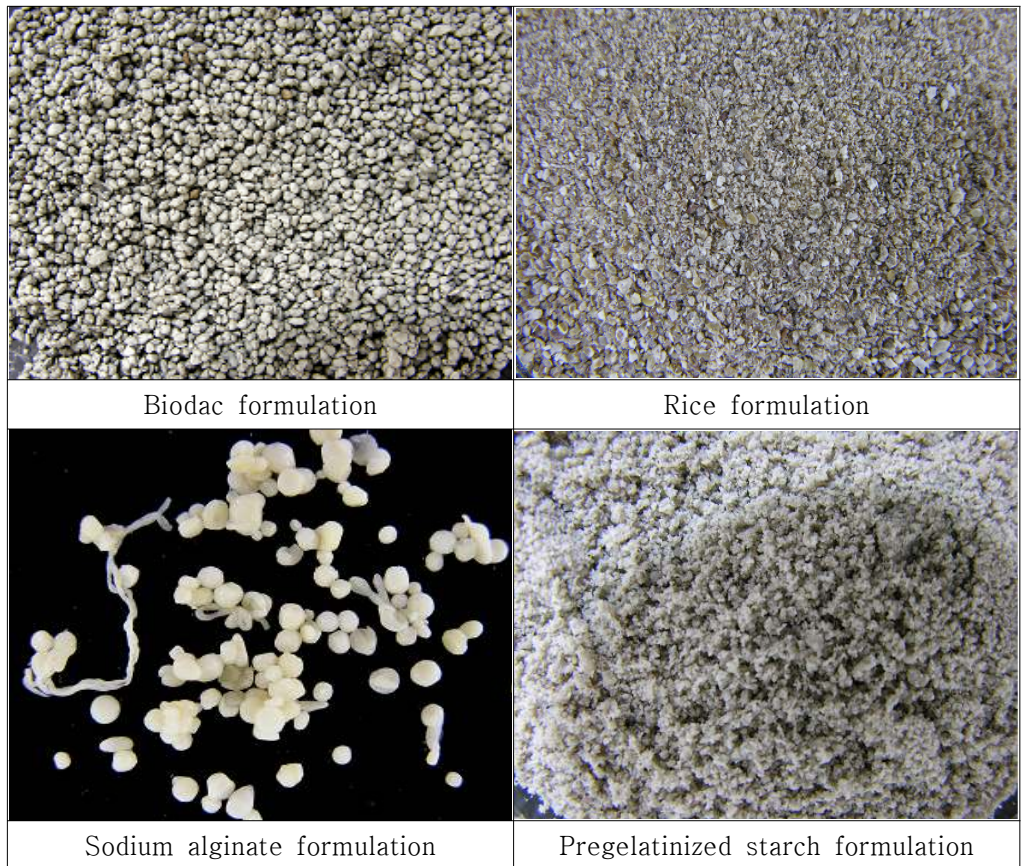


Fig 3. Some examples of formulation of predatory fungi

나) 밀 제제

밀 제제의 경우도 싸래기 제제의 경우와 거의 비슷한 방법을 사용하

여 포식성곰팡이를 배양하였다. 단, 고압살균시 밀이 서로 엉겨 붙는 것을 방지하기 위하여 밀에 석고 1%를 넣고 잘 섞은 다음 고압 살균하였으며, 이후의 단계는 싸래기제제 배양의 경우와 동일하다.

장기 보관 시험을 위해서는 만들어진 밀 제제를 비닐봉투에 넣어두고 각각 5℃ 냉장고 및 25℃ 상온에서 보관하면서 1개월 간격으로 4개월간 밀 제제의 활성을 조사하였다. 밀 제제의 활성은 각 온도 처리마다 0.1g의 제제를 취하여 1.5% water agar가 담긴 배지위에 두고 약 1주일간 포자 발생정도 및 균사 생육 정도를 조사하였다.

다. 천적곰팡이의 토양 정착능력 검정

토양에 처리된 포식성곰팡이 제제가 온실 포장 상태의 토양에서 얼마나 오랫동안 정착하고 있는지를 확인하기 위하여 2종의 포식성곰팡이를 Pregelatinized Starch Stabilizer formulation하고 1%의 양으로 온실 토양에 처리하였으며, 처리 50, 100, 150일 후에 위에서 개발된 부식선충을 이용한 trap 법을 이용한 희석평판 배양법으로 포장에 처리된 천적곰팡이를 재분리해서 근권정착능을 조사하였다.

3. 선충 포식성곰팡이 제제를 이용한 효능검증 및 이용방법 연구

토양에 처리된 포식성곰팡이 제제가 온실 포장 상태의 토양에서 다양한 타입으로 개발된 제형들을 실내, 온실 및 포장실험을 통하여 효과를 검정하여 뿌리혹선충의 생물학적 방제에 효과적인 제형을 선발하고자 하였다. 제제의 효과를 검정하기 위하여 뿌리혹선충이 감염된 포장 흙을 채집하여 직경이 2-mm되는 체로 쳐서 굵은 돌과 식물 뿌리등을 골라내고, 3번 이상 잘 섞어 선충의 밀도를 균일하게 하였다. 시험전 토양의 뿌리혹선충은 고구마뿌리혹선충 *Meloidogyne incognita* 이었으며, 유충의 밀도는 3반복 평균 토양 100 cm³당 500마리로 시험에 충분한 수준이었다.

가. 포식성곰팡이 제제의 실내 검정

Starch formulation이 이용하여 만들어진 포식성곰팡이 7종을 시험에 사용하였다. 선충 감염토양 10g과 제제(0%, 1%, 2%)를 용량 100ml의 비닐봉투에 넣고 잘 섞은 후 실온에 두었다. 접종 10일후 토양 전체를 Baermann 깔데기법을 이용하여 선충을 분리하고 선충의 밀도는 해부현미경하에서 검정하였다. 각 시험은 5반복으로 처리하였다.

5종 포식성곰팡이의 배양균사체를 이용하여 포식성 능력 검정시험을 실시하였다. 선충 감염토양 10g과 배양균사체(0%, 1%, 2%)를 용량 100ml의 비닐봉투에 넣고 잘 섞은

후 실온에 두었다. 접종 10일후 토양 전체를 Baermann 깔데기법을 이용하여 선충을 분리하여 해부현미경하에서 검경하였다. 각 시험은 5반복으로 처리하였다.

Pregelatinized starch에 Kaolin을 섞은 제제로 만들어진 포식성곰팡이 5종을 시험에 사용하였다. 선충 감염토양 10g과 제제(1.0%)를 용량 100ml의 비닐봉투에 넣고 잘 섞은 후 실온에 두었다. 접종 8일, 18일후 2회에 걸쳐 시기별로 포식성 능력을 조사하였고, 토양 전체를 Baermann 깔데기법을 이용하여 선충을 분리하고 선충의 밀도는 해부현미경하에서 검경하였다. 각 시험은 5반복으로 처리하였다.

나. 포식성곰팡이 제제의 풋드 검정

포식성곰팡이 Vermiculate-starch formulation(0.25%, 0.5%, 1%, 2%)과 선충 감염토양을 비닐봉지에 같이 넣고 잘 섞은 후 직경 10cm 토분에 넣었다. 토분에 흙을 담은후 물이 흐르지 않을 정도로 관수하고 신문지를 덮어 온실에 10일간 두었다. 10일후 멸균된 모래가 담긴 프러그포트(3×3×5cm)에서 미리 육묘 시켜둔 3-4엽기의 토마토 묘 cv. '서광'을 풋드당 한 포기씩 이식하였다. 대조구로는 선충이 감염된 토양에 제제를 처리하지 않은 "무처리구"와 살선충제 Furadan 혹은 Fosthiazate를 처리한 대비구를 두었다.

각 처리별 선충의 증식정도는 토마토 이식 60일 후에 뿌리에 만들어진 뿌리혹선충의 난낭(eggmass)의 숫자와 토마토의 뿌리와 줄기 무게를 조사하였다. 난낭조사는 토마토 뿌리를 물에 조심스럽게 잘 씻고 0.15% Phloxin B(Sigma) 용액에 담가, 15분간 염색하였으며, 바닥이 흰색인 용기에서 붉게 염색된 난낭의 숫자를 육안으로 조사하였다. 시험은 5반복으로 처리하였다.

포식성곰팡이 제제별 효과 검정은 Pregelatinized Starch Stabilizer formulation, 싸레기제제, 밀제제 등을 이용하였으며, 시험은 위와 유사한 방법으로 풋드시험으로 실시하였다.

다. 포식성곰팡이 제제의 포장 시험

1) 마이크로프룻 시험

시험구는 두께 0.5 cm 합판으로 30 x 40 x 15 cm(좌 x 우 x 깊이)의 나무 박스를 만들고 하우스내 토양에 묻고, 이 박스 안에 뿌리혹선충 유충의 밀도가 토양 100cm³ 당 600 마리인 토양을 넣었다. 포식성곰팡이는 위에서 선발된 *Isolate F4*, *Isolate F5*를 이용하여 Pregelatinized Starch Stabilizer formulation을 만들고 이 제제를 이용하여 시험

하였다. 포식성곰팡이 제제(Pregelatinized Starch Stabilizer formulation)를 토양량의 1.5% (270g/900cm²), 3.0% (540g/900cm²), 포스치아제이트 입제(Fosthiazate 5%)를 0.6g/900cm²(300g a. i./10a)의 비율로 토양 표면에 살포하고 삽으로 토양 깊이 10cm정도로 섞어 주었고 물을 충분히 주었다. 기비는 표준량을 토양과 섞어 정식전에 사용하였고 추비는 수확이 시작된 후(9월 1일) 매주 간격으로 균일하게 사용하였다. 시험구배치는 완전임의배치 5반복으로 하였다.

시험은 고추 cv. '슈퍼탄강'과 오이 cv '슈퍼만촌' 2종의 작물을 이용하였다. 오이는 윤이나(대연육종연구소) 대목에 접목하여 23일 육묘한 cv. 중복삼척(신젠타) 오이를 8월 1일 상자 내에 1포기씩 정식하였다. 관수는 각 상자마다 분수호스(dripper flow=1.49 liter/hour; Netafim Co.)를 이용하여 필요 시기마다 관수하였고 토양 온도는 토양 깊이 10 cm에 온도기록계(Hobo)를 묻어두고 시험기간 동안 30분 간격으로 조사하였다. 오이에 발생하는 병해충을 방제하기 위하여 살균제인 Azoxystrobin+chlorothalonil을 살충제인 thiacloprid 혹은 acetamiprid와 혼용하여 1주일 간격으로 살포하였다.

정식 4주 후인 9월 1일부터 수확이 시작되었고, 그 후 매주 오이를 수확하여 수와 무게를 측정하였다. 오이 수확 즉시 개별 무게를 측정하였고 이들의 총무게를 합산하여 구당 수량으로 환산하였다. 12주인 11월 1일 최종 수확을 하였으며, 수확후 오이 줄기의 길이와 무게를 측정하였다. 뿌리는 조심스럽게 파내서 씻어 무게를 측정하였다. 뿌리속에 있는 뿌리혹선충의 알과 유충은 개량된 sodium-hypochlorite 방법(Barker, 1985)을 사용하여 분리하였다. 그 방법은 먼저 뿌리 전체 무게를 측정한 후 뿌리를 1 cm 길이로 잘게 잘라 잘 섞고, 그 중 10g을 취하여 믹서기에 넣는다. 믹서기에 1% NaOCl 용액 200 ml를 넣고 고속으로 1분간 회전시킨다(Barker, 1985). 믹서된 용액에 들어있는 뿌리 찌꺼기, 알, 유충은 75- μ m 채와 28- μ m-채를 통과시키고 28- μ m 채에 걸린 알과 유충을 해부현미경하에서 관찰하였다. 토양의 선충 밀도 조사는 직경 2.5 cm의 토양채집도구를 이용하여 각 구당 약 1 Kg의 흙을 채집하고, 채집한 흙은 잘 섞어 300cm³를 취한 후 개량된 Baermann법으로 선충을 분리하여 검경하였다(Southey, 1986).

오이 수량 감소 비율에 따른 손실액을 비교하기 위하여 2007년 오이 재배 면적, 시기별 가격, 농산물 소득자료집 등을 기준으로 하여(Seoul Agricultural & Marine Products Corp, 2008) 뿌리혹선충 방제에 소요되는 경영비(농촌진흥청, 2006)와 수량 감소에 따른 손

실액을 산출하였다.

기주 식물 고추 cv. '슈퍼탄강'을 이용한 시험도 위와 유사하였는데, 수확은 6월 18일 시작되어 9월 4일까지 수확하였다. 기타 식물체 조사, 선충 밀도조사, 난랑조사 방법은 오이의 경우와 동일하였다.

2) 포장 시험

포장 시험은 땅콩뿌리혹선충, *M. arenaria* race 2,에 감염된 성주과채류 시험장의 온실 포장(400m²)에서 실시되었다. 시험 포장에는 시험전까지 참외를 재배하여 선충의 밀도가 균일하게 증가된 포장으로 시험구를 2 x 3m(가로 x 세로)로 나누었으며, 각 시험구는 플라스틱(높이 30cm x 깊이 20cm)을 이용하여 칸막이를 하였다. 포식성곰팡이는 위에서 선발된 *Isolate F4*, *Isolate F5*를 이용하여 Pregelatinized Starch Stabilizer formulation을 만들고 이 제제를 이용하여 시험하였다. 제제는 시험구당 2kg/6m²로 하였고 참외 정식 10일전 처리하고 토양과 잘 섞어주었다. 비교를 위하여 Fosthiazate(300 g a.i./10a), Abamectin(180g a.i./10a) 처리와 무처리를 두었고 완전임의배치 3반복으로 하였다. 처리방법은 포식성곰팡이 제제를 토양 표면에 골고루 살포한 후 즉시 쇠스랑으로 긁어서 토양 깊이 10cm정도로 섞어 주었으며, 건조를 막기 위하여 표면에 물을 살포하였다.

참외 재배는 '신토좌호박' 대목(*Cucurbit maxima* x *Cu. moschata*)에 접목하여 40일 육묘한 '금싸라기은천참외'(*Cucumis melo* L. cv. Geumssaragi-euncheon)를 40cm 간격으로 본포에 정식하였으며, 기타 재배관리는 참외 표준재배법에 준하였다.

포장시험에서 각 시험구의 선충 밀도는 제제 처리전, 참외 정식전, 수확후 3회에 걸쳐 조사하였다. 토양 채집 방법은 직경 2.5cm의 토양채집도구를 이용하여 각 구당 14번씩 찔러 흙을 채집하고, 채집한 흙은 잘 섞어 300cm³를 취한 후 깔데기법으로 선충을 분리하여 검정하였다(Southey, 1986). 수확된 참외는 무게를 측정하였고 모든 시험성적은 SAS GLM procedure와 Duncan's Multiple Range Test를 이용하여 분석하였다(SAS, Institute, Cary, NC).

라. 포식성곰팡이 제제의 살충력에 영향을 미치는 생물적·환경적 요인

1) 포장내 뿌리혹선충의 분포도

천적 포식성곰팡이를 실용적으로 포장에 처리하기 위해서는 항상 처리량에 문제가 가된다. 따라서 가장 적절한 양을 토양에 처리하기 위해서는 토양중에 뿌리혹선충이

얼마나 깊은 곳에 몇% 정도가 분포되어있는지에 대한 기초 자료가 필요하다. 이를 위하여, 지난 5년간 참외를 계속하여 재배하여 뿌리혹선충의 밀도가 높은 포장에서 뿌리혹선충의 수직적 분포를 조사하였다.

포장을 깊이 1m x 폭 1m로 파고 수직 단면을 5cm 간격으로 나누어 깊이 70cm 까지 각각 토양을 채집하였다. 각 깊이별로 1kg의 토양을 채집하였으며 1개 포장내에서 3개소를 조사하였다. 채집된 흙은 잘 섞어 300cm³를 취한 후 깔데기법으로 선충을 분리하여 뿌리혹선충의 밀도를 조사하였다(Southey, 1986).

2) 포식성곰팡이 서식지 토양의 환경 요인 분석

포식성곰팡이의 살충력에 미치는 환경적 영향을 평가하기 위하여 포식성곰팡이의 종류와 밀도가 높은 토양과 낮은 토양을 상호 비교분석하였다. 선충은 깔데기법으로 분리하여 해부현미경하에서 동정하였고, 미생물 조사는 dilution plate법으로 하였다. 대상 미생물에 따라 토양 방선균은 glycerol yeast extract agar(GYA: glycerol 5.0ml, yeast extract 2.0ml, K₂HPO₄ 1.0ml, agar 15g, DW 1 L), 세균은 tryptic soy agar(TSA: tryptone 15g, soytone 5g, sodium chloride 5g, agar 15g, DW 1 L), 곰팡이는 rose bengal 0.033g과 streptomycine 30mg/L을 첨가한 sabouraud dextrose agar(SDA: peptone 10g, dextrose 40g, agar 15g, DW 1 L)를 사용하였다. 항생제인 streptomycine은 SDA 배지 살균 후 첨가하였다. 선충잡이곰팡이는 GYA와 1.5% Water agar(WA)등 2종류를 사용하였다(Barron, 1977).

토양 이화학적 분석은 농촌진흥청 토양 및 식물체 분석법(2000)에 따랐으며, 산도는 1:5 토양 침출액을 pH meter(초자전극)로 측정하였고, 유기물함량은 Tyurin법으로, 유효인산은 Lancaster법, 치환성 양이온은 1N-NH₄OAc(pH 7.0)으로 추출하여 원자흡광분석기(Perkin-Elmer, AAS 3300)로 분석하였다. 그리고 토양의 염류농도는 토양 10g에 증류수 50ml을 넣고 1시간 진탕후 여과하여, 여액을 전기전도(E. C.)계로 측정하여 25℃로 온도 보정하였다.

3) 포식성곰팡이 살충력 제고를 위한 토양 환경 조절

포식성곰팡이의 효율 개선을 위하여 포식성곰팡이 2종을 이용하여 Pregelatinized Starch Stabilizer formulation을 만들고, 이 제제 2%를 선충 감염토양과 같이 비닐봉지에 넣고 잘 섞은 후 직경 10cm 토분에 넣었다. 토분에 흙을 담은후 물이 흐르

지 않을 정도로 관수하고 신문지를 덮어 온실에 10일간 두었다. 10일후 멸균된 모래가 담긴 프러그포트(3×3×5cm)에서 미리 육묘 시켜둔 3-4엽기의 토마토 묘 cv. '서광'을 콧드당한 포기씩 이식하였다. 산소 처리구를 2가지로 나누었는데, 1번 처리는 토분 아래 배수구 부분에 실리콘튜브를 설치하고 이 튜브를 열대어 어항에 사용하는 공기펌프에 연결하여 지속적으로 공기를 공급하였고(0.5 L/vvm), 2번 처리는 CaO₂ 2%(W/W)를 토양과 혼합 처리하였다. 부식성선충 접종구는 미리 배양시켜둔 부식성선충을 콧드양 50,000마리 접종하여 포식성곰팡이의 활착을 유도하였다. 각 처리는 5반복으로 실시하였다.

2차 시험에서는 포식성곰팡이 2종을 이용하여 Pregelatinized Starch Stabilizer formulation을 만들고, 이 제제 2%를 선충 감염토양과 같이 비닐봉지에 넣고 잘 섞은 후 직경 10cm 토분에 넣었다. 토분에 흙을 담은후 물이 흐르지 않을 정도로 관수하고 신문지를 덮어 온실에 10일간 두었다. 10일후 멸균된 모래가 담긴 프러그포트(3×3×5cm)에서 미리 육묘 시켜둔 3-4엽기의 토마토 묘 cv. '서광'을 콧드당한 포기씩 이식하였다. CO₂ 처리구는 토분 아래 배수구 부분에 실리콘튜브를 장치하여 1% 농도의 이산화탄소를 공급하였고 O₂ 처리구는 토분 아래 배수구 부분에 실리콘튜브를 설치하고 이 튜브를 열대어 어항에 사용하는 공기펌프에 연결하여 지속적으로 공기를 공급하였다(0.5 L/vvm). 대조구로는 선충이 감염된 토양에 제제를 처리하지 않은 "무처리구"와 살선충제 Fosthiazate(300g a.i./10a)를 처리한 대비구를 두었고 각 5반복으로 실험하였다.

각 처리별 선충의 증식정도는 토마토 이식 60일 후에 뿌리에 만들어진 뿌리혹선충의 난낭(eggmass)의 숫자와 토마토의 뿌리와 줄기 무게를 조사하였다. 난낭조사는 토마토 뿌리를 물에 조심스럽게 잘 씻고 0.15% Phloxin B(Sigma) 용액에 담가, 15분간 염색하였으며, 바닥이 흰색인 용기에서 붉게 염색된 난낭의 숫자를 육안으로 조사하였다.

2절 연구 내용 및 결과

1. 선충 포식성곰팡이 분리 및 균주 선발

가. 선충 포식성곰팡이 분리 및 동정

1) 배지 종류별 포식성곰팡이 분리효율 비교.

