

최 중
연구보고서

*Pasteuria penetrans*을 이용한 원예작물뿌리혹선충
방제기술 개발

Suppression of *Meloidogyne* spp. Using *Pasteuria*
penetrans in Horticulture

연구기관
강원대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “*Pasteuria penetrans*을 이용한 원예작물뿌리혹선충 방제기술 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004 년 8월 23일

주관연구기관명 : 강원대학교

총괄연구책임자 : 임 춘 근

세부연구책임자 : 허 장 현

세부연구책임자 : 최 신 건

연 구 원 : 주 영 철

박 덕 환

홍 인 표

박 동 식

김 성 수

이 상 민

협동연구기관명 : 농촌진흥청

원예연구소

세부연구책임자 : 조 명 래

연 구 원 : 한 혜 립

요 약 문

I. 제 목

*Pasteuria penetrans*을 이용한 원예작물뿌리혹선충 방제기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

뿌리혹선충(*Meloidogyne* spp.)은 토양속에서 서식하면서 원예작물뿌리에 침입하여(Fig. 1) 혹(Gall)을 형성하며, 가해를 받은 작물로 하여금 영양결핍증상을 나타내게 되며 심할 경우 고사를 시키기도 한다(Fig. 2).

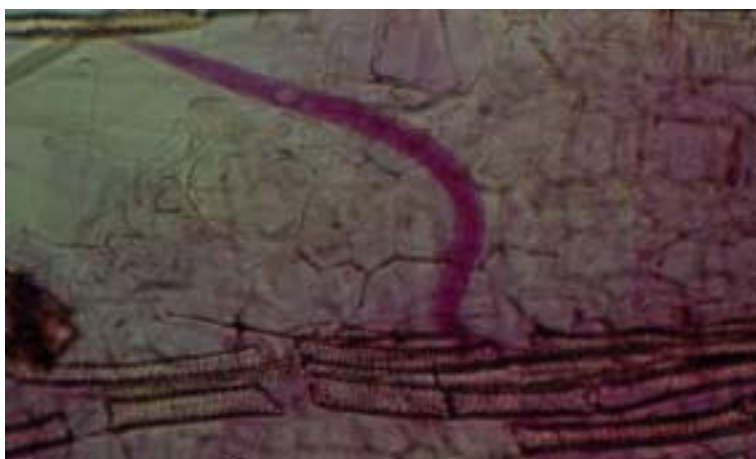


Fig. 1. Nematode juvenile penetrate plant root tissue.

뿌리혹선충은 거의 모든 원예작물에 피해를 주고있는 식물 선충으로써 시설재배면적이 증가되어 연작재배가 가능하여 피해가 급증하고 있다. 원예작물(과채류)재배면적 76,453ha 로써 그 중 약 70%를 차지하는 52,949ha가 시설재배를 하고 있으며, 시설재배지에서 뿌리혹선충 검출농가가 50%이상으로 조사되어 뿌리혹선충방제기술개발을 요구하는 농민의 수요가 급증하고 있다. 뿌리혹선충방제를 위한 저항성품종개발이 매우 어려우며, 태양열소독

이나 토양개량과 같은 물리적방법의 방제는 비용이 많이 필요하고 3년에 한번씩 진행하여야 한다. 현재 뿌리혹선충방제제로 등록되어 있는 화학방제제의 경우, ① 대부분의 선충제는 유기인제 또는 카바메이트계로 고독성이기에 사용농민에게 매우 유해함 ② 토양잔류시 식물체내로 이행하는등 환경문제를 심각하게 유발시킴 ③ 살선충농약의 대부분은 토양훈증제로 토양내의 거의 모든 생물체를 죽임으로써, 유용생물체의 밀도가 급감하게 되어 토양의 황폐화를 가속화 ④ 대분의 선충제의 경우, 식물에 약해를 유발하기에 재배기간동안에는 사용하지 못하므로 작기 중 뿌리혹선충의 피해가 발생하여도 대처방안이 없는 등 단점을 가지고 있다. 따라서 작기 중에도 사용할 수 있으며, 환경도 보호할 수 있는 생물학적 방제제의 개발이 시급한 실정이다.



Fig. 2 The melon root of damaged by *Meloidogyne* spp.

현재 세계에서 뿌리혹선충을 방제하는데 가장 각광을 받고 있는 생물학적 방제제로 *Pasteuria*속 세균으로, 일본에서는 미생물농약으로 등록되어 판매되고 있다(Fig. 3). 그러나 국내에서는 아직 *Pasteuria*세균이 뿌리혹선충방제미생물제로 등록되어 있지 않고 있어 그러한 원인으로 본 과제에서는 수년의 방제시험을 통하여 뿌리혹선충 방제효과가 입증된 국내분리 *Pasteuria*세균을 산업화할 수 있는 기술을 개발하여, 농민들에게 보급하는 것을 목표로 하고 있다.



Fig. 3. The Product of *Pasteuria penetrans* in Japan

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. *P. penetrans*의 분류 및 조기동정기술개발

- 가. 유전자분석을 통한 분류체계확립
- 나. 단백질 분석에 의한 분류체계 확립
- 다. DNA probes를 이용한 세균의 조기동정 및 monitoring 기술개발

2. *P. penetrans*의 제형기술개발 및 안전성평가

- 가. *P. penetrans* 제형에 따른 방제효과 비교검정
- 나. *P. penetrans* 제형이 세균의 물리 및 화학적 안정성에 미치는 영향
- 다. 제형이 *Pasteuria penetrans*의 생존율에 미치는 영향
- 라. 안전성평가

3. *P. penetrans*의 생물학적 특성분석 및 대량배양기술 개발

- 가. *P. penetrans*과 뿌리혹선충간의 생물학적 특성분석
- 나. *P. penetrans*의 효과적인 선충부착기술개발
- 다. 토마토 뿌리를 이용한 세균의 대량배양기술개발

라. 형질전환된 토마토 모상근을 이용한 세균의 대량배양기술개발

4. 뿌리혹선충의 분류 및 조기동정기술개발

가. 뿌리혹선충의 분포 조사 및 뿌리혹선충의 단백질 및 효소분석에 의한 분류

나. 뿌리혹선충의 DNA 추출기술 개발 및 RAPD, RFLP 분석을 통한 유전자 진단체계의 개발

다. 뿌리혹선충의 PCR-RFLP 분석을 통한 유전자 진단체계의 개발

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. *Pasteuria*세균의 분류 및 조기동정기술개발

가. *P. penetrans*를 이용한 뿌리혹선충 방제를 위하여 *Pasteuria*세균의 분류체계를 확립하고, *Pasteuria*세균의 조기진단기술개발을 개발하였다.

나. 실험에 사용된 *P. penetrans* KW-1, KW-2의 유연관계를 분석한 결과 국내에서 분리된 두 균주(KW-1, KW-2)간에는 91%의 유연관계를 나타내었고, GenBank에 등록된 AF375881(*P. penetrans*, 미국)과 AF077672(*P. penetrans*, 미국)는 99%의 높은 유연관계를 나타내어 기존 연구에서 발표된 *Pasteuria* spp.와는 유전적으로 다양성을 가지는 것으로 확인 하였다.

다. *Pasteuria* 특이 probe를 선별하기 위하여 *P. penetrans* chromosomal DNA에서 증폭된 것을 입증할 수 있는 16S rRNA 유전자에서 특이적인 염기서열을 확인하였고, PasF-R을 제작하여, 특이 Probe로 사용 가능한 것을 확인 하였다.

라. 토양 sample에서의 직접 검출을 위하여 특이 probe를 시험 한 결과, 토양 내에서의 *Pasteuria* spore 분리법을 보완 한다면, 앞으로 토양에서의 *Pasteuria* spp.의 밀도분석에 사용할 수 있을 것으로 보인다.

2. *Pasteuria*세균의 제형기술개발 및 안전성평가

가. 기주식물인 참외, 상추, 토마토에 *P. penetrans*를 이용하여 *Meloidogyne* spp.에 대한 방제효과실험을 진행한 결과 모두 일정한 방제효과를 나타내었으며, 이러한 방제효과는 작물의 연작 재배 시 방제효과가 상승하는 것으로 나타났다.

나. *P. penetrans* KW-1은 10~70℃의 온도 범위와 pH 4~10의 범위 내에서 안전하게

생존할 수 있는 것으로 관찰되어 일반적인 온도와 pH 조건에서 안전하게 생존할 수 있어 다양한 토양조건에서 쉽게 정착되어 뿌리혹선충을 방제할 수 있을 것으로 사료한다.

다. *P. penetrans* KW-1 수화제를 이용하여 뿌리혹선충의 방제효과를 검정한 결과 78% 이상 나타났으며, 제형화를 실시하여 뿌리혹선충의 활성을 더욱 오래 유지할 수 있을 것으로 사료된다.

라. *P. penetrans* KW-1 수화제를 대상동물인 rat(SD)에 경구주입식으로 1.7×10^8 endospores의 *P. penetrans* KW-1 시 7, 14, 21일 후 체내의 소장, 대장, 위 등 장기에 모두 잔존하지 않았으며, 출혈이나 갈변증상이 나타나지 않았고, rat의 입주위에 혈흔이나, 혈루증, 항문이나 생식기 주위, 털의 변색이 발견되지 않았다.

마. 대상동물인 rat(SD)에 경구주입식으로 1.7×10^8 endospores *P. penetrans* KW-1 투여 후 1일차 분변에서 92%이상의 세균이 배출되는 것을 확인하였으며, 7, 14, 21일차 분변에서는 모두 발견되지 않았다. 또한 실험에서 *P. penetrans* KW-1의 rat에 대한 LD₅₀은 $> 1.7 \times 10^8$ endospores인 것으로 나타났다.

3. *Pasteuria* 세균의 생물학적 특성분석 및 대량배양기술 개발

가. 포장에서 토마토를 이용하여 *P. penetrans*를 대량 증식 시, 먼저 *P. penetrans*와 *Meloidogyne* spp.을 50℃ 조건에서 *P. penetrans*을 60 분간 활성화한 다음, *P. penetrans*을 뿌리혹선충과 혼합하여 centrifuge (3000rpm, 5분)한 후 shaking (140rpm, 12hrs)하여 효과적인 부착을 유도할 수 있다.

나. *P. penetrans*가 부착된 *Meloidogyne* spp.을 토양과 혼합하여 15,000 J2 수준으로 12주령의 토마토뿌리 주변에 주입하면 40-50일 후 대량의 *P. penetrans*를 수확할 수 있다.

다. 토마토의 종자를 이용하여 멸균상태에서 어린잎을 배양한 후 *agrobacterium rhizogene* (strain A4)을 이용하여 토마토 모상근을 획득하였다. *P. penetrans*과 뿌리혹선충을 shaking (140rpm, 12hrs)하여 부착시킨 후 0.5% sodium hypochlorites solution을 이용하여 표면살균한 다음 토마토의 모상근 주위에 주입하여 대량의 *P. penetrans*을 증식할 수 있었다.

라. 기내에서 모상근을 이용하여 *P. penetrans*을 증식하는데 35일이 소요되어 포장에서 소요되는 49일에 비하여 12일간 앞당겨 대량 증식할 수 있었다.

마. 모상근을 이용하여 *P. penetrans*을 증식할 수 있으나 배지가 쉽게 오염되고, 모상근이 갈변하면서 영양부족에 따른 증상을 나타내는 등 재현성이 낮은 문제점과 고비용이

란 단점이 작용하고 있어 더욱 심도있는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

4. 뿌리혹선충의 분류 및 조기동정기술개발

1) 뿌리혹선충 유충 및 암컷의 DNA 분석을 통한 신속정확한 동정체계가 확립하여 국내에서 뿌리혹선충의 동정 시 주로 암컷, 수컷 및 유충의 형태적 특징이나 판별기주식물을 이용한 동정체계를 개선하였다.

2) 국내에 분포하는 뿌리혹선충류에 대해 암컷의 효소표현형을 이용한 정확한 종 동정체계를 확립하여 DNA polymorphism을 이용한 PCR 동정체계를 확립함으로써 국내 분포 뿌리혹선충류의 신속하고 정확한 동정기술을 개발하였다.

3) 토양 또는 식물체 뿌리로부터 뿌리혹선충 암컷 또는 유충이 검출될 경우 암컷에 대해서는 효소표현형 동정법, 유충에 대해서는 PCR동정법을 활용하여 종 동정에 필요한 소요시간을 단축하였다.

따라서 금후 원예작물 및 기타 작물에서의 뿌리혹선충 화학적 방제기술개발, 천적을 이용한 생물적방제기술 개발, 저항성품종의 육성, 검역 시 뿌리혹선충 동정방법 적용 등 각 분야에서 신뢰도 높은 뿌리혹선충 동정체계를 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

SUMMARY

I . Title

Suppression of *Meloidogyne* spp. Using *Pasteuria penetrans* in Horticulture

II . Introduction

Root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp., are frequently found in the warm and hot climatic areas and the host range is extremely wide. *M. incognita* is the one of the economically important nematodes, which is able to reproduce in more than 2,000 plant species (Jung and Wyss, 1999). Root-knot nematodes invade plant roots at infective second-stage juveniles (J2) and hatch eggs by *Meloidogyne* females, which retained in the protective gelatinous egg sac. The J2 of root-knot nematodes have a less robust stylet and hence, after root invasion, they migrate intercellularly between cortical cells, first towards the root tip, where they turn round in order to reach the vascular cylinder (Wyss et al., 1992; Jung and Wyss, 1999).

In the past, nematodes had been controlled in the field by treating nematicides, wide crop rotation and growing resistant crops. However, recently treatment of nematicides has been prohibited because of their highly toxic components (Jung and Wyss, 1999).

P. penetrans destroy nematodes by their parasitic behaviour while the non-parasitic rhizobacteria reduce nematode populations by colonizing the rhizosphere of the host plant. Previous work on *P. penetrans* (Sayre and Starr, 1985), a hyperparasite of root-knot nematodes, indicated that while a nematode resistant tomato prevent to increase of root-knot nematode populations it would not favor the establishment of *P. penetrans* and the bacterium has to be applied before planting a susceptible crop to maximize its effect (Oostendrop et al., 1991; Stirling, 1991; Tzorzakakis and Gowen, 1994; Chen et al., 1996).

Therefore, the main objectives of this research work were to identify the *Pasteuria*

spp. and *Meloidogyne* spp., their classification, early diagnosis method for disease symptoms, development, selection and establishment of optimum mass production system of *Pasteuria* spp. for controlling the root-knot nematode. These research works were performed in *in vitro* and *in vivo* tests during last three years.

III. Research scopes and perspectives

1. Classification of *Pasteuria* spp. and development of rapid identification techniques
 - a. Taxonomic position establishment by gene analysis
 - b. Taxonomic position establishment by protein analysis
 - c. Generation of Rapid identification and monitoring technique using DNA probe

2. Development of formulation for *P. penetrans* and safety evaluation
 - a. Suppression effect according formulations of *P. penetrans*
 - b. Viability of *P. penetrans* under physio-chemical conditions
 - c. Viability of *P. penetrans* according formulation type
 - d. Safety evaluation of *P. penetrans*

3. Analysis characteristic and mass production of *P. penetrans*
 - a. Analysis characteristic of *P. penetrans* with *Meloidogyne* spp.
 - b. Development of techniques for *P. penetrans* attachment with *Meloidogyne* spp.
 - c. Mass production of *P. penetrans* with tomato *in vivo*
 - d. Mass production of *P. penetrans* with hairy root of tomato *in vitro*

4. Classification of *Meloidogyne* spp. and development of rapid identification technique
 - a. Distribution of root-knot nematodes and their classification based on protein and enzyme analyses
 - b. Development of DNA isolation method for root-knot nematode and molecular diagnosis using RAPD and RFLP methods
 - c. Development of molecular diagnosis using PCR-RFLP

IV. Results and suggestions

1. Classification of *Pasteuria* spp. and development of rapid identification technique

a. Due to stagnancy in the horticultural cultivation areas, nematode accumulation in the soils has occurred predominantly in the recent years. The biological control of nematodes using *Pasteuria* spp. is an eco-friendly approach for their control. The method of their classification and identification was established.

b. The genetic homology between two local *Pasteuria* spp. kw-1 and kw-2 was found to be 91%, where as that of two species deposited in GenBank, (*P. penetrans*, AF375881 and AF 077672) was found to be 99%. This implies that the local *Pasteuria* spp. KW-1 and KW-2 were genetically heterogeneous to that of the previously deposited species.

c. In order to prepare specific probe from *Pasteuria* spp., the 16s rRNA gene was amplified from chromosomal DNA of *Pasteuria* and 'Pas F-R' sequence was used as prospective probe for its identification.

d. Identification of *Pasteuria* spp. directly from soil was attempted, but failed to obtain any results. However, the detection of *Pasteuria* spp. using the probe is possible if there would be an easy method for *Pasteuria* spp. isolation from soil samples.

2. Development of formulation for *P. penetrans* and Safety evaluation

a. *P. penetrans* can be successfully suppressed *Meloidogyne* spp. in the melon, lettuce and tomato and this suppression effect will increase in the repeated cultivation.

b. *P. penetrans* was viable under wide range of pH levels and temperatures, and this bacteria can be used for biological control of *M. arenaria*.

c. The suppression effect of *P. penetrans* KW-1 after formulation was above 77%, it is similarly the suppression effect of *P. penetrans* KW-1 endospores.

d. When administration of 1.7×10^8 endospores *P. penetrans* KW-1 WP to rat (SD), there were no residue in the small intestine, large intestine and paunch, no phenomena of congestion, decoloration, bleeding around the rat's mouth, congestion, and no discoloration near the anus and genital organ after 7, 14, 21 days.

e. After the administration of 1.7×10^8 endospores *P. penetrans* KW-1 to SD rat, above 92% bacteria were exhausted in the feces at the first day, and no bacteria were found on the 7, 14, 21 day's feces. The LD₅₀ value of *P. penetrans* KW-1 in rat was above 1.7×10^8 endospores.

3. Analysis characteristic and mass production of *P. penetrans*

a. In order to mass produce *P. penetrans* with tomato in the field, firstly *P. penetrans* was activated for 60 min at 50°C mixed with *Meloidogyne* spp., and the mixture of *P. penetrans* and root knot nematode was centrifuged (3000rpm, 5min), then shaking at 140rpm for 12hrs, effective attachment was obtained.

b. *Meloidogyne* spp. attached with *P. penetrans* were mixed with soil, and injected to 12-weeks-old tomato root at the level of 15,000 J2. After 40-50 days, mass *P. penetrans* were harvested.

c. Tomato hairy root were obtained with the method of transformation by *Agrobacterium rhizogene* (strain A4). After attachment by shaking at 140rpm for 12hrs, *P. penetrans* and root knot nematode were sterilized with 0.5% sodium hypochlorites solution, then injected into 12-weeks-old tomato root around, mass *P. penetrans* were harvested.

d. Proliferation of *P. penetrans in vitro* by hairy-root needed 35 days, it is faster for about 12 days than that proliferation in the field which needed 49 days.

e. Although it is possible to proliferate the *P. penetrans* with hairy root, there were several demerits such as contamination of medium, deficiency of nutrition after the decoloration of hairy root, and low re-appearance, high-cost, it is necessary to study deeply in the future.

4. Development of techniques for rapid and precise identification of root-knot nematodes

a. Survey was conducted on the distribution of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in vegetable production areas in Korea. Soil samples were collected from greenhouses in Sungju (Kyungpook), Pusan (Kyungnam), Yeosu and Pyeongtaek (Kyungki), and Goheung (Chonnam) provinces. Using the female enzyme phenotypes of

MDH and EST, the four major root-knot nematodes, *M. incognita* (MI), *M. arenaria* (MA), *M. hapla* (MH), and *M. javanica* (MJ) could be identified. The major species of root-knot nematode found in Sungju area were MA, MI, and few unknown species of *Meloidogyne* sp., and in Pusan area were MI and unknown species of *Meloidogyne*. In Goheung area, MH and MJ were identified. MH and MA were detected in Yeosu and MJ and MI were found in Pyeongtak area.

b. Isozyme phenotype analysis was conducted for the identification of major *Meloidogyne* species. Two to five fresh females of root-knot nematodes were isolated from infected plant roots and used for isozyme phenotype analysis. Electrophoresis was performed and esterase and malate dehydrogenase were stained. The phenotypic characteristics of esterase and malate dehydrogenase could separate the 4 major root-knot nematode species and unknown species of *Meloidogyne* isolates in Korea.

c. Partial mitochondrial DNA from single female or second stage juvenile (J2) of root-knot nematodes was amplified by PCR (Polymerase chain reaction), and the further analysis by RFLP (Restriction fragment length polymorphism) provided discriminatory profiles useful for 4 major *Meloidogyne* species, MA, MI, MJ, and MH in Korea. The sizes of PCR product (1.7 kb and 500 bp) and restriction patterns obtained from single female nematodes were consistent with the results from single J2 within the same species. MH was easily differentiated from the two other root-knot nematode species by the size of the PCR products. A fragment of 500 bp was generated from MH, while MA, MI, and MA produced an 1.7 kb fragment in PCR amplification. MA and MJ could be distinguished from MI by analysis of restriction enzyme digestion by Hinf I or Alu I. Hinf I had no digestion site in mitochondrial DNA of MA and MJ; however, it generated 1.3 kb and 400 bp fragments in MI. Alu I digestion resulted in 1 kb, 460 bp, and 250 bp fragments in MA and MJ, but showed different digestion patterns in MI by generating 800 bp, 460 bp, 250 bp, and 150 bp fragments. MA and MJ could be separated by Mse I digestion in that MJ produced the 85 bp while MA showed 160 bp in the biggest size of band.

Contents

Summary	2
Chapter 1. Introduction	42
Section 1. Necessity of research	42
Section 2. Object and content of research	72
Chapter 2. Present situation of International technical development	8
Chapter 3. Perspectives of research and Results	92
Section 1. Classification of <i>Pasteuria</i> spp. and development of rapid identification technique	30
1. Introduction	31
2. Materials and methods	33
1) Taxonomic position establishment by gene analysis	33
2) Taxonomic position establishment by protein analysis	35
3) Generation of Rapid identification and monitoring technique using DNA probe	36
3. Results and discussion	37
1) Taxonomic position establishment by gene analysis	37
2) Taxonomic position establishment by protein analysis	46
3) Generation of Rapid identification and monitoring technique using DNA probe	47
4. Summary	52
Section 2. Development of formulation for <i>P. penetrans</i> and Safety evaluation	53
1. Introduction	54
2. Materials and methods	56

1) Suppression effect according formulations of <i>P. penetrans</i>	56
2) Viability of <i>P. penetrans</i> under physio-chemical conditions	58
3) Viability of <i>P. penetrans</i> according formulations	59
4) Safety evaluation of <i>P. penetrans</i> WP	60
3. Results and discussion	63
1) Suppression effect according formulations of <i>P. penetrans</i>	63
2) Viability of <i>P. penetrans</i> under physi-chemical conditions	69
3) Viability of <i>P. penetrans</i> according formulations	71
4) Safety evaluation of <i>P. penetrans</i>	74
4. Summary	77
Section 3. Analysis characteristic and mass production of <i>P. penetrans</i>	78
1. Introduction	79
2. Materials and methods	82
1) Analysis characteristic of <i>P. penetrans</i> with root-knot nematode	82
2) Development of techniques for <i>P. penetrans</i> attachment with root-knot nematode	82
3) Mass production of <i>P. penetrans</i> with tomato <i>in vivo</i>	83
4) Mass production of <i>P. penetrans</i> with hairy root of tomato <i>in vitro</i>	86
3. Results and discussion	87
1) Analysis characteristic of <i>P. penetrans</i> with root-knot nematode	87
2) Development of techniques for <i>P. penetrans</i> attachment with root-knot nematode	88
3) Mass production of <i>P. penetrans</i> with tomato <i>in vivo</i>	89
4) Mass production of <i>P. penetrans</i> with hairy root of tomato <i>in vitro</i>	98
4. Summary	101
Section 4. Development of techniques for rapid and precise identification of root-knot nematodes	102
1. Introduction	103
2. Materials and methods	105
1) Distribution of root-knot nematode and classification based on protein and	

enzymes analyses	105
2) Development of DNA isolation methods for root-knot nematode and molecular diagnosis using RAPD and RFLP methods	106
3. Results and discussion	108
1) Distribution of root-knot nematode and classification based on protein and enzymes analyses	108
2) Development of DNA isolation methods for root-knot nematode and molecular diagnosis using RAPD and RFLP methods	113
3) Development of molecular diagnosis using PCR-RFLP	116
4. Summary	126
Chapter 4. Research Achievement and its contribution	721
Chapter 5. Recommendation	8
Chapter 6. Reference	12

목 차

요 약 문	2
제 1장 연구개발과제의 개요	24
제 1절 연구개발의 필요성	24
제 2절 연구개발의 목적과 범위	27
제 2장 국내외 기술개발 현황	28
제 3장 연구개발 수행내용 및 결과	29
제 1절 <i>P. penetrans</i> 의 분류 및 조기동정기술개발	30
1. 서론	31
2. 재료 및 방법	33
1) 유전자분석을 통한 분류체계 확립	33
2) 단백질 분석에 의한 분류체계 확립	35
3) DNA probes를 이용한 세균의 조기동정 및 monitoring 기술개발	36
3. 결과 및 고찰	37
1) 유전자분석을 통한 분류체계 확립	37
2) 단백질 분석에 의한 분류체계 확립	46
3) DNA probes를 이용한 세균의 조기동정 및 monitoring 기술개발	47
4. 결과 요약	52
제 2절 <i>P. penetrans</i> 의 제형기술개발 및 안전성평가	53
1. 서론	54
2. 재료 및 방법	56
1) 세균의 제형에 따른 방제효과 비교검정	56
2) 세균의 제형이 세균의 물리 및 화학적 안정성에 미치는 영향	58
3) 제형이 세균의 생존율에 미치는 영향	59

4) 안전성평가	60
3. 결과 및 고찰	63
1) 세균의 제형에 따른 방제효과 비교검정	63
2) 세균의 제형이 세균의 물리 및 화학적 안정성에 미치는 영향	69
3) 제형이 세균의 생존율에 미치는 영향	71
4) 안전성평가	74
4. 결과 요약	77
제 3절 <i>P. penetrans</i>의 생물학적 특성분석 및 대량배양기술 개발	78
1. 서론	79
2. 재료 및 방법	82
1) <i>P. penetrans</i> 과 뿌리혹선충간의 생물학적 특성분석	82
2) 세균의 효과적인 선충부착기술개발	82
3) 토마토 뿌리를 이용한 세균의 대량배양기술개발	83
4) 형질전환된 토마토 모상근을 이용한 세균의 대량배양기술개발	86
3. 결과 및 고찰	87
1) <i>P. penetrans</i> 과 뿌리혹선충간의 생물학적 특성분석	87
2) 세균의 효과적인 선충부착기술개발	88
3) 토마토 뿌리를 이용한 세균의 대량배양기술개발	89
4) 형질전환된 토마토 모상근을 이용한 세균의 대량배양기술개발	98
4. 결과 요약	101
제 4절 뿌리혹선충의 분류 및 조기동정기술개발	102
1. 서론	103
2. 재료 및 방법	105
1) 뿌리혹선충의 분포 조사 및 뿌리혹선충의 단백질 및 효소분석에 의한 분류	105
2) 뿌리혹선충의 DNA 추출기술 개발 및 RAPD, RFLP 분석을 통한 유전자 진단체계의 개발	106
3. 결과 및 고찰	108
1) 뿌리혹선충의 분포 조사 및 뿌리혹선충의 단백질 및 효소분석에 의한 분류	108

2) 뿌리혹선충의 DNA 추출기술 개발 및 RAPD, RFLP 분석을 통한 유전자 진단체계의 개발	113
3) 뿌리혹선충의 PCR-RFLP 분석을 통한 유전자 진단체계의 개발	116
4. 결과 요약	126