끈끈이그물을 형성하는 포식성곰팡이는 cornmeal agar 배지에서 1/2CMA나 Water agar에 비하여 2배 정도 더 많은 포식성곰팡이가 분리되었다. 분리 배지에 따라 분리되는 포식성곰팡이의 종류가 달랐는데, Water agar나 1/2CMA에서는 *Cystopage* sp., *Monacrosporium* sp. 등이 주로 발견되고, CMA에서는 *A. oligospora*, *A. conoides*, *A. dactyloides* 등이 주로 발견되었다(Table 2, Fig. 6). 이것은 배지의 양분 함유량에 따른 차이로 생각되며 배지내 양분이 상대적으로 많은 CMA에서는 *Arthrobotrys* 종류가 빠르게 성장함으로서 상대적으로 천천히 자라는 *Cystopage*류와 *Monacrosporium*류의 발견을 어렵게 만든 것이 아닌가한다(Table 2, 3). *Cystopage*류는 대부분 초기에 발생하였다가 끈끈이그물을 만드는 포식성곰팡이(*Arthrobotrys* spp., *Monacrosporium* spp.)가 번성하는 15일 이후부터는 사라지며, 배지에서만 관찰이 가능하고 인공배양은 되지 않았다(Fig. 5).

배지 선발 및 항생제 첨가 시험에서는 2지역의 토양을 사용하였는데, 지역별로 포식성곰팡이의 분리율에는 차이가 없었다(40% vs. 43%). 3종의 배지를 사용하여 시험한 결과 배지별 포식성곰팡이의 검출율은 Milk agar : Reynold's Medium : CMA = 54% : 84% : 53%로 Reynold's Medium에서의 검출율이 가장 높았다.

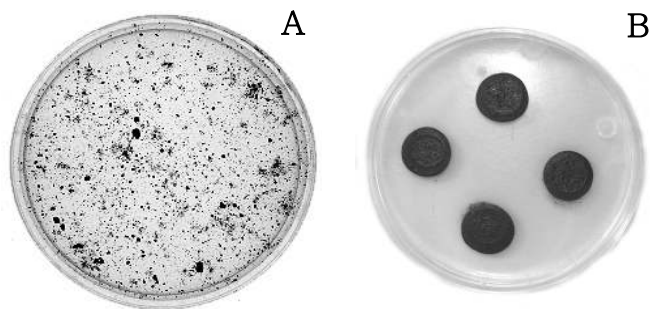


Fig. 4. Isolation method for predatory fungi from soil. A: Soil was sprinkled in a Petri dish, B: Diluted soil placed at four point in a Petri dish.

Table 2. Isolation of predatory fungi using two different media in two strength^a.

Soil ^b	Cornmeal agar		1/2 CMA		Water agar		1/2 WA	
	Network ^c	<i>Cystopage</i>	Network	<i>Cystopage</i>	Network	<i>Cystopage</i>	Network	<i>Cystopage</i>
A	44%	0%	15%	20%	6%	13%	10%	25%
B	56%	25%	25%	58%	25%	38%	8%	33%
Avg.	50%	13%	20%	39%	16%	25%	9%	29%

^a20g soil was mixed with 20ml of distilled water and four drops of 0.2ml soil mixtures were dropped on a d-15cm Petri dish in four equally spaced locations.

^bSoil A: Greenhouse soil from Seongju, B: Greenhouse soil from Goryung.

^cNetworks = network forming predatory fungi such as *Arthrobotrys* spp. or *Monacrosporium* spp.

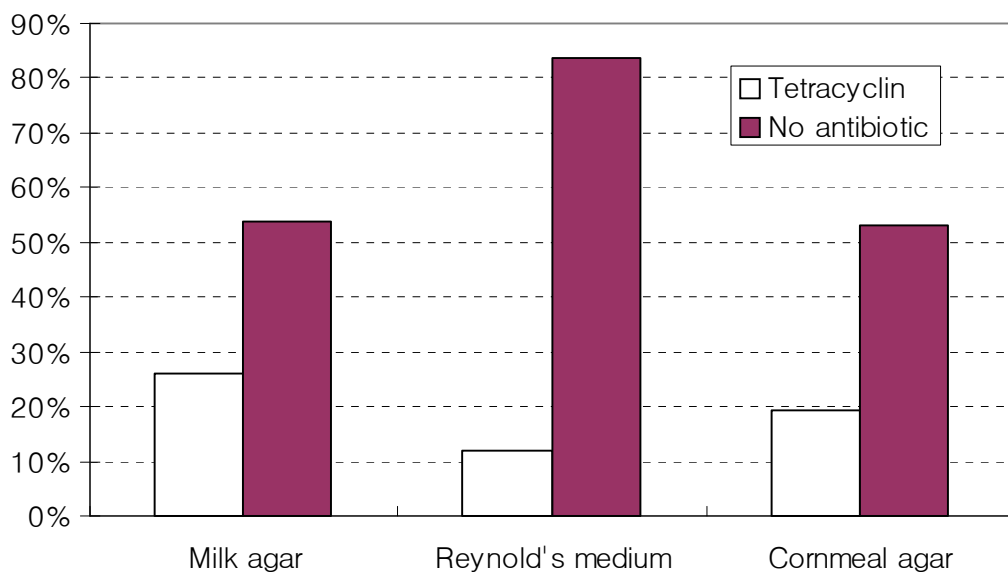


Fig. 7. Isolation of predatory fungi using three different media with or without antibiotics.

Table 3. Effects of addition of *Rhabditis* sp. as a baits for isolation of predatory fungi.

Plating method	Baits	Rate of detection	First detected in day	No. of species isolated	Isolated species
Sprinkle	+	100%	6	5	<i>Cystopage</i> sp., <i>Monacrosporium thaumasium</i> , 3 species of <i>Monacrosporium</i> sp.
	-	50%	12	3	<i>Cystopage</i> sp., <i>Arthrobotrys oligospora</i> , <i>Monacrosporium thaumasium</i>
Dilution	+	100%	6	6	<i>Cystopage</i> sp., <i>Arthrobotrys conooides</i> , <i>Arthrobotrys dactyloides</i> , <i>Arthrobotrys oligospora</i> , <i>Monacrosporium thaumasium</i> , <i>Monacrosporium</i> sp.
	-	33%	12	3	<i>Cystopage</i> sp., <i>Arthrobotrys dactyloides</i> , <i>Monacrosporium</i> sp.

^aSprinkle: Ca. 50mg of soil was sprinkled on a d-15cm Petri dish, Dilution: 20g soil was mixed with 20ml of distilled water and four drops of 0.2ml soil mixtures were dropped on a d-15cm Petri dish in four equally spaced locations.

^bAbout 50 *Rhabditis* sp. in 0.2ml water were inoculated in the center of a Petri dish.

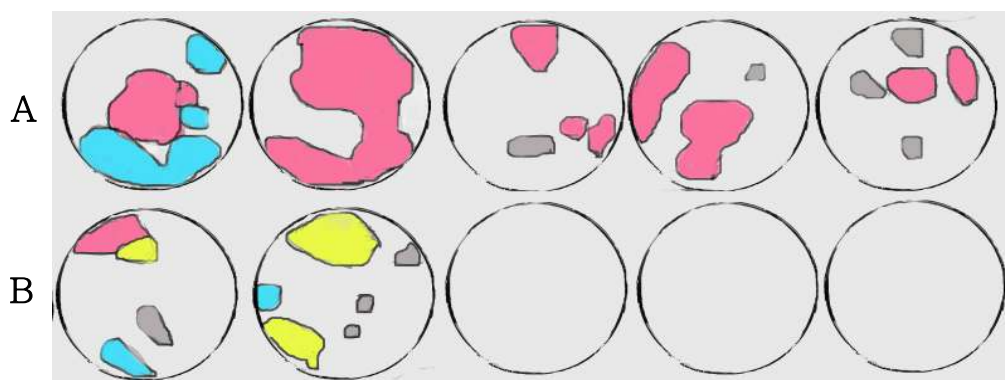


Fig. 8. Isolation pattern and number of species of predatory fungi isolated. A. Nematode added and predatory fungi appeared at 6th days after plating, B. Nematode not added and predatory fungi appeared at 12th days after plating. Pink = *Arthrobotrys oligospora*, Yellow = *A. conooides*, Blue = *Monacrosporium* sp., Grey = unidentified predatory fungi.

항생제 첨가 배지와 무첨가 배지 비교에서는 항생제를 첨가하지 않은 Petri dish에서 3배 많은 선충 포식성곰팡이가 분리되었다(19% vs. 64%) (Fig. 7). 이것은 항생제로 인하여 배지내 세균의 번식이 억제되었고 따라서 이 세균을 먹이로 하는 부식성선충의 발생이 억제되었으며 결과적으로 이러한 선충을 먹이로 하는 포식성곰팡이의 검출율도 동시에 떨어진 것으로 보인다. 이러한 결과는 배지내 혹은 토양내의 세균 번식이 부식성선충과 포식성곰팡이의 밀도 및 발생과 밀접한 연관성이 있다는 것을 알 수 있다.

Linford(1937)는 신선유기물을 토양에 공급하면 식물기생성선충의 밀도가 줄어든다고 보고하였는데, 원인으로 신선유기물을 토양에 공급하면 먼저 세균이 번식하게 되고, 다음으로 세균을 먹이로 하는 부식성선충이 번식하며, 다음으로 부식성선충을 먹이로 하는 천적인 포식성곰팡이가 발생하게 되며, 이 포식성곰팡이는 부식성선충과 식물기생성선충을 구분하지 않고 모두 포식함으로써 자연적으로 식물기생성선충의 밀도도 줄어든다고 설명하였다. 국내 포장 관찰에서도 일반적으로 뿌리혹선충의 밀도가 높은 포장에서는 부식성선충의 밀도가 낮고, 반대로 부식성선충의 밀도가 높은 토양에서는 뿌리혹선충의 밀도가 낮은 경향이였다(Kim, Person. comm.). 이 연구 결과로 보면, 토양으로부터 포식성곰팡이를 분리할 때에는 항생제를 첨가하지 않은 Reynold's Medium을 사용하는 것이 가장 효율이 높을 것으로 생각된다.

2) 포식성곰팡이 분리시 부식성선충 첨가 효과.

선충을 첨가한 Petri dish에서는 접종 약 6일후부터 포식성곰팡이 관찰 가능하였고, 부식성선충을 접종하지 않은 Petri dish에서는 12일후 포식성곰팡이가 처음 발견되었다(Table 3). 이러한 결과는 포식성곰팡이를 분리할 때 부식성선충을 동시에 접종함으로써 약 6일 빠르게 또 더 많은 포식성곰팡이를 분리할 수 있었다(Fig. 8). 부식성선충을 접종하지 않은 Petri dish에서 포식성곰팡이의 분리 시기가 늦어진 이유는, 배지에 토양을 배치하였을 때 배지내에서 부식성선충이 먼저 번식되고 그 이후 이 번식된 부식성선충을 포식한 포식성곰팡이가 검출되기 때문에 늦어지는 것이라 생각된다.

6일 빠르게(2배 빠르게) 포식성곰팡이가 분리된다는 사실은 매우 중요한 결과를 가져오는데, 1) 포식성곰팡이 분리시 사용되는 토양의 양을 평소보다 1/3 이상 적게 사용하여도 분리가 가능하다, 2) 토양을 적게 사용함으로써 포식성곰팡이 분리시 방해되는 요소인 뿌리응애나 애지렁이의 발생을 최소화 할 수 있다, 3) 토양의 양을 적게 사용함으로써 빠르

게 번식하는 우점종인 *A. oligospora* 등의 발생을 억제하여 신종 및 미기록 포식성곰팡이의 분리가 가능해진다.

3) 토양 희석에 의한 포식성곰팡이 밀도 산출.

토양내 포식성곰팡이의 밀도를 정확하게 측정하기 위한 토양 희석 농도별 포식성곰팡이 분리 효율 시험 결과는 토양 4mg 사용시 검출율이 4%였고, 토양의 양이 증가할수록 검출율이 증가하여 토양 10mg에서 가장 높은 25%의 검출율을 나타내었고 10mg 이상에서는 더 이상 검출율이 높아지지 않았다(Fig. 9). 따라서 토양 10mg 정도를 이용하면 가장 적은 양의 토양으로 포식성곰팡이의 밀도를 검정할 수 있을 것이다. 이 방법을 기준으로 한다면 서로 다른 토양에서의 포식성곰팡이의 밀도에 대한 상호 비교가 가능할 것이며 실제 토양에서의 포식성곰팡이 생물적방제 시험에서 생물적방제 제제별, 토양내 처리 방법별, 처리 온도별, 처리 기간별 포식성곰팡이의 밀도 변화를 정확하게 추정할 수 있을 것이다.

4) 살선충제에 의한 배지내 발생하는 토양 미생물 억제.

토양으로부터 포식성곰팡이를 분리할 때, 특히 자라는 속도가 느린 포식성곰팡이를 분리하기 위해서는 15일-30일간 지속적으로 관찰할 필요가 있다. 이때 포식성곰팡이의 분리를 방제하는 가장 큰 요소의 하나는 배지내에 발생하는 뿌리응애와 애지렁이이다. 뿌리응애와 애지렁이는 배지내 활동이 매우 왕성하여 일단 발생하면 더 이상 포식성곰팡이의 분리는 불가능하게 된다. 이번 실험에서 diflubenzuron, dimethoate, acequinocyl, thiacloprid 등은 기준량의 2배를 처리하여도 뿌리응애와 애지렁이 억제에 전혀 효과가 없는 살충제였고, spiroadiclofen, thiamethoxam은 2배량 처리에서 뿌리응애 방제에 약간의 효과를 보였으나 애지렁이에는 전혀 억제 효과가 없었다(미발표). Abamectin은 기준량에서 뿌리응애와 애지렁이를 억제하였으나 동시에 부식성선충도 억제하였다. tebufenpyrad는 60ppm에서 응애와 애지렁이를 모두 억제하였으며 20ppm에서는 뿌리응애의 발육을 억제하였다(Table 4). 낮은 농도에서도 가장 억제 효과가 높은 살충제는 dichlorvos였다. 그러나 2-5ppm의 낮은 농도에서는 뿌리응애 억제효과는 떨어지나 여전히 애지렁이 억제효과는 있었으며 10ppm에서는 선충까지 억제되었다(Table 4). 분리 토양중에서 뿌리응애나 애지렁이의 발생이 예상된다면 dichlorvos 2ppm과 tebufenpyrad 20ppm을 혼합하여 사용한다면 뿌리응애와 애지렁이 발생을 억제하면서 장기간 배지 관찰이 가능할 것이다.

이번에 개선된 포식성곰팡이 분리 방법은 잘 섞은 토양 20g에 증류수 380ml을 첨가하여 교반기에서 1분간 잘 섞은 다음 피펫으로 그중 0.2ml을 취하여(실지 토양 10mg) 항생제를 첨가하지 않은 Reynold's medium위에 균일한 간격으로 0.2ml씩 두고 그 중앙에 포식성선충을 인공적으로 접종하는 것이다. 그 결과 일반적인 방법보다 2배정도 빠른 6일 만에 포식성곰팡이를 분리할 수 있었으며, 또한 상대적으로 적은 양의 토양이 사용됨으로서 빠르게 성장하는 포식성곰팡이의 출현을 줄이고 뿌리응애나 애지렁이의 발생도 줄일 수 있었다. 결과적으로 자라는 속도가 느린 *A. dactyloides*, *A. robusta*, *A. vermicola* 등의 다양한 포식성곰팡이의 출현율이 높아졌다. 만약 분리 토양중에서 뿌리응애나 애지렁이의 발생이 예상되면 dichlorvos 2ppm, tebufenpyrad 20ppm을 사용할 수 있다.

이러한 방법을 이용한 결과, 국내 미기록 포식성곰팡이 2종, *Arthrotrrys amerospora*(김 등, 2006), *Dactylella pseudoclavata*(김 등, 2007) 과 신종 1종, *Monacrosporium ullum* n. sp.(김 등, 2006)을 발견할 수 있었으며 각각 미기록종 및 신종으로 각각 학회 보고하였다.

Table 4. Effects of pesticides in predatory fungi isolation media to inhibit *Rhizoglyphus* sp. and Enchytraeid without inhibition of *Rhabditis* sp.

Pesticides	ppm in media	Numbers in a Petri dish			Influence to predatory fungi
		<i>Rhizoglyphus</i> sp.	Enchytraeid	<i>Rhabditis</i> sp.	
	5	720	17	42	- ^a
Tebufenpyrad	10	342	36	42	-
	20	228	26	36	-
	2	222	23	102	-
Dichlorvos	5	652	14	96	-
	10	660	4	0	-

^a- : Not influenced.

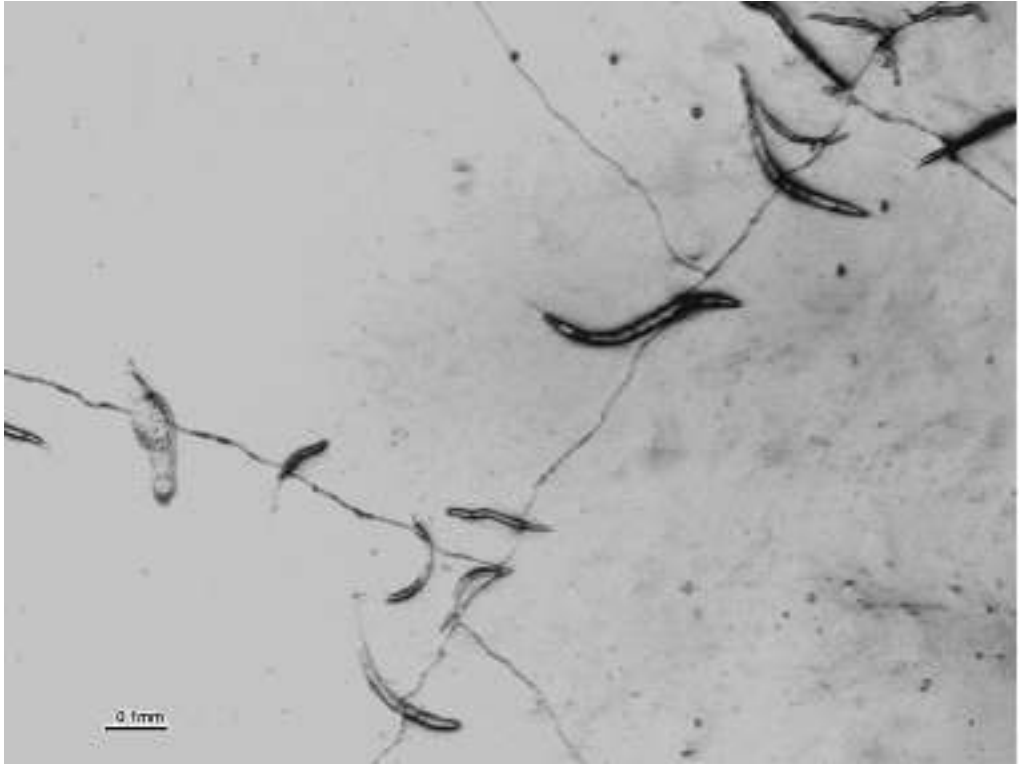


Fig. 5. Nematodes captured on sticky hyphae of *Cystopage* spp.



Fig. 6. Predatory fungi isolated from soil. A: network, B: sticky knob.

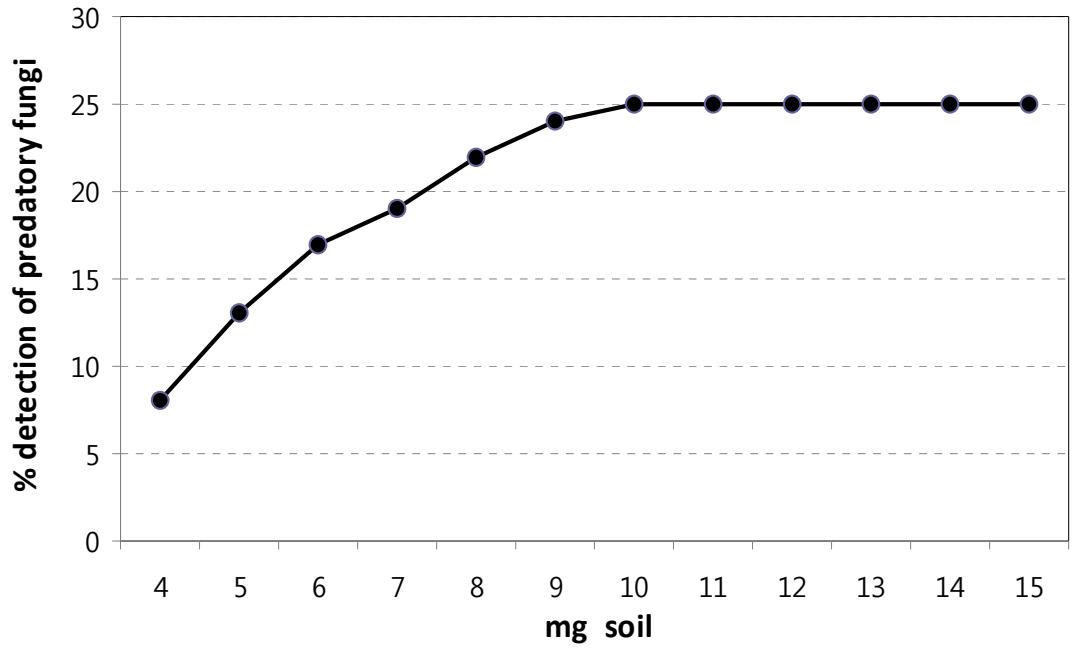


Fig. 9. Evaluation of predatory fungi population density in soil using dilution plating methods. Diluted soil in each of 0.2ml was dropped on a d-15cm Petri dish in four equally spaced locations.

5) 포식성곰팡이 분류 및 동정

신종보고 *Monacrosporium ullum* sp. nov. Fig. 10, 11, 12.

이 종은 경상북도 울릉군에서 발견되었는데, 끈끈이봉을 이용하여 선충을 잡으며 포자는 방추형이고 포자 크기는 $26.5 \mu\text{m} \times 8.1 \mu\text{m}$ 이다. 포자에는 1-4개의 격막이 있다(격막 2개=47%).

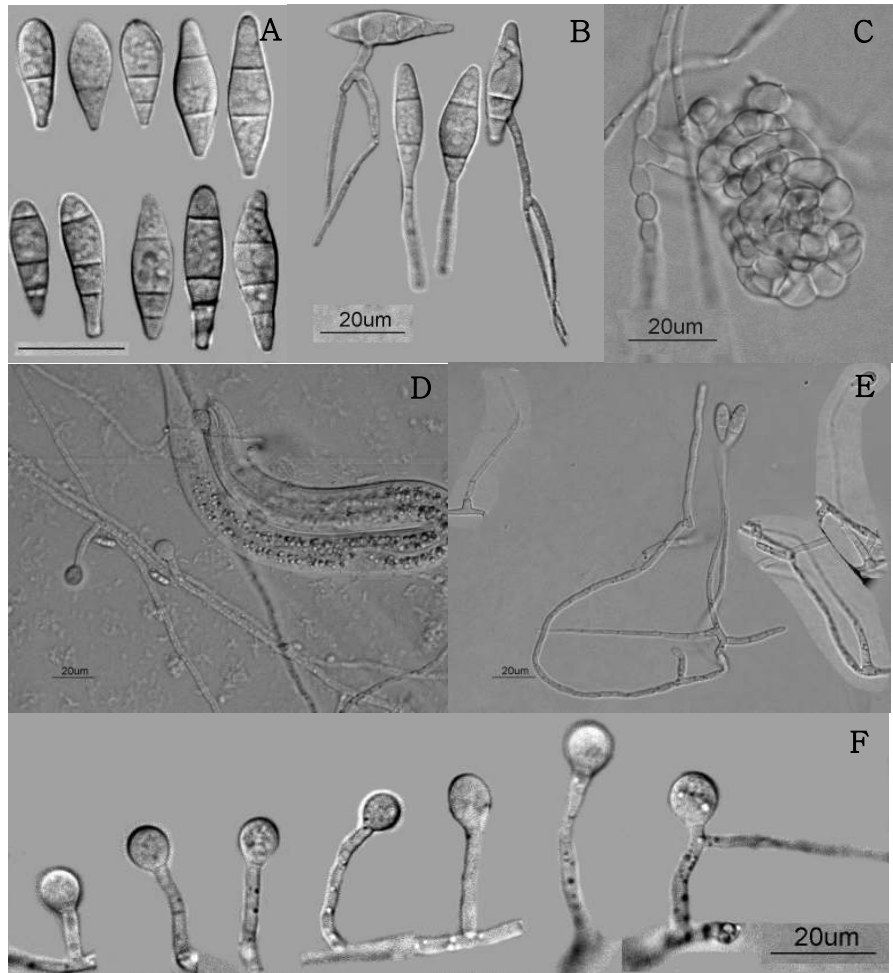


Fig. 10. *Monacrosporium ullum* sp. nov. A. Conidia. B. Germinating conidia. C. Chlamydospore. D. Captured nematode on adhesive knob. E. Conidiophores. F. Adhesive knobs.

```

TCGGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT/CCAATCATGTCTCCAGCCGAAAGGTTGGTGCAGGCGCCTTAACCCTTTG
18S rDNA/ITS I
TGAACCAAAAAACCTTTTCGCTTCGGCAGCAGCTCGGTTGGCAACAGCCTCTGCGTCAGCCTGCCGGTAGCACCAATCATC
AAAACTTGAGTTAATAACATTGTCTGATTACCAAATTTTGAATGAAAATC/AAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGTT
5.8S
CCCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAACGCGATAGTTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACG
CACATTGCGCCATTGGTATTCCATTGGGCATGTCTGTTTGAGCGTC/ATTACAACCTCGGTACCACCGGTTTTGAGCA
ITS II
AGCGAGGTCTCCGGACCCGGCTGGCTTTAAAGTTGTAAGCTCTGCTGGCTGCCAGGCCAACAGAACATAGTAAATCA
TGCTTGTTCACGGTTTTCGGTTCGAAGCGGTACGGCTGAACAATACCTACCACCTTTAGTT/TGACCTCAGATCAGACA
28S rDNA
AGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

```

Fig. 11. DNA sequence of *Monacrosporium ullum* Inter Transcribed Spacer I II and 5.8S rDNA.

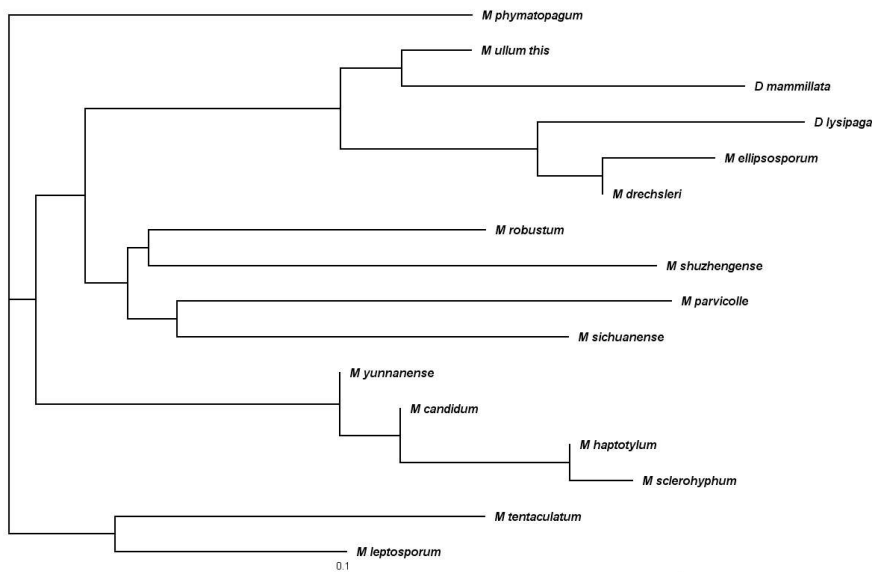


Fig. 12 The phylogenetic tree based on nuclear ribosomal DNA ITS and 5.8S region of *Monacrosporium* by Neighbor-Joining method.

국내 미기록종 *Arthrotrrys amerospora* Schenck et al. Fig. 13, Table 5.

이 곰팡이는 1976년 Schenck et al. (1976)가 최초로 보고하였다. 포자는 길이가 15-31 (23.6) μm , 폭이 10-20 (15.9) μm 로 둥글며 격막이 없는 것이 특징이다. 끈끈이그물로 선충을 잡는다.

Table 5. Comparisons of *Arthrotrrys amerospora* isolates from Korea with the original description (Schenck et al., 1976).

Characters		Korean isolate (μm)	Original description (μm)
Conidium	length	23.3 (20-27)	23.6 (15-31)
	width	14.1 (11-17)	15.9 (10-20)
	septum	0	0
Conidiophore length		362.8 (311-418)	75-250
Chlamydo spores		15-72 x 10-20	18-50 x 18-23

국내 미기록종 *Dactylella pseudoclavata* Miao et al. Fig. 14, Table 6

이 곰팡이는 2003년 중국에서 처음 발견되었다(Miao et al., 2003). 포자는 길이가 30-40 μm , 폭이 8-11 μm 로 길쭉하며 격막은 0-1개이고 포자 끝 모양이 병의 목 모양인 것이 특징이다. 끈끈이그물로 선충을 잡으며 또한 매우 많은 수의 Chlamydo spore(30-35 x 25-30 μm)를 만든다.

Table 6. Comparisons of *Dactylella pseudoclavata* isolates from Korea with the original description (Miao et al., 2003).

Characters		Korean isolate (μm)	Original description (μm)
Conidia	length	35.3 (23-58)	30-45
	width	13.3 (10-16)	8-11
Conidiophore length		318.4 (180-465)	150-300
		7.4 (6.1-8.5)	6-7.5
Chlamydo spores		27.0 (23-29)	30-35 x 25-30

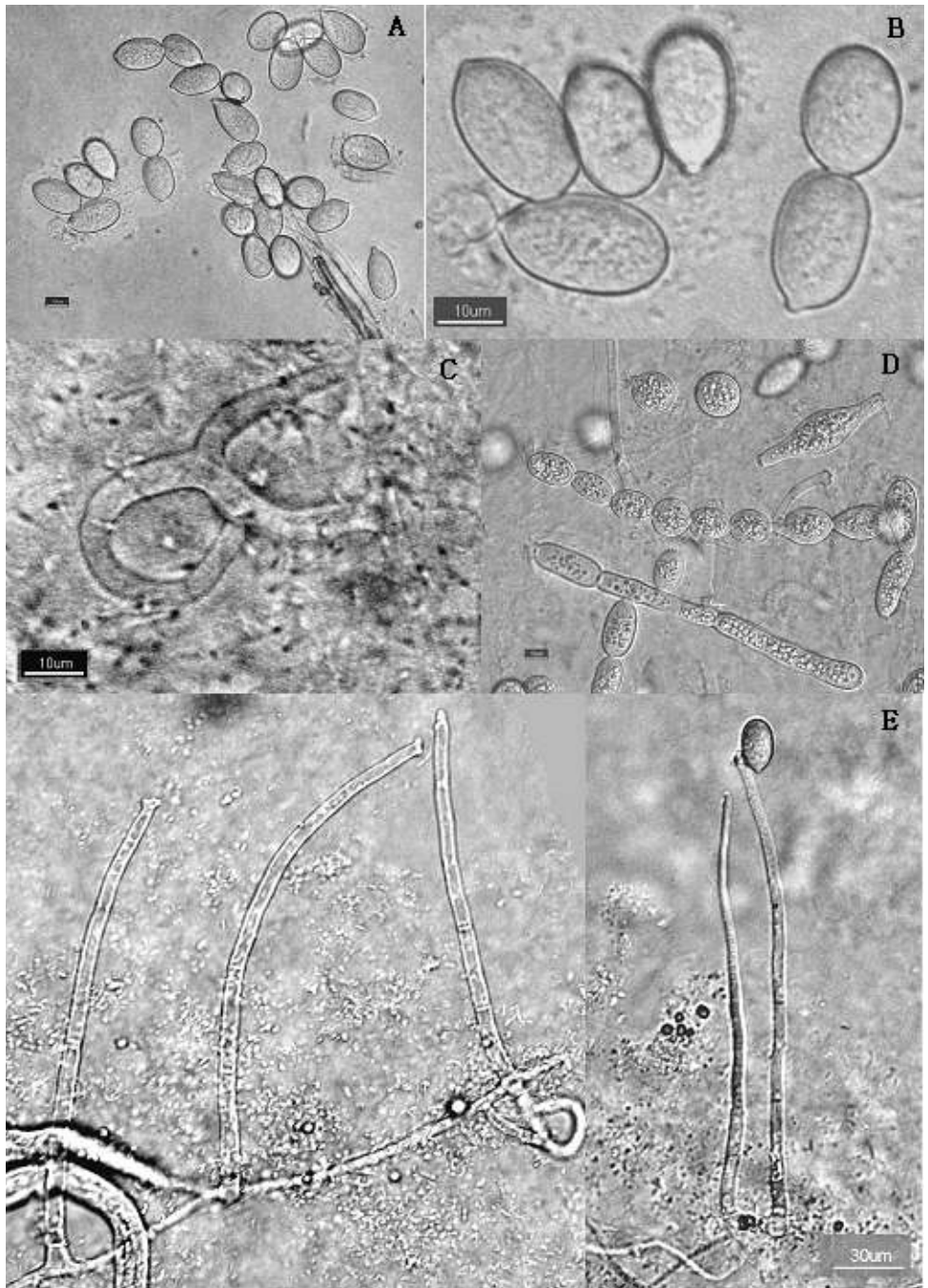


Fig. 13. *Arthrobotrys amerospora*. A–B. Conidia. C. adhesive network. D. Chlamydospores. E. Conidiophore.

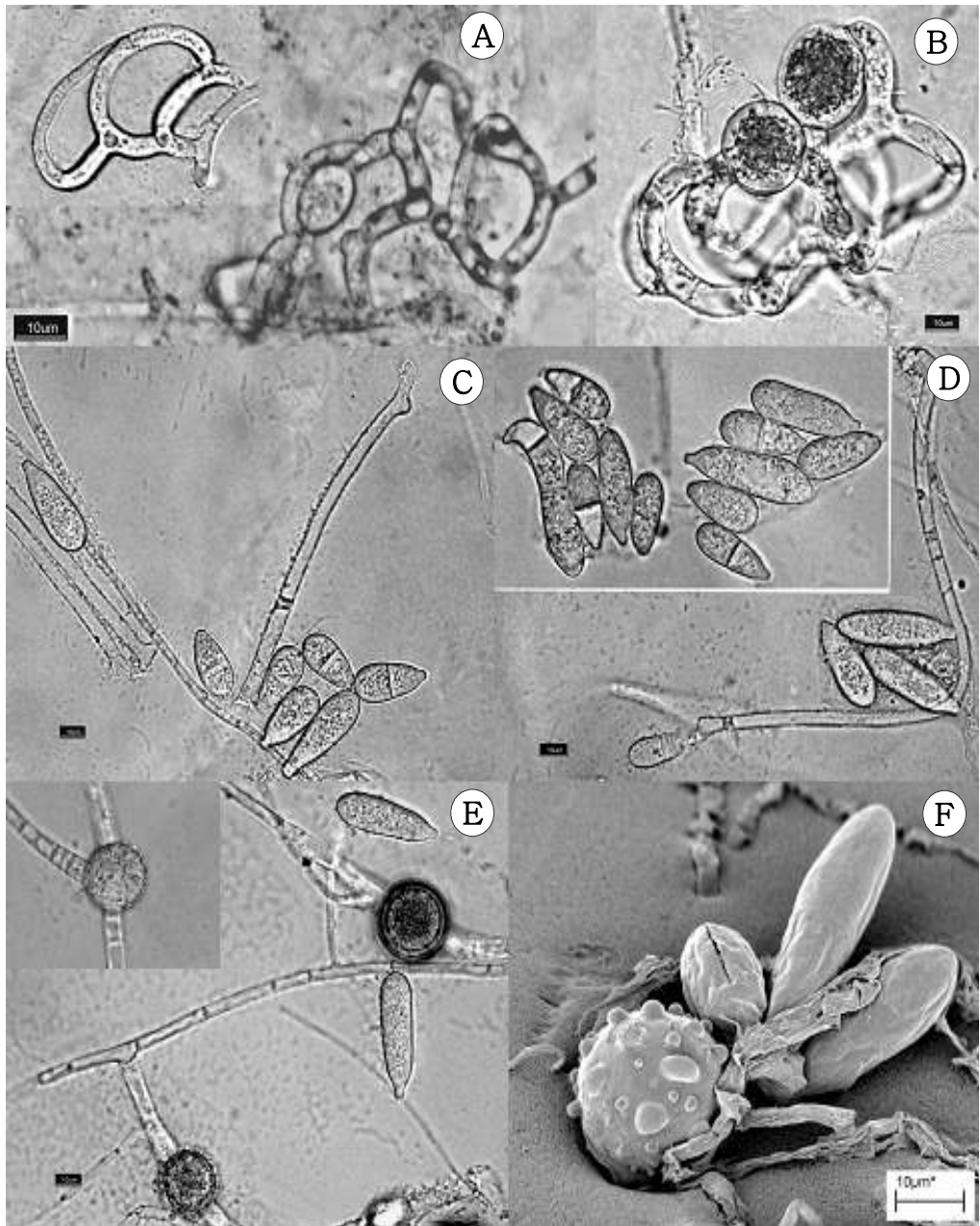


Fig. 14. *Dactylella pseudoclavata*. A. Adhesive network, B. Chlamydospores formed on adhesive network, C–D. Bottle-neck shaped conidia and short conidiophores, E. Chlamydospores. F. Scanning electron micrograph of chlamydospore and conidia. (Bar represents 10 μm).

나. 선충 포식성곰팡이 선발

어떤 천적을 선정할 것인가 하는 문제는 생물적방제에서 있어서 가장 중요한 과제이다. 선충의 생물적방제에 있어서도 지금까지 많은 천적곰팡이들이 선정되고 시험되었으나, 아직까지 뚜렷하게 우수한 천적은 없다. 일반적으로 토양중에는 공기 중에서와 달리 산소의 농도는 낮고 이산화탄소의 농도는 높아진다. 이번 과제에서는 기존의 선발 방법과 방법을 달리하여 선발하고자 하였다. 그 방법은 1) 이산화탄소의 농도가 토양 상태와 비슷한 상황에서 포식성이 높은 포식성곰팡이 선발, 2) 토양 세균의 존재 하에서도 포식성이 높은 포식성곰팡이 선발, 3) 실지 온실 재배환경과 유사한 고온 및 저온 하에서 활성이 높은 포식성곰팡이 선발 등이다.

이러한 고이산화탄소 농도 적응성, 세균 적응성, 저온적응성, 고온적응성 포식성곰팡이를 선발하고자 시험을 실시한 결과, 포식성곰팡이 분리 균주들은 세균이 존재할 때, 저온 혹은 고온, CO₂ 농도에 따라 포식능력, 균사의 생장 및 포자 발생 정도가 다르게 나타나고 있다. 이러한 사실을 염두에 두고 산소가 적은 상태에서 세균과 무관하게 또 저온이나 고온에서 포식성이 뛰어난 포식성곰팡이 균주를 선발하였다.

1) 포식성곰팡이의 산소농도에 따른 반응성

지금까지 대부분의 포식성곰팡이 균주 선발이 산소나 이산화탄소의 농도 조절과 무관하게 실내에서 선발되었으므로 실지 토양내 이산화탄소 농도가 높고 산소농도가 낮은 상태에서 선충 포식능력이 다르게 나타날 수 있다. 산소의 양을 0%, 10%, 21%로 조절하여 포식성곰팡이의 종류별로 균사생장, 포자 발생량, 선충 포식성을 조사한 결과, 포식성곰팡이 종류에 따라서 그 반응이 다르게 나타남을 알 수가 있었다. 일반적으로 산소의 농도가 낮을 때 균사의 생육은 영향이 적었으나 포자의 발생량 및 선충 포식능력은 저하되는 경향이었다(Table 7).

그중에서 *A. conoides* #3-5, *A. vermicola* 등은 산소가 적은 상태에서도 포자의 발생량이 가장 많은 종이었고 *Dactylella pseudoclavata* 는 산소가 적은 상황에서도 포식능력에 차이를 보이지 않는 종이였다.

2) 포식성곰팡이의 온도에 대한 반응성

성주 참외재배 지역의 작형을 보면, 10월경에 포장을 마련하여 12월경에 참외를 정식하게 된다. 그러므로 참외 뿌리혹선충 방제를 위한 포식성곰팡이 제제의 처리시

기는 포장 준비 후부터 참외 정식전인 10월에서 12월 사이가 선충 천적 제제의 최적 처리 시기가 될 것이다. 그러나 이때의 토양온도는 대부분 15도 이하로 유지되는 시기임으로 포식성곰팡이 선발시 저온적응성 균주를 선발해야한다. 또한 뿌리혹선충의 증식이 가장 활발하게 이루어지고 피해가 가장 많이 나타나는 5-7월경에는 참외 하우스의 온도가 낮에는 40도 이상까지 올라가게 된다. 이러한 고온기에는 토양의 온도도 높게 유지됨으로 이러한 고온에서도 뿌리혹선충을 포식할 수 있는 고온성 포식성곰팡이도 필요하다.

배양 온도를 5℃와 30℃로 하였을 때, 포식성곰팡이의 균주별로 그 반응이 다르게 나타났다. 일반적으로 저온보다 고온에서 생육이 약하거나 정지되는 균이 많았는데, 그중에서 *A. conoides* #3-4, *Dactylella pseudoclavata*, *Monacrosporium thaumasium* #10-1은 저온 혹은 고온 모두에서 성장이 양호한 균주였다(Table 8).

3) 포식성곰팡이의 세균에 대한 반응성

또한 포식성곰팡이들은 토양내에서 항상 세균과 접촉하고 있으며 세균이 발생하는 물질에 의한 fungistasis를 받고 있다(Dobbs and Hinson, 1953; Mankau, 1962). 그러므로 토양 세균에 대한 저항성, 즉 세균의 존재 하에서도 균사 성장 및 포식능력이 높은 포식성곰팡이가 유리하다.