제 4 장 목표달성도 및 관련분야의 기여도	127
-------------------------------	-----

제 5 장 연구개발결과의 활용계획	130
--------------------------	-----

제 6 장 참고문헌	132
------------------	-----

List of figure

Fig. 1.	Nematode juvenile penetrance plant root tissue	2
Fig. 2.	The melon root of damaged by <i>Meloidogyne</i> spp.	3
Fig. 3.	The Product of <i>Pasteuria penetrans</i> in Japan	4
Fig. 4.	Root-knot Nematode	24
Fig. 5.	Damaged root of tomato by Root-Knot nematode	25
Fig. 6.	<i>Pasteuria penetrans</i>	26
Fig. 7.	Isolation of <i>Pasteuria</i> spore. using NaBr density gradient centrifugation	37
Fig. 8.	PCR amplification of 16s rRNA gene using <i>P. penetrans</i> KW-1 , KW-2	38
Fig. 9.	<i>Pasteuria penetrans</i> kw-1 16s rRNA gene	39
Fig. 10.	<i>Pasteuria penetrans</i> kw-2 16s rRNA gene	40
Fig. 11.	Phylogenic tree of <i>Pasteuria</i> spp. based on 16S rRNA gene sequences	40
Fig. 12.	PCR of <i>Pasteuria</i> sp. ITS region	41
Fig. 13.	<i>Pasteuria</i> spp. KW-1 ITS(large fragment 518bp)	41
Fig. 14.	<i>Pasteuria</i> spp. KW-1 ITS(small fragment 407bp)	41
Fig. 15.	<i>Pasteuria</i> spp. KW-2 ITS(large fragment 516bp)	42
Fig. 16.	<i>Pasteuria</i> spp. KW-2 ITS(small fragment 407bp)	42
Fig. 17.	comparison of restriction enzyme recognition site	43
Fig. 18.	<i>Pasteuria penetrans</i> KW-1 RAPD band pattern	44
Fig. 19.	Cloning of lane 6 RAPD products (0.5~3.0 kb)	44
Fig. 20.	SDS PAGE analysis of <i>Pasteuria Penetrans</i> KW-1 , KW-2	46
Fig. 21.	Phylogenic tree of <i>Pasteuria</i> sp. and various strains based on 16S rRNA gene sequences	49
Fig. 22.	(A) PCR product of 16S rRNA gene. (B) PCR amplification of specific sequence using <i>Pasteuria</i> specific probe. (C) Southern hybridization of(B)	50
Fig. 23.	PCR amplification of specific sequence using various <i>Pasteuria</i> spore concentration	51
Fig. 24.	Attachment of <i>Pasteuria penetrans</i> on root-knot nematode juvenile cuticle	54
Fig. 25.	The picture of <i>Pasteuria penetrans</i> endospores	79

Fig. 26. Life cycle of the root-knot Nematode and <i>Pasteuria penetrans</i>	80
Fig. 27. Mass production of <i>Pasteuria penetrans</i> KW-2 on <i>Meloidogyne arenaria</i> according different attachment methods on 8 weeks old tomato	88
Fig. 28. Mass production of <i>Pasteuria penetrans</i> KW-1 and KW-2 on <i>Meloidogyne arenaria</i> 3,000 on 8 weeks old tomato	89
Fig. 29. The picture of mass production of <i>Pasteuria penetrans</i> KW-1 on <i>Meloidogyne arenaria</i> 3.000 after treated 60 minutes under different temperature on 8 weeks old tomato.	90
Fig. 30. Mass production of <i>Pasteuria penetrans</i> KW-1 on <i>Meloidogyne arenaria</i> 3.000 after treated 60 minutes under different temperature on tomato	91
Fig. 31. The picture of mass production of <i>Pasteuria penetrans</i> KW-1 on <i>Meloidogyne arenaria</i> 3.000 after treated 60 minutes under different pH on 8 weeks old tomato	92
Fig. 32. Mass production of <i>Pasteuria penetrans</i> KW-1 on <i>Meloidogyne arenaria</i> 3.000 after treated 60 minutes under different pH on 8 weeks old tomato	93
Fig. 33. The picture of mass production of <i>Pasteuria penetrans</i> KW-1 on <i>Meloidogyne arenaria</i> 1.000 on different old tomato	94
Fig. 35. Mass production of <i>Pasteuria penetrans</i> KW-1 on <i>Meloidogyne arenaria</i> according No. of nematode on 8 weeks old tomato	96
Fig. 36. Mass production of <i>Pasteuria penetrans</i> kw-1 on <i>Meloidogyne arenaria</i> in Ri-T DNA transformed tomato hairy-root	97
Fig. 37. Ri-T DNA transformed tomato hairy-root	98
Fig. 38. Mass production of <i>Pasteuria penetrans</i> kw-1 on <i>Meloidogyne arenaria</i> in Ri-T DNA transformed tomato hairy-root	99
Fig. 39. Malate dehydrogenase and estrase phenotypes detected in 4 major root-knot nematode species of <i>Meloidogyne arenaria</i> (MA), <i>M. hapla</i> (MH), <i>M. incognita</i> (MI), and <i>M. javanica</i> (MJ)	110
Fig. 40. Malate dehydrogenase and estrase phenotypes detected in populations collected from Sungju province	110
Fig. 41. DNA extraction by NASBA method from root-knot nematode female (0.8 %	

	agarose gel)	114
Fig. 42.	DNA extracted by PCI method from root-knot nematode female (0.8 % agarose gel)	115
Fig. 43.	PCR of mitochondrial DNA (COII/LrRNA) from root-knot nematode	116
Fig. 44.	Comparison of PCR amplified mitochondrial DNA (COII/LrRNA) of root-knot nematodes	117
Fig. 45.	Restricted enzyme analysis of root-knot nematode mitochondrial DNA by EcoR I and Hind III	118
Fig. 46.	Restricted enzyme analysis of root-knot nematode mitochondrial DNA by EcoR I and Hind III	118

List of table

Table 1.	Weeks and Weight range of Rat(SD) in experiment	61
Table 2.	Suppression effect of <i>Pasteuria penetrans</i> KW-1 (PP) on reproduction of <i>Meloidogyne incognita</i> in melon cropping	63
Table 3.	Suppression effect of <i>Pasteuria Pasteuria penetrans</i> KW-1 (PP) on reproduction of <i>Meloidogyne incognita</i> in lettuce continuos cropping	64
Table 4.	Suppression effect of <i>Pasteuria penetrans</i> KW-2 (PP) on reproduction of <i>Meloidogyne arenaria</i> in melon cropping	65
Table 5.	Suppression effect of <i>Pasteuria penetrans</i> KW-2 (PP) on reproduction of <i>Meloidogyne arenaria</i> in tomato continuos cropping	65
Table 6.	Suppression effect of <i>Pasteuria penetrans</i> KW-1 (PP) on reproduction of <i>Meloidogyne arenaria</i> (MA) in tomato	66
Table 7.	Suppression effect of <i>Pasteuria penetrans</i> KW-1 (PP) by different treatments to soil on reproduction of <i>Meloidogyne arenaria</i> in tomato	67
Table 8.	Suppression effect of <i>Pasteuria penetrans</i> KW-1 (PP) and nematicides on reproduction of <i>Meloidogyne arenaria</i> in tomato	68
Table 9.	Attachment rate of <i>Pasteuria penetrans</i> KW-1 with <i>Meloidogyne arenaria</i> under different temperature	69
Table 10.	Attachment rate of <i>Pasteuria penetrans</i> KW-1 with <i>Meloidogyne arenaria</i> under different pH	70
Table 11.	Suppression effect of <i>Pasteuria penetrans</i> KW-1 (PP) mixed with different surfactant on reproduction of <i>Meloidogyne arenaria</i> in tomato	71

Table 12.	Attachment rate of <i>Pasteuria penetrans</i> KW-1 treated by different surfactant with <i>Meloidogyne arenaria</i>	72
Table 13.	Suppression effect of <i>Pasteuria penetrans</i> KW-1 (PP) and <i>Pasteuria penetrans</i> KW-1 WP (PP-WP) on reproduction of <i>Meloidogyne arenaria</i> in tomato	73
Table 14.	The selected prescription for <i>Pasteuria penetrans</i> WP	74
Table 15.	The physio-chemistry property of <i>Pasteuria penetrans</i> WP	74
Table 16.	The store safety property of <i>Pasteuria penetrans</i> WP	75
Table 17.	Weight of rat after oral administration of <i>Pasteuria penetrans</i> KW-1	76
Table 18.	Attachment of <i>Pasteuria penetrans</i> isolates on <i>Meloidogyne</i> spp.	87
Table 19.	Comparision of <i>pasteuria penetrans</i> growth between <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> condition in tomato	100
Table 20.	Major crops cultivated in surveyed protected cultivation area	108
Table 21.	Density and infestation of root-knot nematode in major protected cultivation areas	109
Table 22.	Identification of root-knot nematode by esterase and malate dehydrogenase pattern analysis	111
Table 23.	Spectrophotometry of DNA amounts from 3 larvae of root-knot nematodes	113

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1절. 연구개발의 필요성

뿌리혹선충 (*Meloidogyne* spp.)은 1850년대 영국의 온실에서 재배중인 오이 뿌리혹에서 처음 발견되었고, 세계적으로 78종, 국내에는 6종의 뿌리혹선충이 서식하고 있다. 뿌리혹선충에 의한 피해는 전 세계적으로 나타나고 있는데, 한대지방보다는 온도가 높은 열대나 아열대지방에서 피해가 특히 심한 것으로 보고되어 있다(Fig. 4).

뿌리혹선충은 경제적으로 중요한 식물기생선충으로 약 2,000 여종의 식물을 기주로 이용하고 있다. 또한 온도에 대한 적응력이 높아 추운지방에서도 생존이 가능하여 그 분포가 매우 광범위하다(Taylor와 Sasser, 1978, 김 등, 1998).

국내의 경우, 시설재배지에서는 겨울동안에도 채소류를 연중 재배함으로써 아열대지방에 적응하는 뿌리혹선충의 발생이 심한 실정이다. 국내에서 주요하게 고추, 땅콩, 들깨, 토마토, 오이, 당근, 작약 등의 채소, 약초식물이 피해를 받고 있는데, 그 중 오이, 참외, 당근이 20%, 토마토가 15%의 피해를 받고 있는 실정이다(김과 한, 1988; 김 등, 1998). 특히 농가의 소득을 증진하기 위하여 재배되고 있는 고소득 채소작물과 화훼식물들이 뿌리혹선충에 의하여 극심한 피해를 받고 있지만 효과적인 방제법이 없는 실정이다(김 등, 1998).



Fig. 4. Root-knot Nematode

우리나라에는 고구마뿌리혹선충, 당근뿌리혹선충, 자바뿌리혹선충이 우점종으로 서식하며, 뿌리혹선충의 침입 시 전형적인 증상은 기주식물의 뿌리에 구형 또는 타원형의 혹을 형성하는 것으로 크기는 차이가 많고 눈으로 쉽게 구분된다. 박 등에 의하면 과채류의 경우 감염 시 외부로는 뚜렷한 증상이 없으나 생육의 중기와 후기에 식물체가 갑자기 시들

고 생육이 둔화되며 뿌리를 뽑아보면 많은 혹이 생기고 여기에 병원균이 함께 침투하여 뿌리가 부패하면서 식물체가 고사하게 된다(Fig. 5). 이러한 뿌리혹선충에 의한 피해증상은 가뭄이 많은 지역에서 기주식물이 뿌리혹의 영향으로 수분의 정상적인 흡수가 이루어지지 않아 더욱 쉽게 나타나며, 수분관리가 불량하면 쉽게 뿌리가 부패해 고사하게 된다(김과 최, 2001).

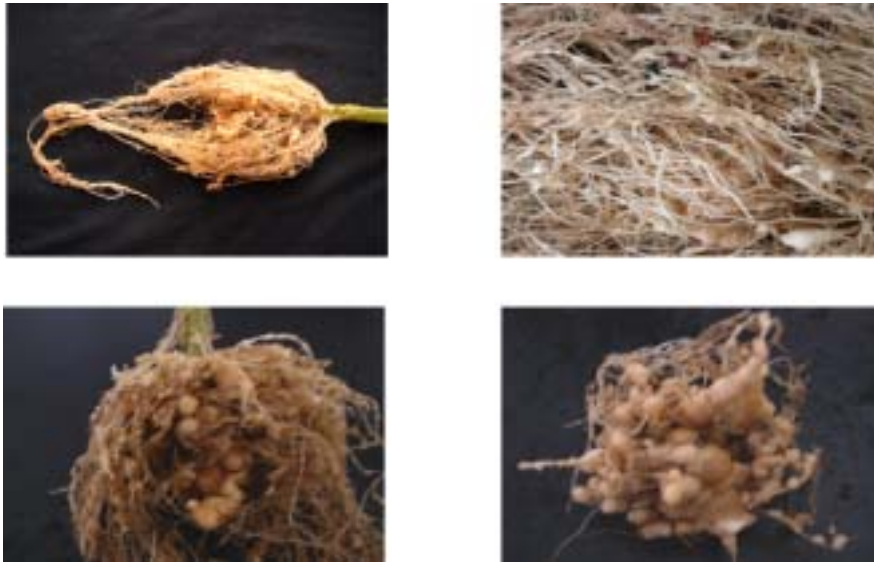


Fig. 5. Damaged root of tomato by Root-Knot nematode

현재 시설재배지에서의 뿌리혹선충 방제를 위한 방안으로 토양 개량법, 태양열 소독법, 작부체계 변경, 화학적 방제법, 생물학적 방제법을 많이 사용되고 있는데 농민들은 포장조건, 방제효율, 경제성 등을 고려하여 여러 가지 방법 중 한두가지 방법을 선택하여 사용하게 된다(김과 최, 2001). 그러나 토양 개량에는 많은 비용이 필요하고 3년을 주기로 다시 반복하여 실시하여야 하며, 태양열 소독법은 오랜 소독시간이 소요되고 경제적 손실이 크고, 작부체계 변경에는 일량이 많아 일손이 많이 필요하다. 또한 화학적 방제는 그 조작이 간편하고 방제효과가 높지만 지속시간이 짧고 제한된 공간에서 사용되므로 약해에 대한 우려가 높다.



Fig. 6. *Pasteuria penetrans*

최근 널리 알려지고 있는 *P. penetrans*(Fig. 6)를 이용한 생물학적 방제법은 제한된 공간에서 뿌리혹선충에 대한 방제효과가 높고 친환경적으로 재배할 수 있고, 연작 시 뿌리혹선충의 방제에 더욱 효과적으로 나타나 각광을 받고 있다. *P. penetrans*는 그람(Gram) 양성이며, 격막이 있는 균사를 형성하는 세균으로, 뿌리혹선충에 절대 기생하여 사멸시키며, 선충 내에서 내성포자의 형태로 번식함으로써, 토양에 포자의 형태로 토양에 누출되어도, 수년이상 생존력을 가진다. 또한 이러한 내성포자의 형성은 환경변화, 즉 온도와 습도의 변화, 토양 내 물리·화학적 변화에 대해 상당한 내성을 가지게 한다. 때문에 화학적 살 선충제에 의존하여 선충을 방제하는 상기의 방법보다 환경친화적이며, 효율적인 선충 방제법으로 인식되고 있다.

따라서 본 과제에서 강원대학교 연구팀에서는 개발한 국내토착 *P. penetrans*를 이용한 뿌리혹선충을 생물학적으로 방제하는 기술을 개발하는 것을 목적으로 하고 있다.

제 2절. 연구개발의 목적과 범위

1. *Pasteuria*세균의 분류 및 조기동정기술개발

- 가. 유전자분석을 통한 분류체계확립
- 나. 단백질 분석에 의한 분류체계 확립
- 다. DNA probes를 이용한 세균의 조기동정 및 monitoring 기술개발

2. *Pasteuria*세균의 제형기술개발 및 안전성평가

- 가. 세균의 제형에 따른 방제효과 비교검정
- 나. 세균의 제형이 세균의 물리 및 화학적 안정성에 미치는 영향
- 다. 제형이 세균의 생존율에 미치는 영향
- 라. 안전성평가

3. *Pasteuria*세균의 생물학적 특성분석 및 대량배양기술 개발

- 가. *Pasteuria*세균과 뿌리혹선충간의 생물학적 특성분석
- 나. 세균의 효과적인 선충부착기술개발
- 다. 토마토 뿌리를 이용한 세균의 대량배양기술개발
- 라. 형질전환된 토마토 모상근을 이용한 세균의 대량배양기술개발

4. 뿌리혹선충의 분류 및 조기동정기술개발

- 가. 뿌리혹선충의 분포 조사 및 뿌리혹선충의 단백질 및 효소분석에 의한 분류
- 나. 뿌리혹선충의 DNA 추출기술 개발 및 RAPD, RFLP 분석을 통한 유전자 진단체계의 개발
- 다. 뿌리혹선충의 PCR-RFLP 분석을 통한 유전자 진단체계의 개발

제 2 장 국내외 기술개발 현황

뿌리혹선충은 경제적으로 중요한 식물기생선충으로 약 2,000 여종의 식물을 기주로 이용하고 있다. 또한 온도에 대한 적응력이 높아 추운지방에서도 생존이 가능하여 그 분포가 매우 광범위하다(Taylor와 Sasser, 1978, 김 등, 1998). 국내의 경우, 시설재배지에서는 겨울동안에도 채소류를 연중 재배함으로써 오이, 참외, 당근이 20%, 토마토가 15%의 피해를 받고 있는 실정이다(김과 한, 1988; 김 등, 1998). 특히 성주의 경우 참외를 연작 재배하므로써 선충에 의한 피해가 50%이상에 달한다.

우리나라에는 고구마뿌리혹선충, 당근뿌리혹선충, 자바뿌리혹선충이 우점종으로 서식하며, 현재 시설재배지에서의 뿌리혹선충 방제를 위한 방안으로 토양 개량법, 태양열 소독법, 작부체계 변경, 화학적 방제법, 생물학적 방제법을 많이 사용되고 있으나 고비용이거나 방제효과가 짧아 뿌리혹선충을 방제하기 어려운 실정이다(김과 최, 2001). 또한 식물추출물이나, 태양열소독법, 토양개량 등 물리적방법과 화학약제를 이용한 방제제가 등록이 되어 있으나 그 방제효과가 짧아 효과적으로 방제할 수 없는 것으로 나타났다.

토양에 서식하는 *P. penetrans*은 그람양성 세균으로 온도와 습도에 저항성을 가지고 있으며, 토양에 포자의 형태로 토양에 누출되어도, 수년이상 활성을 유지한다. 그러나 *P. penetrans*을 이용하여 뿌리혹선충에 대하여 방제효과가 우수하나 대상 세균의 뿌리혹선충에 대한 절대기생특성을 가지고 있어 아직 효과적으로 *P. penetrans*을 대량증식 할 수 없는 실정이다.

*P. penetrans*에 관련되는 생물학적방제제에 대하여 외국의 경우 활발히 진행되고 있다. 일본의 경우, *P. penetrans*을 이용한 뿌리혹선충 생물학적 방제제가 개발되어 시판되고 있으나, 국내의 경우에는 *P. penetrans*에 대한 연구가 매우 미비한 실정이다. 현재 강원대학교 연구팀을 중심으로 최근 몇년 연구한 결과, 국내토착 *P. penetrans*을 이용한 뿌리혹선충을 생물학적으로 방제가 가능한 것으로 확인되었으며, 대량생산에 대한 연구가 진행되고 있다.

제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

제 1 절 *P. penetrans*의 분류 및 조기동정기술 개발

제 2 절 *P. penetrans*의 제형기술개발 및 안전성평가

제 3 절 *P. penetrans*의 생물학적 특성분석 및 대량
배양기술 개발

제 4 절 *Meloidogyne spp.*의 분류 및 조기동정기술
개발

제 1 절 *P. penetrans*의 분류 및 조기동정기술 개발

1. 서 론
2. 재료 및 방법
3. 결과 및 고찰
4. 결과요약

1. 서 론

토양식물기생선충은 모든 흙 속에 존재하는 선충 강에 속하는 작은 생물체이며, 대부분의 식물기생성 토양식물기생선충은 그 크기가 매우 작아 육안으로는 확인하기 어렵고, 현미경으로 관찰이 가능하다. 형태는 일반적으로 실 모양으로 가늘거나, 방추형의 모습으로 좌우 대칭형이며, 그 길이는 대개 0.25 내지 0.45 mm로 매우 작고, 몸에는 마디가 없으나, 체표에는 주름을 가지고 있다. 체벽은 크게 표피, 진피 및 근육으로 구성되어 있으며, 중앙신경계 및 식도 주위의 신경환으로 신경계를 구성하고 있다. 번식은 암컷 성충이 알을 낳는 것으로 하며, 자웅이체이나 동정생식을 통해 번식하기도 한다. 알에서 부화한 토양식물기생선충은 4단계의 유충기를 지난 후, 성충으로 부화하고 대략 1개월 정도 생존하는데 소화기관과 생식기관이 특징적으로 발달하였으며, 암컷의 경우 생존기간 동안 대략 50 내지 600개의 알을 낳는다. 또한 입주위에 구침을 가지고 있으며, 이를 이용하여 식물의 뿌리에 구멍을 내고, 식물조직의 영양분을 흡수하거나 뿌리조직내로 침입한다. 식물기생성 토양식물기생선충은 식물의 종자, 잎, 줄기, 뿌리 등 모든 부분에 기생하며, 종에 따라 식물체의 외부에서 식물체를 가해하는 외부기생성, 식물조직 내부로 침입하여 가해하는 내부기생성 및 머리 부분만 식물체 내에 삽입하여 영양분을 섭취하는 반 내부기생성 등 다양한 생활양식을 갖는다. 또한 내부기생성 토양식물기생선충은 이동하며 가해하는 이동성인 것과 한번 가해하기 시작하면 이동하지 않는 정착성인 것도 있다.

뿌리혹선충은 농작물의 뿌리에 기생하여 양분과 수분을 탈취함으로써 작물의 생육을 저하시키고 심할 경우 작물을 조기에 고사시키거나 다른 병원균의 침입을 조장하여 막대한 피해를 유발하는 해충이다. 우리나라에서 주로 발견되는 뿌리혹선충은 당근뿌리혹선충, 고구마뿌리혹선충, 자바뿌리혹선충, 땅콩뿌리혹선충 등이 있으며 주로 연작을 통해 시설재배지에서 재배되는 참외, 오이, 토마토, 수박, 딸기, 고추, 인삼 등에 큰 피해를 주고 있다. 식물기생성 토양식물기생선충에 의한 피해는 토양내 선충의 서식 밀도가 낮은 경우에는 경미하지만, 작물이 성장하면서 재배기간이 경과함에 따라 서식 밀도가 높아지면 기주식물은 치명적인 손상을 입거나 고사하게 된다. 기생성 토양식물기생선충에 감염된 식물체는 병원균에 대한 저항력이 감소되어 병원균이 침입하였을 때 발병을 조장하거나 심화시키고, 일부 토양식물기생선충은 식물병원성 바이러스를 매개하기도 한다. 이러한 식물기생성 토양식물기생선충에 의한 피해를 경감시키고, 토양식물기생선충을 방제하기 위하여 다양한 방법들이 시도되고 있다. 최근 원예작물 및 특용작물의 재배면적이 늘어나고 한정된 농지에서의 연작 년수가 증가함에 따라 토양해충인 뿌리혹선충에 의한 피해가 확산되고 있다. 뿌리혹선충은 식물의 뿌리에 기생하여 약 4주에 생활주기를

완료하여 암컷이 약 400개 이상의 알을 낳으므로 번식이 매우 빨라 연작재배지에서는 해마다 피해가 늘어나고 있다.

농가에서는 뿌리혹선충을 방제하기 위하여 화학적 방제법으로는 살선충제를 사용하여 토양소독을 하고 있다. 물리적방제로는 토양객토, 토양반전, 태양열소독법, 윤작, 침수 등의 처리를 하고 있으나 이들 역시 비용만 많이 소요될 뿐 장기적으로 효과적이지 못하여 보다 친환경적이면서 효과적인 새로운 방제기술의 개발이 시급한 실정이다.

본 과제에서는 뿌리혹선충을 방제할 수 있는 국내토착 *P. penetrans* 분리에 하였으며, 분리된 *P. penetrans*은 그람(Gram)양성이며, 격막이 있는 균사를 형성하는 세균으로, 뿌리혹선충에 절대 기생하여 사멸시키며, 선충 내에서 내성포자의 형태로 번식함으로 토양에 포자형태로 토양에 누출되어도, 수년이상 생존력을 가진다. 또한 이러한 내성포자의 형성은 환경변화, 즉 온도와 습도의 변화, 토양 내 물리화학적 변화에 대해 상당한 내성을 가지게 한다. 때문에 화학적 살 선충제에 의존하여 선충을 방제하는 상기의 방법보다 환경친화적이며, 효율적인 선충 방제법으로 인식된다.

본 연구는 *Pasteuria*세균의 분류체계를 확립하고, *Pasteuria*세균을 쉽게 동정할 수 있는 조기진단기술개발을 확립하기 위하여 실험을 수행하였다.

2. 재료 및 방법

1) 유전자 분석을 통한 분류체계 확립

***P. penerans* KW-1, KW-2세균의 16S rRNA 유전자 분석에 의한 분류**

P. penerans KW-1, KW-2세균의 spore를 순수 분리하기 위하여 기존의 *Bacillus* sp. spore분리 방법을 변형하여 NaBr을 이용한 원심분리법을 이용하였다. *Pasteuria*세균이 포함된 상태로 배양된 nematode를 spatular와 syringe를 사용하여 분쇄하고 15,000rpm 10분간 원심분리 한다. 얻어진 상층액에 NaBr를 0.25g/ml의 최종농도로 가하고 잘 섞어준다. 이후 Beckman Table-top ultracentrifuge에 맞는 polycarbonate tube에 0.5ml의 NaBr(1.0 g/ml of D.W.)를 넣은 후 spore가 포함된 시료 0.5ml을 조심스럽게 섞어주며, 이때 두 층이 섞이지 않게 한다. 준비된 tube를 Horizontal rotor를 이용하여 15,000rpm으로 10분간 원심분리 하여 흰색의 spore band를 얻는다. 이렇게 얻어진 spore band를 뽑아 멸균증류수에 희석한 후 다시 15000rpm으로 10분간 원심분리 하여 최종적으로 침전된 spore를 얻었다.

*Pasteuria*세균의 DNA를 분리하기 위해 1×10^6 cells/ml 5ml을 취하여 상기 방법으로 순수 spore를 분리 하였다. 이후 10분간 끓인 후, 원심분리 하여 얻어진 pellet에 lysozyme 200 μ l (25mg/ml)를 첨가하여 현탁 하였다. 현탁액을 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양한 후 SDS를 2%로 첨가하여 다시 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켰다. 원심분리 후 얻어진 pellet에 3회 washing을 한 후 RNase와 protease를 처리하여 각각 37 $^{\circ}$ C와 55 $^{\circ}$ C에서 30분과 2시간동안 반응시켰으며 원심분리 후 얻어진 pellet을 TE buffer 500 μ l에 현탁 하여 광학현미경과 LB 배지에 도말배양 하여 다른 미생물의 오염도를 알아보았다. 오염원이 없는 것으로 판단된 sample에 glass bead와 phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1)를 동량 처리한 후 Mini-Beadbeater를 이용하여 30초간 4회 처리하여 얻어진 sample에 침지법 으로 DNA를 분리하였다.