Pseudomonas sp. 세균과 동시에 접종하여 포식성곰팡이들의 포식능력을 측정 한 결과, 세균이 존재할 때에는 포식성곰팡이의 포식능력이 매우 급격하게 저하되는 것을 알 수가 있다. 따라서 토양의 세균이 포식성곰팡이의 활성화에 미치는 영향이 막대하다는 것을 알 수 있으며, 이러한 토양 세균과 포식성곰팡이 간의 관계를 밝히는 것이 앞으로 선충 천적방제에 있어서 매우 중요한 과제가 될 것이다.

그중에서 *A. conoides*, *A. musiformis*, *A. oligospora*, *A. vermicola*, *M. thaumasium*에 속하는 몇몇 균주들은 다른 종에 비하여 세균에 대한 저항성이 비교적 강한 것으로 나타났다(Table 9). 그러나 토양중에는 수많은 세균들이 서식하고 있음으로, 유기물을 첨가하였을 때, 키토산 등 특수 자재를 토양에 첨가하였을 때 등 각 각의 처리 방법에 따라 발생하는 토양 세균의 종류와 밀도, 그리고 이들이 토양에 처리된 포식성곰팡이 제제의 효과에 미치는 영향 등에 대하여 심도 있는 연구가 필요하다. 앞의 시험에서 저 산소, 고온, 저온 적응성이 높았던 *Dactylella pseudoclavata*는 세균에 대한 저항성은 약한 것으로 나타났다.

Table 7. Different responses of predatory fungi to oxygen contents

균주 번호	종명	O ₂ 21%			O ₂ 10%			O ₂ 0%		
		포식율	포자수	균사생육	포식율	포자수	균사생육	포식율	포자수	균사생육
1-1	<i>A. amerospora</i>	77%	0	2	25%	0	2	78%	0	2
1-2	<i>A. amerospora</i>	95%	2	2	88%	0	5	60%	0	2
2-1	<i>A. arthro.</i>	100%	5	5	88%	5	5	82%	0	2
2-2	<i>A. arthro.</i>	43%	0	0	0%	0	2	80%	0	2
3-1	<i>A. conoides</i>	100%	0	5	88%	0	5	55%	0	2
3-2	<i>A. conoides</i>	100%	2	5	98%	2	5	78%	0	2
3-3	<i>A. conoides</i>	100%	5	5	99%	2	5	55%	0	2
3-4	<i>A. conoides</i>	45%	0	0	40%	0	5	78%	0	2
3-5	<i>A. conoides</i>	99%	5	5	93%	5	5	63%	5	2
3-6	<i>A. conoides</i>	100%	0	5	99%	0	5	90%	0	2
3-7	<i>A. conoides</i>	100%	2	5	98%	5	5	78%	0	2
3-8	<i>A. conoides</i>	100%	2	5	99%	5	5	50%	0	2
4-2	<i>A. musiformis</i>	100%	5	5	100%	5	5	60%	0	2
4-3	<i>A. musiformis</i>	100%	5	5	100%	5	5	25%	0	2
4-4	<i>A. musiformis</i>	100%	2	5	70%	0	5	70%	0	2
5-1	<i>A. oligospora</i>	100%	2	5	83%	2	5	50%	0	2
5-2	<i>A. oligospora</i>	100%	2	5	95%	2	5	35%	0	5
5-3	<i>A. oligospora</i>	100%	2	5	65%	2	5	10%	0	2
5-4	<i>A. oligospora</i>	100%	5	5	94%	2	5	97%	0	2
5-5	<i>A. oligospora</i>	100%	2	2	99%	0	5	94%	0	2
6-1	<i>A. robusta</i>	99%	5	2	35%	0	0	0%	0	0
6-2	<i>A. robusta</i>	99%	5	5	100%	5	5	70%	0	0
6-3	<i>A. robusta</i>	95%	0	2	83%	0	2	48%	0	2
7-1	<i>A. vermicola</i>	100%	5	5	100%	5	5	60%	2	2
7-2	<i>A. vermicola</i>	100%	5	5	95%	5	5	80%	5	5
7-3	<i>A. vermicola</i>	100%	5	5	100%	5	5	97%	5	5
8-1	<i>D. pseudo</i>	98%	0	2	99%	0	5	100%	0	5
9-1	<i>M. elipso</i>	95%	0	5	85%	0	2	30%	0	0
9-2	<i>M. elipso</i>	100%	0	5	85%	0	2	55%	0	0
9-3	<i>M. ellipso</i>	77%	0	0	80%	0	2	45%	0	2
9-4	<i>M. ellipso</i>	97%	0	2	50%	0	0	40%	0	0
9-5	<i>M. ellipso</i>	100%	0	2	73%	0	2	0%	0	0
10-1	<i>M. thaumasium</i>	81%	0	5	88%	0	5	65%	0	5
10-2	<i>M. thaumasium</i>	100%	2	5	100%	0	5	90%	0	2
10-3	<i>M. thaumasium</i>	100%	2	5	100%	0	5	86%	0	2
10-4	<i>M. thaumasium</i>	100%	0	5	90%	0	5	30%	0	2

Table 8. Different responses of predatory fungi to temperatures.

Species	Isolates	Growth temperature	
		5°C	30°C
<i>Arthrobotrys amerospora</i>	1-1	++	++++
<i>A. amerospora</i>	1-2	++	++++
<i>A. arthrobotryoides</i>	2-1	+++	+++
<i>A. arthrobotryoides</i>	2-2	++	++++
<i>A. conoides</i>	3-1	+++	+
<i>A. conoides</i>	3-2	+++	+
<i>A. conoides</i>	3-3	+++	+
<i>A. conoides</i>	3-7	+++	+
<i>A. conoides</i>	3-8	+++	+
<i>A. conoides</i>	3-5	+++	+++
<i>A. conoides</i>	3-4	++++	++++
<i>A. conoides</i>	3-6	++++	++
<i>A. musiformis</i>	4-2	+++	+
<i>A. musiformis</i>	4-4	+++	+
<i>A. musiformis</i>	4-3	++++	++
<i>A. oligospora</i>	5-2	+++	+
<i>A. oligospora</i>	5-4	+++	+
<i>A. oligospora</i>	5-1	++++	++
<i>A. oligospora</i>	5-3	++++	++
<i>A. oligospora</i>	5-5	++++	++
<i>A. robusta</i>	6-1	+	+
<i>A. robusta</i>	6-2	++	++
<i>A. robusta</i>	6-3	++	++
<i>A. vermicola</i>	7-3	+++	+
<i>A. vermicola</i>	7-1	++++	++
<i>A. vermicola</i>	7-2	++++	++
<i>Dactylella pseudoclavata</i>	8-1	++++	++++
<i>Monacrosporium elipsosporum</i>	9-1	++	++
<i>M. elipsosporum</i>	9-2	++	++
<i>M. ellipsosporum</i>	9-5	+	+
<i>M. ellipsosporum</i>	9-4	++++	++++
<i>M. ellipsosporum</i>	9-3	++++	++++
<i>M. thaumasium</i>	10-4	+	+++
<i>M. thaumasium</i>	10-3	++	++++
<i>M. thaumasium</i>	10-1	++++	++++
<i>M. thaumasium</i>	10-2	++	++++

Table 9. Different responses of predatory fungi to the presence of *Pseudomonas* sp.

Species	Isolates	Predacity (0-5)		Avg.
		+ bacteria	- bacteria	
<i>Arthrobotrys amerospora</i>	#1-1	2	0	0
<i>A. amerospora</i>	#1-2	2	0	0
<i>A. arthrobotryoides</i>	#2-1	0	5	2
<i>A. arthrobotryoides</i>	#2-3	2	0	0
<i>A. conoides</i>	#3-1	2	5	3
<i>A. conoides</i>	#3-10	2	5	4
<i>A. conoides</i>	#3-3	5	5	5
<i>A. conoides</i>	#3-5	—	2	2
<i>A. conoides</i>	#3-6	2	2	2
<i>A. conoides</i>	#3-7	0	2	2
<i>A. conoides</i>	#3-9	3	0	0
<i>A. musiformis</i>	#4-2	3	5	4
<i>A. musiformis</i>	#4-3	3	2	2
<i>A. musiformis</i>	#4-4	3	5	4
<i>A. oligospora</i>	#5-1	0	5	4
<i>A. oligospora</i>	#5-2	0	5	4
<i>A. oligospora</i>	#5-3	0	5	4
<i>A. oligospora</i>	#5-5	3	2	2
<i>A. oligospora</i>	#5-7	3	2	2
<i>A. oligospora</i>	#5-8	0	5	2
<i>A. robusta</i>	#6-2	0	2	0
<i>A. robusta</i>	#6-3	0	0	0
<i>A. robusta</i>	#6-4	0	2	0
<i>A. robusta</i>	#6-5	0	0	0
<i>A. vermicola</i>	#7-1	3	5	4
<i>A. vermicola</i>	#7-2	3	2	0
<i>A. vermicola</i>	#7-3	3	5	4
<i>Dactylella pseudoclavata</i>	#8-1	0	2	0
<i>Monacrosporium elipsosporum</i>	#9-1	0	5	2
<i>M. elipsosporum</i>	#9-5	0	0	0
<i>M. thaumasium</i>	#10-1	0	0	0
<i>M. thaumasium</i>	#10-2	3	2	2
<i>M. thaumasium</i>	#10-4	2	2	2

Table 10. Responses of predatory fungi to oxygen contents, temperature, and presence of *Pseudomonas* sp.

Species	Isolate	Influenced by		Abundance of conidia	Temperature	
		<i>Pseudomonas</i> sp.	CO ₂		5°C	30°C
<i>A. amerospora</i>	1-1	+	+++	++++	++	++++
<i>A. amerospora</i>	1-2	+	+++	++++	++	++++
<i>A. arthro.</i>	2-1	++++	+++	++	+++	+++
<i>A. arthro.</i>	2-2	+	++	++	++	++++
<i>A. conoides</i>	3-1	++++	+++	++	+++	+
<i>A. conoides</i>	3-2	++	++++	++	+++	+
<i>A. conoides</i>	3-3	++++	++++	++	+++	+
<i>A. conoides</i>	3-7	++++	+++	++++	+++	+
<i>A. conoides</i>	3-8	++++	++++	++++	+++	+
<i>A. conoides</i>	3-5	++	++++	++++	+++	+++
<i>A. conoides</i>	3-4	++	+++	+	++++	++++
<i>A. conoides</i>	3-6	++++	++++	+++	++++	++
<i>A. musiformis</i>	4-2	+	++++	+++	+++	+
<i>A. musiformis</i>	4-4	++++	+++	++++	+++	+
<i>A. musiformis</i>	4-3	++++	+++	+++	++++	++
<i>A. oligospora</i>	5-2	++++	++++	+++	+++	+
<i>A. oligospora</i>	5-4	++++	++++	+++	+++	+
<i>A. oligospora</i>	5-1	++++	+++	+++	++++	++
<i>A. oligospora</i>	5-3	++++	+++	+++	++++	++
<i>A. oligospora</i>	5-5	++++	++++	+++	++++	++
<i>A. robusta</i>	6-1	++++	++	+++	+	+
<i>A. robusta</i>	6-2	++++	+++	++++	++	++
<i>A. robusta</i>	6-3	++++	+++	++++	++	++
<i>A. vermicola</i>	7-3	++++	++++	++++	+++	+
<i>A. vermicola</i>	7-1	++++	++++	++++	++++	++
<i>A. vermicola</i>	7-2	++++	++++	++++	++++	++
<i>D. pseudoclavata</i>	8-1	++	++++	++++	++++	++++
<i>M. elipsosporum</i>	9-1	+	++	+	++	++
<i>M. elipsosporum</i>	9-2	+	+++	+	++	++
<i>M. ellipsosporum</i>	9-5	+	+++	+	+	+
<i>M. ellipsosporum</i>	9-4	+	+	+	++++	++++
<i>M. ellipsosporum</i>	9-3	+	+	+	++++	++++
<i>M. thaumasium</i>	10-4	++++	++++	+	+	+++
<i>M. thaumasium</i>	10-3	++++	+++	+	++	++++
<i>M. thaumasium</i>	10-1	++++	+++	+	++++	++++
<i>M. thaumasium</i>	10-2	++++	+++	+	++	++++

2. 선충 포식성곰팡이 배양 및 제제화

가. 균사 액체배양

포식성곰팡이 균주는 sucrose 등 대부분의 탄소원을 모두 잘 이용할 수 있는 것으로 알려져 있는데(Hayes and Blackburn, 1966; Saxena et al., 1989), 이번 시험에서는 값싼 탄소원을 개발하기 위하여 sucrose를 포함한 glucose, malto dextrin, 요리당 등을 이용하였다. 요리당을 탄소원으로 하여 시험한 결과, 요리당 4.0g/l, yeast extract 1.0g/l 조합에서 균사체 수확량이 높았다(Fig. 15). 균주별로 탄소원에 대한 성장 반응이 다르게 나타났는데, *Arthrobotrys musiformis* isolate #802-1는 malto dextrin에서 가장 잘 자랐으며, *Arthrobotrys oligospora* isolate #5-7은 모든 탄소원을 잘 이용할 수 있었고, *Dactylella pseudoclavata* isolate #8-1은 malto dextrin과 sucrose를 첨가한 배지에서 가장 잘 자랐다. 이상의 결과를 종합하여본 결과, 탄소원으로 Malto dextrin을 이용하는 것이 2배정도 균사의 생산량이 많아 가장 효율적이었다. 탄소원의 양을 기준량인 6.0g/l에서 2배인 12g/l까지 2배로 증가 시켜도 균사의 생산량에는 변화가 없어 탄소원으로는 6.0g/l를 사용하였다.

포식성곰팡이 배양시 질소원의 종류에 따라 건조 균체량에서 큰 차이를 보이는데, 일반적으로 유기질소원을 잘 이용하나 무기질소원은 잘 이용하지 못한다(Hayes and Blackburn, 1966; Saxena et al., 1989). 유기질소원 중에서도 yeast extract, soybean meal는 잘 이용할 수 있으나, corn steep liquor, malt extract, peptone 등은 잘 이용하지 못하는 것으로 알려져 있다. 이번 시험에서는 yeast extract를 기준으로 시험을 실시하였고 값싼 질소원으로 skim milk를 시험하였다. 값싼 질소원을 개발하기 위하여 skim milk를 이용한 결과, 배지 1리터당 Glucose 6.0g/L, Yeast extract 2.4g/L, skim milk 0.6g/L, pH 4.0에서 가장 많은 균체를 수확할 수 있었다(Table 11, 14). 그러나 skim milk가 첨가된 배지는 세균에 쉽게 오염되는 단점이 있었고 이를 피하기 위해서는 항상 pH를 4.0 정도로 낮게 유지 시켜야함으로 사용이 불편하여 앞으로의 시험에서는 제외하였다(Table 12, 13; Fig. 16, 17).

천적곰팡이의 액체배양시 Casamino acid가 첨가되면 액체배양 중에 많은 포자가 생성된다는 보고가 있어, 이번 배양시험 중에 casamino acid를 첨가량을 달리하여 시험을 실시하였다. Casamino acid를 0.5g/L-2.0g/L 첨가가 한 결과, 포식성곰팡이에서는 casamino acid의 첨가에 의한 포자 발생 효과는 없었고 균사의 생장은 yeast extract보다

적었다. 따라서 포식성곰팡이의 액체배양에서는 casamino acid의 첨가효과가 나타나지 않았다(Table 15, 16; Fig. 19, 20).

균성장 중 탄소원과 질소원의 최적비율은 균 성장뿐만 아니라 균에 의해 부산물로서 생산되는 초산, 젖산과 같은 유기산등의 생산을 최소화하여 균체량의 절대 값을 최대가 되는 중요한 요인이다. 이번 시험에서는 값싼 탄소원으로 malto dextrin이 선발되었으며, 가장 경제적이면서 만들기 쉬운 배지 조합은 배지 1리터당 malto dextrin 6.0g, yeast extract 3.0g이었고 이 조합에서의 균사 생산량은 1.7g/리터였다.

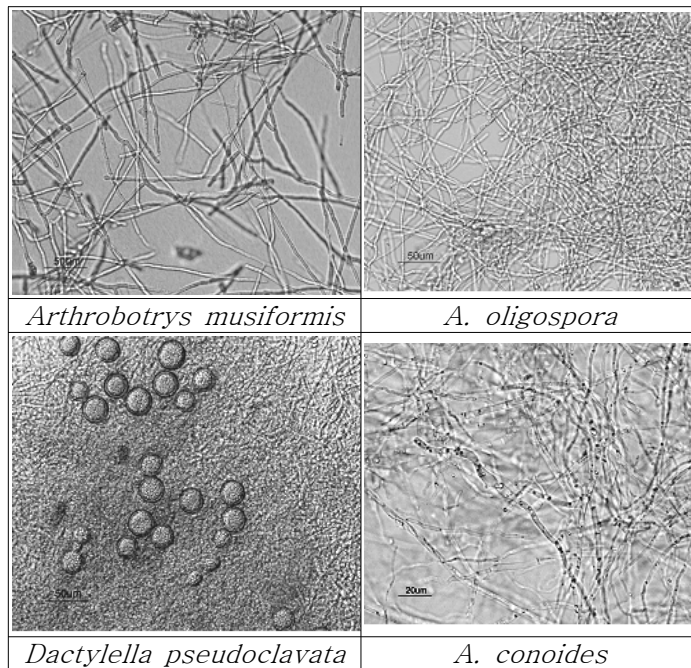


Fig. 15. Mycelium of predatory after liquid fermentation for 6 days.

Table 11. Liquid fermentation of *Arthrotrrys musiformis* isolate #802-1 using cooking sucrose as a carbon source and yeast extract as nitrogen source.

Syrup(ml)	Yeast Extract		
	0.5	1.0	1.5
0	0.04	0.03	0.08
1	0.08	0.11	0.09
2	0.1	0.13	0.13
4	0.12	0.16	0.18

Table 12. Liquid culture of *Arthrotrrys musiformis* isolate #802-1 using glucose, yeast extract, and skim milk(I).

Treat no.	Amount(g/L)		
	Glucose	Yeast Extract	Skim milk
1	1.0	1.0	1.0
2	1.0	1.0	0.5
3	1.0	1.0	0.0
4	1.0	2.0	1.0
5	1.0	2.0	0.5
6	1.0	2.0	0.0
7	1.0	3.0	1.0
8	1.0	3.0	0.5
9	1.0	3.0	0.0
10	8.0	0.8	0.8
11	8.0	0.8	0.4
12	8.0	0.8	0.0
13	8.0	1.6	0.8
14	8.0	1.6	0.4
15	8.0	1.6	0.0
16	8.0	3.2	0.8
17	8.0	3.2	0.4
18	8.0	3.2	0.0
19	6.0	0.6	0.6
20	6.0	0.6	0.3
21	6.0	0.6	0.0
22	6.0	1.2	0.6
23	6.0	1.2	0.3
24	6.0	1.2	0.0
25	6.0	2.4	0.6
26	6.0	2.4	0.3
27	6.0	2.4	0.0

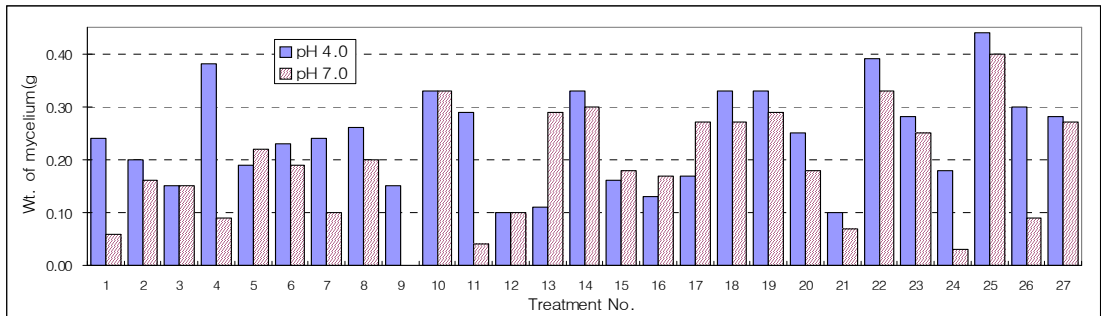


Fig. 16. Liquid culture of *Arthrotrrys musiformis* isolate #802-1 using glucose, yeast extract, and skim milk(I).

Table 13. Liquid culture of *Arthrotrrys musiformis* isolate #802-1 using glucose, yeast extract, and skim milk(II).

Treat No.	Amount(g/L)		
	Glucose	Yeast Extract	Skim milk
1	6.0	0.5	0.6
2	6.0	1.0	0.6
3	6.0	1.5	0.6
4	6.0	2.0	0.6
5	6.0	2.5	0.6
6	6.0	3.0	0.6
7	6.0	0.5	0.3
8	6.0	1.0	0.3
9	6.0	1.5	0.3
10	6.0	2.0	0.3
11	6.0	2.5	0.3
12	6.0	3.0	0.3
13	6.0	0.5	0
14	6.0	1.0	0
15	6.0	1.5	0
16	6.0	2.0	0
17	6.0	2.5	0
18	6.0	3.0	0

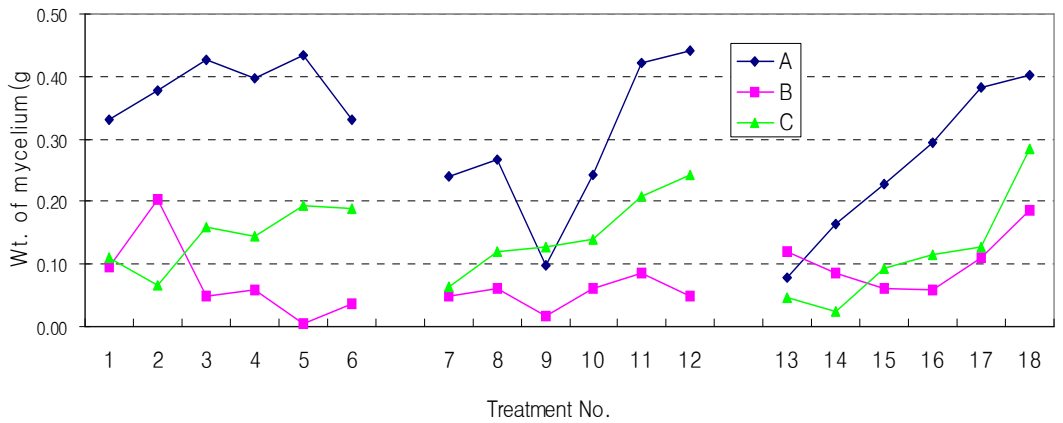


Fig. 17. Liquid culture of predatory fungi using glucose, yeast extract, and skim milk(II). A: *Arthrobotrys musiformis* isolate #802-1, B: *Arthrobotrys oligospora* isolate #5-7, C: *Dactylella pseudoclavata* isolate #8-1

Table 14. Liquid culture of predatory fungi using glucose and yeast extract.

Treat no.	Amount(g/L)	
	glucose	yeast extract
1	6.0	3.0
2	6.0	3.5
3	6.0	4.0
4	6.0	4.5
5	6.0	5.0
6	6.0	5.5
7	6.0	6.0
8	8.0	4.0
9	8.0	4.7
10	8.0	5.3
11	8.0	6.0
12	8.0	6.7
13	8.0	7.3
14	8.0	8.0
15	10.0	5.0
16	10.0	5.8
17	10.0	6.7
18	10.0	7.5
19	10.0	8.3
20	10.0	9.2
21	10.0	10.0

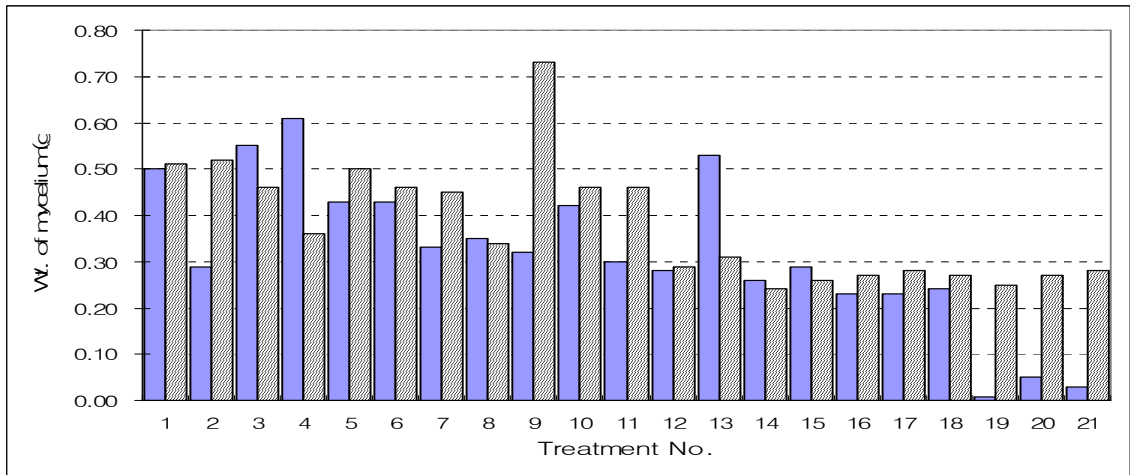


Fig. 18. Liquid culture of *Arthrotrrys musiformis* isolate #802-1 using glucose, yeast extract. A: *Arthrotrrys musiformis* isolate #802-1, B: *Arthrotrrys oligospora* isolate #5-7

Table 15. Liquid culture of 3 different predatory fungi using malto dextrin, glucose, yeast extract, and casamino acid(I).

Treat no.	Amount(g/L)				
	Sucrose	malto dextrin	glucose	yeast extract	casamino acid
1			6.0	3.0	
2			6.0		2
3			6.0		3
4			6.0		4
5		6.0		3.0	
6		6.0			2
7		6.0			3
8		6.0			4
9	6.0			3.0	
10	6.0				2
11	6.0				3
12	6.0				4

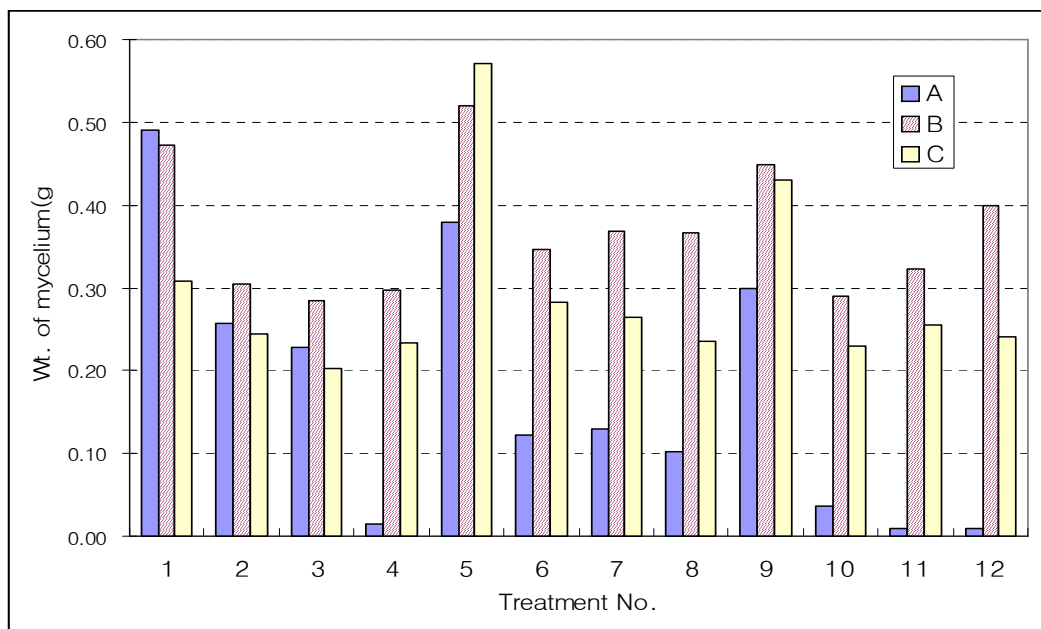


Fig. 19. Liquid culture of 3 different predatory fungi using malto dextrin, glucose, yeast extract, and casamino acid. A: *Arthrobotrys musiformis* isolate #802-1, B: *Arthrobotrys oligospora* isolate #5-7, C: *Dactylella pseudoclavata* isolate #8-1.

Table 16. Liquid culture of 3 different predatory fungi using malto dextrin, glucose, yeast extract, and casamino acid (II).

No.	Source of nutrients				
	Sucrose	malto dextrin	glucose	yeast extract	casamino acid
1			6.0	3.0	
2			6.0		5
3			6.0		10
4			6.0		15
5			6.0		20
6		6.0		3.0	
7		8.0		3.0	
8		10.0		3.0	
9		12.0		3.0	
10	6.0			3.0	
11	8.0			3.0	
12	10.0			3.0	
13	12.0			3.0	

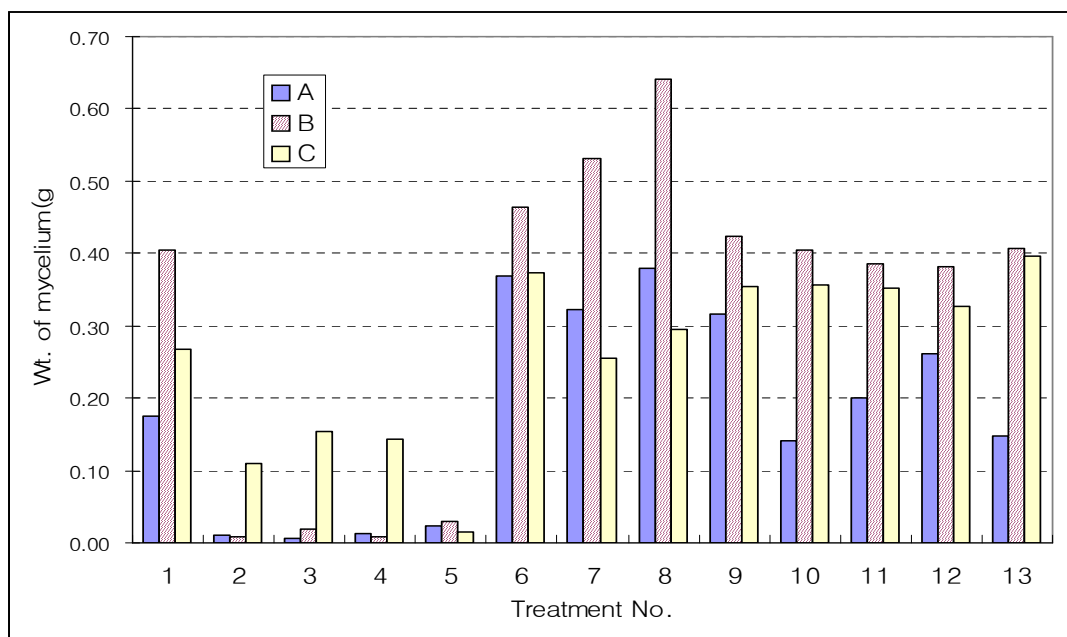


Fig. 20. Liquid culture of 3 different predatory fungi using malto dextrin, glucose, yeast extract, and casamino acid (II). A: *Arthrobotrys musiformis* isolate #802-1, B: *Arthrobotrys oligospora* isolate #5-7, C: *Dactylella pseudoclavata* isolate #8-1.

나. 포식성곰팡이 고체 제제화 및 효과 검정

곰팡이 친적의 직면한 큰 제약 가운데 하나는 곰팡이 포자 (분생포자, 병자각, 후막포자)와 기타 영양 휴면 곰팡이 증식체를 생산하는 문제이며 액체배양에서 곰팡이 포자를 배양하고 건조하여 사용 전까지 보관 가능한 제형으로 보존하는 방법을 찾는 데 집중되고 있다. 그러나 균사를 이용할 경우에는 액체 배양후 포자를 따로 분리하지 않고 균사와 포자를 함께 섞어 알지네이트 (alginate)로 만들기도 하고, 흡수성 전분 옥수수유, 당, 규토로 이루어진 '스타빌레즈 (Stabilize)'라는 새로운 제형으로 만들기도 하는데, 이 실험에서는 스타빌레즈 (Stabilize) 방법을 이용한 균사제제를 만드는 방법을 포함하였다(Kim and Riggs, 1995; Lemaire et al. 1986; Stirling et. al, 1998; Lewis et al, 1991).

포식성곰팡이 선발균주의 제제화에서 Vermiculate-starch formulation 등 모든 제제의 균생장과 포자형성은 양호하였다. Vermiculate-starch formulation은 입자에 공극이 많아 배양액과 혼합할시 수분조절이 중요한 요인인 조제가 용이하였다. 제제화중 Bentonite를 같이 혼합하여 시험하였는데, 균의 생장은 양호하였으나 배양액과 혼합 조제시 뭉쳐져서 조제시 덩어리 형태로 되어 사용이 불편하였다.

Sodium alginate matrix formulation은 기존에 잘 알려진 방법이고 만드는 방법이 표준화되어있어 제제화에 어려움은 없었다. 그러나 대량생산을 위해서는 몇 가지 방법에 개선이 필요했는데, 우리가 사용한 방법은 곰팡이균사와 sodium alginate를 믹서기로 혼합 후 가정용 농약살포용 sprayer에 넣고 압력을 주어 갈데기로 밀어 보내는 방법으로 하였다. 갈데기는 거꾸로 세워 밀을 프라스틱 뚜껑으로 막았으며 뚜껑에는 미리 구멍을 뚫어두어 한꺼번에 50개 정도의 bead가 만들어질 수 있도록 하였다. Pregelatinized Starch Stabilizer formulation 제제에서는 Kaolin을 섞지 않았을 때는 점도가 높아 제제하기가 곤란하였다. 제제시 약 10%의 Kaolin을 섞어 제제 하였을 때, 반죽, 국수기계 통과, 건조, 파쇄등이 모두 용이하였다. 싸레기제제와 밀제제는 모두 제제를 만들기전에 충분히 물에 불려 사용하였고, 특히 밀제제는 밀이 상호 엉기는 것을 방지하기위하여 석고를 1% 첨가하였다.

6종의 제제를 5°C와 25°C에 보관하였을 때, 제제의 활성은 30일 이내 급격히 저하하였는데, 25°C 보관에서는 보관기간이 2개월 이하였고, 5°C 보관에서는 활성이 90% 이상 떨어졌지만 4개월까지 생존은 가능하였다(Fig. 21). 2가지 온도 처리에서 모두 30일 이내

에 활성이 80-90%의 저하됨으로 앞으로 연구과제는 습윤제, 보호제 혹은 포식성곰팡이의 먹이가 될 수 있는 영양제를 첨가하든가, 최적 보관을 위한 제제화 적정습도를 파악하는 등의 연구를 통하여 30일 이내 활성저하를 막을 수 있는 연구가 시급히 필요하다.

다. 천적곰팡이의 토양 정착능력 검증

제제화된 포식성곰팡이를 토양에 처리한 후 위의 선행연구에서 개발된 토양 회식에 의한 포식성곰팡이 밀도 산출 방법을 이용하여, 토양에 접종된 포식성곰팡이를 토양으로부터 재분리한 결과 토양중에 처리된 포식성곰팡이의 밀도는 처리 40일후 까지 검출이 가능하였다. 따라서 앞으로 이 방법을 이용하면 토양중 포식성곰팡이의 경시적 변화 추적이 가능할 것으로 생각된다.

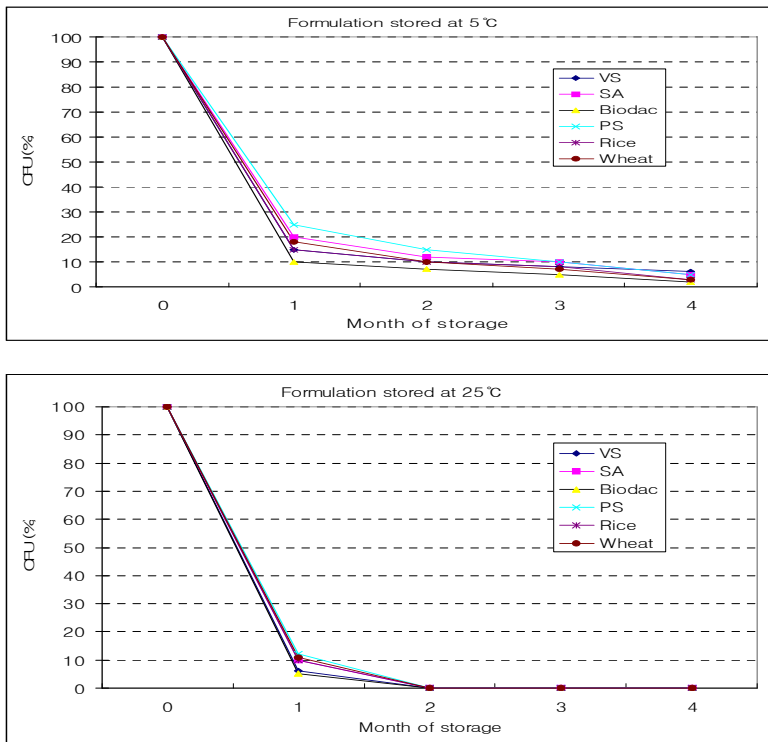


Fig. 21. Effects of long-term storage of six formulations at 5°C and 25°C.

VS : Vermiculate-starch formulation, SA : Sodium alginate matrix formulation, Biodac : BIODAC® formulation, PS : Pregelatinized starch stabilizer formulation, Rice : Rice

formulation, Wheat : Wheat formulation.

3. 선충 포식성곰팡이 제제를 이용한 효능검증 및 이용방법 연구

가. 포식성곰팡이 제제의 실내 검증

1차 시험에서 5종의 포식성곰팡이를 액체배양후 배양된 균사를 직접 이용하여 토양에 처리한 결과, 대부분의 처리에서 뿌리혹선충의 밀도가 낮은 경향이었으나 통계적 유의성은 없었고 부식성선충의 밀도에서도 뚜렷한 경향이 나타나지 않았다(Table 17).

2차 시험에서 7종의 포식성곰팡이를 Pregelatinized starch formulation방법으로 제제화하여 실내에서 포식성곰팡이 선발시험을 실시한 결과, *Isolate F6*, *Isolate F13* 균주들이 무처리에 비하여 70-90%의 방제효율을 보였다. *Isolate F7* 균주는 처리량이 높을 때, 즉 2.0%의 처리량에서 약간의 효과를 보였다. 나머지 균주들은 방제효과를 보이지 않았으며, 부식성선충의 밀도 억제 효과도 뿌리혹선충의 밀도억제효과와 비슷한 경향이었다(Table 18).

3차 시험에서 5종의 포식성곰팡이를 Kaolin을 첨가한 Pregelatinized starch formulation으로 만들고, 이를 이용하여 실내 선발시험을 실시한 결과, 무처리나 후라단(선충방제 약제)에 비하여 50-70%의 방제 효과를 나타내고 있어 상당한 뿌리혹선충 밀도억제 효과가 인정되었다. 그리고 처리시간이 8일에서 18일로 길어질수록 밀도억제 효과는 더 높았다(Table 19). 대부분의 포식성곰팡이들이 높은 밀도 억제 효과를 보였는데, 그중에서 특히 3종의 포식성곰팡이가 무처리에 비하여 90% 이상의 방제효율을 보였다. *M. ullah* 은 뿌리혹선충 방제효과는 높으나 부식성선충의 밀도가 증가하였다. 그 외 부식성선충의 밀도 억제 효과도 뿌리혹선충의 밀도억제효과와 비슷한 경향이었다(Table 19).

Table 17. Control of *Meloidogyne incognita* using fermentation mycelium of 6 predatory fungi in vitro.

No.	Inoculum	No. of nematodes		Total
		<i>Meloidogyne sp.</i>	<i>Rhabditis sp.</i>	
<i>Isolate F2</i>	1%	18	27	45
<i>Isolate F4</i>	1%	24	30	54
<i>Isolate F5</i>	1%	30	27	57
<i>Isolate F8</i>	1%	24	54	78
<i>Isolate F13</i>	1%	33	9	42
Mix of 5 species	1%	42	36	78
Control	—	89	35	123

Table 18. Control of *Meloidogyne incognita* using pregelatinized starch formulation of 7 predatory fungi in vitro.

No.	Inoculum	No. of nematodes		Total
		<i>Meloidogyne sp.</i>	<i>Rhabditis sp.</i>	
Control	—	255 a	42 b	297
<i>Isolate F4</i>	1.0%	102 ab	105 a	207
	2.0%	60 b	72 ab	132
<i>Isolate F5</i>	1.0%	180 ab	57 b	237
	2.0%	114 ab	132 a	246
<i>Isolate F6</i>	1.0%	27 b	87 ab	114
<i>Isolate F7</i>	1.0%	135 ab	123 a	258
	2.0%	75 b	183 a	258
<i>Isolate F8</i>	1.0%	201 a	357 a	558
	2.0%	183 a	531 a	714
<i>Isolate F10</i>	1.0%	189 a	48 b	237
	2.0%	246 a	48 b	294
<i>Isolate F13</i>	1.0%	45 b	45 b	90
	2.0%	78 b	42 b	120

Table 19. Control of *Meloidogyne incognita* using pregelatinized starch with kaolin formulation of 6 predatory fungi in vitro.

ID	Inoc.	8DAI		18DAI		Average	
		<i>Melo.</i>	<i>Rhabditis</i>	<i>Melo.</i>	<i>Rhabditis</i>	<i>Melo.</i>	<i>Rhabditis</i>
<i>Isolate F2</i>	1.0%	64	2,436	40	20	52	1,228
<i>Isolate F4</i>	1.0%	108	340	0	0	54	170
<i>Isolate F5</i>	1.0%	8	20	20	4	14	12
<i>Isolate F7</i>	1.0%	140	16	20	8	80	12
<i>Isolate F13</i>	1.0%	64	16	4	1960	34	988
Mix of 4 species	1.0%	156	36	80	8	118	22
Furadan	1.0g	376	56	344	88	360	72
Control	—	552	261	388	183	470	222

나. 포식성곰팡이 제제의 쫓드 검정

포식성곰팡이 균주를 여러 방법으로 제제화하여 조제한 제제의 뿌리혹선충 방제 시험은 뿌리혹선충이 감염된 자연 토양을 이용하여 온실에서 실시되었다.