위 방법으로 얻어진 *Pasteuria*세균의 DNA로부터 16S rRNA 유전자의 증폭은 eubacteria 전용 universal primer인 fD1(5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3')과 rP2(5'- ACGGCTACCTTGTTACGACT -3')를 이용하여 PCR방법으로 증폭하였으며 반응조건은 94 $^{\circ}$ C 15초, 50 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 1분 30초간 반응을 28회 반복하였다. 증폭된 밴드는 pGEM-T easy vector 시스템을 이용하여 클로닝한 후, labeling sequencing 방법에 준하여 염기서열

을 분석하였다. 염기서열 분석은 GenBank에 등록된 *Pasteuria* 세균의 16S rRNA 유전자와 비교 분석하였으며, 비교 분석 방법은 cluster 방법을 이용하였다.

P. penerans kw-1, kw-2 세균의 interspace(ITS) 유전자 분석에 의한 분류

현재까지 *Pasteuria* 세균의 ITS 지역은 연구가 이루어지지 않아 자체 제작된 primer를 이용하였다. 먼저 forward primer 5'-GAAAGGCC(A/T)CGAAAGAGT-3'와 reverse primer 5'-CGGGTACTTAGATGTTTCA-3'를 이용하여 94℃ 15초, 50℃ 30초, 72℃ 2분의 cycle로 28번 반복하여 얻어진 밴드를 pGEM-T easy vector system을 이용하여 클로닝 하였다.

RAPD 에 의한 Pasteuria 세균의 분석

Operon technologies (Alameda, CA, U.S.A.)에서 발매되는 OPB01~20 primers 중에서 일반적으로 세균에 있어 많이 사용되는 8개의 Primers를 선정 (data not shown)하여 이용하였으며 GC 함량은 각각 50~60% 정도이다.

primers	DNA sequences (5'-3')
OPB-05	TGCGCCCTTC
OPB-06	TGCTCTGCC
OPB-07	GGTGACGCAG
OPB-08	GTCCACACGG
OPB-10	CTGCTGGGAC
OPB-11	GTAGACCCGT
OPB-12	CCTTGACGCA
OPB-14	TCCGCTCTGG

PCR 반응은 91℃ 15초, 42℃ 15초, 72℃ 1분10초의 cycle로 38번 반복하여 얻어진 반응물 중 특징적인 밴드를 pGem Teasy vector system으로 클로닝한 후 염기서열을 분석하였다.

2) 단백질 분석에 의한 분류체계 확립

***P. penetrans* KW-1, KW-2 전체 단백질의 SDS PAGE 분석.**

순수 분리된 *P. penetrans* KW-1, KW-2의 spore는 sample자체의 양적 한계로 직접적인 단백질 분석이 불가능 하였다. 때문에 숙주로 사용되는 MI, MA를 control로 사용하여 순수분리 이전의 sample과 비교하고자 하였다. *P. penetrans* KW-1, KW-2 1×10^6 cells/ml 4 ml을 원심분리 하고, pellet을 1ml의 PBS(pH7.0, 1mM PMSF)에 재 현탁 하였다. 이후 0.5 ml 부피의 glass bead와 혼합하여 Mini-Beadbeater를 이용하여 30초간 4회 처리 하였다. 각 처리사이에는 30초간 ice에 정치하여 열에 의한 단백질의 손상을 최소화 하고자 하였다. 이후 15,000rpm으로 10분간 원심분리 하고, 상등액 중 0.5ml을 취하여 80%의 포화도로 ASP(Ammonium sulfate precipitation)하여 농축하였다. 얻어진 농축물을 투석을 거쳐 탈염하고, 최종 20 μ l의 PBS(pH7.0, 1mM PMSF)로 녹여 SDS-PAGE(poly acrylamide gel electroporesis)의 sample로 사용하였다.

상기 방법으로 분리한 전체 단백질을 5xLaemmli sample buffer와 1:4의 부피비로 혼합하고, 12% 로 준비된 SDS PAGE gel에서 Bio-Rad(Hercules, California, USA)사의 mini-protean III system을 이용하여, 100V 의 전압으로 1시간동안 전기영동 하였다. 전기영동 완료 후 Bio-Rad사의 silver stain plus kit을 이용하여 염색한 후, protein band pattern을 분석 하였다.

3) DNA probe를 이용한 세균의 조기동정 및 monitoring 기술개발

특이 유전자를 이용한 동정기술 개발

P. penetrans KW-1, KW-2의 16S rRNA 유전자 분석에서 근연종과 구분되는 특이 sequence를 확인 할 수 있었고, 이를 바탕으로 *Pasteuria* 특이 primer로써 PasF(5'-CTCCCCTTGGGGAGCGAG-3'), PasR(5'-CGTCATTTCTTCTCCCG-3')을 제작 하였다. 이 primer set을 이용하여, *Pasteuria penetrans* KW-1, KW-2를 포함한 *Bacillus* 및 *Alicyclobacillus* group등의 균주를 증폭하였다.

토양에서의 *P. penetrans* 밀도 monitoring 기술 개발

토양내에 포함되어 있는 *Pasteuria*의 세균밀도를 특이 유전자를 이용하여 정량하기 위하여 다음의 방법을 사용하였다. *Pasteuria*를 포함하는 토양 sample 0.5g을 200mesh sieve를 사용하여 거른다. 이중 0.2g을 0.5g glass bead와 혼합하고, 0.5ml의 TE buffer를 가한다. 이후 0.5ml의 phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1)을 가하고, Mini-Beadbeater를 이용하여 30초간 4회 처리하여 얻어진 sample에 침지법으로 DNA를 분리하였다.

3. 결과 및 고찰

1) 유전자 분석을 통한 분류체계 확립

***P. penerans* KW-1, KW-2세균의 16S rRNA 유전자 분석에 의한 분류**

선충에 절대 기생하는 *Pasteuria* 세균의 특수성으로 순수분리의 어려움이 있었으며, 때문에 이에 대한 연구가 부진하였다. 본 실험에서 사용한 상기의 분리 방법은 효과적으로 *Pasteuria*와 선충조직 및 식물조직을 분리하는 방법으로, 비교적 순수한 상태의 *Pasteuria* spore를 얻을 수 있었다(Fig 7).



15,000 rpm x 5 min



15,000 rpm x 10min

Fig. 7. Isolation of *Pasteuria* spore. using NaBr density gradient centrifugation

PCR을 통해 증폭된 16S rRNA 유전자를 이용하여 *Pasteuria*세균의 분류체계를 확립하기 위해 국내에서 분리된 두 균주 (KW-1, KW-2)를 사용하였다.

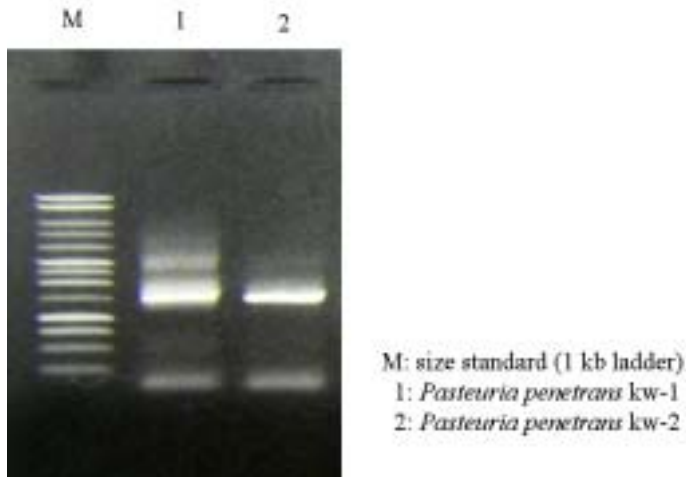


Fig. 8. PCR amplification of 16s rRNA gene using *P. penetrans* KW-1, KW-2 total DNA

염기서열 분석은 labeling sequencing 방법으로 하였고, NCBI의 Blast search program 을 사용하여 분석하였다. 16s rRNA gene sequence와 높은 homology를 보임으로, 본 실험에 사용된 spore 순수분리법과, *Pasteuria* spore로 부터의 전체 DNA분리법이 효과 적임을 확인 하였다(Fig 8). 이후 계통도의 작성은 cluster 방법을 이용하여 GenBank에 등록된 *Pasteuria* 16S rRNA 유전자와 비교 분석하였다(Fig. 9, 10).

```

AGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTACTACATGCAAGTCGAGCA
CGCTCCCCTTGGGGAGCGGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGATAACCTGTCCA
GAAGTCGGGGGATTACCCCTGAAACGGGGGTCAATACCGGATACGCTCTCTGGATCGC
ATGGTTCGGAGGGGAAAGGTACCTTCGGGTGTCGCTTTTGGGTGGATCCGCGGCGCATT
AGTTGGTGGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGGCTTGGGAGAGCGG
ACGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAA
TTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCGACGCCGCGTGGGTGAAGACGGCCTTC
GGTTGTAAAGCCCTGTTTCATCGGGAAGAAGAAATGACGGTACCGGTGAAGAAAGCCCC
GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCGAGCGTTGTCCGGGATG
ATTGGGCGTAAAGGGCGTGTAGGCGGATGTATAGGTGCGGCGTGAAAGGCACGGGCTC
AACCCGTGTAAGCGTTCGAAACGGTGCATCTTGAGTGCGGTAGAGGGAAGCGGAATTC
TGGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATCAGAAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTCC
TGGACTGTTACTGACGCTGAGGCGCAAGGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTG
GTAGTCCACGCGGTAACGATGAGTGCTAGGTGTAGGGATGCTCAGCATCTTTGTGCCG
AAGGAAACCCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTGCAGGCTGAAACTCAAAGG

```

AATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAG
AACCTTACCAAGGCTTGACATCCCGATGAAAGGCCACGAAAGAGTGCCGTGCCCCCTTC
GGGGGAGCATTGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTT
GGGTTTCAGTCCGCCCCCTCGGGGGGAGCATTGGTGACGGGTGGTGCATGGTTGTCGTC
AGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTTCAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCTCCGGT
TGCCAGCACGTAAGGGTGGGCACTTTGGAGAGACAGCCGGCGAAAGCCGGCGGCCGGC
GGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGC
CGTTACAGCGGGAGGCGAAGTCGCGAGACGGAGCGAATCCAGAAAAGCGGTCTCAGT
TCGGATCGCAGGCTGCAACTCGCTGCGTGAAGTAGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCA
GCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGGGG
GTGGGTACACCCGAAGTCGGTGAGGGAACCTGGTTCGCCAGGACCCAGCCGCCGAAG
GTGGGGCTCGCGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTATCCTA

Fig. 9. *Pasteuria penetrans* kw-1 16s rRNA gene

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTACGTCATGCAAGTCGAG
CACGCTCCCCTTGGGGAGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGATAACCTGTCC
AGAAGTCGGGGATTACCCCTGGAACGGGGGTCAATACCGGATACGCTCTCTGGATCGC
ATGGTTCGGAGGGGAAAGGTACCTTCGGGTGTCGCTTTTGGGTGGATCCGCGGCGCATT
AGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGGCTTGGGAGAG
CGGACGGCCACACTGGGACTGAGACAGGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGG
GAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCGACGCCGCGTGGGTGAAGACGGCC
TTAGGGTTGTAAAGCCCTGTTTCATCGGGAAGAAGAAATGACGGTACCGGTGAAGAAAGC
CCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCGAGCGTTGTCCGGG
ATGATTGGGCGTAAAGGGCGTGTAGGCGGATGTATAGGTCGGGCGTGAAAGGCACGGG
CTAACCCGTGTAAGCGTTCGAAACGGTGCATCTTGAGTGCGGTAGAGGGAAGCGGAATT
TCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATCAGAAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTT
CCTGGACTGTTACTGACGCTGAGGCGCGAAGGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACC
CTGGTAGTCCACGCGGTAACGATGAGTGCTAGGTGTAGGGATGCTCAGCATCTTTGTG
CCGAAGGAAACCCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGGCTGAAACTCAA
AGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATACGATGCAACGCG
AAGAACCTTACCAAGGCTTGACATCCCGATGAAAGGCCTCGAAAGAGTGCCGTGCCCC
TTCGGGGGGAGCATTGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGCT
GTTGGGTTTCAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCTCCGGTTGCCAGCACGTAAGGGT
GGGCACTTTGGAGAGACAGCCGGCGAAAGCCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATC
ATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCCGTTACAGAGGGAGGC
GAAGTCGCGAGACGGAGCGAATCCAGAAAAGCGGTCTCAGTTCGGATCGCAACTCGCC
TGCGTGAAGTAGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCC

GGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGGGAGTGGGTCACACCCGAAGTCGGTGA
 GGGAACCTGGTTCGCCAGGACCCAGCCGCCGAAGGTGGGGCTCGCGACTGGGGTGAAG
 TCGTAACAAGGTATCCTA

Fig. 10. *Pasteuria penetrans* kw-2 16s rRNA gene

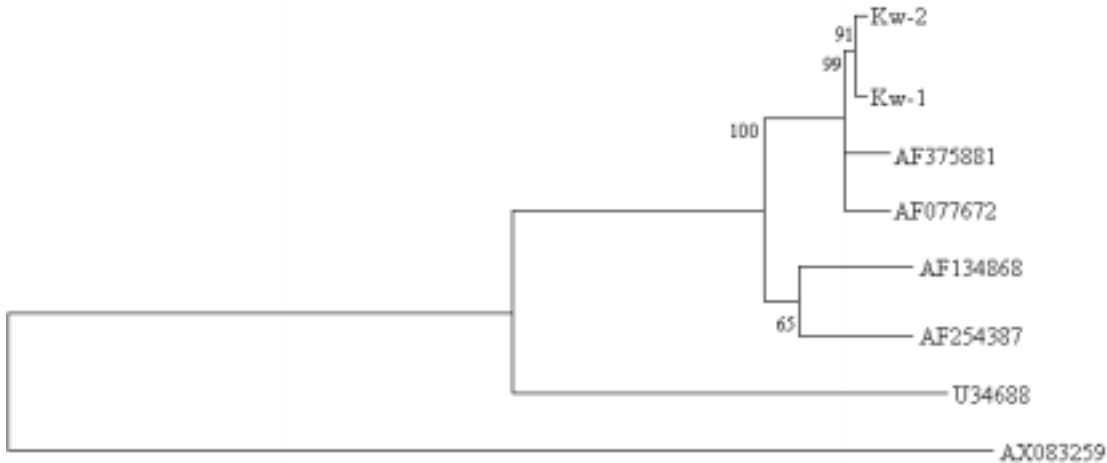


Fig. 11. Phylogenetic tree of *Pasteuria* spp. based on 16S rRNA gene sequences

98-35 : *P. penetrans*, 상주, **KW-1** : *P. penetrans*, 제주도, AF375881 : *P. penetrans*, USA, AF077672 : *P. penetrans*, USA, AF134868 : *Pasteuria* sp., USA, AF254387 : *Pasteuria* sp., USA, U34688 : *P. ramosa*, UK, AX083259 : unidentified organism.

16S rRNA 유전자를 이용하여 *Pasteuria* 세균의 유연관계를 분석한 결과 국내에서 분리된 두 균주(**KW-1**, **KW-2**)간에는 91%의 유연관계를 나타내었고, gene bank에 등록된 AF375881(*P. penetrans*, 미국)과 AF077672(*P. penetrans*, 미국)간에는 99%의 높은 유연관계를 나타내었다(Fig 11).

***P. penerans* KW-1, KW-2세균의 interspace(ITS)유전자 분석에 의한 분류**

Pasteuria 세균의 ITS region에 대한 연구는 아직 보고된 바 없다. 때문에 본 연구에서는 16s rRNA gene 상의 specific sequence와 일반적으로 사용하는 23S primer를 사용하여 16s-23s rRNA ITS region에 대한 sequencing을 시도 하였다. 증폭결과 두 균주 모두 두 종류, 즉 large와 small 의 두 단편이 증폭되었다

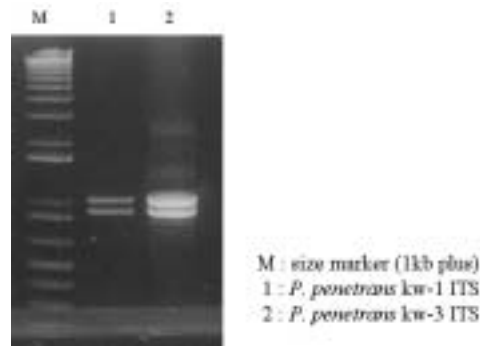


Fig. 12. PCR of *Pasteuria* spp. ITS region

AGTCGTAACAAGGTATCCCTACCGGAAGGTGGGGATGGATCACCTCCTTTCTGGAGTTTT
 GTCAGGCACTCTGCGCACAGATGTGATTCCTTTCGGTTGTGAAGGAATACCCTAGCGG
 GGGTGGGAGTATTTTCTGTTCCCCCTTTGGTAGACTTCAATGTGGTATTTTTAGTGTC
 GTATTTATGTAGTATATGGGGCCATAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCCTTGACACGCAG
 GAGGTCAGCGTTTCGATCCCGCTTGGCTCCACCATGCGTACCTTGCCAACTACATTATGG
 ATGAAAGAGCGTAGAGCTGTCCTCGTTTGGTTGGGTCAAACGAAGAAGGGCACACGGTG
 GAGGCCTAGGAGCCAAGTGCCGATGAAGGACGGGGCAAGCGCCGATATGCCACGGGGA
 GCTGCAGGCAAGCTGGGATCCGTGGATTTCCGAATGGGGAAACCCGCCTGTGTGGAGCA
 CAGGTATCCGCAGGCTGAAGTGAGTAGGCCCGCGGAGGGTAATCAGGGGAAGTGAAAC
 ATCTAAGTACCCG

Fig. 13. *Pasteuria* spp. **KW-1** ITS(large fragment 518bp)

AGTCGTAACAAGGTATCCCTACCGGAAGGTGGGGATGGATCACCTCCTTTCTGGAGTTTC
 ATTAGAGCACTCTTATGCATAGATAGCCATTACACTCTTTCGGTTGTGAGGGAGCGAAGCA
 GGCCGAAATCGGTTTTCTTCCCTCCCTTTTCGTACCTTGCCAACTACATTATGGATTGAGA
 GAGCGTAGATCTGTTCCCGTTTGGTTGGGTCAAACAGAGAAGGGCGCACGGTGGAGGCC
 TAGGAGCCAAGTGCCGATGAAGGACGGGGCAAGCGCCGATATGCCACGGGGAGCTGCA
 GGCAAGCTGGGATCCGTGGATTTCCGAATGGGGAAACCCGCCTGTGTGGAGCACAGGTA
 TCCGCAGGCCGAAGTGAGTAGGCCCGCGGAGGGTAATCAGGGGAAGTGAAACATCTAA
 GTACCCG

Fig. 14. *Pasteuria* spp. **KW-1** ITS(small fragment 407bp)

AGTCGTAACAAGGTATCCCTACCGGAAAGGTGGGGATGGATCACCTCCTTTCTGGAGTTT
TATCAGGCACTCTGCGCACAGATGTGATTCACCTCTTCGGTTGTGAAGGAATACCCTAGCG
GGGGGTGGGGAGTATTTTCTGTTCCCCCTTTGGTAGACTTCAATGTGGTATTTTTAGTGT
CGTATTTATGTAGTATATGGGGCCATAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCCTTGCACGCA
GGAGGTCAGCGGTTTCGATCCCGCTTGGCTCCACCATGCGTACCTTGCCAACTACATTATG
GATTGAGAGAGCGTAGATCTGTTCCCGTTTTGTTGGGTCAAACAGAGAAGGGCGCACGG
TGGAGGCCTAGGAGCCAAGTGCCGATGAAGGACGGGGCAAGCGCCGATATGCCACGGG
GAGCTGCAGGCAAGCTGGGATCCGTGGATTTCCGAATGGGGAAACCCGCCTGTGTGGA
GCACAGGTATCCGCAGGCCGAAGTGAGTAGGCCCGCGGAGGGTAATCAGGGGAAGTGA
AACATCTAAGTACCCG

Fig. 15. *Pasteuria* spp. **KW-2** ITS(large fragment 516bp)

AGTCGTAACAAGGTATCCCTACCGGAAAGGTGGGGATGGATCACCTCCTTTCTGGAGTTTC
ATTAGAGCACTCTTATGCATAGATAGCCATTACACTCTTCGGTTGTGAGGGAGCGAAGCA
GGCCGAAATCGGTTTTCTTCCCTCCCTTTTCGTACCTTGCCAACTACATTATGGATTGAGA
GAGCGTAGATCTGTTCCCGTTTTGTTGGGTCAAACAGAGAAGGGCGCACGGTGGAGGCC
TAGGAGCCAAGTGCCGATGAAGGACGGGGCAAGCGCCGATATGCCACGGGGAGCTGCA
GGCAAGCTGGGATCCGTGGATTTCCGAATGGGGAAACCCGCCTGTGTGGAGCACAGGTA
TCCGCAGGCCGAAGTGAGTAGGCCCGCGGAGGGTAATCAGGGGAAGTGAAACATCTAA
GTACCCG

Fig. 16. *Pasteuria* spp. **KW-2** ITS(small fragment 407bp)

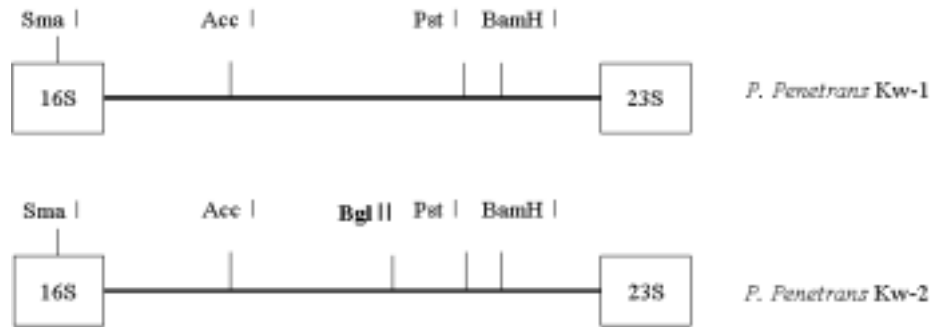
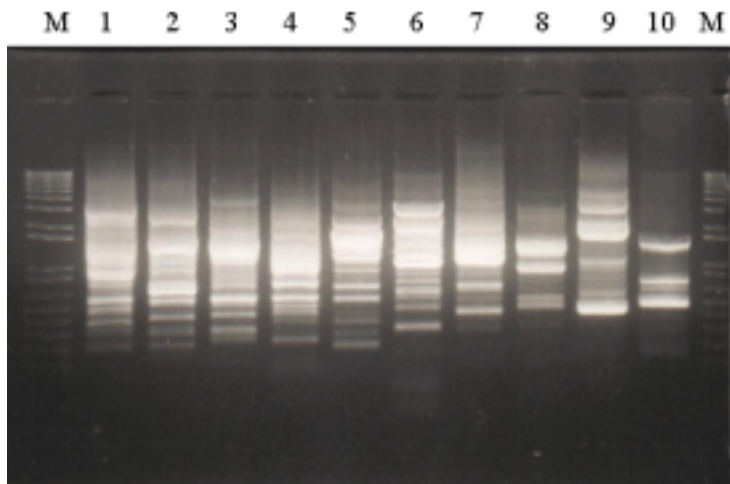


Fig. 17. comparison of restriction enzyme recognition site

염기 서열 분석결과 증폭된 두 염기 서열 중 large fragment부분에 tRNA^{Ala} 유전자를 코딩하고 있는 것으로 나타났다. 또한 large fragment 에 대한 제한효소 *Bgl* II를 처리한 결과 kw-2에서만 제한 효소 위치가 확인되었고, Small fragment의 경우에는 *Bgl* II 제한효소 위치를 모두 가지고 있으며 1bp만 차이를 보였다(Fig. 17).

RAPD 에 의한 *Pasteuria* 세균의 분석

RAPD분석을 위해, *P. penetrans KW-1* 전체 DNA를 주형으로 사용하였다. random primer는 Operon technologies (Alameda, CA, U.S.A.)의 OPB-05, 06, 07, 08, 10, 11, 12, 14를 사용하여 다양한 band pattern을 얻었다(Fig. 18). 이중 0.5kb에서 3kb까지의 20종의 분리 가능한 band를 elution하고 pGEM Teasy vector system I 에 cloning한 후 염기 서열을 결정하였다(Fig. 19).



- M : size standard (1 kb ladder)
- 1 : RAPD product by primer OPB-05
- 2 : RAPD product by primer OPB-06
- 3 : RAPD product by primer OPB-07
- 4 : RAPD product by primer OPB-08
- 5 : RAPD product by primer OPB-10
- 6 : RAPD product by primer OPB-11
- 7 : RAPD product by primer OPB-12
- 8 : RAPD product by primer OPB-14
- 9 : Positive control (*Bacillus* sp. IFO3336)
- 10 : Positive control (*β-proteobacterium* KNU3)

Fig. 18. *Pasteuria penetrans* KW-1 RAPD band pattern



- C : size marker (pGEM T-easy), 3.0 kb
- 1~20 : miniprep of recombinant plasmids harboring RAPD products

Fig. 19. Cloning of lane 6 RAPD products (0.5~3.0 kb)

염기서열 분석 후 NCBI의 BLAST search program으로 분석한 결과 기존 database상의 어떠한 서열과도 matching되지 않는다는 결과를 얻었다. 이것은 *Pasteuria* sp.에 대한 기존 연구 결과가 거의 없음으로, RAPD에 대한 증폭 결과물을 비교할 수 있는 reference가 없기 때문에 추정된다.

2) 단백질 분석에 의한 분류체계 확립

P. penetrans KW-1, KW-2 전체 단백질의 SDS PAGE 분석.

순수 분리된 *P. penetrans* KW-1, KW-2의 spore는 sample 자체의 양적 한계로 직접적인 단백질 분석이 불가능 하였다. 때문에 비교적 대량의 sample을 얻을 수 있는 방법으로, 숙주선충인 MA, MI 에 감염된 상태로 직접 전체 단백질을 얻은 후, *P. penetrans*가 감염되지 않은 MA, MI 에서 얻은 전체 단백질 pattern과 비교하여 특징적인 *P. penetrans* 단백질 pattern을 얻고자 하였다.

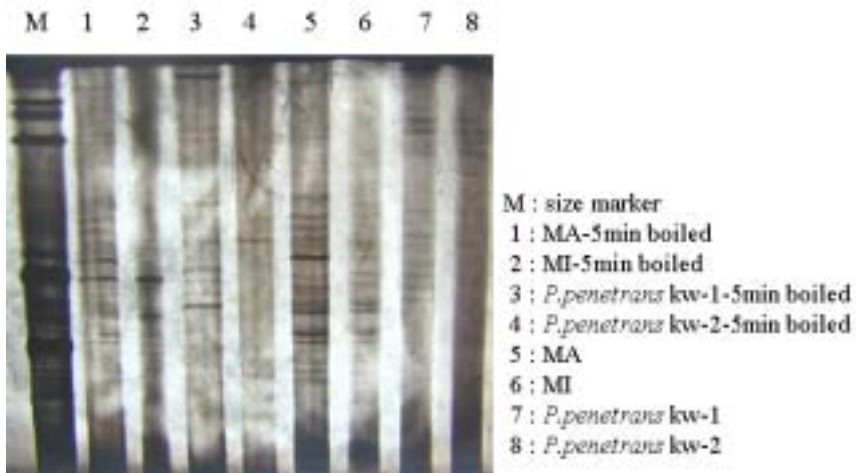


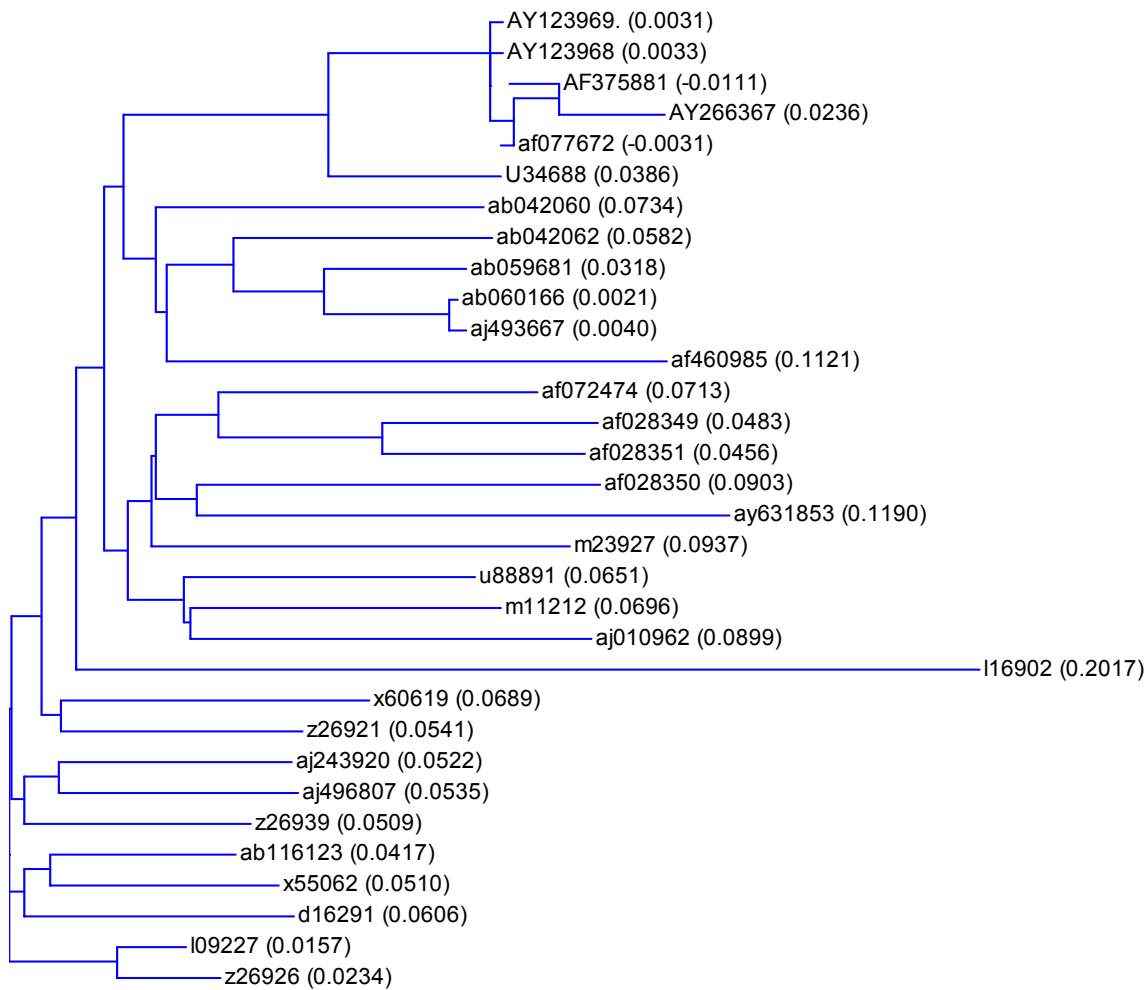
Fig. 20. SDS PAGE analysis of *P. Penetrans* KW-1, KW-2

그러나 Fig. 20에서 볼 수 있듯이, *P. penetrans*를 포함하는 밴드와 그렇지 않은 밴드를 비교하여도 특징적인 *P. penetrans* 단백질 band를 확인 할 수 없었다. 이것은 sample prep. 시점부터, *Pasteuria* 와 선충만을 순수하게 분리하기 어렵기 때문으로 생각된다.

3) DNA probe를 이용한 세균의 조기동정 및 monitoring 기술개발

특이 유전자를 이용한 동정기술 개발

Pasteuria sp.에 대한 기존 연구 결과의 부족과 본 연구에서의 RAPD data에 대한 분석 불가로 *P. penetrans* KW-1, KW-2에 대한 특이 probe 선발에는 어려움이 많았다. 특이 probe에 대한 신뢰성을 높이기 위하여 *P. penetrans* KW-1, KW-2 chromosomal DNA에서 유래하였다는 것이 입증된 16S rRNA 유전자의 염기 서열을 기존 database상의 염기 서열과 비교 하였다(Fig. 21). 총 24개의 균주에 대한 16S rRNA 유전자에 대한 분석에서 *Pasteuria* spp.에 대해 특이적인 두 개의 sequence를 확인 하였고(data not shown), 이 영역에 대해서 specific probe를 제작 하였다. 비교 균주로 사용하였던 22개의 균주 중 분류학상으로 유사한 8개의 균주를 사용하여 특이 probe의 민감도를 확인 하였다. 또한 16S rRNA 유전자를 우선 적으로 증폭하여 각 균주의 전체 DNA의 상태에 따른 증폭실수를 최소화 하고자 하였다.



ab042060	<i>Bacillus schlegelii</i> gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence
ab042062	<i>Bacillus tusciae</i> gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence
ab059681	<i>Alicyclobacillus cycloheptanicus</i> gene for 16S rRNA, strain:DSM 4007
ab060166	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> gene for 16S rRNA
ab116123	<i>Bacillus sphaericus</i> gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain:S33
af028349	<i>Clostridium fusiformis</i> 16S ribosomal RNA gene, complete sequence
af028350	<i>Clostridium cocleatum</i> 16S ribosomal RNA gene, complete sequence
af028351	<i>Clostridium indolis</i> 16S ribosomal RNA gene, complete sequence
af072474	<i>Clostridium difficile</i> strain 79685 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
af077672	<i>Pasteuria penetrans</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence p-20, p100
af375881	<i>Pasteuria penetrans</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
af460985	Uncultured <i>Sulfobacillus</i> sp. P3-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
aj010962	<i>Clostridium quercicolum</i> 16S rRNA gene, strain DSM 1736(T)
aj243920	<i>Bacillus halophilus</i> 16S rRNA gene, strain DSM 4771T
aj493667	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> subsp. rittmannii 16S rRNA gene
aj496807	<i>Amphibacillus xylanus</i> 16S rRNA gene, strain DSM 6626
ay123968	<i>Pasteuria penetrans</i> strain kw-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; and tRNA ^{Ala} gene, complete sequence
ay123969	<i>Pasteuria penetrans</i> strain kw-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; and tRNA ^{Ala} gene, complete sequence
ay266367	<i>Pasteuria penetrans</i> strain PpTH 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
ay631853	<i>Bacillus subtilis</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
d16291	<i>Sporolactobacillus racemicus</i> 16S rRNA gene
l09227	<i>Saccharococcus thermophilus</i> 16S ribosomal RNA
l16902	<i>Thermoactinomyces dichotomicus</i> 16S ribosomal RNA (16S rRNA) sequence
m11212	<i>Heliobacterium chlorum</i> 16S ribosomal RNA
m23927	<i>Clostridium barkeri</i> 16S small subunit ribosomal RNA
u34688	<i>Daphnia endosymbiotic bacterium</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
u88891	<i>Desulfotomaculum halophilum</i> strain SEBR 3139 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
x55062	<i>Bacillus thuringensis</i> 16S ribosomal RNA
x60619	<i>Bacillus larvae</i> 16S ribosomal RNA
z26921	<i>Bacillus thermoruber</i> gene for 16S ribosomal RNA
z26926	<i>Bacillus thermocatenulatus</i> gene for 16S ribosomal RNA
z26939	<i>Bacillus thermocloacae</i> gene for 16S ribosomal RNA

Fig. 21. Phylogenetic tree of *Pasteuria* sp. and various strains based on 16S rRNA gene sequences

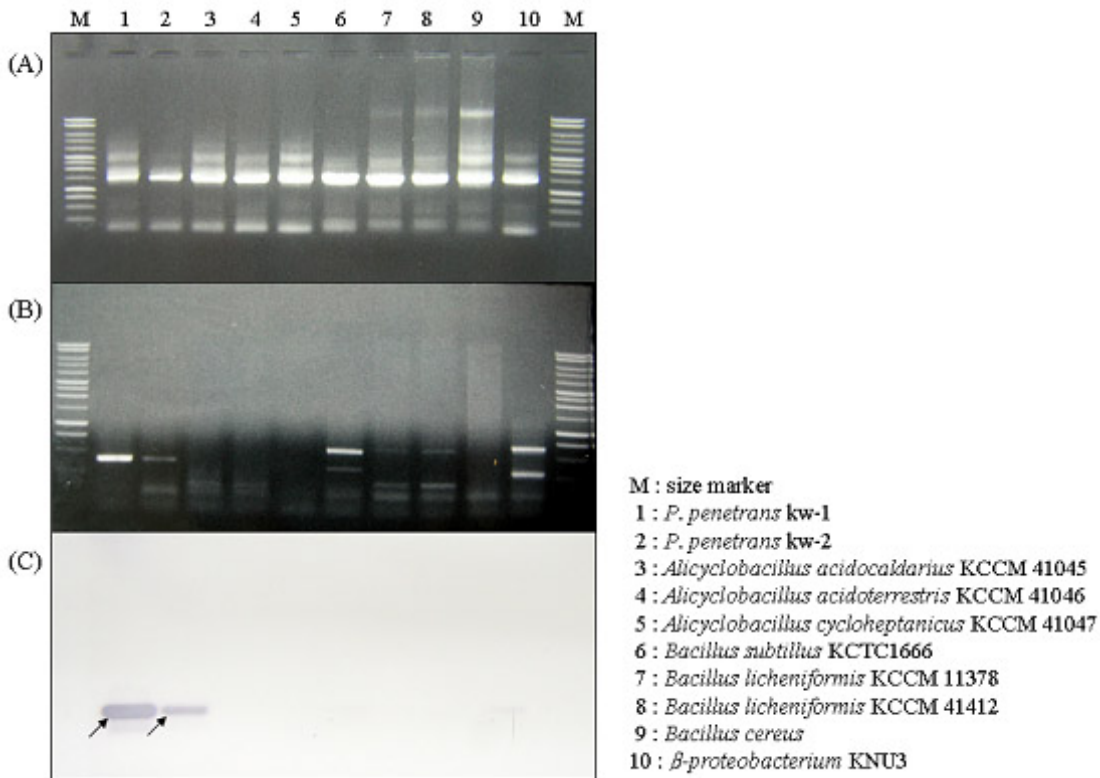


Fig. 22. (A) PCR product of 16S rRNA gene. (B) PCR amplification of specific sequence using *Pasteuria* specific probe. (C) Southern hybridization of (B).

특이 probe를 이용한 각 균주에 대한 분석으로 *P. penetrans* kw-1, kw-2에서는 380bp 크기의 특이 염기서열이 증폭되었으며, *Bacillus subtilis* KCTC1666과 *β-proteobacterium* KNU3에서 특이 염기서열보다 큰 band와 특이 염기서열보다 50b 정도 작은 두 개의 band가 증폭 되었다. 또한 *P. penetrans* kw-1에서의 특이 염기서열 증폭물을 probe를 사용한 southern blot analysis 결과 *P. penetrans* 특이 염기 서열보다 50bp 정도 작은 band에서 약한 signal이 있었으나, *P. penetrans* 특이 염기 서열이 이종 간에서도 유사도가 높은 16S rRNA 유전자에서 유래하였기 때문에 내부 염기서열에 약한 homology가 있는 것으로 해석하였다(Fig. 22).

토양에서의 *P. penetrans* 밀도 monitoring 기술 개발

Pasteuria spp.의 밀도에 따른 PCR반응에의 영향을 확인하기 위하여 1×10^5 , 1×10^4 ,

1x10³, 500, 100, 10 cells/ml의 농도로 *P. penetrans*를 희석하고, 동일 조건으로 전체 DNA를 분리 하였다. 이후 각각의 sample을 *P. penetrans* 특이 probe인 PasF-R을 이용하여 증폭 하였다.

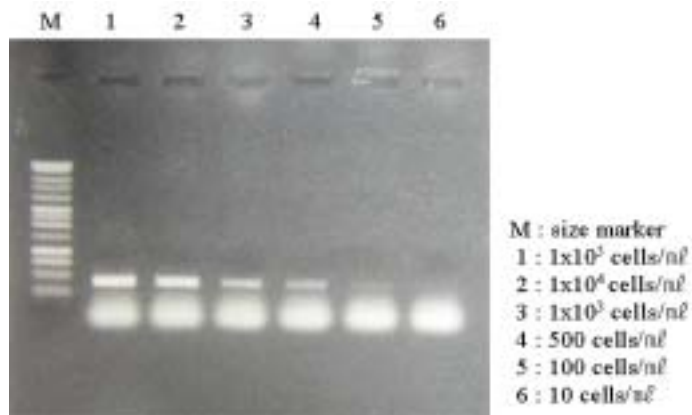


Fig. 23. PCR amplification of specific sequence using various *Pasteuria* spore concentration.

Fig. 23의 결과에서 보여주듯이 1x10⁵~10 cells/ml의 범위에서 정량적인 PCR반응이 이루어짐을 알 수 있다. 즉 초기 주형 DNA인 *P. chromosomal* DNA 양의 차이에 의해 최종 반응 증폭물이 결정되는 것으로, 동일 조건의 분리과정으로 1x10⁵~10 cells/ml 농도의 *Pasteuria* cell의 양을 역으로 유추 할 수 있다. 단 과량의 반응물이 증폭될 경우 plateau phase에 의한 PCR의 결점으로 인하여, 정량 PCR법으로의 직접 응용은 불가능 할 수 있으므로, 이후 competitive PCR법 및 real time PCR법에 의한 접근방식도 시도 될 수 있을 것으로 보인다.

4. 결과 요약

가. *P. penetrans*를 이용한 뿌리혹선충 방제를 위하여 *Pasteuria*세균의 분류체계를 확립하고, *Pasteuria*세균의 조기진단기술개발을 개발하였다.

나. 실험에 사용된 *P. penetrans* kw-1, kw-2의 유연관계를 분석한 결과 국내에서 분리된 두 균주(KW-1, KW-2)간에는 91%의 유연관계를 나타내었고, GenBank에 등록된 AF375881(*P. penetrans*, 미국)과 AF077672(*P. penetrans*, 미국)간에는 99%의 높은 유연관계를 나타내었다. 계통분류에 의한 분석결과 본 실험에서 사용한 균주는 기존 연구에서 발표된 *Pasteuria* spp.와 차이를 보이며, 유전적으로 다양성을 가지는 것으로 확인하였다.

다. *Pasteuria*의 배양 특성상 PCR법에 의해 증폭한 결과물의 해석에 어려움이 있었다. 때문에 특이 probe를 선별하기 위하여 *P. penetrans* chromosomal DNA에서 증폭된 것을 입증할 수 있는 16S rRNA 유전자에서 특이적인 염기서열을 확인하였고, PasF-R을 제작하였다. 제작된 특이 Probe를 사용한 PCR반응에서 *Pasteuria* spp.에서만 선택적으로 증폭 가능한 염기 서열로 입증되었으며, 특이 probe로 사용 가능한 것을 확인하였다.

라. 토양 sample에서의 직접 검출을 위하여 특이 probe를 시험 한 결과, 앞으로 토양에서의 *Pasteuria* spp.의 밀도분석에 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

제 2 절 *P. penetrans*의 제형기술개발 및 안전성평가

1. 서 론
2. 재료 및 방법
3. 결과 및 고찰
4. 결과요약

1. 서 론

뿌리혹선충 (*Meloidogyne* spp.)은 1850년대 영국의 온실에서 처음 발견되었고, 국내에는 현재 6종의 뿌리혹선충이 서식하고 있다. 뿌리혹선충은 경제적으로 중요한 식물기생선충으로 약 2,000 여종의 식물을 기주로 이용하고 있다. 또한 온도에 대한 적응력이 높아 추운지방에서도 생존이 가능하여 그 분포가 매우 광범위하다(Taylor와 Sasser, 1978, 김 등, 1998). 국내의 경우, 시설재배지에서는 겨울동안에도 채소류를 연중 재배함으로써 아열대지방에 적응하는 뿌리혹선충의 발생이 심한 실정이다. 특히 농가의 소득을 증진하기 위하여 재배되고 있는 고소득 채소작물과 화훼식물들이 뿌리혹선충에 의하여 극심한 피해를 받고 있지만 효과적인 방제법이 없는 실정이다(Choo 등, 1987; 김 등, 1998).

우리나라에는 고구마뿌리혹선충, 당근뿌리혹선충, 자바뿌리혹선충이 우점종으로 서식하며, 방제를 위한 방안으로 토양 개량법, 태양열 소독법, 작부체계 변경, 화학적 방제법, 생물학적 방제법을 많이 사용하고 있다(Park et al., 1995; Chon, 1996; 김과 최, 2001).

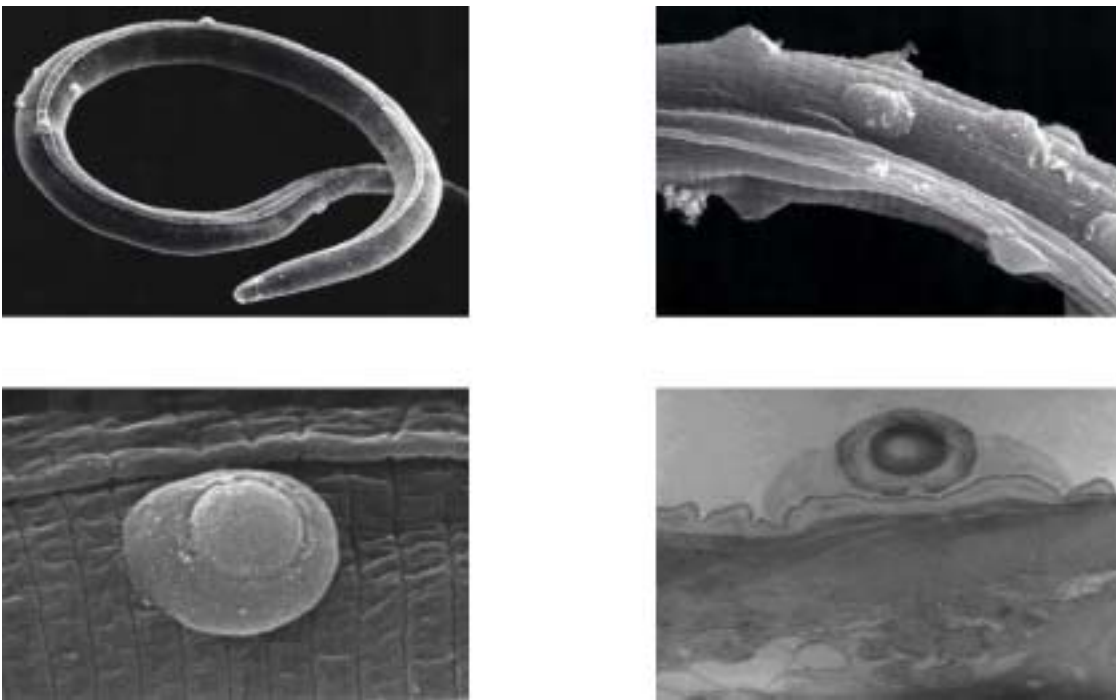


Fig. 24. Attachment of *Pasteuria penetrans* on root-knot nematode juvenile cuticle

최근 널리 알려지고 있는 *P. penetrans*를 이용한 생물학적 방제법은 제한된 공간에서 뿌리혹선충에 대한 방제효과가 높고 친환경적으로 재배할 수 있고, 연작 시 뿌리혹선충의 방제에 더욱 효과적으로 나타나 각광을 받고 있다. *P. penetrans*는 그람양성 세균으로 온도와 습도에 저항성을 가지고 있으며, 도양 중에서 비운동성으로 선충이 지나가는 시기에 부착하여 기주식물의 뿌리에 침입하여 선충 대신 *P. penetrans*를 대량 증식하게 되어 뿌리혹선충을 방제할 수 있게 된다(Fig. 24).

강원대학교 연구팀에서는 뿌리혹선충을 생물학적으로 방제하기 위하여 국내 토착 *P. penetrans*를 분리하였으며, 산업화하여 실용적으로 유통시키고 살포작업이 가능하고, 또한 사용자에 대한 농약살포시의 편의성을 제공하고 최적의 약효발현과 최소의 약해발생을 위한 것이며 유효성분의 특성에 가장 적합한 살포형태로 만들어 유효성분의 물리화학적 안전성을 향상시켜 유통기간을 연장하거나 보다 안전한 형태로 살포자에 대한 안전성을 향상시키고자 제형화를 실시하였다. 농약의 제제에는 최적의 제형화를 위하여 다양한 보조제가 사용되고 있으며 또한 정밀한 제조 및 가공기술이 요구되므로 상품화를 위한 제제기술을 확보하는 것은 새로운 화합물을 개발하는 것 못지않게 매우 중요하다. 국내의 경우, 외국에서 이미 개발된 유제, 수화제, 액제, 수용제, 액상수화제, 분제, 입제 등을 사용하고 있으며, 최근에는 기존 제형의 단점을 보완한 미립제, 저비산분제, 미분제, 캡슐제, 혼연제 등이 개발되어 사용되고 있다.

제형이 완료된 방제제는 상품화되기 전에 살포된 후의 환경이나 인축에 대한 안전성으로 인하여 독성실험이 진행되어야 한다. 독성반응은 동물의 종류, 성별, 생육단계 및 형태에 따라 서로 다르나 주로 설치류인 rat를 이용하여 실시하게 된다. 농약의 급성독성은 시험동물의 50%가 죽는 양을 의미하는 반수치사량으로 나타내며, 농약을 경구, 경피로 투여하거나 피하, 복강, 정맥에 주사하였을 때 나타내는 것으로 *P. penetrans*를 제형화 한 후 실시하여야 한다.

따라서 국내 시설재배지에서 뿌리혹선충을 효과적으로 방제하기 위하여 *P. penetrans*를 이용한 제형기술개발 및 안전성실험을 진행하였다.

2. 재료 및 방법

1) *P. penetrans*를 이용한 *Meloidogyne* spp. 방제효과 검정

*P. penetrans*를 이용한 *Meloidogyne* spp. 방제효과

*P. penetrans*와 땅콩뿌리혹선충을 멸균된 토양에 골고루 섞은 후, 직경 750 mm, 높이 950 mm의 polyethylene pot에 300 g씩 넣고 25°C 조건에서 방치하였다. 실험에 사용된 토양은 “바로커” 상토이고, 처리 5일 후 pot에 참외, 상추, 토마토 4주묘를 정식하였다. *P. penetrans*를 이용한 *M. arenaria*에 대한 방제효과는 14주 후 뿌리를 수확하여 형성된 뿌리혹수를 counting하여 검정하였다. 또한 식물체의 연작에 따른 방제효과를 검정하기 위하여 상추와 토마토를 2작기 재배하였으며, 10주 후에 땅콩뿌리혹선충에 대한 방제효과를 검정하였다. 방제효과 실험은 처리구 당 MA를 3,000 J2/plant 수준으로 접종한 후 *P. penetrans*를 1×10^5 endospores/plant와 2×10^5 endospores/plant 수준으로 수행하였다.

*P. penetrans*의 밀도에 따른 방제효과

P. penetrans KW-1균주와 땅콩뿌리혹선충을 멸균된 토양에 골고루 섞은 후, 직경 750 mm, 높이 950 mm의 polyethylene pot에 300 g씩 넣고 25°C 조건에서 방치하였다. 실험에 사용된 토양은 “바로커” 상토이고, 토마토는 “서광” 품종으로써 처리 5일 후 pot에 토마토 4주묘를 정식하였다. *P. penetrans* KW-1균주의 밀도에 따른 *M. arenaria*에 대한 방제효과는 14주 후에 토마토의 뿌리를 수확하여 형성된 뿌리혹수를 counting하여 검정하였다. 방제효과 실험은 처리구 당 MA를 500 J2/plant 수준으로 접종한 후 *P. penetrans* KW-1를 3,000 endospores/plant와 30,000 endospores/plant, 300,000 endospores/plant 수준으로 처리하여 수행하였다.

***P. penetrans*의 살포방법에 따른 방제효과**

P. penetrans KW-1와 땅콩뿌리혹선충을 멸균된 토양에 골고루 섞은 후, 직경 750 mm, 높이 950 mm의 polyethylene pot에 300 g씩 넣고 25℃조건에서 방치하였다. 실험에 사용된 토양은 “바로커” 상토이고, 토마토는 “서광” 품종으로써 처리 5일 후 pot에 토마토 4주묘를 정식하였다. *P. penetrans* KW-1균주의 밀도에 따른 *M. arenaria*에 대한 방제효과는 14주 후에 토마토의 뿌리를 수확하여 형성된 뿌리혹수를 counting하여 검정하였다. 방제효과 실험은 처리구 당 MA를 500 J2/plant 수준으로 접종한 후 30,000 endospores/plant 수준으로 *P. penetrans* KW-1균주는 토양혼화처리와 토양표면살포방법으로 처리하여 수행하였다.

***P. penetrans*과 다른 살선충제에 따른 방제효과 비교**

P. penetrans KW-1균주와 땅콩뿌리혹선충을 멸균된 토양에 골고루 섞은 후, 직경 750 mm, 높이 950 mm의 polyethylene pot에 300 g씩 넣고 25℃조건에서 방치하였다. 실험에 사용된 토양은 “바로커” 상토이고, 토마토는 “서광” 품종으로써 처리 5일 후 pot에 토마토 4주묘를 정식하였다. *P. penetrans* KW-2균주의 밀도에 따른 *M. arenaria*에 대한 방제효과는 14주 후에 토마토의 뿌리를 수확하여 형성된 뿌리혹수를 counting하여 검정하였다. 방제효과 실험은 처리구 당 MA를 500 J2/plant 수준으로 접종한 후, “선충탄 (fosthiazate)”을 추천농도인 6 kg/10a, “파스토리아”와 *P. penetrans* KW-2균주는 일본에서 제품화된 “파스토리아”의 추천농도인 3×10^{12} endospores/10a 수준으로 혼화하여 수행하였다.

2) *P. penetrans*의 물리 및 화학적 안정성평가

Temperature에 따른 *P. penetrans* KW-1의 안전성 평가

P. penetrans KW-2을 15 ml tube에 300,000 endospores 넣은 후 10°C, 30°C, 50°C, 70°C의 온도 조건에서 60분간 방치하였다. 처리된 *P. penetrans* KW-1가 들어있는 tube에 *M. arenaria*를 500 J2 접종하여 1 ml의 증류수에 희석하였다. 희석액을 12시간 shaking한 후 400배 현미경하에서 *P. penetrans* KW-1와 *M. arenaria*의 부착율을 확인하였다. 부착율은 임의로 30마리 선충을 선정하여 확인하였으며, 부착율에 의하여 *P. penetrans* KW-2의 온도에 대한 안전성 평가를 수행하였다.

pH에 따른 *P. penetrans* KW-2의 안전성 평가

P. penetrans KW-1을 15 ml tube에 300,000 endospores 넣은 후 pH를 4, 7, 10의 조건에서 60분간 방치하였다. 처리된 *P. penetrans* KW-1이 들어있는 tube에 *M. arenaria*를 500 J2 접종하여 1 ml의 증류수에 희석하였다. 희석액을 12시간 shaking한 후 400배 현미경하에서 *P. penetrans* KW-1과 *M. arenaria*의 부착율을 확인하였다. 부착율은 임의로 30 마리 선충을 선정하여 확인하였으며, 부착율에 의하여 *P. penetrans* KW-1의 pH에 대한 안전성 평가를 하였다.