포식성곰팡이 제제의 뿌리혹선충 밀도억제 효과는 Table 20, 21과 같다. 토마토 이식 1주전에 1.0%, 2.0% 제제를 처리한 토양에서는 약 47%의 선충 밀도억제 효과를 보여 높은 유의성이 인정되었다(P=0.01). 포식성곰팡이 제제 0.3%, 0.5% 처리는 각각 15%–20%의 밀도억제효과를 보였으나 무처리와 비교해 통계적 유의성은 없었다(Table 20). 그러나 지상부 및 뿌리의 무게는 곰팡이 제제 처리구와 무처리 구간 통계적 유의성이 없었다. 토마토 이식과 동시에 곰팡이를 처리한 것은 뿌리혹선충 밀도억제 효과가 없었다(Table 생략). 화분에서 포식성곰팡이 제제를 작물 심기 1주전에 처리한 것은 뿌리혹선충 유충의 뿌리 침입이 적었으나 직전 처리한 것은 전혀 효과가 없어 포식성곰팡이의 처리시기가 매우 중요함을 알 수 있었는데, 일반적으로 화분에서 실시하는 시험은 뿌리의 분포가 제한되어있고 뿌리혹선충의 뿌리내로의 침입이 용이하여 포장시험에 비하여 훨씬 많은 선충이 침입하며 따라서 친적의 효과도 그 만큼 높게 나타난다(Hams and Wilkins, 1961).

2종의 포식성곰팡이를 Pregelatinized Starch Stabilizer formulation으로 제제화하여 풋드시험에서 처리한 결과, 뿌리혹 생성 정도나 난랑 생성 정도를 볼 때 *Isolate F5* 제제 처리는 살선충인 fosthiazate 정도의 효과를 나타내었다(13-60% 방제가), 특히 *Isolate F5* 포식성곰팡이 제제 처리는 난랑 및 혹에 대한 방제가가 60% 정도로 상당히 높았다(Table 21).

포식성곰팡이 *Isolate F5*를 Pregelatinized Starch Stabilizer formulation, 싸레기제제, 밀제제 등 3조의 제제를 만들고 이들을 이용하여 풋드에서 뿌리혹선충 방제시험을 실시한 결과, 포식성곰팡이 제제 처리는 무처리에 비하여 40-80% 방제가를 보였다(Table 22). 모든 처리에서 방제 효과가 있었으나 제제에 따른 차이도 매우 크게 나타났는데, Pregelatinized Starch Stabilizer formulation는 방제효과가 가장 낮았고 유기제제를 이용한 싸레기제제나 밀제제의 효과가 높았다. 이상의 결과를 종합해 볼 때, 배양 균사를 이용한 Pregelatinized Starch Stabilizer formulation 제형은 뿌리혹선충 방제가가 15-63%로 선충탄(13-60%)에 비하여 비슷하거나 높은 편으로 비록 유기제제(쌀, 밀)에 비해서는 낮은 편이었지만 대량 제제화의 용이성 등으로 미루어 볼 때 장기보관성 등 좀 더 제제를 개발한다면 포식성곰팡이 균사를 효율적으로 제형에 이용하는 것이 가능할 것으로 보인다.

싸레기제제와 밀제제에서 방제 효과가 높았던 이유는, 더 심도 있는 분석이 필요하겠지만, 현재로서 가능한 추정은 싸레기와 밀이 탄수화물로 이루어져있으므로 이들에 포함된 유기영양원이 부식선충의 발생을 조장하여 2차적으로 포식성곰팡이의 발생을 촉진시키지 않았을까한다.

*Isolate F4*와 *Isolate F5*의 Rice formulation은 뿌리혹선충에 대하여 70-80% 방제가를 보였는데(난랑과 혹의 수), 선충탄의 13-60% 방제가 보다 훨씬 높은 방제 효율을 보였다. Wheat formulation은 뿌리혹선충이 만든 난랑과 혹의 수에 대하여 60-80% 방제가를 보였는데, *Isolate F4*의 방제 효율이 *Isolate F5*보다 약간 높았고 선충탄의 난랑이나 뿌리혹 방제가 13-60%보다 훨씬 높은 방제 효율을 보였다(Table 23).

Table 20. Control of *Meloidogyne incognita* using vermiculate–starch formulation of predatory fungi in greenhouse test.

Treatment	Inoculum	Fungus treat one week before planting		
		Eggmass(no./plant)	Plant wt.(g)	Root wt.(g)
Control	–	319 a	27.0 a	21.3 a
<i>Isolate F4</i>	0.3%	251 b	26.5 a	18.8 a
	0.5%	234 b	24.3 a	19.3 a
	1.0%	146 c	25.7 a	19.4 a
	2.0%	148 c	27.6 a	19.6 a
Factorial analysis of variance				
Treatment		0.01	n.s.	n.s.
Application rates		0.01	n.s.	n.s.

Table 21. Control of *Meloidogyne incognita* using pregelatinized starch stabilizer formulation of two predatory fungi in greenhouse test.

Formulation	Number of nematode per plant			Control efficacy(%)	
	Eggmass	Gall	J2	Eggmass	Gall
Control	45.2 a	239.7 ab	680.0	0	0
Fosthiazate	39.4 a	96.8 b	320.0	13	60
<i>Isolate F4</i>	30.1 a	203.8 ab	288.7	33	15
<i>Isolate F5</i>	16.5 b	92.4 b	333.3	63	61

Table 22. Comparisons of three different formulations of *Isolate F5* for the control of *Meloidogyne incognita* in greenhouse test.

Formulation	Number per plant			Control efficacy(%)	
	Eggmass	Gall	J2	Eggmass	Gall
Control	45.2 a	239.7 a	680.0 a	0	0
Starch formu.	23.3 b	148.1 b	311.0 ab	49	39
Rice formu.	9.7 b	55.4 b	125.3 b	79	77
Wheat formu.	15.3 b	73.3 b	76.7 b	67	70

Table 23. Comparisons of two different formulations of two different predatory fungi for the control of *Meloidogyne incognita* in greenhouse test.

Treatment	Number of nematode per plant			Control efficacy(%)	
	Eggmass	Gall	J2	Eggmass	Gall
Control	45.2	239.7	680.0	0	0
Fosthiazate	39.4	96.8	320.0	13	60
<i>Isolate F4</i> (Rice formu.)	11.0	64.8	100.0	76	73
<i>Isolate F5</i> (Rice formu.)	8.4	46.0	150.0	82	81
<i>Isolate F4</i> (Wheat formu.)	12.8	41.3	120.0	72	83
<i>Isolate F5</i> (Wheat formu.)	18.2	105.3	33.3	60	57

다. 포식성곰팡이 제제의 포장 시험

1) 마이크로프로트 시험

포장시험중 재배 중기에 잎굴파리의 피해가 약간 발생하였고, 재배 후기에는 노균병이 심하게 발생되었다. 잎굴파리는 방제가 가능하였고, 노균병은 실험이 거의 끝난 시기에 발생되어 이번 실험의 결과 해석에는 영향이 적었다. 이번 시험에서 토양 깊이 10 cm에서의 평균온도는 정식시에는 27.5℃이었고 4주후인 첫 수확기에는 약 22℃이었으며 수확후기인 11월에는 20℃ 정도였다(Fig. 22). 적산온도법에 의한 뿌리혹선충 발생을 계산하면 뿌리혹선충은 재배 기간 중 약 2-3회 번식한 것으로 추정된다(Kim and Yeon, 2001).

이번시험에서 시험구당 오이 수확수는 42-53개로 농가의 수확 수보다는 약간 적었지만 시험분석을 위해서는 충분한 정도로 오이의 성장이 이루어졌고 정상적으로 수확이 되었다고 할 수 있다(Fig. 23, Table 24). 식물의 키는 무처리의 375cm에 비하여 포식성곰팡이 *Isolate F4*와 *Isolate F5* 처리구는 406-453cm로 잘 성장하였고 식물체 무게는 무처리의 439.6g에 비하여 479-480g로 약간 더 무거웠다. 뿌리 무게는 무처리의 20.8g/plant에 비하여 포식성곰팡이 처리구가 20.8-22.8g/plant로 비슷하였다. 수량은 무처리의 2506.4g/plot에 비하여 3179.2-3220.0g/plot으로 127-128% 증수되었다. 뿌리혹선충의 알 밀도는 무처리가 4,406개/plant이며 포식성곰팡이 처리구는 7,980-10,980/plant로 오히려 많았다. 반면에 살선충제 fosthiazate 처리구는 선충의 밀도는 처리중 가장 낮았고 수량은 116%로 약간 증수되었다(Table 24).

이러한 결과는 포식성곰팡이 제제 처리에 의하여 초기 뿌리혹선충 밀도가 억제된 것이 아닌가 생각되는데, 작물생육 초기에 뿌리혹선충의 밀도가 낮아짐으로서, 초기에 뿌리로 침입된 선충의 밀도가 낮아 작물이 대체로 건전하게 생육한 것이 아닌가 생각된다. 대부분의 뿌리혹선충 피해는 작물생육 초기에 가장 많은 피해를 받기 때문이다. 후기에 포식성곰팡이 제제 처리구에서 오히려 선충의 밀도가 높아진 이유는 포식성곰팡이 제제 처리로 작물의 생육과 뿌리의 발육이 좋아짐으로서 풍부한 영양공급으로 인하여 뿌리혹선충의 번식력이 더 좋아진 것으로 해석할 수 있다. 이러한 경향은 살선충제를 처리한 외국의 시험에 있어서도 여러 번 인지된 사실이다.

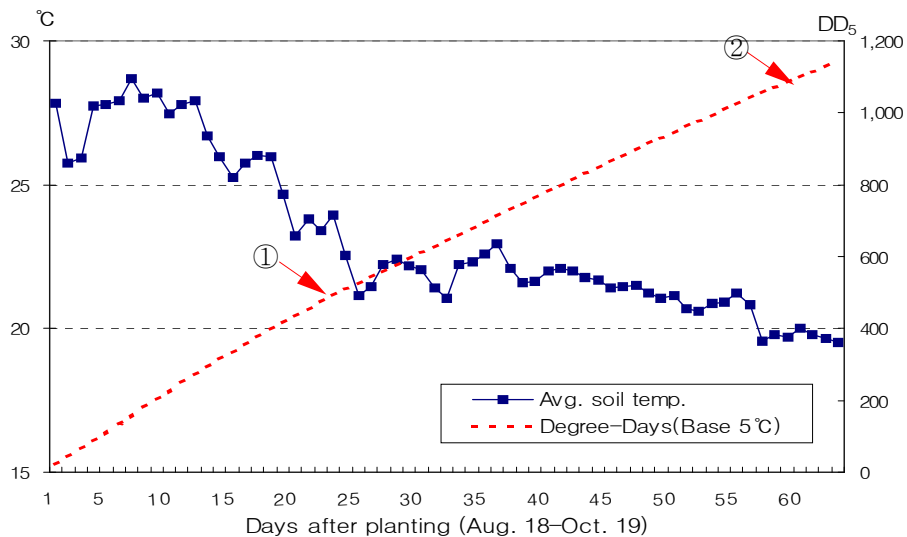


Fig. 22. Soil temperature(■) at depth 10cm and degree-days(base 5°C, ----) during the experiment. ① : 1st generation, ② : 2nd generation.

Table 24. Control of *Meloidogyne incognita* on cucumber using two predatory fungi in microplot test.

Treatment	No. of nematodes		Plant growth			Fruit Yield (g)	% yield increase
	Eggs	J2	Plant ht. (cm)	Plant wt. (g)	Root wt. (g)		
Control	5,406	2,709	375.0	439.6	20.8	2,506.4	100
Fosthiazate	2,880	1,187	437.2	459.0	17.6	2,911.8	116
Isolate F4	7,980	2,056	406.0	480.4	20.8	3,179.2	127
Isolate F5	10,980	1,754	453.0	479.0	22.8	3,220.0	128

^a. Cucumber seedling (*Cucumis sativa* L. cv. Super Manchon) grafted on Jangshushintozoa (*Cucurbita maxima* x *Cu. moschata*) was planted in wooden box (30 x 40 x 15 cm, L x W x D) under a plastic house in August 01.

^b. Early : cucumber harvested between Sep. 01–Sep. 20; Middle : cucumber harvested

between Sep. 21–Oct. 10; Late : cucumber harvested between Oct. 11–Oct. 30.

이번 시험에서 시험구의 고추 성장은 키 450cm, 무게 125g, 수량 약 600g으로 시험분석을 위해서는 충분한 정도였다. 식물의 키는 무처리의 451.2cm에 비하여 포식성곰팡이 *Isolate F4*와 *Isolate F5* 처리구는 562.2–567.6cm로 잘 성장하였고 식물체 무게는 무처리의 125.6g에 비하여 133.2–136.4로 약간 더 무거웠다. 뿌리 무게는 무처리의 37.3g에 비하여 포식성곰팡이 처리구가 40.8–44.0으로 더 무거웠다(Table 25). 뿌리혹선충의 혹수는 무처리가 72.6개/plant이며 포식성곰팡이 처리구는 30.4–52.2/plant로 약간 낮았고, 난량은 129.5개/plant에 비하여 57.6–95.4개/plant로 낮았다. 유충의 밀도는 무처리의 129.5에 비하여 포식성곰팡이 처리구는 497.6–576.8마리/plant로 약간 높았다. 반면에 수량은 무처리의 598.8g에 비하여 745.2–804.0으로 124–134% 증수되었다. 살선충제 fosthiazate 처리구는 선충의 밀도는 처리중 가장 낮게 유지되었으나 수량은 증수되지 않아 포식성곰팡이 처리구와 대조적이었다(Table 25).

이상의 결과를 요약한다면, 오이, 고추 재배지에서 포식성곰팡이 제제를 처리함으로써 수량은 20% 이상 증수가 가능하다. 그 이유로는 포식성곰팡이 제제처리가 뿌리혹선충의 초기 밀도를 억제하여 작물이 초기에 뿌리혹선충의 피해를 회피한 것으로 생각된다.

Table 25. Control of *Meloidogyne incognita* on pepper using two predatory fungi in microplot test.

Treatment	No. of nematodes			Plant		Root wt (g)	Fruit yield (g)	% yield increase
	Gall	Eggmass	J2	height	weight			
Control	72.6	129.5	491.7	451.2	125.6	37.3	598.8	100
Fosthiazate	22.8	30.2	288.8	418.4	127.2	34.8	620.6	104
<i>Isolate F4</i>	30.4	57.6	497.6	562.2	136.4	40.8	745.2	124
<i>Isolate F5</i>	52.2	95.4	576.8	567.6	133.2	44.0	804.0	134

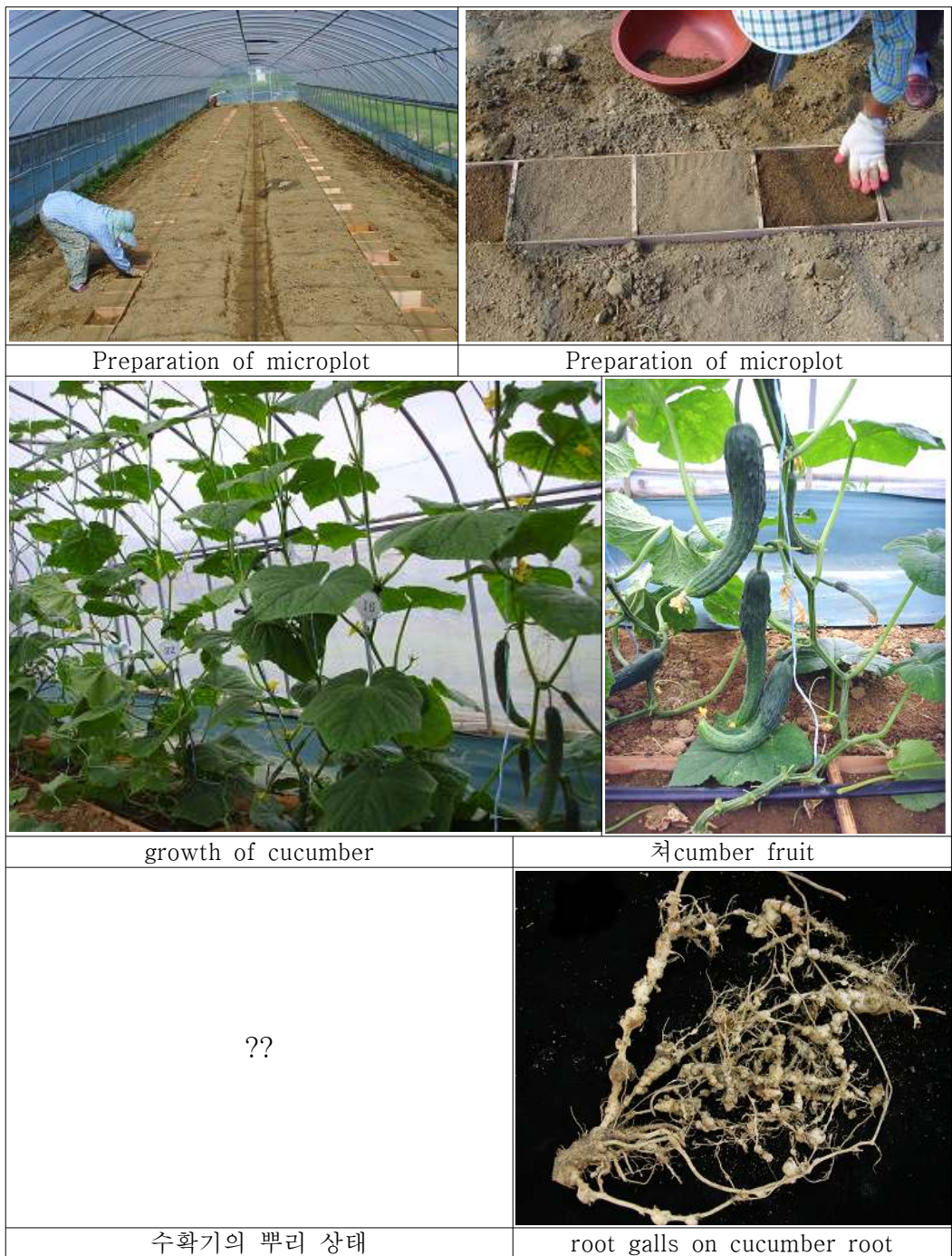


Fig. 23. Preparation of microplot test and growth of plants.

2) 포장 시험

2007년 시험에서 제제를 처리하기 전 토양 300g당 뿌리혹선충 유충 밀도는 285-888마리/토양 300g였으며, 2종의 포식성곰팡이 제제와 2종의 살선충제를 처리한 18일 후, 즉 참외를 심기직전에는 유충 밀도가 4-33마리/토양 300g으로 급격히 감소하였고 90일 후 참외 수확시에도 5-22마리로 낮게 유지되었으나 유의성있는 차이는 없었다(Table 26). 수량에 있어서는 무처리의 2,484g/plot에 비하여 포식성곰팡이 처리구는 2,501-2,972g/plot로 101-120% 증수, 살선충제 처리구는 3,109-3,431g/plot로 125-138% 증수되었다. 포장시험에 있어서도 포식성곰팡이 처리구는 무처리에 비하여 20% 이상의 수량 증수를 가져왔다. 포장 시험은 현지 포장 사정상 고온기에 단기간 실시되었다.

Table 26. Control of *Meloidogyne incognita* on oriental melon using two predatory fungi in field test.

Treatment	No. of J2/300g soil			Yield/plot (g)	% yield increase
	before	at planting	harvest		
	0	18d after	90d after		
Control	403	70	34	2,484	100
<i>Isolate F4</i>	366	22	13	2,972	120
<i>Isolate F8</i>	538	4	5	2,501	101
Fosthiazate	888	16	8	3,431	138
Abamectin	285	33	22	3,109	125

뿌리혹선충의 밀도와 오이 수량과의 관계를 보면(Fig. 24), 선충 무접종 처리구의 수량은 45.6 kg/m²로 가장 많았으며 뿌리혹선충이 10마리 이상이면 수량이 약 39% 감소하였다. 오이 시설재배에서 뿌리혹선충의 토양중 유충 밀도(X)와 오이 수량(Y)과의 관계를 상관분석한 결과 회귀식은 $Y=0.82-0.04 \cdot \text{Log}_{10}(\text{Pi}+1)$ 로 선충밀도와 수량은 고도의 부의 상

관관계가 인정되었다(P_i = 초기 밀도). 뿌리혹선충에 의한 오이 수량이 1% 감소하는 시점 (85,000원 손실)은 토양 1,000 cm^3 당 뿌리혹선충 유충 밀도 5마리 정도이며, 수량이 9% 감소하는 시점(890,000원 손실)은 토양 1,000 cm^3 당 뿌리혹선충 유충 25마리 정도이다. 이것은 선충의 밀도에 따라서 방제방법을 달리하여 방제해야 할 필요가 있음을 보여주고 천적을 이용한 선충 방제시 뿌리혹선충 유충의 밀도를 5마리 이하로 유지하여야 효과가 있다고 할 수 있겠다.

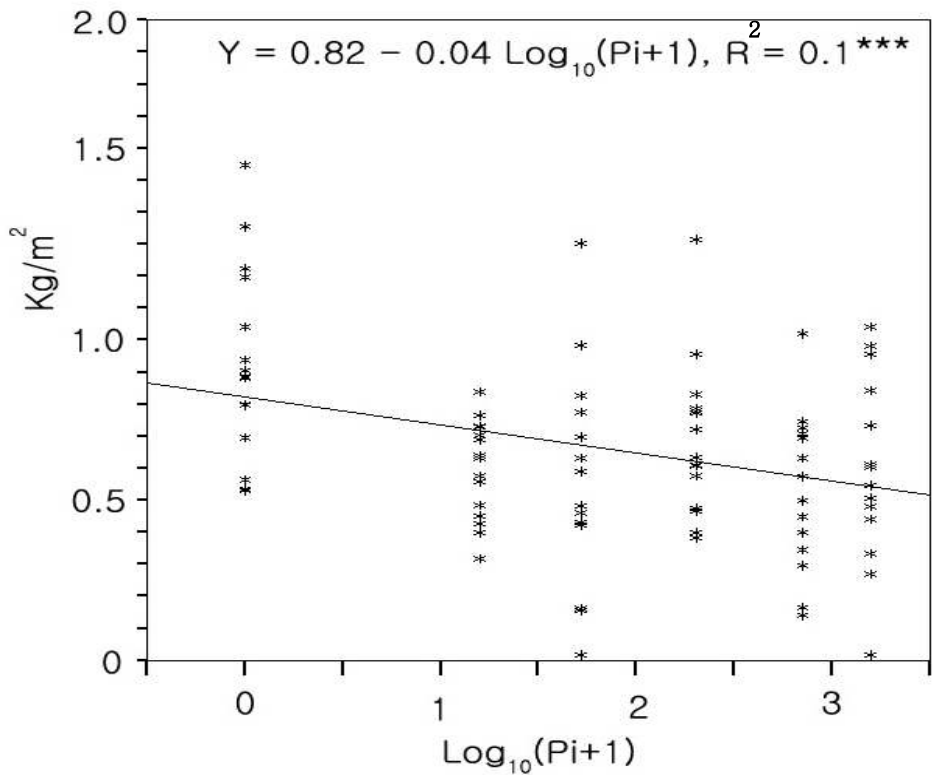


Fig. 24. Linear models: Relationship between cucumber yield and initial population densities (P_i) of *Meloidogyne incognita* in microplot experiment. P_i were transformed to $\text{log}_{10}(\text{Pi} + 1)$ values for analysis.

라. 포식성곰팡이 제제의 살충력에 영향을 미치는 생물적·환경적 요인

1) 포장내 뿌리혹선충의 분포도

뿌리혹선충은 토양깊이 0-5cm에 280마리, 6-5-10cm 사이에 410마리, 11-15cm 사이에 610마리, 16-20cm 사이에 340 마리, 21-25cm 사이에 570마리, 25-30cm 사이에 150마리가 분포하고 있어 깊이 25cm 사이에 대부분의 선충이 분포하고 있었다(Fig. 25). 26cm 이하에서는 밀도가 급격히 낮아져 거의 선충을 발견할 수가 없다. 그러므로 천적을 이용하여 뿌리혹선충을 방제하기 위해서는 반드시 토양 깊이 25cm까지를 목표로 하여 생물적방제제를 처리를 하여야 할 것이다. 예를 들어 포장 300평에 천적곰팡이 1%를 토양 깊이 25cm까지 처리한다면, 약 2.5ton의 포식성곰팡이 제제가 필요하다. 이 정도의 양은 토양에 유기물 처리 기준량(3ton/300평)과 유사하며 농민들이 납득할만한 수준이다.

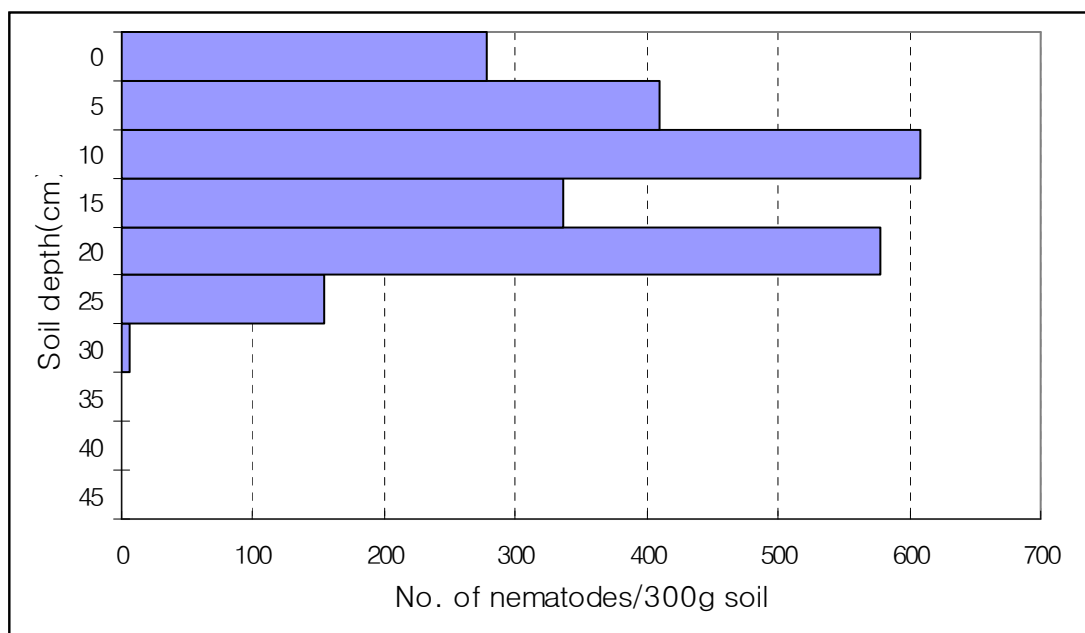


Fig. 25. Vertical distribution of juveniles of *Meloidogyne incognita* in oriental melon greenhouse soil.

2) 포식성곰팡이 서식지 토양의 환경 요인 분석

조사지역의 곰팡이, 방선균, 세균의 밀도는 각각 $3-47 \times 10^3$, $3-58.8 \times 10^4$, $8-2,228 \times 10^3$ 이었으며, 시기별로는 세균은 4월이 9월보다 밀도가 높았다(Table 28). 곰팡이와 세균+방선균의 밀도는 정반대의 경향으로 나타났는데, 즉, 곰팡이의 밀도가 높으면 세균+방선균의 밀도가 낮았고, 곰팡이의 밀도가 낮으면 세균+방선균의 밀도가 높았다. 토양 중 식물기생선충은 위축선충류인 *Tylenchorhynchus* sp.가 우점종이었고 뿌리썩이선충류인 *Pratylenchus* sp., 나선선충류인 *Helicotylenchus* sp. 등이 가끔 발견되었다(Table 28). 선충척곰팡이는 *Monacrosporium* spp., *Cystopage* sp. 그리고 *Harposporium* sp.이 발견되었으며 그중 *Monacrosporium* spp.이 우점종이었다 (Table 28).

토양 이화학적 및 토양 미생물이 토양내 선충잡이곰팡이의 서식에 미치는 영향을 조사한 결과, organic matter, 작물수량, K, 부식성 선충은 다른 요인과의 상관관계가 낮았고 pH, 인산, 칼슘, 고토, 규소, *Tylenchorhynchus* sp., 곰팡이, 방선균, 세균은 상관관계가 높게 나타났다(Table 27, 29). pH는 칼슘, 고토, *Tylenchorhynchus* 선충 밀도, 부식선충 밀도, 곰팡이, 세균, 방선균 등 대부분의 요인과 상관관계가 높았는데, 대부분 정의상관관계였고 특이하게 곰팡이 밀도와는 부의상관관계로 나타났다(Table 30). 또 곰팡이 밀도는 이번 에 조사된 여러 요인들에 대해서도 부의 상관관계로 나타났는데, pH가 낮을수록, 인산함량이 낮을수록, 칼슘이온이 적을수록, 고토 함량이 적을수록, *Tylenchorhynchus* 선충 밀도가 낮을수록 곰팡이의 밀도가 높게 나타났다($r=-0.80^*-0.97^{***}$).

부식성선충이 많은 곳에 선충잡이곰팡이의 종류가 다양하였고 선충잡이곰팡이의 밀도가 높은 곳에는 식물기생성충 밀도가 낮았다(Table 29). 토양에 미숙 유기물을 첨가하면 끈끈이그물을 가진 종이 가장 먼저 나타나고, 이 종이 줄어들기 시작하면 끈끈이격자를 가진 *M. cionopagum*이 나타나는데, 수축성올가미를 가진 종은 가장 마지막에 나타나고 기생성곰팡이류는 거의 역할이 미미하다.

Table 27. Chemical soil characteristics in the experimental sites.

Month	pH (1:5)	O.M. (%)	Av.P ₂ O ₅ (mg/kg)	EX. Cation (cmol+/kg)			SiO ₂ (mg/kg)
				K	Ca	Mg	
Apr.	5.4 a ^x	1.7 a	85 c	0.31 ab	4.50 a	1.88 a	85 b
Sept.	5.6 bc	1.5 a	113 ab	1.15 a	3.02 a	0.81 a	101 bc
Standard	6-7	3%	100-200	≤ 1	5	1.5-5	

O.M.; organic matter

^x Means followed by same letter are not significantly different at 5% level by DMRT.

Table 28. Soil microorganisms and nematodes in the experimental sites.

Soil microorganisms / g soil (×1,000)						No. of nematodes / 300 cm ³ soil			
Fungi		Actinomycetes		Bacteria		<i>Tylencho.</i>		Non-parasitic	
April	Sept.	April	Sept.	April	Sept.	April	Sept.	April	Sept.
10	10	405	265	1,190	77	370	168	290	239

Table 29. Relation between population density of Root-knot nematodes and *Rhabditis* sp. in soil.

No. of samples	Organic matter (g/kg)	Population density of nematodes		
		Predatory	root-knot	<i>Rhabditis</i> sp.
16	2.1	4	0	904
16	1.7	1	> 1,000 이상	57

¹ Numbers of nematode per 300g soil

Table 30. Correlation analysis among factors in the experimental sites.

	pH	O.M	P ₂ O ₅	K	Ca	Mg	Tylencho.	Sapro.	Fungi	Actino.	Bact.
pH	1.00										
O.M	-0.29	1.00									
P ₂ O ₅	0.66	-0.03	1.00								
K	0.53	-0.83**	0.12	1.00							
Ca	0.96***	-0.05	0.75*	0.37	1.00						
Mg	0.90**	0.05	0.82**	0.14	0.95***	1.00					
Tylencho.	0.96***	-0.12	0.82**	0.37	0.99***	0.97***	1.00				
Sapro.	0.82**	-0.41	0.25	0.43	0.67	0.65	0.66	1.00			
Fungi	-0.85**	-0.12	-0.80*	-0.04	-0.90**	-0.97***	-0.92***	-0.63	1.00		
Actino.	0.95***	-0.19	0.85**	0.39	0.96***	0.95***	0.99***	0.67	-0.93***	1.00	
Bact.	0.92***	-0.32	0.59	0.63	0.89**	0.75*	0.88**	0.67	-0.75*	0.89**	1.00

O.M: Organic matter, *Tylencho.*: *Tylenchorhynchus* sp., Sapro.: Saprozoic, Actino.: Actinomycetes, Bact.: Bacteria.

Table 31. Effects of soil additives to increase control efficacy of predatory fungi

Treatments	Number of nematodes per plant			Control efficacy(%)	
	Eggmass	Gall	J2	Eggmass	Gall
Control	45.2	239.7	680.0	0	0
<i>Isolate F4</i> + air	21.4	147.0	294.3	53	39
<i>Isolates F4</i> + CaO ₂	30.4	221.1	423.3	33	8
<i>Isolates F4</i> + <i>Rhabditis</i>	24.0	161.1	290.2	47	33
<i>Isolate F4</i> alone	19.1	85.2	244.7	58	65

Air = 1/6 air pump capacity(3W), *Isolate F4* = 2.0%, CaO₂ = 0.2%, *Rhabditis* = 5,000마리. 500g soil

3) 포식성곰팡이 살충력 제고를 위한 토양 환경 조절

포식성곰팡이 제제의 처리는 무처리에 비하여 33-58%의 난랑억제 효과를 보였고 유충의 밀도도 50% 정도 낮았다. 그러나 포식성곰팡이 제제의 효율을 더 높이기 위한 환경 조절 처리(부식성곰팡이 첨가, 공기 주입, 토양 산소 공급을 위한 CaO₂ 처리)에서는 뚜렷한 효과를 얻지 못하였다(Table 31). CaO₂ 처리에서는 오히려 제제를 단독으로 처리한 플롯에 비해 오히려 흑의 수, 난랑의 수, 유충의 밀도가 증가하였다.

2번째 시험에서는 *Isolate F4*와 *F5* 2종의 포식성곰팡이를 이용하여 산소공급, 탄소공급의 효과를 비교하였다(Table 32). 이 실험 결과는 살선충제인 fosthiazate 처리가 유충의 밀도도 낮고 뿌리혹도 적어 가장 방제 효과가 높았다. 그러나 포식성곰팡이 제제 처리는 일부 효과는 있었으나, 균주별로, 또 산소, 이산화탄소 처리별로 결과가 상이하여 일정한 경향을 찾기가 어려웠다. 예를 들어 *Isolate F5* 균주를 이용하여 이산화탄소를 처리한 결과, 뿌리혹 8.3개/plant로 살선충제와 비슷한 높은 방제 효과가 있었으나, *Isolate F4* 이산화탄소 처리는 뿌리혹 97.6개/plant로 다른 처리에 비해 오히려 매우 높은 편이며 무처리에 비해서도 높았다(Table 32). 2번의 시험에서 공통되게 뚜렷한 경향을 발견하지 못하였는데, 이러한 결과는 토양환경 조절을 통하여 포식성곰팡이의 효율을 증진시킬 수 있다는 가설에 반대되는 결과로, 앞으로 그 이유를 자세히 밝혀 포식성곰팡이를 이용한 천적 방제에 활용되어야 할 것이다.

다. 포식성곰팡이 제제의 효율적 이용방법 제안

3년간의 연구를 통하여 포식성곰팡이 제제의 포장 검정 시험을 수행한 결과, 국내의 온실재배지에 감염되어있는 뿌리혹선충에 대하여 *Isolate F4*와 *Isolate F5* 균주의 제제를 이용하여 충분히 초기 밀도 억제 및 수량 증수 효과를 볼 수 있을 것으로 평가되었다. 그러나 여전히 개선되거나 해결해야 할 여러 가지 문제점이 있는데, 첫 번째는 대량 액체배양 중 균주의 활성을 높게 유지할 수 있도록 개선이 필요하다. 실용적인 측면에서는 유기물을 이용한 대량 처리법 및 재배 기간 중 뿌리혹선충이 발생했을 때, 관주를 통한 반복처리가 가능할 수 있도록 제제화하는 연구가 보다 심도있게 진행될 필요가 있다. 또한 다른 작물에 발생하는 *Aphelenchoides*, *Pratylenchus*, *Heterodera* 속의 선충류에 대한 억제효과나 살선충제와의 복합 처리효과 등도 검토할 필요가 있다.

포식성곰팡이 제제에 대한 포장 검정시험을 종합하여 정리하면, 성주 참외재배 지

역의 작형은 10월경에 포장을 마련하여 12월경에 참외를 정식한다. 그러므로 참외 뿌리혹 선충 방제를 위한 포식성곰팡이 제제의 처리시기는 10-12월 사이가 된다. 이 시기는 온도가 낮게 유지되는 시기임으로 저온성 포식성곰팡이 제제를 유기물과 같이 투입하여 토양과 혼화하며, 뿌리혹선충의 피해가 많이 발생하는 4-5월 이후에는 고온성 포식성곰팡이를 관주용으로 개발하여 포장에 처리하는 기법이 필요할 것이다.

Table 32. Influences of oxygen and carbon dioxide on two predatory fungi for the control of *Meloidogyne incognita*.

Treatment	Gas	Plant length (cm)	Plant wt. (g)	Root wt. (g)	No. of nematodes	
					J2	Gall
None	None	205.3	110.0	12.0	3.7 a	25.0 ab
	O ₂	179.7	115.0	6.1	11.2 a	22.4 ab
	CO ₂	95.5	43.7	2.9	8.5 ab	20.8 ab
<i>Isolate F4</i>	None	175.2	92.7	7.9	8.0 ab	45.8 ab
	O ₂	131.9	94.3	4.7	20.0 a	42.4 ab
	CO ₂	125.1	101.0	8.4	24.6 a	97.6 a
<i>Isolate F5</i>	None	236.4	199.3	6.7	21.8 a	46.8 a
	O ₂	144.8	107.0	7.4	10.8 ab	21.8 ab
	CO ₂	188.7	143.3	9.3	2.0 b	8.3 a
Fosthiazate	선충탄	154.0	100.7	6.0	3.2 b	5.8 a
Contrast analysis						
fungi vs. fosthiazate		ns	ns	ns	0.01	0.01
none vs. O ₂		ns	ns	ns	ns	ns
none vs. CO ₂		ns	ns	ns	ns	ns

Air = 1/6 air pump capacity(3W), Isolate F4 = 2.0%, CaO₂ = 0.2%, *Rhabditis* = 5,000 nematodes/500g soil

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1절 연구개발 목표의 달성도

1. 선충 포식성곰팡이 분리 및 균주 선발

선충 포식성곰팡이를 분리하기 위한 최적배지 선발, 특화된 선발법을 통한 우수 균주 선발을 통하여 국내 미기록종 2종, 신종 1종, 우수균주 4종에 대한 특성을 파악하였으며 진도에 따라 100% 목표 달성하였다.

2. 선충 포식성곰팡이 배양 및 제제화

포식성곰팡이 균주의 대량 생산을 위한 경제적 영양원의 종류와 농도 및 온도와 pH, 배양시간 등 최적배양조건을 확립하였으며 살충효과를 높이기 위한 제제화 기법을 확립하는 등 진도를 100% 달성하였다.

3. 선충 포식성곰팡이 제제를 이용한 효능검증 및 이용방법 연구

본 연구의 최종 목표인 포식성곰팡이 균주 제제의 효과에 대한 포장 검정 시험을 완료하였고, 효율적인 이용 방법 연구를 수행하여 토양 처리량, 처리시기, 포식성곰팡이 포장 밀도 추정법, 환경에 따른 요인분석 등을 제안하였으며, 뿌리혹선충에 대한 생물농약의 구체적인 처리법, 밀도 조사방법 등을 제시하였다. 그러므로 본 연구의 목표를 100% 달성하였다고 평가할 수 있었다.

2절 관련분야의 기술발전예의 기여도

1. 선충 포식성곰팡이 분리 및 균주 선발

선충 포식성곰팡이를 분리법 개선을 통하여 국내 미기록종 2종, 신종 1종을 학회에 보고하였으며 앞으로 이 방법을 이용하여 많은 국내 신규 및 미등록 포식성곰팡이가 발견, 보고 될 것이다.

2. 선충 포식성곰팡이 배양 및 제제화

포식성곰팡이의 효율적인 대량생산조건을 확립함으로써 차후 선충 천적곰팡이의 대량생산이 가능해질 것으로 전망되며 현재까지 확립된 제제화 기법은 향후 생물농약제제의 안정성 및 물리성 개선에 기초될 것으로 기대된다.

3. 선충 포식성곰팡이 제제를 이용한 효능검증 및 이용방법 연구

시설재배에서 주요한 문제해충인 뿌리혹선충에 대한 미생물농약의 약효를 검정.평가하는 방법이 상이하고 합리적인 포장 검정법이 없었으나 본 연구를 통하여 뿌리혹선충에 대한 합리적인 포장검정법과 밀도 조사법 등이 제시되어 향후 관련 연구자 및 미생물농약 개발자에게 유용한 기초 정보를 제공하였다고 생각된다. 그리고 본 연구에서 그 효능이 검증된 포식성곰팡이의 제제화 과정에서 필요한 기초 정보와 문제점 등을 제사함으로서 보다 원활한 시제품을 생산할 수 있을 것으로 예상된다. 뿐만 아니라, 참외 주산지인 성주 시설재배지 환경조건과 뿌리혹선충 발생 실태를 분석하여 기초 자료를 제시함에 따라 생물농약을 포함한 뿌리혹선충 방제법 개발에 중요한 정보로 이용될 것으로 기대된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 선충 포식성곰팡이 분리 및 균주 선발

포식성곰팡이를 효율적으로 분리할 수 있는 방법이 개발됨으로서 앞으로 국내 선충 천적곰팡이에 대한 분포도를 작성할 것이다. 연구결과를 통한 기술들은 국내외 학술지에 논문을 게재할 예정이며 이미 제1세부과제와 공동으로 학술지에 발표한 바 있다.

2. 선충 포식성곰팡이 배양 및 제제화

포식성곰팡이의 효율적인 대량생산조건 및 제제화 기술을 차후 제품개발에 활용할 계획이다.

3. 선충 포식성곰팡이 제제를 이용한 효능검증 및 이용방법 연구

본 연구개발 결과인 포식성곰팡이 제제의 뿌리혹선충 방제 자료는 포식성곰팡이를 이용한 다양한 생물농약 제제의 개발과 그 이용에 활용될 수 있을 것으로 예상된다. 또한 본 연구의 결과는 국내외 관련 연구자에게 유용하고 새로운 정보를 많이 제공할 것으로 사료되어 국제 학술지에 논문을 게재하거나 국제 학술회의에 참가하여 발표할 계획이다. 이미 포식성곰팡이 분리법, 환경요인 분석, 포식성곰팡이 미기록종, 포식성곰팡이 신종 등의 연구 결과는 국내 학술지에 5편을 게재하였으며, 살충력 검정에 대한 결과는 논문으로 투고 중이다. 아래는 현재까지 본 연구 성과를 발표한 제목과 내용들이다.