3) 제형이 *P. penetrans*의 생존율에 미치는 영향

*P. penetrans*의 생물적특성유지를 위한 제형재료 선발

P. penetrans KW-1와 땅콩뿌리혹선충을 멸균된 토양에 골고루 섞은 후, 직경 750 mm, 높이 950 mm의 polyethylene pot에 300g씩 넣고 25℃조건에서 방치하였다. 실험에 사용된 토양은 “바로커” 상토이고, 토마토는 “서광” 품종으로써 처리 5일 후 pot에 토마토 4주묘를 정식하였다. *P. penetrans* KW-1균주의 밀도에 따른 *M. arenaria*에 대한 방제효과는 14주 후에 토마토의 뿌리를 수확하여 형성된 뿌리혹수를 counting하여 검정하였다. 방제효과 실험은 처리구 당 MA를 500 J2/plant 수준으로 접종한 후 Triton x-100, Skim milk, Tween 20, NK-VN, NK-SLS, NK-D425 6가지 계면활성제를 5% 수준으로 30,000 endospores/plant의 *P. penetrans* KW-1균주와 혼합하여 제형별 방제효과를 검정하여 세균의 생물적특성 유지여부를 확인하였다.

제형재료의 *P. penetrans*에 대한 생존율 평가

Triton x-100, Skim milk, Tween 20, NK-VN, NK-SLS, NK-D425 6가지 계면활성제를 5% 수준으로 30,000 endospores/plant의 *P. penetrans* KW-1균주와 혼합하여 4℃ 조건에서 6개월, 12개월간 방치하였다. *P. penetrans* KW-1를 각 제형별로 tube에 옮긴 후 1 ml의 증류수로 희석하였으며, *M. arenaria*를 500 J2와 혼합하여 shaking (140rpm, 28℃)12시간 한 후 400배 현미경하에서 *P. penetrans* KW-1와 *M. arenaria*의 부착율을 확인하였다. 부착율은 임의로 30 endospores를 선정하여 확인하였으며, 부착율에 의하여 *P. penetrans* KW-1의 제형재료에 대한 생존율 평가를 진행하였다.

*P. penetrans*의 제형화에 따른 방제효과 검정

P. penetrans KW-1(15%) 수화제와 *P. penetrans* KW-1을 300,000endospores/plant 수준으로 500 J2 MA와 함께 멸균된 토양에 골고루 섞은 후, 직경 750 mm, 높이 950 mm의 polyethylene pot에 300g씩 넣고 25℃조건에서 방치하였다. 실험에 사용된 토양은 “바로커” 상토이고, 토마토는 “서광” 품종으로써 처리 5일 후 pot에 토마토 4주묘를 정식하였다. *P. penetrans* KW-1의 *M. arenaria*에 대한 방제효과는 14주 후에 토마토의 뿌리를 수확하여 형성된 뿌리혹수를 counting하여 제형화에 따른 방제효과를 검정하였다.

4) *P. penetrans* KW-1 제형화에 따른 안전성평가

1. *P. penetrans* KW-1의 제형화

P. penetrans KW-1를 대상으로 수화제를 대상으로 처방검토를 실시하였다. *P. penetrans* KW-1를 대상으로 적절한 보조제를 선별하여 유효성분의 안정성 및 활성에 대한 사전 검토하였다. 또한 다양한 보조제를 선별하여 보조제별 이화학적 특성을 검토하고 *P. penetrans* KW-1와의 혼용 가능성 및 약효증진 가능성을 체크하여 처방검토에 이용하였다.

수화제의 제조과정은 먼저 원제와 계면활성제 보조제를 혼합한 다음, 건식 분쇄기인 air mill로 분쇄하여 제조하게 된다. 이때 air mill의 분쇄압은 5-8 kgf/cm³이며 분쇄입도는 10 μ m이하를 기준으로 한다. 이렇게 하여 제조된 수화제는 농약관리법상의 검사항목인 수화성과 분말도를 측정하여 일정기준 이상일 경우 시험용 시료로 사용하게 되는데 제형의 수화성은 1분 내외를 기준으로 하고, 분말도는 325mesh에 대하여 98% 이상이 통과되어야 한다.

2. *P. penetrans* KW-1 제형화에 따른 경시적인 저장안정성

수화제형태의 제품은 유통 및 저장과정 중에 경시적인 분말도의 악화현상과 입도성장 문제가 발생하는 원인으로 경시적인 저장안정성에 대한 검토를 실시하였다.

수화제의 저장안정성은 제품의 상품화 과정에서 실온에서 보관하여 경시적인 이화학적 변화의 변화를 관찰하여야 하나 시간적으로 제약으로 통상적으로 고온에서의 단기적인 학대시험으로 대체하게 된다. 고온 학대시험은 *P. penetrans* KW-1 제형화된 시료를 고온에 보관한 다음, 일정 기간마다 꺼내어 물성의 변화를 관찰하여 제품의 유통조건과 유통기간을 정하게 된다.

3. *P. penetrans* KW-1(15%) 수화제의 급성경구독성 및 병원성시험

가) 실험동물선정 및 사육환경

농촌진흥청고시 제2004-3호 미생물 농약의 등록시험 방법 및 등록 신청서류 검토 기준에 따라 급성경구독성 및 병원성시험 대상동물로 rat(SD계통)를 사용하였다. 동물을 입수한 후 암·수 각 5마리를 검역·부검하고, 나머지 동물은 동물실험실 사육환경 하에서 7일간 순화시키면서, 피모상태 및 건강을 확인한 후 건전한 개체를 선별하여 시험에 이용하였다.

Table 1. Weeks and Weight of Rat(SD) in experiment

Rat	Female	Male
Weeks of first	6 weeks	7 weeks
Rat weight of fist (g)	170.7(165 - 179)	185.3(179 - 193)
Weeks when oral administration	7 weeks	8 weeks
Rat weight when oral administration (g)	223.3(215 - 229)	204.7(197 - 209)

Rat의 사육은 폴리카보네이트 사육상자 (420×260×180mm)에 대패밥 깔집((주) 샘타코 바이오 코리아, 한국)을 깔아 암·수 각각 2마리씩 사육 유지하였다. 온도는 21±1℃, 상대 습도 55±5%, 조명시간 12시간(오전 8시 ~ 오후 8시)의 유지하면서 사료와 음수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다. 사료는 실험동물용 고형사료(신촌사료(주), 한국)를, 음수는 상수도수를 대형 고압멸균기를 이용하여 멸균 후 자유 섭수시켰다(Table 1).

나) *P. penetrans* KW-1 수화제(15%) 투여약량 수준설정 및 약제 투여

P. penetrans KW-1 수화제 투여약량은 시험물질이 증류수에 현탁하였으며, 시험물질의 조제는 20ml의 Teflon Cap Vial을 이용하여 칭량한 후 증류수를 가하여 용해 및 현탁시켜 조제하여 1.7×10⁸ endospores 수준으로 암컷과 수컷 rat에 투여하여 시험을 수행하였다.

P. penetrans KW-1 수화제 투여개시 약 12시간 전부터 절식을 시킨 후 rat용 경구 주사침(Zonde)을 이용하여 개체 당 1.7×10⁸ endospores를 경구로 위내에 강제투여 하였으며 투여 3 - 4시간 후 사료급여를 재개하였다. 투여당일은 투여 후 1시간에서 4시간까지 매시간, 익일부터는 매일 1회씩 일반중독증상을 관찰하였고, 투여 당일부터 7, 14, 21일차에 개체별 체중을 측정하고, 그 결과를 Excel Program을 이용하여 통계 처리하여 분석하였다. 또한 시험기간 중 중간 부검군 및 종료 부검군과 대조군에서 살아있는 개체를 이산화탄소(CO₂) 가스로 마취시킨 후 내부 장기를 육안으로 이상유무를 확인하였다.

다) *P. penetrans* KW-1의 체내 잔류와 체외 배출 여부

P. penetrans KW-1의 체내 잔류여부를 파악하기 위해 대조군과 중간 및 최종 부검군의 동물에서 신장, 간장, 폐장, 비장, 위장, 소장 및 대장을 적출하여 시험개시 7, 14, 21

일차의 rat(SD) 개체별 *Pasteuria* 수화제를 투여한 처리구와 대조구에서 체내 *P. penetrans* KW-1 잔존여부를 확인하였으며 각 처리는 암컷과 수컷으로 나뉘어 진행되었다.

P. penetrans KW-1의 체외 배출 상황을 파악하기 위해 1, 7, 14, 21차에 각각 분변을 수집하여 rat(SD) 개체별 *P. penetrans* KW-1 수화제를 투여한 처리구와 대조구 분변에서의 *P. penetrans* KW-1의 배출여부를 확인하였으며 각 처리는 암컷과 수컷으로 나뉘어 진행되었다.

2. 결과 및 고찰

1) *P. penetrans*를 이용한 *Meloidogyne* spp. 방제효과 검증

*P. penetrans*를 이용한 *Meloidogyne* spp.에 대한 방제효과

참외를 이용한 *P. penetrans* KW-1의 *M. incognita*에 대한 방제효과실험에서 1×10^5 endospores/g medium 처리구는 34.5%, 2×10^5 endospores/g medium 처리구는 60.2%의 방제효과를 나타내었다(Table 2). 상추를 이용한 방제효과실험에서는 1×10^5 endospores/g medium 처리구는 3.0%, 2×10^5 endospores/g medium 처리구는 38.9%의 방제효과를 나타내어 *P. penetrans* KW-1를 이용하여 땅콩뿌리혹선충인 *M. incognita*를 방제할 수 있는 것으로 판단되었다. 또한 상추를 연작할 경우 1×10^5 endospores/g medium 처리구는 54.4%, 2×10^5 endospores/g medium 처리구는 77.2%의 방제효과를 나타내어 시간이 지날수록 방제효과가 더욱 높게 나타났다(Table 3).

Table 2. Suppression effect of *Pasteuria penetrans* KW-1 (PP) on reproduction of *Meloidogyne incognita* in melon cropping^{a)}

Treatments	No. of galls/root	Suppression effect (%)
MA J2 5,000	80.7	-
J2+PP 1×10^5 endospores/g medium	52.9	34.5 a
J2+PP 2×10^5 endospores/g medium	32.1	60.2 a
Control	0	-

^{a)} Data are means of 6 replicates. Means within a column followed by the same letter are not different according to Duncan's multiple-range test ($P < 0.05$).

Table 3. Suppression effect of *Pasteuria Pasteuria penetrans* KW-1 (PP) on reproduction of *Meloidogyne incognita* in lettuce continuous cropping^{a)}

Treatments	First cropping		Second cropping	
	No. galls/root	Suppression effect (%)	No. of galls/root	Suppression effect (%)
MA J2 5,000/plant (N)	150	-	330 a	-
N + PP 100,000 endospores / g medium (T1)	147	3.0 a	150 b	54.4
N + PP 100,000 endospores / g medium (T2)	92	38.9 a	75 c	77.2
Control	0	-	0 d	-

^{a)} Data are means of 6 replicates. Means within a column followed by the same letter are not different according to Duncan's multiple-range test ($P < 0.05$).

참외를 이용한 *P. penetrans* KW-2의 땅콩뿌리혹선충에 대한 방제효과실험에서 1×10^5 endospores/g medium 처리구는 26.7%, 2×10^5 endospores/g medium 처리구는 62.9%의 방제효과를 나타내었다(Table 4). 토마토를 이용한 방제효과실험에서는 1×10^5 endospores/g medium 처리구는 55.9%, 2×10^5 endospores/g medium 처리구는 92.1%의 방제효과를 나타내어 *P. penetrans* KW-2를 이용하여 땅콩뿌리혹선충인 *M. arenaria*를 방제할 수 있는 것으로 판단되었다. 또한 토마토를 연작할 경우 1×10^5 endospores/g medium 처리구는 85.1%, 2×10^5 endospores/g medium 처리구는 93.2%의 방제효과를 나타내어 시간이 지날수록 방제효과가 더욱 높게 나타났다(Table 5).

*P. penetrans*을 이용하여 *Meloidogyne* spp. 방제가 가능할 것으로 판단되며, 연작 재배 시 더욱 효과적으로 관찰되었다. 이러한 원인은 세균이 선충에 기생하여 대량 증식되어 고밀도의 *P. penetrans*가 토양속에 잔류하여 다음 세대 뿌리혹선충에 더욱 많이 부착할 수 있기에 가능한 것으로 판단된다. 이러한 *P. penetrans*을 이용한 뿌리혹선충의 생물학적 방제법은 높은 방제효과를 기대할 수 있으며, 방제효과가 짧은 화학적방제법과 물리적방법에 비하여 장기간에 걸쳐 효과적인 것으로 나타났다.

Table 4. Suppression effect of *Pasteuria penetrans* KW-2 (PP) on reproduction of *Meloidogyne arenaria* in melon cropping^{a)}

Treatments	No. of galls/root	Suppression effect (%)	No. of egg mass/root	Suppression effect (%)
MA J2 5,000	87.5	-	24.3 b	-
J2+PP 1×10 ⁵ endospores/g medium	64.1	26.7 b	4.0 a	83.5 b
J2+PP 2×10 ⁵ endospores/g medium	32.5	62.9 a	3.0 a	87.7 a
Control	0	-	0 a	-

^{a)} Data are means of 6 replicates. Means within a column followed by the same letter are not different according to Duncan's multiple-range test ($P < 0.05$).

Table 5. Suppression effect of *Pasteuria penetrans* KW-2 (PP) on reproduction of *Meloidogyne arenaria* in tomato continuous cropping^{a)}

Treatments	First cropping		Second cropping	
	Percentage of root galled	Suppression effect (%)	No. of galls/root	Suppression effect (%)
MA J2 5,000/plant (N)	85.0	-	460.6 a	-
N + PP 100,000 endospores / g medium (T1)	37.5	55.9 b	68.8 b	85.1
N + PP 100,000 endospores / g medium (T2)	6.7	92.1 a	31.4 c	93.2
Control	0	-	0	-

^{a)} Data are means of 6 replicates. Means within a column followed by the same letter are not different according to Duncan's multiple-range test ($P < 0.05$).

***P. penetrans*의 밀도에 따른 방제효과**

M. arenaria 500 J2를 접종한 후 *P. penetrans* KW-1 의 밀도별 방제실험에서 30,000 endospores 처리구에서 71.7%, 300,000 endospores 처리구에서 80.8%, 3,000,000 endospores 처리구에서 91.2%의 방제효과를 나타내어, *P. penetrans*의 밀도가 높을수록 더욱 높은 방제효과를 기대할 수 있으며, 장기간에 걸쳐 뿌리혹선충에 기생하여 대량증식이 가능하여 영구적으로 방제할 수 있을 것으로 판단된다(Table 6).

Table 6. Suppression effect of *Pasteuria penetrans* KW-1 (PP) on reproduction of *Meloidogyne arenaria* (MA) in tomato^{a)}

Treatments	No. of gall/root	Suppression effect (%)	Height of plants (cm)	Wt. of plant (g/plant)	Root wt. (g/plant)
MA J2 500/plant (N)	1117	-	171 a	174.9 a	29.4 a
N + PP 30,000 endospores / plant	334	71.7 a	170 a	172.9 a	27.2 a
N + PP 300,000 endospores / plant	226	80.8 a	176 a	173.8 a	28.0 a
N + PP 3,000,000 endospores / plant	103	91.2 a	178 a	176.7 a	25.6 a
Control	0	-	179 a	175.6 a	26.6 a

^{a)} Data are means of 6 replicates. Root galls, leaves weight, root weight, and Height of total leaves were examined 12 weeks after planting. Means within a column followed by the same letter are not different according to Duncan's multiple-range test (P< 0.05).

***P. penetrans*의 살포방법에 따른 방제효과**

M. arenaria 500 J2를 접종한 후 *P. penetrans* KW-1 (PP) 300,000 endospores를 살포 방법에 따라 진행된 방제실험에서 토양과의 혼화처리 처리구에서 80.8%, 토양표면에 살포한 처리구에서 53.4% 방제효과를 나타내었다. 토양혼화 처리구에서 표면처리구보다 유의성 있게 높은 방제효과를 나타낼 수 있는 원인은 *P. penetrans*가 토양 깊이 10~50 cm 범위에 생존하는 뿌리혹선충과 쉽게 부착할 수 있기 때문이라고 판단된다(Table 7).

Table 7. Suppression effect of *Pasteuria penetrans* KW-1 (PP) by different treatments to soil on reproduction of *Meloidogyne arenaria* in tomato^{a)}

Treatments	No. of gall/root	Suppression effect (%)	Height of plants (cm)	Wt. of plant (g/plant)	Root wt. (g/plant)
MA J2 500/plant (N)	1117	-	171 a	174.9 a	29.4 a
Intimate mixture with soil (N + PP 300,000 endospores / plant)	226	80.8 a	176 a	173.8 a	27.9 a
Spray at soil surface (N + PP 300,000 endospores / plant)	549	53.4 b	177 a	171.9 a	21.5 a
Control	0	-	179 a	175.6 a	26.6 a

^{a)} Data are means of 6 replicates. Root galls, leaves weight, root weight, and Height of total leaves were examined 12 weeks after planting. Means within a column followed by the same letter are not different according to Duncan's multiple-range test (P< 0.05).

***P. penetrans*과 다른 살선충제에 따른 방제효과 비교**

M. arenaria 500 J2를 접종한 후 *P. penetrans* KW-1 처리구는 80.8%, 일본에서 제품화된 파스토리아 처리구는 28.9%, 국내에 등록된 선충탄(fosthiazate) 처리구는 93.8%의 방제효과를 나타내었다. *P. penetrans* KW-1 처리구가 일본에서 제품화된 파스토리아 처리구에 비하여 높은 방제효과를 나타낼 수 있는 원인은 일본에서 분리된 *P. penetrans*가 지역특성상 국내의 뿌리혹선충과 부착이 어렵기 때문이며, 국내에 뿌리혹선충 방제제로 등록된 선충탄 (fosthiazate) 처리구에 비하여 방제효과가 낮은 것은 방제효과 실험이 pot에서 진행하여 뿌리혹선충의 이동특성이 포장조건에 비하여 제한되었기 때문이라고 판단된다(Table 8).

Table 8. Suppression effect of *Pasteuria penetrans* KW-1 (PP) and nematicides on reproduction of *Meloidogyne arenaria* in tomato^{a)}

Treatments	No. of gall/root	Suppression effect (%)	Height of plants (cm)	Wt. of plant (g/plant)	Root wt. (g/plant)
MA J2 500/plant (N)	1117	-	171 a	174.9 a	29.4 a
N + PP(Korea) 300,000 endospores / plant	226	80.8 b	176 a	173.8 a	28.0 a
N + 6ppm Fosthiazate / plant	73	93.8 a	182 a	170.2 a	26.5 a
N + PP(Japan)300,000 endospores / plant	837	28.9 c	178 a	179.8 a	27.4 a
Control	0	-	179 a	175.6 a	26.6 a

^{a)} Data are means of 6 replicates. Root galls, leaves weight, root weight, and Height of total leaves were examined 12 weeks after planting. Means within a column followed by the same letter are not different according to Duncan's multiple-range test (P< 0.05).

2) 제형이 *P. penetrans*의 물리 및 화학적 안정성에 미치는 영향

Temperature에 따른 *P. penetrans* KW-1의 안전성 평가

P. penetrans KW-1을 다양한 온도조건에서 60분간 처리한 후 *M. arenaria*와의 부착실험에서 70℃, 50℃, 30℃, 10℃의 온도조건 하에서 각각 96.7%, 96.7%, 98.9%, 96.7%의 부착율을 나타내었다, 따라서 모두 96%이상의 부착율을 나타내어 *P. penetrans* KW-1 이 10~70℃ 온도조건하에서 안전하게 생존할 수 있을 것으로 판단된다. 또한 농약 제제시의 온도가 보통 60℃ 정도임을 고려할 때 *P. penetrans* KW-1을 이용하여 제형화를 용이하게 진행할 수 있을 것으로 사료된다(Table 9).

Table 9. Attachment rate of *Pasteuria penetrans* KW-1 with *Meloidogyne arenaria* under different temperature

Temperature (°C)	Times of treatment (min)	Attachment rate (%)
70	60	96.7 a
50		96.7 a
30		98.9 a
10		96.7 a

pH에 따른 *P. penetrans* KW-1 의 안전성 평가

P. penetrans KW-1을 다양한 산도조건에서 60분간 처리한 후 *M. arenaria*와의 부착실험에서 pH가 10, 7, 4조건에서 각각 82.2%, 90.0%, 86.7%의 부착율을 나타내었다, 따라서 모두 82%이상의 부착율을 나타내어 *P. penetrans* KW-1이 pH 10~4 조건하에서 안전하게 생존할 수 있을 것으로 판단된다. 우리나라 토양의 경우, 대부분 pH 5.5~6.0의 범위를 갖는 약산성임을 고려할 때 *P. penetrans*의 pH 4~10에서의 생존 가능성은 다양한 토양의 pH에서도 *P. penetrans*에 대한 방제가 가능할 것으로 판단된다(Table 10).

Table 10. Attachment rate of *Pasteuria penetrans* KW-1 with *Meloidogyne arenaria* under different pH

pH	Times of treatment (min)	Attachment rate (%)
10		82.2 c
7	60	90.0 a
4		86.7 b

3) 제형이 *P. penetrans*의 생존율에 미치는 영향

*P. penetrans*의 생물적특성유지를 위한 제형재료 선발

M. arenaria 500 J2를 접종한 후 다양한 계면활성제를 *P. penetrans* KW-1와 혼합하여 수행된 방제실험에서 Triton x-100처리구는 79.6%, Skim milk처리구는 78.9%, Tween 20처리구는 79.5%, NK-VN처리구는 80.4%, NK-SLS처리구는 78.0%, NK-D425처리구는 77.5%, 그리고 무처리구는 79.8%의 방제효과를 나타내었다. 다양한 계면활성제와의 혼합처리구가 무처리구에 유사한 방제효과를 나타내어 다양한 계면활성제가 *P. penetrans*에 대하여 생물학적특성을 유지할 수 있을 것으로 판단된다(Table 11).

Table 11. Suppression effect of *Pasteuria penetrans* KW-1 (PP) mixed with different surfactant on reproduction of *Meloidogyne arenaria* in tomato^{a)}

Treatments	No. of gall/root	Suppression effect (%)	Height of plants (cm)	Wt. of plant (g/plant)	Root wt. (g/plant)
MA J2 500/plant (N)	1117	-	171 a	174.9 a	29.4 a
N + PP 300,000 endospores / plant (T)	226	79.8 a	176 a	173.8 a	28.0 a
T+5% Triton x-100	240	79.6 a	181 a	174.6 a	27.3 a
T+5% Skim milk	236	78.9 a	185 a	191.7 a	28.2 a
T+5% Tween 20	242	79.5 a	184 a	180.2 a	29.1 a
T+ 5% NK-VN	219	80.4 a	167 a	176.4 a	29.7 a
T+5% NK-SLS	246	78.0 a	181 a	197.1 a	30.4 a
T+5% NK-D425	251	77.5 a	172 a	182.0 a	28.6 a
Control	0	-	179 a	175.6 a	26.6 a

^{a)} Data are means of 6 replicates. Root galls, leaves weight, root weight, and Height of total leaves were examined 12 weeks after planting. Means within a column followed by the same letter are not different according to Duncan's multiple-range test ($P < 0.05$).

제형재료의 *P. penetrans*에 대한 생존율 평가

다양한 계면활성제를 *P. penetrans* KW-1 (PP)와 혼화하여 6개월 방치 후 *M. arenaria* 와의 부착실험에서 Triton x-100처리구는 89.2%, Skim milk처리구는 86.3, Tween 20처리구는 82.9%, NK-VN처리구는 91.6%, NK-SLS처리구는 86.8%, NK-D425처리구는 90.4%, 그리고 무처리구는 88.7%의 부착율을 나타내었다. 다양한 계면활성제와의 혼화처리구가 무처리구에 유사한 부착율을 나타내어 다양한 계면활성제가 *P. penetrans*에 대하여 생존에는 영향을 주지 않는 것으로 판단된다(Table 12).

Table 12. Attachment rate of *Pasteuria penetrans* KW-1 treated by different surfactant with *Meloidogyne arenaria*

Surfactant	Times of treatment (month)	Attachment rate (%)
Triton x-100	6	89.2 a
Skim milk		86.3 a
Tween 20		82.9 a
NK-VN		91.6 a
NK-SLS		86.8 a
T+5% NK-D425		90.4 a
Control		88.7 a

***P. penetrans*의 제형화에 따른 방제효과 검증**

M. arenaria 500 J2를 접종한 후 *P. penetrans* KW-1 수화제(15%)와 *P. penetrans* KW-1을 300,000 endospores/plant 수준으로 처리된 방제효과실험에서 각각 77.5%, 78.7% 방제효과를 나타냈으나, 유의성 차이가 나타나지 않았다. 따라서 *P. penetrans* KW-1를 수화제 형태로 제형화를 실시하여도 *P. penetrans* KW-1의 뿌리혹선충에 대한 활성을 유지하고 있으며, 제형화의 실시로 더욱 장기간 보존할 수 있을 것으로 전망된다(Table 13).

Table 13. Suppression effect of *Pasteuria penetrans* KW-1 (PP) and *Pasteuria penetrans* KW-1 WP (PP-WP) on reproduction of *Meloidogyne arenaria* in tomato^{a)}

Treatments	No. of gall/root	Suppression effect (%)	Height of plants (cm)	Wt. of plant (g/plant)	Root wt. (g/plant)
MA J2 500/plant (N)	1238	-	154 a	163.2 a	29.3 a
N + PP 300,000 endospores / plant	264	78.7 a	156 a	163.8 a	28.0 a
N + PP-WP 300,000 endospores / plant	279	77.5 a	158 a	159.8 a	27.4 a
Control	0	-	158 a	165.4 a	26.3 a

^{a)} Data are means of 6 replicates. Root galls, leaves weight, root weight, and Height of total leaves were examined 12 weeks after planting. Means within a column followed by the same letter are not different according to Duncan's multiple-range test ($P < 0.05$).

4) *P. penetrans* KW-1 제형화에 따른 안전성평가

P. penetrans KW-1의 제형화

P. penetrans KW-1의 경우, 해충을 대상으로 하는 생물농약 살선충제로써 카오린을 증량제로 이용하고 계면활성제는 습윤 및 분산성이 안정적인 조합에 대한 검토를 실시하였다. 통상적으로 상용되는 비이온 계면활성제인 polyoxyethylene alkylaryl ether / polyoxyethylene alkyl ether와 이온성 계면활성제인 alkyl sulfate, lignosulfonate, naphthalene sulphonate formaldehyde condensates 등을 대상으로 검토를 실시하여 안정적인 물성을 보이는 조합을 선발하였고 생물농약의 안정성 및 약효증진을 위한 보조제로는 무기 광물질인 silicon dioxide를 선발하여 처방에 활용하여 15% 함량의 수화제를 선발하였다(Table 14). 이렇게 선발된 처방에 의하여 제조된 수화제 시료는 농약관리법상 검사항목에 해당하는 수화성과 분말도를 측정된 결과, 검사기준에 부합하여 생물활성 시험용 시료로 분양하였으며, 저장 안정성을 위한 시험에 사용되었다(Table 15).

Table 14. The selected prescription for *Pasteuria penetrans* WP

Item	Subsidiary material	Content (%)
Active ingredient	<i>Pasteuria penetrans</i>	15
wet/dispersible agent	Nonionic SA	3
Supplemental agent	Silicone dioxide	2
Carrier	Kaolin	80
Total		100

Table 15. The physico-chemistry property of *Pasteuria penetrans* WP

Item	Condition
Appearance	Light gray powder
Size	6.9 μm
Wetting property	Good
Pulverization	Good

P. penetrans KW-1 수화제에 따른 경시적인 저장안전성

수화제 시료를 고온조건에 보관한 다음, 일정시간 간격으로 시료를 꺼내어 이화학적 특성을 검토한 결과, 경시적으로 시료가 갈변화 되면서 입도가 성장하였으나(표 15) *P. penetrans* KW-1의 활성을 검토한 결과 유의성있게 차이가 나타나지 않아 50℃조건에서 28일간 보관 하여도 안정한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 실온조건에서 3년간 저장한 결과와 같은 것으로 제품 판매 시 3년동안 저장할 수 있을 것으로 판단된다(Table 16).

Table 16. The store safety property of *Pasteuria penetrans* WP

physico-chemistry property	Times ^{a)} (days)		
	0	14	28
Color	Light gray	Gray	Light brown
Size	6.9 μm	7.4 μm	8.1 μm
Wetting property	Good	Good	Good
Pulverization	Good	Good	Good

a) Times under 50℃ condition.

P. penetrans KW-1 수화제(15%)의 급성경구독성 및 병원성시험

가) 치사동물 및 LD₅₀값 및 일반중독증상

시험물질인 *Pasteuria* 세균 수화제(15%)는 시험약량인 1.7×10^8 endospores에서 시험기간 동안 암수 모두 치사개체가 발견되지 않았다. 또한 약제 처리 직후부터 시험 전 기간에 걸쳐 특이한 중독증상은 관찰되지 않아 시험물질의 반수치사약량(LD₅₀)은 $> 1.7 \times 10^8$ endospores로 확인되었다.

나) 체중변화

시험에 이용된 동물의 시험개시 0, 7, 14, 21일차의 개체별 체중기록은 부표와 같다. 이 결과로 보아 약제투여군은 무처리 대조군과 비교하여 유의차가 없었다(Table 17).

Table 17. Weight of rat after oral administration of *Pasteuria penetrans* KW-1

		Weight of Rat ± SD			
		0 DAT ^{b)}	7 DAT	14 DAT	21 DAT
Treatment ^{a)}	Male	225.5 ± 4.95	284.0 ± 4.24	352.0 ± 8.49	395.0 ± 7.07
	Female	207.0 ± 2.83	219.5 ± 3.54	228.0 ± 5.66	236.5 ± 2.12
Control	Male	217.5 ± 6.36	274.5 ± 6.36	311.0 ± 28.28	367.0 ± 1.41
	Female	202.0 ± 1.41	220.5 ± 6.36	229.0 ± 7.07	241.0 ± 9.90

a) Oral administration of *Pasteuria penetrans* KW-1(1.7×10^8 endospores);

b) Days after treatment.

다) *P. penetrans* KW-1의 체내 잔존 여부와 체외 배출 여부

시험개시 7, 14, 21일차 rat(SD) 개체별 *P. penetrans* KW-1 수화제를 투여한 처리구와 대조구에서의 각 처리에서의 암컷과 수컷으로 나뉘어 진행하였으며, 소장, 대장, 위, 신장, 간장, 폐장, 비장에서 모두 *P. penetrans* KW-1 세균이 발견되지 않았다.

시험개시 1, 7, 14, 21일차 rat(SD) 개체별 *P. penetrans* KW-1 수화제를 투여한 처리구와 대조구 분변에서의 *Pasteuria* 배출여부를 확인하였으며 각 처리는 암컷과 수컷으로 나뉘어 진행되었다. *P. penetrans* KW-1 수화제를 처리한 rat(SD) 암컷과 수컷에서 D1일째 분변에서 투여량의 92% 이상인 1.6×10^8 endospores를 확인할 수 있었으며, 7, 14, 21일차의 rat(SD) 암컷과 수컷의 분변에서 모두 *P. penetrans* KW-1 세균을 발견하지 못하였다.

라) *P. penetrans* KW-1 세균 수화제 투입에 따른 부검소견

시험이 진행된 7 DAT, 14 DAT, 21 DAT에 생존한 수컷과 암컷에 대하여 부검을 실시하였으며 모든 개체에서 소장, 대장, 위, 신장, 간장, 폐장, 비장이 대조구에 비하여 출혈이나 변색이 발견되지 않았으며, rat의 입주위에 혈흔이나, 혈루증, 항문이나 생식기 주위, 털의 변색이 발견되지 않았다. 전체적으로 육안적 부검소견으로 모든 개체에서 특이한 이상소견은 관찰되지 않았다.

4. 결과 요약

가. 기주식물인 참외, 상추, 토마토에 *P. penetrans*를 이용하여 *Meloidogyne spp.*에 대한 방제효과실험을 진행한 결과 모두 일정한 방제효과를 나타내었으며, 이러한 방제효과는 작물의 연작 재배 시 방제효과가 상승하는 것으로 나타났다.

나. *P. penetrans* KW-1은 10~70℃의 온도 범위와 pH 4~10의 범위 내에서 안전하게 생존할 수 있는 것으로 관찰되어 일반적인 온도와 pH 조건에서 안전하게 생존할 수 있어 다양한 토양조건에서 쉽게 정착되어 뿌리혹선충을 방제할 수 있을 것으로 사료한다.

다. *P. penetrans* KW-1 수화제를 이용하여 뿌리혹선충의 방제효과를 검정한 결과 78% 이상 나타났으며, 제형화를 실시하여 뿌리혹선충의 활성을 더욱 오래 유지할 수 있을 것으로 사료된다.

라. *P. penetrans* KW-1 수화제를 대상동물인 rat(SD)에 경구주입식으로 1.7×10^8 endospores의 *P. penetrans* KW-1 시 7, 14, 21일 후 체내의 소장, 대장, 위 등 장기에 모두 잔존하지 않았으며, 출혈이나 갈변증상이 나타나지 않았고, rat의 입주위에 혈흔이나, 혈루증, 항문이나 생식기 주위, 털의 변색이 발견되지 않았다.

마. 대상동물인 rat(SD)에 경구주입식으로 1.7×10^8 endospores *P. penetrans* KW-1 투여후 1일차 분변에서 92%이상의 세균이 배출되는 것을 확인하였으며, 7, 14, 21일차 분변에서는 모두 발견되지 않았다. 또한 실험에서 *P. penetrans* KW-1의 rat에 대한 LD₅₀은 $> 1.7 \times 10^8$ endospores인 것으로 나타났다.

제 3 절 *P. penetrans*의 생물학적 특성분석 및 대량 배양기술
개발

1. 서 론
2. 재료 및 방법
3. 결과 및 고찰
4. 결과요약

1. 서 론

토양 중에는 많은 종류의 병원균과 해충이 서식하고 있으며, 식물의 병과 직·간접적으로 관련이 있는 식물기생선충이 있다. 이러한 식물기생선충은 크기가 작고 작물의 지상부나 지하부에 나타나는 증상도 일반 병징과 유사하여 선충에 의한 피해를 쉽게 진단할 수 없다.

뿌리혹선충은 일종의 식물기생선충으로 영국에서 처음 발견되었으며, 또한 온도에 대한 적응력이 높아 추운지방에서도 생존이 가능하여 그 분포가 매우 광범위하다(Taylor와 Sasser, 1978, 김 등, 1998). 국내의 경우, 시설재배지에서 겨울동안에도 채소류를 연중 재배함으로써 아열대지방에 적응하는 뿌리혹선충의 발생이 심한 실정이다. 국내의 경우에는 고구마뿌리혹선충, 당근뿌리혹선충, 자바뿌리혹선충이 우점종으로 서식하고 있다.

뿌리혹선충이 기주 식물체에 침입할 경우 뿌리에 혹을 형성하여 영양성분과 수분 흡수를 저해하여 많은 관수와 비료가 소요된다. 또한 뿌리혹선충의 침입으로 인한 바이러스의 감염도 많이 일어나고 있는 실정이다. 국내의 경우, 원예작물 재배면적이 76,453ha로 그 중 70%인 52,949ha가 시설재배지로서 이용되고 있다. 이러한 시설 재배지에서는 동일작물에 대한 연작 재배로 인하여 뿌리혹선충의 피해가 급증하고 있으며, 그 중 50%의 농가에서 뿌리혹선충이 검출되고 있다. 현재 시설재배지에서의 뿌리혹선충 방제를 위한 방안으로 토양 개량법, 태양열 소독법, 작부체계 변경, 화학적 방제법, 생물학적 방제법을 많이 사용되고 있으나, 고비용이거나 약효시간이 짧은 등 원인으로 효과적으로 방제할 수 없었다.

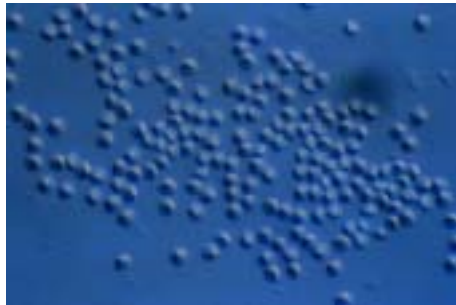


Fig. 25. The picture of *Pasteuria penetrans* endospores

최근에는 *P. penetrans*를 이용한 생물학적 방제법이 뿌리혹선충에 대한 방제효과가 높

아 각광을 받고 있다. *P. penetrans*는 그람양성 세균으로 온도와 습도에 저항성을 가지고 있으며, 토양 중에서 비운동성으로 선충에 부착하여 기주식물의 뿌리에 침입하여 선충 대신 *P. penetrans*를 대량 증식하게 되어 뿌리혹선충을 방제할 수 있게 된다(Fig. 25, 26).

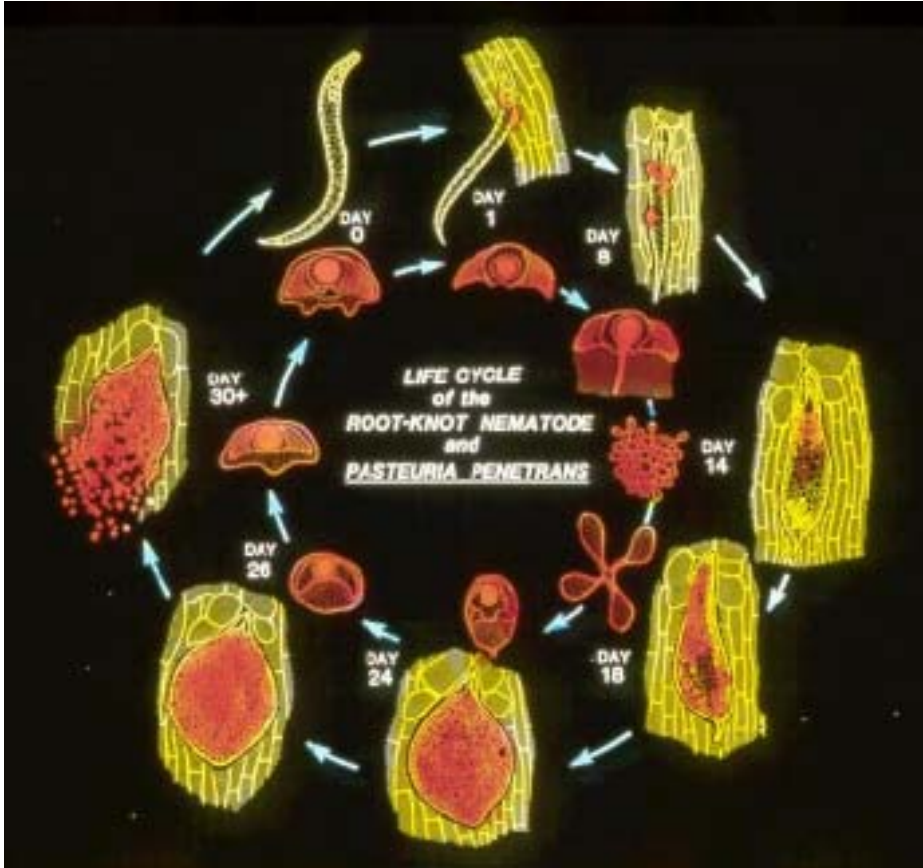


Fig. 26. Life cycle of the root-knot Nematode and *Pasteuria penetrans*

그러나 *P. penetrans*을 이용하여 뿌리혹선충에 대하여 방제효과가 우수하나 대상 세균의 뿌리혹선충에 대한 절대기생성으로 하여 대량증식이 매우 어려운 실정이다. 이러한 원인으로 많은 나라에서 *P. penetrans*의 뿌리혹선충에 대한 방제효과를 알고 있으나 개발하여 뿌리혹선충 방제제로 사용하지 못하였다. 미국의 경우, 70년대에는 직접 *P. penetrans*가 존재하는 지역의 토양을 이용하여 채소 경작지에서의 뿌리혹선충 방제제로 사용하기도 하였다.

따라서 본 실험에서는 포장에서 토마토를 이용하여 효과적으로 *P. penetrans*를 대량

증식할 수 있는 최적의 방법과 환경의 영향을 적게 받는 토마토의 모상근을 이용하여 기내에서의 대량 증식실험을 수행하였다.

2. 재료 및 방법

1) *P. penetrans*과 *Meloidogyne* spp.간의 생물학적 특성분석

Meloidogyne spp.을 종별로 *P. penetrans*을 첨가한 후 원심분리를 진행하였다. 원심분리 후 해부현미경($\times 400$)하에서 임의로 30마리의 선충을 선발하여 *P. penetrans*의 선충에 대한 부착율로 생물학적 특성분석을 진행하였다. 실험은 *P. penetrans* KW-1과 KW-2을 100,000 endospores 수준으로 *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. hapla* 각각 500 J2와 혼화하여 1 ml의 증류수에 희석하여 원심분리(4000rpm, 4분)를 진행하였다.

2) *P. penetrans*의 *Meloidogyne* spp.간의 효과적인 부착기술개발

P. penetrans KW-1가 부착된 *M. arenaria* 선충을 토마토 4주묘의 뿌리주변에 접종하였으며, 실험에서는 polyethylene pot (직경 750 mm, 높이 950 mm)에 “바로커” 상토 300g 씩 넣고 토마토를 정식하여 25℃조건에서 유지하였다. 실험에 토마토는 “서광” 품종을 이용하였으며, 부착효과는 7주 후에 토마토의 뿌리를 수확하여 *P. penetrans* KW-1의 개체수를 counting하여 결정하였다. 최적의 부착기술을 확인하기 위하여 MA를 500 J2/plant 수준으로 접종한 후 300,000 endospores의 *P. penetrans* KW-1균주와 혼화하여 1) shaker (140rpm, 24hrs); 2) Centrifuge (5000rpm, 5분); 3) Shaker (140rpm, 24hrs) after centrifuge (5000rpm, 5분); 4) Shaker (140rpm, 24hrs) after centrifuge (3000rpm, 5분) 등 방법으로 부착하여 토마토를 이용한 대량증식정도를 확인하여 최적의 부착기술을 선발하였다.

3) 토마토를 이용한 *P. penetrans*의 대량배양기술 개발

***P. penetrans* KW-1과 KW-2의 *M. arenaria*를 이용한 증식효과**

P. penetrans KW-1과 KW-2에 *M. arenaria* 3,000 J2를 첨가하여 28℃ 조건에서 shaking(140rpm, 12hrs)한 후 증식효과를 관찰하였다. *P. penetrans*가 부착된 *M. arenaria* 선충을 토마토 8주 묘의 뿌리주변에 접종하였으며, 실험에서는 polyethylene pot (직경 750 mm, 높이 950 mm)에 “바로커” 상토 300g씩 넣고 토마토를 정식하여 25℃조건에서 유지하였다. 실험에 토마토는 “서광” 품종을 이용하였으며, 증식효과는 7주 후에 토마토의 뿌리를 수확하여 *P. penetrans*의 개체수를 counting하여 결정하였다.

***P. penetrans*의 온도변화에 따른 증식효과**

P. penetrans KW-1가 부착된 *M. arenaria* 선충을 토마토 8주묘의 뿌리주변에 접종하였으며, 실험에서는 polyethylene pot (직경 750 mm, 높이 950 mm)에 “바로커” 상토 300g씩 넣고 토마토를 정식하여 25℃조건에서 유지하였다. 실험에서 토마토는 “서광” 품종을 이용하였으며, 증식효과는 7주 후에 토마토의 뿌리를 수확하여 *P. penetrans* KW-1의 개체수를 counting하여 결정하였다. 실험은 *P. penetrans* KW-1 300,000 endospores를 10℃, 30℃, 50℃, 70℃ 조건에서 60분 처리한 후 *M. arenaria* 3,000 J2를 첨가하여 1 ml의 증류수에 희석하여 28℃ 조건에서 shaking (140rpm, 12hrs) 하여 부착시킨 후 토마토에 접종하였다.

***P. penetrans*의 pH 변화에 따른 증식효과**

P. penetrans KW-1가 부착된 *M. arenaria* 선충을 토마토 8주묘의 뿌리주변에 접종하였으며, 실험에서는 polyethylene pot (직경 750 mm, 높이 950 mm)에 “바로커” 상토 300g씩 넣고 토마토를 정식하여 25℃조건에서 유지하였다. 실험에서 토마토는 “서광” 품종을 이용하였으며, 증식효과는 7주 후에 토마토의 뿌리를 수확하여 *P. penetrans* KW-1의 개체수를 counting하여 결정하였다. 실험은 *P. penetrans* KW-2 30만 마리를 pH 4, 7, 10 그리고 토양 산도인 5.8 조건에서 60분 처리한 후 *M. arenaria* 3,000 J2를 첨가하여 1 ml의 증류수에 희석하여 28℃ 조건에서 shaking (140rpm, 12hrs) 하여 부착시킨 후 토마토에 접종하였다.

***P. penetrans*의 토마토의 생육에 따른 증식효과**

P. penetrans KW-1균주가 부착된 *M. arenaria* 선충을 토마토 뿌리주변에 접종하였으며, 실험에서는 polyethylene pot (직경 750 mm, 높이 950 mm)에 “바로커” 상토 300g씩 넣고 토마토를 정식하여 25℃조건에서 유지하였다. 실험에서 토마토는 “서광” 품종을 이용하였으며, 증식효과는 7주 후에 토마토의 뿌리를 수확하여 *P. penetrans* KW-1균주의 개체수를 counting하여 결정하였다. 실험은 *P. penetrans* KW-1 100,000 pp를 *M. arenaria* 1,000 J2와 함께 1 ml의 증류수에 희석하여 28℃ 조건에서 shaking (140rpm, 12hrs) 하여 부착시킨 후 토마토 4주묘, 8주묘, 12주묘에 접종하여 토마토의 생육에 따른 증식효과를 관찰하였다.

***P. penetrans*의 뿌리혹선충의 양에 따른 최적 증식효과**

P. penetrans KW-1에 *M. arenaria*를 첨가하여 28℃ 조건에서 부착하여 증식효과를 관찰하였다. *P. penetrans* KW-1가 부착된 *M. arenaria* 선충을 토마토 8주묘의 뿌리주변에 접종하였으며, 실험에서는 polyethylene pot (직경 750 mm, 높이 950 mm)에 “바로커” 상토 300g씩 넣고 토마토를 정식하여 25℃조건에서 유지하였다. 실험에서 토마토는 “서광” 품종을 이용하였으며, 증식효과는 7주 후에 토마토의 뿌리를 수확하여 *P. penetrans* KW-1의 개체수를 counting하여 결정하였다. 실험은 *P. penetrans* KW-1와 *M. arenaria* J2를 첨가하여 28℃ 조건에서 shaking (140rpm, 12hrs) 하여 부착시킨 후 8주 묘 토마토에 1,000, 3,000, 8,000, 15,000 J2를 접종하여 그루당 최적의 *P. penetrans*를 증식할 수 있는 조건을 확인하였다.

***P. penetrans*의 최적 증식조건에 따른 증식효과**

P. penetrans KW-1의 대량증식 최적조건에 따라 증식효과실험을 진행하였다. 먼저 50℃조건에서 *P. penetrans* KW-1를 60분간 처리한 후 MA과 같이 원심분리(3000rpm, 5분)하고 28℃ 조건에서 shaking(140rpm, 12시간)하여 효과적으로 부착시킨다. *P. penetrans* KW-1 부착된 *M. arenaria* 15,000 J2/plant 수준으로 토마토 12주묘의 뿌리주위에 주입한 후 12주 후 대량의 *P. penetrans* KW-1 증식효과를 관찰하였다. 대조구로는 *P. penetrans* KW-1를 MA과 같이 28℃ 조건에서 shaking(140rpm, 12시간)하여 부착하여 *P. penetrans* KW-1 부착된 *M. arenaria* 15,000 J2/plant 수준으로 토마토 12주묘의 뿌리주위에 주입한 후 증식효과를 관찰하였다.

4) 토마토의 모상근을 이용한 *P. penetrans*의 대량배양기술 개발

토마토의 모상근의 유도

무균상태의 기내에서 토마토 식물체를 키우기 위하여 종자 내 오염원을 5% sodium hypochlorites solution을 이용하여 5분간 세척한 뒤 1/2 B5 agar 배지에 치상하여 25℃ 배양실에서 배양하였다. 치상된 종자에서 싹이 나고 식물체가 형성되면 어린잎에 *agrobacterium rhizogene* (strain A4)을 상처접종 하였으며, 접종된 토마토 어린잎을 Cefotaxime(250)이 첨가된 1/2 B5 항생제 배지에서 계대배양하여 암상태에서 모상근을 유도하였다. 다음 1/2 B5 agar 배지에 치상하여 25℃ 배양실에서 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

토마토의 모상근을 이용한 *P. penetrans* 기내배양

P. penetrans KW-1와 MA를 28℃ 조건에서 shaking(140rpm, 5분)을 진행하여 부착시킨다. *P. penetrans* KW-1가 부착된 MA를 멸균된 500mesh sieve에 통과시킨 후 0.5% sodium hypochlorites solution을 이용하여 5분간 세척한 뒤 멸균된 증류수로 충분히 세척한다. 멸균된 *P. penetrans* KW-1가 부착된 MA를 1주령의 토마토 모상근에 접종한 후 밀봉하여 28℃ 조건에서 *P. penetrans* KW-1의 증식여부를 확인한다.

3. 결과 및 고찰

1) *P. penetrans*와 뿌리혹선충간의 생물학적 특성분석

P. penetrans KW-1이 고구마뿌리혹선충 *M. incognita* (MI), 땅콩뿌리혹선충 *M. arenaria* (MA), 당근뿌리혹선충 *M. hapla* (MH)에 모두 95%이상의 높은 부착율을 나타내어 넓은 방제 스펙트럼을 나타내는 반면, 나머지 4가지 *P. penetrans*는 3종의 뿌리혹선충 중 1종류의 선충에만 부착되는 선택성을 나타내어 방제효과의 제한성을 나타내었다. 따라서 국내의 경우 *P. penetrans* KW-1를 이용하면 다양한 종류의 뿌리혹선충을 방제할 수 있을 것으로 판단된다(Table 18).

Table 18. Attachment of *Pasteuria penetrans* isolates on *Meloidogyne* spp.

Isolation	Attachment rates (%)		
	<i>M. incognita</i>	<i>M. arenaria</i>	<i>M. hapla</i>
KW-1	100	100	95
KW-2	5	100	10
KW-3	5	50	0
KW-4	0	0	100
KW-5	0	0	100

2) *P. penetrans*의 효과적인 선충부착기술 개발

P. penetrans KW-1를 *M. arenaria* J2에 부착하여 토마토 8주묘에 접종하여 증식한 결과, attach 1, 2, 3, 4처리구에서 1,000 뿌리혹선충을 처리 시 각각 1.3×10^7 endospores/plant, 1.1×10^7 cells/plant, 3.3×10^7 endospores/plant, 4.1×10^7 endospores/plant의 증식효과를 나타내었으며. 3,000 뿌리혹선충을 처리 시 각각 4.6×10^7 endospores/plant, 3.4×10^7 cells/plant, 5.2×10^7 endospores/plant, 7.6×10^7 endospores/plant의 증식효과를 나타내었다. 그 중 attach. 4 방법으로 부착한 처리구에서 1,000마리와 3,000 마리의 MA 접종 시 각각 4.1×10^7 endospores/plant, 7.6×10^7 endospores/plant로 가장 높은 증식효과를 나타내었다. 이러한 결과로부터 *P. penetrans*과 MA를 부착 시 단순한 shaking이나 centrifuge (5000 rpm, 5 minutes)보다는 그것을 조합하여 centrifuge (5000 rpm, 5 minutes)로 일차적으로 부착시킨 후 shaking (140 rpm, 12 hrs)을 실시하여 유효부착율을 높여야 할 것으로 사료된다. 또한 원심분리기를 이용하여 부착 시 3000 rpm조건하에서 일차적으로 부착시키고 shaking (140 rpm, 12 hrs)을 실시하면 더욱 효과적으로 *P. penetrans* KW-1를 증식할 수 있을 것으로 판단된다(Fig. 27).

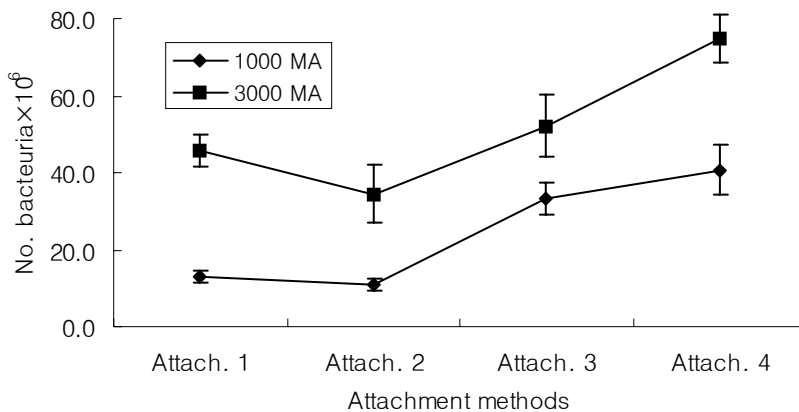


Fig. 27. Mass production of *Pasteuria penetrans* KW-2 on *Meloidogyne arenaria* according different attachment methods on 8 weeks old tomato. Attach. 1 is shaking (140 rpm, 12 hrs); Attach. 2 is centrifuge (5000 rpm, 5 minutes); Attach. 3 is shaking (140 rpm, 12 hrs) after centrifuge (5000 rpm, 5 minutes); Attach. 4 is shaking (140 rpm, 12 hrs) after centrifuge (3000 rpm, 5 minutes) at 28°C.

3) 토마토를 이용한 *P. penetrans*의 대량 배양기술개발

P. penetrans KW-1과 KW-2의 *M. arenaria*를 이용한 증식효과

M. arenaria J2를 이용하여 *P. penetrans* KW-1과 KW-2 증식 처리구는 각각 3.2×10^7 endospores/plant, 30°C , 4.6×10^7 endospores/plant의 증식효과를 나타내었다. 그 중 *P. penetrans* KW-2 증식 처리에서 4.6×10^7 endospores/plant로 KW-1 증식 처리구보다 높은 증식효과를 나타내어 증식이 더욱 용이한 것으로 확인되었다. 또한 *P. penetrans* KW-1는 뿌리혹선충에 대한 기생범위가 KW-2보다 더욱 넓어 국내의 경우 *P. penetrans* KW-1를 대량 증식하여 뿌리혹선충의 방제에 이용할 수 있을 것으로 사료된다(Fig. 28).

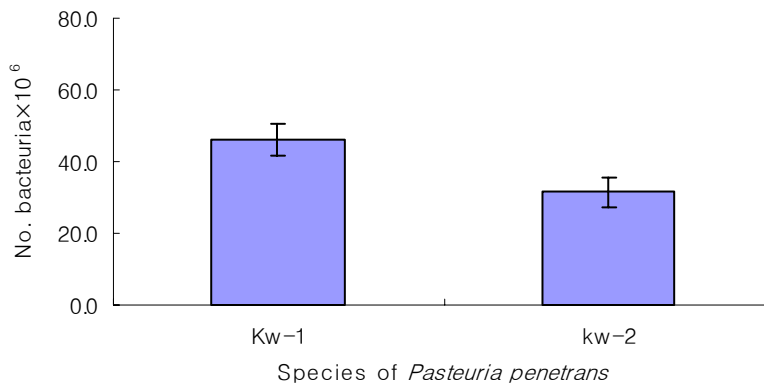


Fig. 28. Mass production of *Pasteuria penetrans* KW-1 and KW-2 on *Meloidogyne arenaria* 3,000 on 8 weeks old tomato. The attachment method is shaking (140rpm) it 12hrs at 28°C temperature.