가. 학술지 논문 게재

- 1) Kim, D. G., N. Vovlas, J. S. Choi, and J. H. Lee. 2005. Description of *Meloinema Odesanens* sp. N.(Nematoda : Heteroderidae) From Korea. *Nematol. Medit.* 33 : 91-99
- 2) Kim, D.G., S. H. Kim, and J. H. Lee. 2005. Observation of Root-knot Nematodes in the Root gall formed on Oriental Melon. *Plant Pathol. J.* 21(1) : 73-76(2005)
- 3) Kim, D. G., Y. H. Ryu, and H. G. Hwang. 2006. First report of two nematode-trapping fungi, *Monacrosporium ullum* sp. nov. and *Arthrobotrys amerospora*,

from Korea. Plant Pathol. J. 22:174-178.

4) Chae Hee Jo, Sun Nam Yu, Dong Geun Kim. 2006. Soil microflora and microfauna in 29 years of N-P-K fertilizer omission plot. Res. in Plant Dis. 12(2): 108-114.

5) Kim, D.G., J. H. Lee, and H. O. Kim. 2007. An unrecorded species of nematode-trapping fungus, *Dactylella pseudoclavata* in Korea. Plant Pathol. J. 23(3): 210-211.

6) Dong-Geun Kim, Myeong-Won Kang and Joong-Hwan Lee. 2008. Effect of Nematicide-dipping Methods on Control of *Aphelenchoides fragariae* in Strawberry. Korean J. Appl. Entomol. 47(1): 101-105.

7) Dong-Geun Kim and Joong-Hwan Lee. 2008. *Lilium tuberosum*, a new host of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* in Korea. Res. in Plant Dis. 14(1): In Press.

8) Dong-Geun Kim and Joong-Hwan Lee. 2008. Economic threshold of *Meloidogyne incognita* for greenhouse grown cucumber in Korea. Res. Plant Dis. 14(1) : In Press.

나. 국제 심포지움 발표

1) Dong-Geun Kim. 2008. Improvement of Isolation Method of Predatory Fungi from Soil. The 5th International Congress on Nematology, Brisbane, Queensland, Australia on 13-18 July 2008.

다. 국내 학술회의 발표

1) Dong-Geun Kim, Myeong-Won Kang and Joong-Hwan Lee. Effect of Nematicide-dipping Methods on Control of *Aphelenchoides fragariae* in Strawberry. 한국

응용곤충학회 춘계 학술연구발표회. 2008. 5. 8-10. 제천 청풍리조트.

2) Dong-Geun Kim and Joong-Hwan Lee. *Lilium tuberosum*, a new host of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* in Korea. 2008년 한국식물병리학회. 춘계학술대회. 2008. 4. 25, 진주 경상대학교 농업생명과학관

라. 신문 및 잡지 기사 게재

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

본 연구를 수행하면서 선충 천적곰팡이의 대량생산 및 제제화, 균주 특성 및 분류 동정, 살충효과 포장 검정 및 이용법에 대한 국외 연구논문을 100 여 편 이상 확보하였다.

동구권인 루마니아를 방문하여(2007. 12. 10 ~16) 여러 기관과 접촉하면서 루마니아의 선충학 연구 동향 파악 및 선충 천적곰팡이 연구 동향도 파악하였고, 앞으로의 과학자 상호방문 및 공동연구에 관하여 토의하고 20여종의 도서 및 연구 논문을 수집하였다.

아래는 방문 기관의 이름 및 연락처이다.

Institutul de Cercetare-Dezvoltare pentru Legumicultura ans Floricultura Vidra-ICDLF
(Research & Development Institute for Vegetable and Flowers Growing Vidra)

Address: Vidra Village, Ilfov County

Tel: 40-21-361.2096

Tel/ Fax: 40-21-361.2094

Agentia Nationala pentru Ameliorare si Reproductie in Zootehnie-ANARZ

(National Agency for Animal Breeding Amelioration and Reproduction)

Address: Sos. Bucuresti-Ploiesti, Km 18, Sector 1, Bucharest

Tel: 40-21-350.1018/ 20/21/22

Fax: 40-21-350.1019

Institutul de Cercetare-Dezvoltare pentru Cresterea Bovinelro Balotesti- ICDCB

(Research & Development Institute for Cattle Breeding Balotesti)

Address: Sos. Bucuresti-Ploiesti, Km 18, Sector 1, Bucharest (same as ANARZ)

Tel: 40-21-350.1034/ 350.1026

Fax: 40-21-350.1030

Statiunea de Cercetare-Dezvoltare pentru Pomicultura Baneasa-SCDP

(Research & Development Station for Fruit Tree Growing Baneasa)

Address: 4, Ion Ionescu de la Brad Blvd, District 1, Bucharest

Tel: 40-21-233.0613/ 17/ 33

Fax: 40-21-233.0614

Ministry of Agriculture and Rural Development

Address: 24, Carol I Blvd, sector 3, Bucharest

Tel: 40-21-307.8643/ 8522/ 2433

Fax: 40-21-307.8627

General Director: Mrs. Roxana Zarma- General Direction of European Affairs and International Relations

제 7 장 참고문헌

- Anderson, M. G., T. B. Jarman, and R. W. Rickards. 1995. Structures and absolute configurations of antibiotics of the oligosporon group from the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. J. Antibiotics 48:391-398.
- Balan, J., and N. Gerber. 1972. Attraction and killing of the nematode *Panagrellus redivivus* by the predacious fungus *Arthrobotrys dactyloides*. Nematologica 18:163-173.
- Barker, K. R. 1985. Nematode extraction and bioassays. In: *An Advance Treatise on Meloidogyne. Vol. II. Methodology* pp. 19-35. North Carolina State University. Raleigh, NC, USA.
- Barron, G. L. 1977. The nematode-destroying fungi. Canadian Biological Publications Ltd, Guelph, Ontario, Canada. 140 pp.
- Cayrol J. C., J. P. Frankowski, R. Lanza, and M. Tamonte. 1991. Nematodes in kiwifruit culture. Biological control trials with the nematophagous fungus T-350. Rev. Hort. No. 313, 54-56.
- Cayrol, J. C. 1983. Biological control of *Meloidogyne* by *Arthrobotrys irregularis*. Rev. Nematol. 6:265-273.
- Cho, H. J. S. C. Han. 1986. Survey of plant parasitic nematodes on economic crops. Korean J. Plant Protec. 25:175-182.
- Cho, M. R., B. C. Lee, D. S. Kim, H. Y. Jeon, M. S. Yiem and J. O. Lee. 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.
- Choi, D. R. and Y. E. Choi. 1982. Survey on plant parasitic nematodes in cropping by controlled horticulture. Korean J. Plant Protec. 21:8-14.
- Choi, Y. E. 1978. Differential host responses to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). Res. Rev. of Kyungpook Nat. Univ. 26:611-615.

- Choi, Y. E. and H. Y. Choo. 1978. A study on the root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) affecting economic crops in Korea. Korean J. Plant Protec. 17:89-98.
- Choo, H. Y., H. K. Kim, J. C. Park, S. M. Lee, and J. I. Lee. 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 Protec. 26:195-201.
- Commandon, J., and P. de Fonbrune. 1939. De la formation et du fonctionnement des pièges des champignons prédateurs des nématodes. Recherches effectuées à l'aide de la micromanipulation et de la cinématographie. C. R. Acad. Sci. Paris 207:304-305. (in Barron, 1977)
- Cooke, R. C. and B. E. S. Godfrey. 1964. A key to the nematode-destroying fungi. Trans. Brit. Mycol. Soc. 47:61-74.
- Cooke, R. C., and V. Satchuthananthavale. 1966. Some nematode-trapping species of *Dactylaria*. Trans. Brit. Mycol. Soc. 48:27-32.
- Couch, J. N. 1937. The formation and operation of the traps in the nematode-catching fungus, *Dactylella bembicodes* Drechsler. Jour. Elisha Mitchell Sci. Soc. 53:301-309.
- Dobbs, C. G., and W. H. Hinson. 1953. A widespread fungistasis in soil. Nature 172:197-199.
- Drechsler, C. 1933a. Morphological diversity among fungi capturing and destroying nematodes. Jour. Wash. Acad. Sci. 23:138-141.
- Drechsler, C. 1933b. Morphological features of some more fungi that capture and kill nematodes. Jour. Wash. Acad. Sci. 23:267-270.
- Drechsler, C. 1937. Some hyphomycetes that prey on free-living terricolous nematodes. Mycologia 29:447-552.
- Drechsler, C. 1944. Three hyphomycetes that capture nematodes in adhesive networks. Mycologia 36:138-171.
- Drechsler, C. 1946. A nematode-destroying Phycomycete forming immotile spores in

- aerial evacuation tubes. Bull. Torrey Bot. Cl. 72:1–17.
- Duddington, C. L. 1962. Predacious fungi and the control of eelworms. In: Viewpoints in Biology. Vol. 1 (C. L. Duddington and J. D. Carthy, Eds.) Butterworths, London.
- Duddington, C. L., F. G. W. Jones, and T. D. Williams. 1956. An experiment on the effect of a predacious fungus upon the soil population of potato root eelworm, *Heterodera rostochiensis* Woll. Nematologica 1:22–343.
- Eisenback, J. D., H. Hirschmann, J. N. Sasser. and A. C. Triantaphyllou. 1981. *A Guide to the Four Most Common Species of Root-knot Nematodes (Meloidogyne spp), with a Pictorial Key*. North Carolina State University, Raleigh, North Carolina. 48 pp.
- Giuma, A. Y., and R. C. Cooke. 1971. Nematotoxin production by *Nematoctonus haptocladus* and *N. concurrens*. Trans. Brit. Mycol. Soc. 56:89–94.
- Ham, A. F. and G. D. Wilkins. 1961. Observations on the use of predacious fungi for the control of *Heterodera* spp. Ann. Appl. Biol. 49:515–523.
- Hayes W. A. and F. Blackburn. 1966. Studies on the nutrition of *Arthrobotrys oligospora* Fres. and *A. robusta* Dudd. Ann. App. Biol. 58:51–60.
- Hibbett, D. S. and R. G. Thorn. 1994. Nematode-trapping in *Pleurotus tuberregium*. Mycologia 86:696–699.
- Jaffee B. A., E. C. Tedford, and A. E. Muldoon. 1993. Tests for density-dependent parasitism of nematodes by nematode-trapping and endoparasitic fungi. Biol. Control. 3:329–336
- Jeong, M. J. 1987. Isolation of nematophagous fungi and evaluation of their biological control potential against *Meloidogyne hapla* Chitwood in pepper. M.S. Thesis. Gyeongsang Nat. Univ. JinJu, Korea
- Jepson, S. B. 1987. *Identification of Root-knot Nematodes (Meloidogyne Species)*. CAB International, Wallingford, Oxon, United Kingdom. 265 pp.
- Kerry, B. 1980. Biocontrol: Fungal parasites of female cyst nematodes. Jour. Nematol. 12:253–259.

- Kim, D. G. and H. Ferris. 2002. Relationship between crop losses and initial population densities of *Meloidogyne arenaria*. J. Nematol. 34:43–49.
- Kim, D. G. and R. D. Riggs. 1995. Efficacy of the nematophagous fungus ART18 in alginate–clay pellet formulations against *Heterodera glycines*. J. of Nematology 27:602–608.
- Kim, D. G. and I. K. Yeon. 2001. Development of *Meloidogyne arenaria* on oriental melon (*Cucumis melo* L.) in relation to degree–day accumulation under greenhouse conditions. Plant Pathol. 17:159–163.
- Kim, D. G., and R. D. Riggs. 1992. Biological control. Pp.133–142 in R. D. Riggs and J. A. Wrather, eds. Biology and management of the soybean cyst nematode. St. Paul, Minnesota: APS Press.
- Kim, D. G., and R. D. Riggs. 1991. Characteristics and efficacy of a sterile Hyphomycete (ARF18), a new biocontrol agent for *Heterodera glycines* and other nematodes. J. Nematol. 23:275–282.
- Kim, D. G., D. R. Choi, and S. B. Lee. 2001. Effects of control methods on yields of oriental melon in fields infested with *Meloidogyne arenaria*. Res. Plant Dis. 7:49–55.
- Kim, D. G., J. K. Lee, Y. K. Lee, Y. C. Choi, and Y. K. Kim. 1997. Description on five species of *Arthrobotrys* (Corda) Schenck, Kendrick & Pramer in Korea and their key. RDA. J. Crop Protection 39:33–41.
- Kim, D. G., S. G. Bae and Y. S. Shin. 2001. Distribution of nematophagous fungi under different habitats. Korean J. Mycol. 29:123–126.
- Kim, D. G., Y. H. Ryu, and H. G. Hwang. 2006. First report of two nematode–trapping fungi, *Monacrosporium ullum* sp. nov. and *Arthrobotrys amerospora*, from Korea. Plant Pathol. J. 22:174–178.
- ???
- Kinloch, R. A. and K. Hinson. 1972. The Florida program for evaluating soybean (*Glycine max* L. Merr.) genotypes for susceptibility to root–knot nematode disease.

- Proc. Soil Crop Sci. Soc. Florida 32:173–176.
- Lackey, B. A., A. E. Muldoon, and B. A. Jaffee.. 1993. Alginate pellet formulation of *Hirsutella rhossiliensis* for biological control of plant–parasitic nematodes. *Biological–Control*. 3:155–160
- Larsen, M., J., S. A. Wolstrup, J. Henriksen, J. Gronvold, and P. Nansen. 1992. In vivo passage through calves of nematophagous fungi selected for biocontrol of parasitic nematodes. *J. Helmin.* 66:137–141.
- Lee, J. K., Kim, D. G. and Lee, Y. K. 2000. Comparison of predacity of nematode predatory fungi against *Meloidogyne incognita*. *Korean J. Applied Entomology* 39:111–115.
- Lemaire J. M., C. alabouvette, P. Davet and R. Tramier. 1986. Problem posed by the large scale application of microorganisms for biocontrol of soil–borne plant pathogens. *Symbiosis*. 2:287–302.
- Lewis. J. A., G. C. Papavizas and R. D. Lumsden. 1991 A new formulation system for the application of biocontrol fungi to soil. *Biocontrol Science and Technology*. 1:59–69.
- Linford, M. B. 1937. Stimulated activity of natural enemies of nematodes. *Science* 85(2196):123–124.
- Linford, M. B. and F. Yap. 1939. Root–knot nematode injury restricted by a fungus. *Phytopathology* 29:596–609.
- Linford, M. B., F. Yab, and J. M. Oliveira. 1937. Reduction of soil populations of the root–knot nematode during decomposition of organic matter. *Soil sci.* 45:127–141.
- Liu, X. Z., L. Ding, X. Y. Wu, and C. Y. Shen. 1992. Nematophagous fungi in China. *Mycosystema* 5:117–126.
- Mankau, R. 1961. An attempt to control root–knot nematode with *Dactylaria thaumasia Drechsler* and *Arthrobotrys arthrobotryoides* Lindau. *Plant Dis. Repr.* 45:164–166.
- Mankau, R. 1962. Soil fungistasis and nematophagous fungi. *Phytopathol.* 52:611–615.
- Meyer–SLF. 1994. Effects of a wild type strain and a mutant strain of the fungus

- Verticillium lecanii on Meloidogyne incognita populations in greenhouse studies. *Fundamental and Applied Nematology*. 1994, 17:6, 563–567.
- Miao, Z. Q., Z. Z. Liu, S. D. Li, and M. X. He. 2003. *Dactylella pseudoclavata* sp. nov., a new nematode-trapping fungus. *Can. J. Bot.* 81:452–456.
- Nansen. P., M. Larsen, J. Gronvold, J. Wolstrup, A. Zorn, and S. A. T. I. Henriksen. 1995. Prevention of clinical trichostrongylidosis in calves by strategic feeding with the predacious fungus *Duddingtonia flagrans*. *Parasitol. Res.* 81:371–374.
- Nordbring-Hertz, B. 1972. Scanning electron microscopy of the nematode-trapping organs in *Arthrobotrys oligospora*. *Physiol. Plant.* 26:279–284.
- Nordbring-Hertz, B. 1973. Peptide-induced morphogenesis in the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Physiol. Plant.* 29:223–233.
- Oostendorp, M. and R. A. Sikora. 1989. Seed-treatment with antagonistic thizobacteria for the suppression of *Heterodera schachtii* early root infection of sugar beet. *Revue Nematol.* 12:77–83.
- Pelagatti O., and A. Piccolo. 1990. Further considerations on the use of R 350 with a base of *Arthrobotrys irregularis*. *Redia* 73:229–242.
- Persson Y., and E. Friman. 1993. Intracellular proteolytic activity in mycelia of *Arthrobotrys oligospora* bearing mycoparasitic or nematode trapping structures. *Exp. Mycology* 17:182–190.
- Pfister D. H. 1994. *Orbilia fimicola*, a nematophagous discomycete and its *Arthrobotrys* anamorph. *Mycologia* 86:451–453.
- Pramer, D., and N. R. Stoll. 1959. Nemin: a morphogenic substance causing trap formation by predacious fungi. *Science* 129:966–967.
- Rhoades, H. L. 1976. Effects of *Indigofera hirsuta* on *Belonolaimus longicaudatus*, *Meloidogyne incognita*, and *M. javanica* and subsequent crop yield. *Plant Dis. Rep.* 60:384–386.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The Neighbor-Joining Method : A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4:406–425.

- SAS, 1990. *SAS/STAT User's Guide*. Version 6. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Sayre, R. M. 1980. Promising organisms for biocontrol of nematodes. *Plant Dis.* 64:527–532.
- Schenck, S., Kendrick, W. B. and Pramer, D. 1977. A new nematode-trapping hyphomycete and a reevaluation of *Dactylaria* and *Arthrobotrys*. *Can. J. Bot.* 55:977–985.
- Seoul Agricultural & Marine Products Corp. 2008. <http://www.garak.co.kr/united/index.jsp>.
- Soprunov, F. F. 1958. (Predacious fungi – Hyphomycetes and their application in the control of pathogenic nematodes. Academy of Sciences of the Turkmen SSR, 1958, Translated from Russian). 292 p.
- Southey, J. F. 1986. *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes*. London: Her Majesty's Stationery Office. London.
- Stirling G. R., L. J. Smith, K. A. Licastro, and L. M. Eden. 1998. Control of root-knot nematode with formulation of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys dactyloides*. *Biological control* 11:224–230.
- Stukus, P. E. 1997. *Investigating Microbiology: A Laboratory Manual for General Microbiology*. Harcourt Brace & Co. Florida.
- Taylor, A. L. and J. N. Sasser. 1978. *Biology, identification and control of root-knot nematodes (Meloidogyne species)*. North Carolina State Univ. Raleigh. 111 pp.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak., F. Jeanmougin, and D. G. Higgins. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24:4876–4882.
- Tunlid, A., H. B. Jansson, and B. Nordbring-Hertz. 1992. Fungal attachment to nematodes. *Mycol. Res.* 96:401–412.
- Wimber, D. B., and T. W. K. Young. 1983. Septum structure in *Dactylella lysipaga*. *Mycologia* 75:174–175.
- Yoo, K. H., Y. H. Choi, H. H. Lee. 1981. Isolation of nematode destroying fungi.

Korean J. Mycol. 9:193~197.

- 김지인, 이해운, 김충희, 한상찬. 1992. 뿌리혹선충의 알기생균 및 포식균의 분포와 동정. 농사시험연구논문집 (작물보호편) 34:91-95.
- 김희규, 정미정, 추호열, 박창석. 1988. 선충기생 천적 진균의 접종원 농도와 온도조건에 따른 선충감염 및 집단감소효과. 한국응용곤충학회지 27:159-164.
- 농촌진흥청. 2006. 2005소득자료 전국2 (작목별경영비및소득). 92pp.
- 박소득, 추연대, 정기채, 심용구, 최영연. 1993. 몇종의 선충천적 진균과 화학약제를 이용한 약용작물 뿌리혹 선충 방제효과 검토. 한국응용곤충학회지 32:105-114.
- 박진숙, 박용근. 1984. *Arthrobotrys conoides*에 의한 선충포획의 전자현미경적 연구. 한국균학회지 22:19-28.
- 이 지열. 1982. 균학. 버섯 재배. 대광문화사. page 123-125. 473 page. 서울, 한국.
- 정미정, 김희규. 1988. 뿌리혹 선충에 대한 기생 천적 진균의 분리 및 이들의 생장에 미치는 환경조건. 한국응용곤충학회지 27:149-158.
- 정미정, 장정식, 김희규, 박창석, 추호열. 1993. 뿌리혹 선충에 대한 선충 천적 기생 균의 생물적 방제 효과. 한국응용곤충학회지 32:382-388.
- 한상찬, 이해운, 김지인. 1990. 식물기생선충의 천적미생물 수집 및 분류, 동정. 한국응용곤충학회지 29:148 (Abstract).

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.