*P. penetrans*의 온도변화에 따른 증식효과

다양한 온도조건하에서 60분간 *P. penetrans* KW-1를 처리 후 *M. arenaria* J2 3,000 마리에 부착하여 토마토 8주묘에 접종하여 증식한 결과, 10°C 처리구에서 5.5×10^7 endospores/plant, 30°C 처리구에서는 4.6×10^7 endospores/plant, 50°C 처리구에서 6.1×10^7 endospores/plant, 70°C 처리구에서 4.6×10^7 endospores/plant의 증식효과를 나타내었다. 그 중 50°C 처리구에서 6.1×10^7 endospores/plant로 가장 높은 증식효과를 나타내었으며,

실내온도인 30℃ 처리구에 비하여 10℃와 50℃ 처리구에서는 높은 증식효과를 나타내었으나, 70℃ 처리구에서는 차이를 나타내지 않았다. 이러한 원인은 *P. penetrans* KW-1의 cuticle층이 일정한 온도범위 내에서 활성을 나타내어 뿌리혹선충과 더욱 효과적으로 부착되어 많은 양의 *P. penetrans* KW-1를 증식한 결과로 판단된다(Fig. 29, 30).

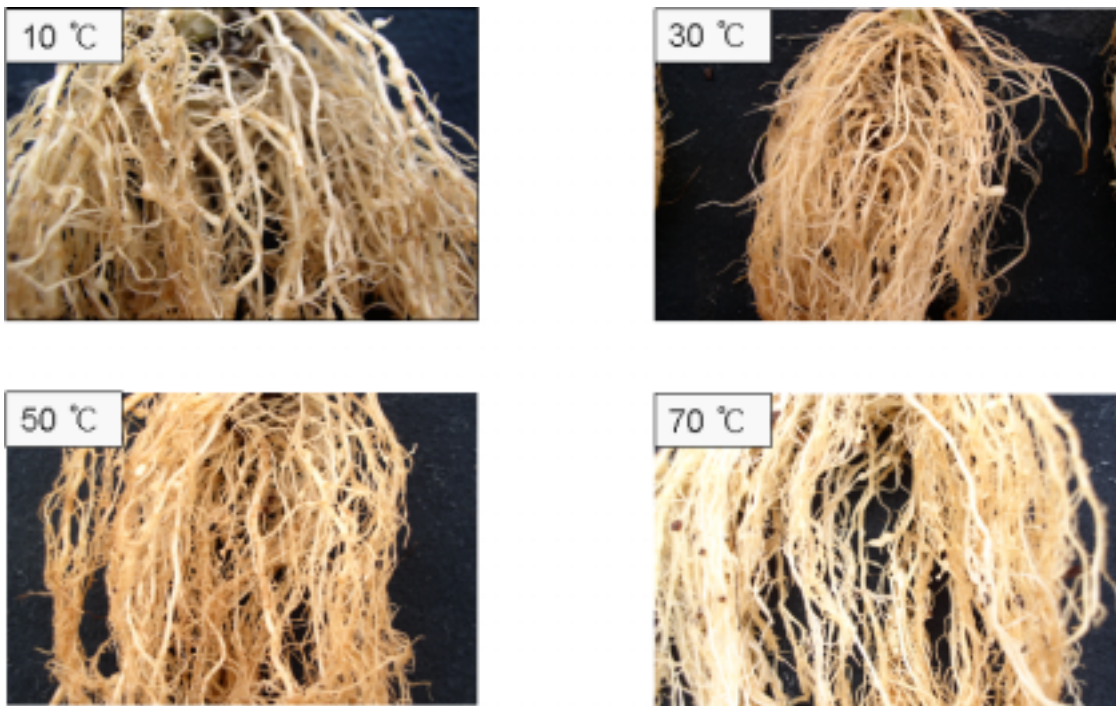


Fig. 29. The picture of mass production of *Pasteuria penetrans* KW-1 on *Meloidogyne arenaria* 3.000 after treated 60 minutes under different temperature on 8 weeks old tomato. The attachment method is shaking (140rpm) 12hrs at 28℃.

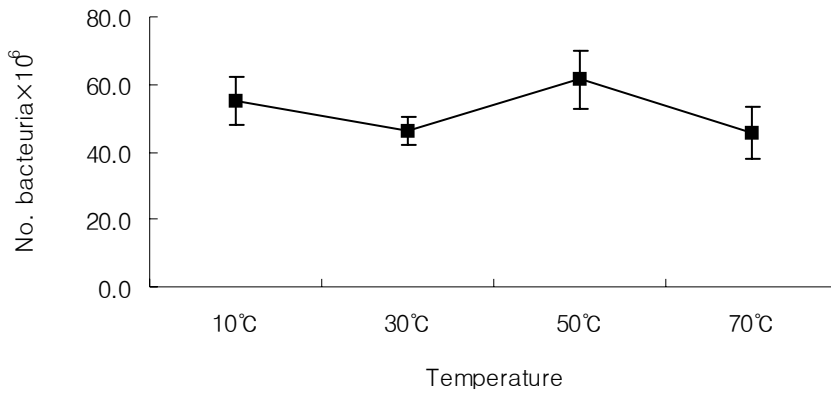


Fig. 30. Mass production of *Pasteuria penetrans* KW-1 on *Meloidogyne arenaria* 3.000 after treated 60 minutes under different temperature on 8 weeks old tomato. The attachment method is shaking (140rpm) 12hrs at 28°C.

***P. penetrans*의 pH 변화에 따른 증식효과**

다양한 pH조건하에서 60분간 *P. penetrans* KW-1를 처리 후 *M. arenaria* J2 3,000 마리에 부착하여 토마토 8주묘에 접종하여 증식한 결과, pH 4 처리구에서 4.3×10^7 endospores/plant, pH 7 처리구에서 3.3×10^7 endospores/plant, pH 10 처리구에서 3.4×10^7 endospores/plant, 일반토양 pH 5.8 처리구에서 4.6×10^7 endospores/plant의 증식효과를 나타내었다. 그 중 pH 5.8 처리구에서 4.6×10^7 endospores/plant로 가장 높은 증식효과를 나타내었으며, pH 4, 7, 10 처리구에서는 모두 pH 5.8보다 낮은 증식효과를 나타냈다. 이러한 원인은 *P. penetrans* KW-1이 일반토양의 pH인 5.8에서 가장 안전하게 뿌리혹선충과 부착되어 *P. penetrans* KW-1를 증식할 수 있는 것으로 판단된다(Fig. 31, 32).

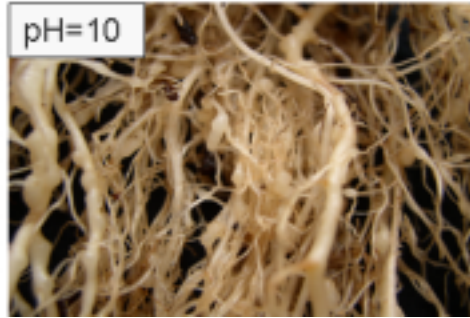
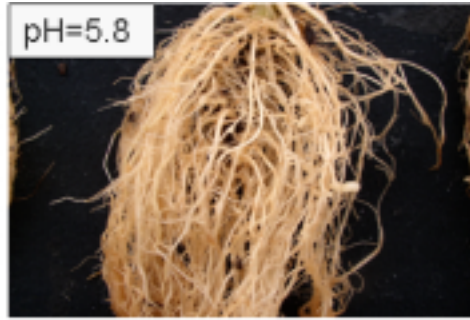


Fig. 31. The picture of mass production of *Pasteuria penetrans* KW-1 on *Meloidogyne arenaria* 3.000 after treated 60 minutes under different pH on 8 weeks old tomato. The attachment method is shaking (140rpm) 12hrs at 28°C.

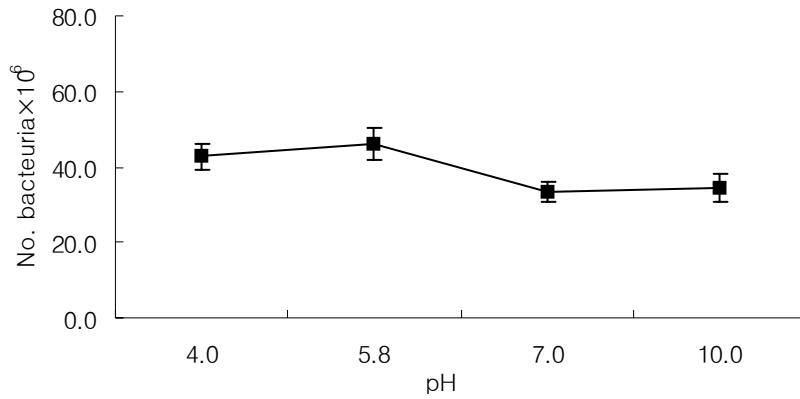


Fig. 32. Mass production of *Pasteuria penetrans* KW-1 on *Meloidogyne arenaria* 3.000 after treated 60 minutes under different pH on 8 weeks old tomato. The attachment method is shaking (140rpm) 12hrs at 28°C.

***P. penetrans*의 토마토의 생육에 따른 증식효과**

토마토 4주묘 처리구에서 2.2×10^7 endospores/plant, 8주묘 처리구에서 1.3×10^7 endospores/plant, 12주묘 처리구에서 1.6×10^7 endospores/plant의 증식효과를 나타내었다. 그 중 4주묘 처리구에서 2.2×10^7 endospores/plant로 가장 높은 증식효과를 나타내어 토마토 뿌리가 어릴수록 쉽게 침입하여 더욱 높은 증식효과를 나타낼 수 있는 것으로 판단된다. 또한 토마토 12주묘 처리구에서 8주묘 처리구보다 증식효과가 높은 것은 뿌리혹선충이 뿌리로의 침입은 어려우나 침입할 수 있는 뿌리 양이 증가하여 결과적으로 많은 양의 *P. penetrans* KW-1를 증식한 결과로 사료된다(Fig. 33, 34).



Fig. 33. The picture of mass production of *Pasteuria penetrans* KW-1 on *Meloidogyne arenaria* 1.000 on different old tomato. The attachment method is shaking (140rpm) 12hrs at 28°C.

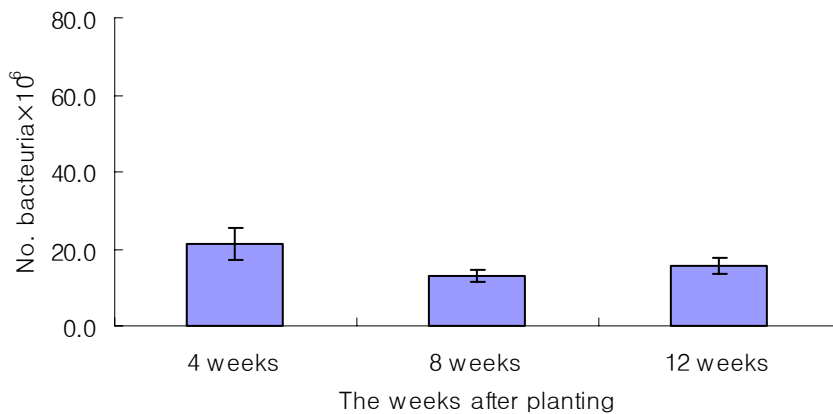


Fig. 34. Mass production of *Pasteuria penetrans* KW-1 on *Meloidogyne arenaria* 1.000 on different old tomato. The attachment method is shaking (140rpm) 12hrs at 28°C.

*P. penetrans*의 선충량에 따른 최적 증식효과

P. penetrans KW-1가 부착된 *M. arenaria* J2를 부착하여 증식실험 결과, 1,000마리 처리구에서 1.3×10^7 endospores/plant, 3,000마리 처리구에서 3.6×10^7 endospores/plant, 8,000마리 처리구에서 7.5×10^7 endospores/plant, 15,000마리 처리구에서 1.1×10^8 endospores/plant, 30,000마리 처리구에서 1.0×10^8 endospores/plant의 증식효과를 나타내었다. 그 중 15,000 처리구에서 1.1×10^8 endospores/plant로 가장 높은 증식효과를 나타내어 pot에서 토마토를 이용하여 *P. penetrans* 증식 시 15,000 J2 수준으로 진행하면 가장 높은 증식효과를 나타낸다고 판단된다(Fig. 35).

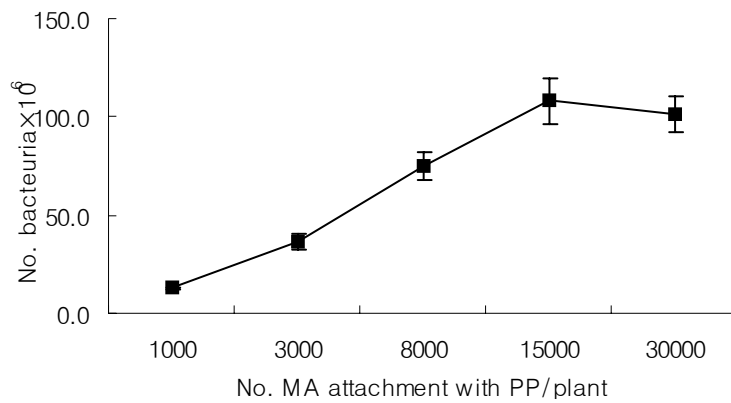


Fig. 35. Mass production of *Pasteuria penetrans* KW-1 on *Meloidogyne arenaria* according No. of nematode on 8 weeks old tomato. The attachment method is shaking (140 rpm) 12 hrs at 28°C.

*P. penetrans*의 최적 증식조건에 따른 증식효과

P. penetrans KW-1의 대량증식 최적조건에 따라 증식효과실험을 진행하였다. 최적조건에서 *P. penetrans* KW-1 증식실험 결과 1.3×10^8 endospores/plant의 증식효과를 나타내 대조구의 9.8×10^7 endospores/plant의 증식효과에 비하여 31.4% 높은 증식효과를 나타냈다(Fig. 36).

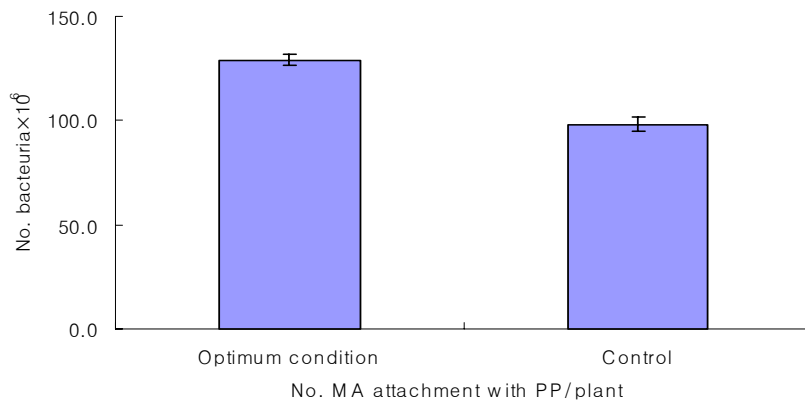


Fig. 36. Mass production of *Pasteuria penetrans* KW-1 on *Meloidogyne arenaria* in optimum condition. The optimum condition is 15,000 J2 MA attachment with *Pasteuria penetrans* on 12 weeks old tomato. The attachment method is shaking (140 rpm, 12 hrs) after centrifuge (3000 rpm, 5 minutes) at 28°C after treated 60 minutes 50°C.

4) 토마토의 모상근을 이용한 *P. penetrans*의 대량배양기술 개발

토마토의 모상근의 유도

토마토 종자 내 오염원을 5% sodium hypochlorites solution을 이용하여 5분간 세척한 뒤 멸균된 증류수를 이용하여 충분히 소독수를 세척하였다. 멸균된 토마토 종자를 1/2 B5 agar 배지에 치상하여 25℃ 배양실에서 배양하여 토마토의 어린잎에 *agrobacterium rhizogene* (strain A4)을 상처접종 하였다. *agrobacterium rhizogene* (strain A4)이 접종된 어린잎을 Cefotaxime(250)이 첨가된 1/2 B5 항생제 배지에서 계대 배양하여 암상태에서 모상근을 유도하였으며 그림 37과 같다.



Fig. 37. Ri-T DNA transformed tomato hairy-root

토마토의 모상근을 이용한 *P. penetrans* 기내배양

멸균된 *P. penetrans* KW-1가 부착된 MA를 1주령의 토마토 모상근에 접종한 후 밀봉하여 28℃ 조건에서 *P. penetrans* KW-1의 증식여부를 확인하였으며 그림 38과 같다.



Fig. 38. Mass production of *Pasteuria penetrans* kw-1 on *Meloidogyne arenaria* in Ri-T DNA transformed tomato hairy-root

기내에서의 *P. penetrans* KW-1의 증식완료가 35일이면 완료될 수 있어 포장에서의 증식완료 소요기일인 49일보다 12일간 앞당길 수 있다(Table 19). 이러한 장점에도 불구하고 기내에서의 *P. penetrans* KW-1 대량증식은 현실적으로 배지가 쉽게 오염되고, 모상근이 갈변하면서 영양부족에 따른 증상을 나타내는 등 재현성이 낮은 문제점과 고비용이란 단점이 작용하고 있어 *P. penetrans*의 동정과 분류를 위한 연구를 진행하기 위하여서는 더욱 심도있는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Table 19. Comparison of *pasteuria penetrans* growth between *in vitro* and *in vivo* condition in tomato

Treatment	Growth stages after inoculation (days)				
	14	21	35	42	49
in vitro (Transformed root)	Vegetative growth	Vegetative growth	Form endospore		
in vivo (Normal root)	Vegetative growth	Vegetative growth	Vegetative growth	Vegetative growth	Form endospore

4. 결과 요약

가. 포장에서 토마토를 이용하여 *P. penetrans*를 대량 증식 시, 먼저 *P. penetrans*와 *Meloidogyne spp.*을 50℃ 조건에서 *P. penetrans*을 60 분간 활성화한 다음, *P. penetrans*을 뿌리혹선충과 혼합하여 centrifuge (3000rpm, 5분)한 후 shaking (140rpm, 12hrs)하여 효과적인 부착을 유도할 수 있다.

나. *P. penetrans*가 부착된 *Meloidogyne spp.*을 토양과 혼합하여 15,000 J2 수준으로 12주령의 토마토뿌리 주변에 주입하면 40 - 50일 후 대량의 *P. penetrans*를 수확할 수 있다.

다. 토마토의 종자를 이용하여 멸균상태에서 어린잎을 배양한 후 *agrobacterium rhizogene* (strain A4)을 이용하여 토마토 모상근을 획득하였다. *P. penetrans*과 뿌리혹선충을 shaking (140rpm, 12hrs)하여 부착시킨 후 0.5% sodium hypochlorites solution을 이용하여 표면살균한 다음 토마토의 모상근 주위에 주입하여 대량의 *P. penetrans*을 증식할 수 있었다.

라. 기내에서 모상근을 이용하여 *P. penetrans*을 증식하는데 35일이 소요되어 포장에서 소요되는 49일에 비하여 12일간 앞당겨 대량 증식할 수 있었다.

마. 모상근을 이용하여 *P. penetrans*을 증식할 수 있으나 배지가 쉽게 오염되고, 모상근이 갈변하면서 영양부족에 따른 증상을 나타내는 등 재현성이 낮은 문제점과 고비용이란 단점이 작용하고 있어 더욱 심도있는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

제 4 절 뿌리혹선충의 분류 및 조기동정기술 개발

1. 서 론
2. 재료 및 방법
3. 결과 및 고찰
4. 결과요약

1. 서 론

국내에서는 최근 온실시설이 고정화, 대형화되고 동일 장소에서의 단일작목 연속 년수가 늘어남에 따라 각종 연작장해가 발생하고 있다. 여러 가지의 연작장해요인 중 특히 뿌리혹선충에 의한 수량감소 및 조기고사 피해는 1980년대 이후 계속 증가하는 추세에 있어 뿌리혹선충에 대한 효과적인 방제대책의 수립이 시급한 실정이다.

시설에서 재배되는 과채류 중 수박 (19,189ha), 참외 (9,365ha), 오이 (5,722ha), 호박 (3,271 ha), 토마토 (3,833ha), 풋고추 (4,808ha), 가지 (300ha) 등 뿌리혹선충의 피해를 받기 쉬운 작목의 재배면적이 46,488ha로 전체 시설재배면적의 약 88%를 점하고 있다 (Ministry of Agr. & For., 1999). 참외 주산단지인 경북 성주군의 경우 뿌리혹선충 포장감염율은 85%에 이르며 포장내 감염주율은 60.5%로 뿌리혹선충이 시들음병과 함께 연작장해의 중요한 요인중의 하나로 보고된 바 있다. 국내 시설재배지에 대한 전체적인 뿌리혹선충의 피해정도와 선충분포에 관한 연구는 아직 이루어지지 못하였으나 성주군의 예를 볼 때 상당한 면적이 뿌리혹선충의 피해를 받고 있을 것으로 추정된다. 뿌리혹선충의 방제방법으로는 3~4년 주기의 토양개량, 수도재배를 통한 침수, 태양열 소독 등이 제시되고 있으나 재배기간이 늘어나고 토양개량 비용이 증가함에 따라 이러한 물리적인 방법의 실용성이 낮아지고 있다.

국내 시설재배지에서는 고구마뿌리혹선충(*M. incognita*)과 당근뿌리혹선충(*M. hapla*)의 피해가 크다고 보고되어 있으며 국내에 분포하는 뿌리혹선충류는 땅콩뿌리혹선충 (*M. arenaria*), 자바뿌리혹선충 (*M. javanica*) 외에 양다래에서 분포가 확인된 *M. cruciani*와 기주식물이 확인되지 않은 *M. hispanica* 등 6종이 보고되어 있다. 그러나 아직도 시설재배단지 별로 어떤 종이 분포하는지에 대한 연구가 부족하여 최근 과채류 재배단지에서 피해가 확산되고 있는 뿌리혹선충의 종합적인 방제대책 수립을 위한 기초자료가 충분하지 못한 상태이다.

특히 뿌리혹선충의 분류를 위해서는 선충의 각 태별 형태적 특성뿐만 아니라 판별식물을 이용한 기주범위 검정까지 이루어져야 하므로 정확한 종의 동정에는 많은 시간과 노력이 소요된다. 최근에는 이러한 단점을 극복하기 위하여 PCR에 의한 유충 종 동정 및 효소표현형을 이용한 동정법이 개발되어 널리 이용되고 있다. 2~3가지의 효소표현형을 이용하면 대부분의 뿌리혹선충 암컷의 동정이 가능하였으며 특히 *esterase*가 주요 뿌리혹선충의 동정에 유용하다고 보고되어 있다. 일본에서는 *esterase*, *malate dehydrogenase*

등 2가지 효소표현형을 이용하여 일본 내 담배포장에 분포하는 당근뿌리혹선충, 땅콩뿌리혹선충, 고구마뿌리혹선충, 자바뿌리혹선충의 분포지도를 작성하였다. 일본에 분포하는 자바뿌리혹선충의 **esterase** 표현형은 미국 분포종과 다르며 세가지의 암컷 **perineal pattern** 을 나타낸 군집들에서 3가지의 **esterase** 효소표현형을 나타내었다고 하였다. 지금까지 국내에서는 뿌리혹선충의 동정에 주로 암컷의 **perineal pattern**과 기주관별법을 사용하였으며 PCR 등 최근 기술을 이용한 분류에 관한 연구는 시작단계에 있다.

2. 재료 및 방법

본 연구에서는 뿌리혹선충 방제를 위한 기초자료 제공을 위하여 과채류 재배단지에서 문제가 되고 있는 선충의 종류를 조사하였으며 기존의 형태적 분류 및 기주식물을 이용한 판별법 등을 적용할 때 문제가 되는 전문성, 장시간 소요 등 문제점을 해결하고자 뿌리혹 선충의 신속 정밀동정 체계 개발을 위해 암컷의 효소표현형을 이용한 동정체계, 유충 및 암컷의 DNA 특징을 활용한 PCR 동정체계에 관한 연구를 수행하였다.

1) 뿌리혹선충의 분포 조사 및 뿌리혹선충의 단백질 및 효소분석에 의한 분류

국내 시설재배지 중 뿌리혹선충의 피해가 큰 경북 성주군의 참외재배단지과 강원도 춘천시의 시설재배지에서 토양을 채집하였다. 농가별로 하우스당 500cc의 토양을 채집하여 실험실로 운반한 후 4℃ 냉장고에 보관하면서 수시로 토양내의 선충을 분리하였다. 선충분리법은 Combined sieving & centrifugation method를 이용하였으며 선충의 종류 및 밀도 조사는 해부현미경하에서 실시하였다.

뿌리혹선충의 정밀동정을 위하여 효소표현형을 이용한 동정을 실시하였는데 그 과정은 다음과 같다. 토양에서 채집한 작물의 뿌리를 물로 잘 씻은 후 뿌리혹 및 난낭이 형성된 뿌리를 해부현미경하에서 핀셋으로 해부하여 신선한 암컷을 채집하였다.

암컷 크기에 따라 2-5마리를 마이크로튜브에 넣고 추출용액(20% sucrose, 2% Triton X-100)을 첨가한 후 약한 열로 끝을 둥글게 만든 피펫팁을 이용하여 잘 마쇄하였다. 추출액은 7.5% Tris-Glycerin gel (12 wells, 10 X10 cm, 두께 1 mm)을 사용하여 4℃에서 100V, 20mA의 전원을 지속적으로 공급하면서 약 90분간 전기영동하였다. 전기영동 후 gel을 용기에 담은 후 상온에서 약 10분간 Malate dehydrogenase (MDH) 염색을 실시한 후 물로 세척하여 Esterase (EST) 염색은 35℃ 정온기 내에서 약 45분간 실시하였다.

2) 뿌리혹선충의 DNA 추출기술 개발 및 RAPD, RFLP 분석을 통한 유전자 진단체계의 개발

DNA 분리 및 정제

DNA 분리를 위해서는 뿌리혹선충 암컷의 경우 NASBA(Nucleic Acid Sequence Based Amplification)와 phenol/ chloroform/ isoamyl alcohol (25:24:1) 방법, 유충의 경우 DNeasy (QIAGEN) kit를 각각 이용하였다.

가) 암컷 DNA 추출

① NASBA법을 이용한 선충 DNA 추출

DNA 분리를 위해서는 우선 뿌리혹 선충 암컷(3-5 마리)을 식물뿌리에서 분리해 낸 다음, 증류수로 2 - 3회 헹구어 준다. 깨끗이 헹구어 진 선충은 약 5 ul의 증류수가 채워진 microcentrifuge tube에 옮겨진 다음 약한 불로 끝을 둥글게 만든 피펫팁을 이용하여 잘 갈아 준다. 마쇄된 선충 sample에 300 ul의 lysis buffer를 첨가하여 다시 한번 갈아준 다음, 14,000 xg에서 1분간 원심분리하여 상등액만 새로운 tube에 옮긴다. 옮겨진 시료에 vortex한 silica, 50 ul를 첨가하여 30 C에서 10 분간 incubation하고, vortex후 다시 10,000 xg에서 30초간 원심분리 한다. 원심분리후 상등액은 버리고 침전된 시료에 1ml의 wash buffer를 첨가하여 vortex한 다음 10,000 xg에서 30초간 원심분리 하는데, 이러한 washing step은 총 3회 반복한다. 그런 다음 70 % ethanol, 1ml를 첨가하여 DNA precipitation 과정을 2회 반복하고, 1 ml의 acetone으로 DNA를 고정한다. sample은 56 C, water bath에서 10 분간 incubation 한 다음, 마지막으로 elution buffer 50 ul를 넣고 10,000 xg에서 2분간 원심분리 하여 DNA가 포함된 상등액을 따로 분리해 낸다.

② P/C/I (25:24:1)를 이용한 선충 분리

DNA 분리를 위해서는 우선 뿌리혹 선충 암컷(3-5 마리)을 식물뿌리에서 분리해 낸 다음, 증류수로 2 - 3회 헹구어 준다. 깨끗이 헹구어 진 선충은 약 5 ul의 증류수가 채워진 microcentrifuge tube에 옮겨진 다음 약한 불로 끝을 둥글게 만든 피펫팁을 이용하여 잘 갈아 준다. 마쇄된 선충 sample에 150 ul의 lysis buffer (100mM NaCl, 50 mM EDTA, 250mM Tris-HCl, 5 % SDS)와 PBS 혼합액 (2:1), 그리고 proteinase K (100ug/ml)를 첨가하여 다시 한번 갈아준 다음, -20 C에서 10 분간 incubation 하였다. 저온저장 후 sample

은 60 C에서 40분간 incubation한 다음 12,000 rpm에서 1분간 원심 분리하여 상등액을 분리하고, 그 추출액에 150 ul의 P/C/I (25:24:1)를 첨가하여 8,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 원심분리후 상등액만 따로 분리하여 새로운 튜브에 옮긴 다음 3M, Sodium acetate 5ul와 isopropanol 350 ul를 함께 첨가하여 다시 15,000 rpm에서 20 분간 원심분리 하였다. 원심분리후 상등액은 모두 버리고 침전물에 70% ethanol을 첨가하여 마지막으로 15,000 rpm에서, 20 분간 원심분리 하였다. DNA침전물은 진공건조 시킨후 30 ul의 TE buffer에 녹여 주었다.

나) 유충 DNA 추출

유충의 경우 알에서 부화된 3-5 마리의 J2를 이용하여 DNA를 분리하였다. 암컷 선충과 마찬가지로 알에서 부화된 유충은 증류수로 2 - 3회 깨끗히 헹구어 준다. 그런 다음 선충을 새로운 tube에 옮긴후 180 ul의 ATL buffer와 proteinase K를 첨가하여, 55 C water bath에서 overnight시킨다. 다음 날, sample에 200 ul buffer AL을 첨가하여 vortex 후 70 C에서 10 분간 incubation 한다. Incubation후, 100 %의 ethanol 200 ul를 첨가하고, 그 혼합물을 DNeasy spin column에 옮겨 6,000 xg에서 1 분간 원심분리 한다. 원심분리후 걸러진 용액은 버리고, column에 500 ul의 AW1 buffer와 AW2 buffer를 첨가하여, 각각 6,000 xg에서 1 분간 원심분리 한다. 마지막으로 200 ul의 AE buffer를 첨가하고, 6,000 xg에서 1 분간 원심분리 하여 순수한 DNA를 분리해 낸다.

3. 결과 및 고찰

1) 뿌리혹선충의 분포 조사 및 뿌리혹선충의 단백질 및 효소분석에 의한 분류

국내 주요 시설 과채류 재배지에서 재배되고 있는 작물은 참외, 수박, 고추 등이 주요 작목이었다. 특히 성주군의 경우 참외재배 시 11월 또는 12월에 정식하여 6-7월까지 수확한 후 다시 같은 하우스에 새로운 묘를 정식하여 연속 재배하는 작형이 최근 도입되어 연작에 따른 뿌리혹선충의 피해가 증가하는 경향이였다. 연장재배의 경우 1차 재배기간 중 뿌리혹선충의 피해가 관찰되더라도 곧바로 2차 정식에 들어가기 때문에 선충 방제를 위한 토양소독에 필요한 시간이 없어 피해를 감수하는 실정이었다. 주요 과채류 재배지에서의 뿌리혹선충의 분포, 감염 및 밀도조사는 Table 20과 같다.

Table 20. Major crops cultivated in surveyed protected cultivation area

Locations	Crops
Sungju, Sunnam	Oriental melon
Sungju, Chojun	Oriental melon
Chunchun	Oriental melon, cucumber
Yeosu	Oriental melon
Jinju	Cucumber, Pepper, Watermelon
Goryung	Watermelon, Oriental melon

시설재배단지별로 뿌리혹선충의 감염실태 및 유충의 밀도에 대한 조사를 수행한 결과 97개 농가 중 57개 농가에서 뿌리혹선충의 검출되었다. 이 조사를 통해 국내 주요 시설 과채류 재배지 토양 중 58% 이상이 뿌리혹선충에 감염되어 있어 뿌리혹선충에 의한 연작장해가 심각할 것으로 추정된다. 뿌리혹선충 유충의 밀도는 농가 및 지역에 따라 평균 120~684마리/300cc 토양이 검출되었다. 농가에 따라서는 2,800마리 이상도 검출되어 연

작장해의 중요요인이 되는 것으로 나타났다(Table 21).

Table 21. Density and infestation of root-knot nematode in major protected cultivation areas

Locations	No. of farms surveyed	No. of farms with <i>Meloidogyne</i> spp. infected	Density/300cc soil AVG(min. ~ max.)
Sungju, Sunnam	12	8	684 (80 ~ 2,844)
Sungju, Chojun	10	6	456 (80 ~ 1,984)
Chunchun	15	10	120 (8 ~ 360)
Yeoju	31	15	248 (48 ~ 1,488)
Jinju	15	10	528 (80 ~ 2,644)
Goryung	14	8	392 (64 ~ 1,960)
Total	97	57	

뿌리혹선충의 암컷을 이용한 신속정확한 종동정 체계 개발을 위해 원예연구소에서 유 지, 증식 중인 뿌리혹선충 4종을 이용하여 효소분석에 의한 밴드특성을 관찰한 결과는 그림 39와 같다. 전기영동 후 Malate dehydrogenase (MDH) 염색을 실시한 후 Esterase (EST)로 염색하면 고구마뿌리혹선충, 당근뿌리혹선충, 땅콩뿌리혹선충, 자바뿌리혹선충 등 우리 나라에 분포하는 4종의 뿌리혹선충의 밴드특성을 이용하여 단시간에 뿌리혹선충의 암컷 동정이 가능하였다.

자바뿌리혹선충(MJ)의 경우 EST, MDH 염색 후 3개의 밴드가 나타나며 고구마뿌리혹 선충(MI)은 1개의 밴드, 당근뿌리혹선충(MH)은 MI 밴드 아래위로 위치에 2개의 밴드가

형성된다. 땅콩뿌리혹선충 (MA)은 MH 밴드 아래쪽에 2개의 밴드가 형성되는데 MJ에서 형성되는 3개의 밴드를 Marker로 이용할 경우 뿌리혹선충 한 마리만 사용하여도 국내에 분포하는 주요뿌리혹선충 4종에 대한 단시간내 정확한 동정이 가능하였다. 이 패턴을 기준으로 국내 시설재배지에서 채집한 암컷의 밴드 특성을 비교하였다(Fig. 40).

MA MH MI MJ

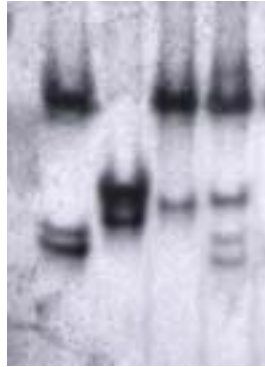


Fig. 39. Malate dehydrogenase and esterase phenotypes detected in 4 major root-knot nematode species of *Meloidogyne arenaria* (MA), *M. hapla* (MH), *M. incognita* (MI), and *M. javanica* (MJ)

1 2 3 4 5 6 7 8 9

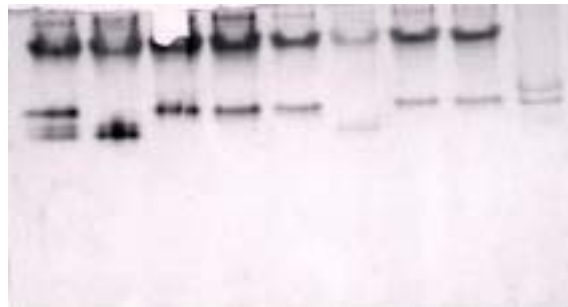


Fig. 40. Malate dehydrogenase and esterase phenotypes detected in populations collected from Sungju province. Lanes 3, 4, 5, 7, and 8 : *Meloidogyne incognita*, Lanes 3 and 6 : *M. arenaria*, Lane 1 : Mixed *Meloidogyne* species. Lane 9 : Marker

뿌리혹선충 밀도 검경 후 토양에 토마토를 정식하여 선충을 증식하고 암컷을 뿌리로 부터 분리하여 EST, MDH 효소표현형을 이용한 암컷의 종동정 결과는 다음과 같다(Table 22).

Table 22. Identification of root-knot nematodes by esterase and malate dehydrogenase pattern analysis.

Locations	No. of populations identified				
	Total	<i>M. arenaria</i>	<i>M. incognita</i>	<i>M. hapla</i>	MA & MI mixed
Sunnam, Sungju	8	4	3	-	1
Chojun, Sungju	6	4	1	-	-
Yipo, Yeosu	14	3	-	11	-
Chunchun	15	3	12	-	-
Jinju	10	2	8	-	-
Goryung	8	3	5	-	-

경북 성주군의 14농가 중 땅콩뿌리혹선충이 8농가, 고구마뿌리혹선충이 4농가, 복합적으로 오염된 농가가 1농가로 조사되었다. 1980년대까지는 이 지역에 고구마뿌리혹선충이 우점종인 것으로 보고된 바 있다. 그러나 이번 조사에서는 땅콩뿌리혹선충과 고구마뿌리혹선충의 발생 빈도가 비슷하게 나타났고 일부 농가에서는 복합 감염된 사례도 조사되었다.

따라서 성주지역의 뿌리혹선충 분포는 과거와 달라진 것으로 판단된다. 이와 같이 뿌리혹선충 우점종이 변화한 것은 과거에 비해 후작으로 하우스에서 과채류를 생산하던 작형에서 최근 1년 내내 담수기간 없이 연작형태로 참외 등을 재배함으로써 토양 및 기온 상승으로 인한 뿌리혹선충의 적응 및 정착여건이 변화한 것이 그 배경 및 원인으로 작용한 것으로 생각된다.

여주에서는 14농가 중 MA 3, MH가 11농가로 다른 지역에 비해 MH(당근뿌리혹선충)이 빈도가 높았다. 여주 지역은 강변의 사질 토양에서 참외를 주로 생산하고 있다. 지역

적으로는 중부 지방에 속하므로 다른 지역에 비해 추운 겨울을 지내는데 당근뿌리혹선충은 비교적 추운 지방에 잘 적응하는 종이므로 이 지역에 우점하고 있는 것으로 생각된다.

진주, 고령의 농가에서는 뿌리혹선충이 모두 MI로 동정되어 남부지역의 시설재배지에서는 MI(고구마뿌리혹선충)의 분포도가 높은 것으로 나타났다. 춘천지역은 우리나라의 중부 내륙지역으로 기후적으로 가장 추운 지역에도 불구하고 남부에 주로 분포되어 있는 MI(고구마뿌리혹선충)가 우점종으로 분포되어 여주지역의 당근뿌리혹선충이 우점종인 것과는 매우 대비되는 현상이 관찰되었다. 춘천의 경우 오이, 토마토, 참외 등 다양한 작물이 재배되고 있는데 이러한 재배작물과 재배작형, 뿌리혹선충의 우점종에 관해서는 금후 정밀조사를 통해 재검토할 필요가 있는 것으로 판단된다.

2) 뿌리혹선충의 DNA 추출기술 개발 및 RAPD, RFLP 분석을 통한 유전자 진단체계의 개발

암컷에서 분리한 뿌리혹 선충의 DNA는 1% agarose gel electrophoresis를 통해서 band를 확인할 수 있었다. NASBA 및 P/C/I를 이용한 암컷 선충의 DNA는 최소 3마리에서 충분한 양의 DNA가 검출되었으며, 유충의 경우 역시 3마리에서 PCR 가능한 양의 DNA가 분리되었다. DNeasy kit를 이용한 유충에서 분리한 DNA는 상대적으로 양이 적기 때문에 nucleic acid spectrophotometer를 이용하여 정량분석을 하였다(Table 23).

Table 23. Spectrophotometry of DNA amounts from 3 larvae of root-knot nematodes

	Sample No.1	Sample No.2	Sample No.3	Sample No.4	Sample No.5	Sample No.6	Sample No.7	Sample No.8	Sample No.9
A260nm	0.012	0.024	0.013	0.018	0.01	0.021	0.013	0.017	0.015
Total DNA (ug/m)	0.587	1.198	0.629	0.887	0.488	1.085	0.629	0.854	0.752

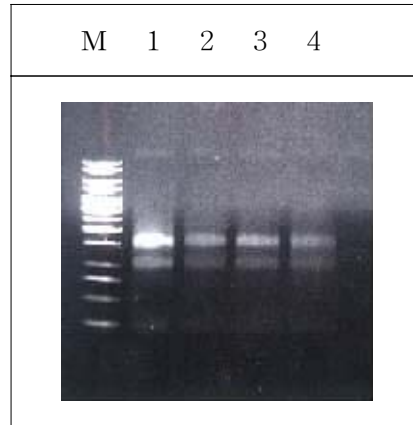


Fig. 41. DNA extraction by NASBA method from root-knot nematode female (0.8 % agarose gel)

M: Molecular marker

Lane 1 : DNA from 5 females of root-knot nematode (5 ul/ 30 ul)

Lanes 2-3: DNA from 3 females of root-knot nematode (5 ul/ 30 ul)

NASBA법을 이용하여 뿌리혹선충의 암컷으로부터 DNA 분리를 시도한 결과는 그림 40과 같다. 뿌리혹선충의 암컷으로부터 1.7 및 1.3 kb 크기의 DNA가 분리되었으며 이것은 기존의 외국 문헌에서 보고된 뿌리혹선충의 DNA 싸이즈와 일치하고 있다. NASBA법을 이용한 뿌리혹선충 DNA 추출방법을 이용함으로써 보다 많은 양의 DNA를 순수하게 분리하는 것이 가능하게 되었다.

따라서 이러한 방법으로 추출한 DNA는 금후 뿌리혹선충의 동정에 사용되는 특이 primer 및 RFLP 방법을 사용하여 PCR 결과를 외국의 기보고 된 DNA 진단결과와 비교하고자 한다.

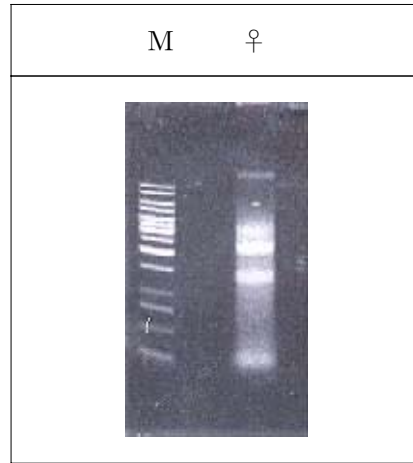


Fig. 42. DNA extracted by PCI method from root-knot nematode female (0.8 % agarose gel)

M: Molecular marker, ♀: DNA from 10 females of root-knot nematode (5ul/20ul)

PCI법을 이용하여 뿌리혹선충의 암컷으로부터 DNA 분리를 시도한 결과는 그림 42과 같다. PCI법에서는 뿌리혹선충 암컷으로부터 2 및 1.5 kb 크기의 DNA가 분리되었으며 PCI법으로 추출한 DNA는 뿌리혹선충용 특이 primer 및 RFLP 방법을 사용하여 PCR을 실시한 후 NASBA법과의 효율성을 비교코자 한다. PCR을 이용한 미토콘드리아 DNA의 증폭은 다양한 annealing 온도 조건에서 시도하였다.

3) 뿌리혹선충의 PCR-RFLP 분석을 통한 유전자 진단체계의 개발

DNA 분리 및 PCR

간단한 선충의 lysis방법을 통해 뿌리혹선충 암컷 한 마리, 유충 한 마리로부터 PCR에 필요한 template DNA를 얻을 수 있었다. 암컷과 유충의 PCR product는 같은 PCR 조건하에서 동일한 크기인 1.7 kb를 증폭하였으며, 증폭량의 경우는 band의 강도에서 알 수 있듯이 유충보다 암컷 sample로부터 유충에 비해 더욱 많은 양의 DNA가 증폭됨을 알 수 있었다(Fig. 43).

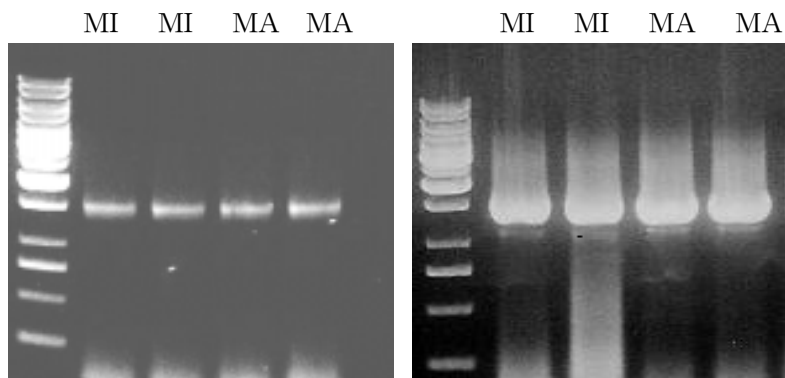


Fig. 43. PCR of mitochondrial DNA (COII/LrRNA) from root-knot nematode. Left : DNA from J2 of root knot-nematode, size 1.7 kb. Right : DNA from female of root knot-nematode, size 1.7 kb. MA : *Meloidogyne arenaria*, MI : *M. incognita*

PCR 및 제한효소분석

58°C annealing temperature 조건하에서 증폭된 총 mitochondrial DNA의 크기는 땅콩뿌리혹선충과 고구마뿌리혹선충의 경우 1.7 kb, 당근뿌리혹선충의 경우 약 500 bp로 나타났다. 따라서 당근뿌리혹선충은 부차적인 제한효소분석과정을 거치지 않고, PCR 증폭 크기만으로도 다른 두 종의 뿌리혹선충과는 구별이 가능하였다 (Fig. 44). 뿌리혹선충의 경우 같은 종내에서 증폭된 mitochondrial DNA 크기에 대한 변이는 없었다.

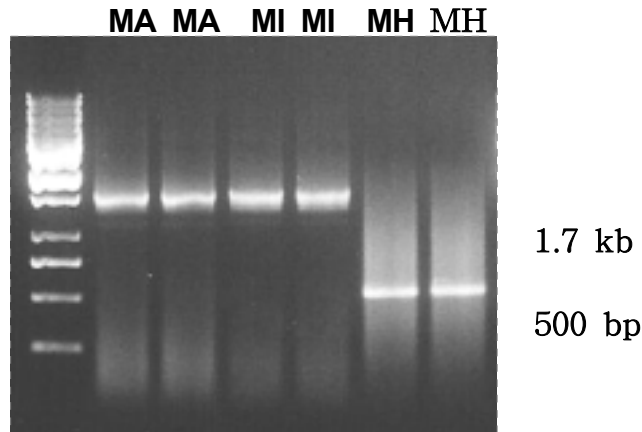


Fig. 44. Comparison of PCR amplified mitochondrial DNA (COII/LrRNA) of root-knot nematodes. MA : *Meloidogyne arenaria*, MI : *M. incognita*, MH : *M. hapla*

땅콩뿌리혹선충과 고구마뿌리혹선충은 선별된 제한효소, Hinf I과 Alu I을 이용하여 종의 구별이 가능하였다. 우선 Hinf I을 처리하였을 경우 고구마뿌리혹선충의 경우 하나의 recognition site를 가짐으로써 두 개의 band를 나타내지만, 땅콩뿌리혹선충의 경우 Hinf I의 recognition site는 없는 것으로 나타나, 원래의 1.7 kb 크기의 band를 그대로 유지함을 알 수 있다 (Fig. 45A). Alu I을 효소처리 하였을 경우, 땅콩뿌리혹선충의 경우 1 kb, 480 bp, 200 bp 크기의 band를 나타내지만, 고구마뿌리혹선충의 경우 800 bp, 480 bp, 200 bp, 그리고 150 bp 크기의 band들을 나타냄으로써 두 종을 구별할 수 있다 (Fig. 45B). 반례로서 EcoR I과 Hind III를 처리하였을 경우 두 종에서 나타나는 banding pattern은 동일하여 두 종간의 차이를 알 수 없다 (Fig. 46A, B).

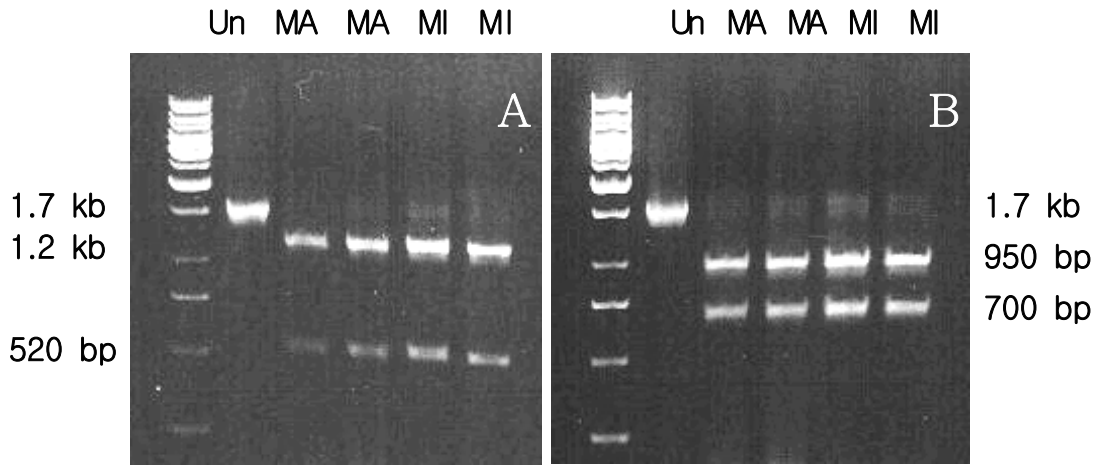


Fig. 45. Restricted enzyme analysis of root-knot nematode mitochondrial DNA by EcoR I and Hind III. A. EcoR I, B. Hind II. MA : *Meloidogyne arenaria*, MI : *M. incognita*, UN: untreated.

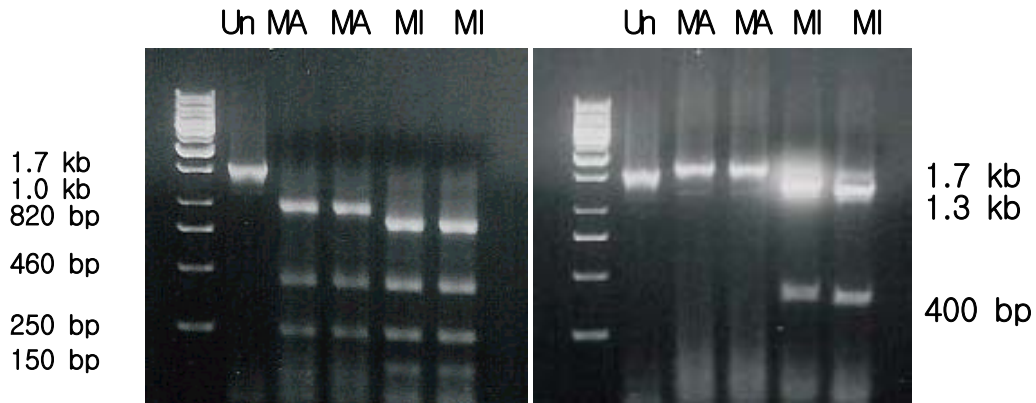


Fig. 46. Restricted enzyme analysis of root-knot nematode mitochondrial DNA by EcoR I and Hind III. A. Alu I, B. Hinf I. MA : *Meloidogyne arenaria*, MI : *M. incognita*, UN: untreated.

DNA sequence analysis

미국 뿌리혹선충종 자바뿌리혹선충, 고구마뿌리혹선충(race 1과 race 4)으로부터 전체

sequence data를, 그리고 한국의 고구마뿌리혹선충, 땅콩뿌리혹선충의 부분적인 sequence data를 얻을 수 있었다. GenBank의 자바뿌리혹선충의 sequence data와 본 실험에서 증폭 sequence된 sequence data간에는 단 하나의 nucleotide에 차이를 보임으로써 100%에 가까운 homology를 나타내었다. 다음은 각각의 sequence data 결과이다.

<자바뿌리혹선충-Florida>

```
TCCACCAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGCCCTTGGTCAATGTTTCAGAAATTTG
TGGTATTAATCATTTCATTTATGCCAATTTTGGTTGAAATTACTTTATTTGATTTTTTTAAGTT
AAATTTATTAACATAATTGATTATTTTATTTTTGTTGAAGCAAGAGAAAATATTAGTCGTTTAA
ATTTTTTTTATTAGTTTTAAAAATAATAAAAAATGTTTTTAAGTGATTAGGGATTAGATTAAC
GATTGTATTATTTATTATTATAAGTTTTTTGAATATTATTTTGATTTTTTGTGTTAATTTCTT
TTTTTTGTATTAATTTATTTTTATTTTTTTGTTAATTTTAATTTTTTATTTTGTAAATTTTATCT
ATAATAATTTGTTAAAATTTTTTTCTAATTTGGGTGAATTAATAATTAGAGATGAATTGATTAG
ATTTTTTTTTTATTATTAATATCATTTTTTATTATTATTAGGATTTTTCAATTGGTTGTGTTAAT
CATTCTTTATTAGATCGGGGTTTAATAATGGGTTCTTTATTGTGTTAATTATTAATAATTAT
TTTGGTTTTTTTAGTGAAATTTTTTATTTAATTTATTTTTATACGAAAAATTATTAGGGAGAAG
ATTTTGATTTTTTTGTTATTTAGAGTTTAAGTTCTTTATAGAACAAAATTTTTTATCTTTTTAGT
ATTCTATTGAAATAGAAGAATTATAAATTAGTTAATTCTAATTTTTATTTATTTTATATGAATTA
TATAAAATTTTAAATTTTTTTGATTTTAGTTTATTTACGTATTTAGTTGATTTTTTTAATAGATTT
AGTTCATCTGTTGATGTAACACAGAGTGGCTCTTTAGTTAATTTACCTGAAGTTAAAAATG
GTCAATTATATGATATAACTTTTTGGTTATCATCAAGAATATTTCAAGGAAATTAAGGTGCTC
ATCCTGATAAAGATCGTAATTTTTATAGTTGTGATATTGTTATATGTCAATCACAAGCTTTA
GAAGAATATCATAATGAATTAATCAATCTGTTAGTGAAAAAATAGTTAATTTTTATTAATAGA
GATATAAGGAGATTTAATTTTTAAGTTAAATCCAATTCGTAATGTTTGAATTTACCAAGGT
AGAATTATACGTTAAATTTAGAAGAATTGTTGAAAAGAATGAATTC-TTAATGGAAACAGTA
AGGATATTTTTTATATAATTATTTTTAATAATATTAATAATAAAGCTATTAATTTCAATTGAAT
TTTTTATTGTGATTAAAAAaGTTTTTTGGCTAAATTTTTTTTTTAGATTATTTTTTATTGTTGAA
AAAATTAATAAATAAATTGTTTTTTACAATAATTAATAATTTATAATTTCAATTTTTAATTTTT
AGTTTTAAATAAATAAATTACAAATATGAAAAATAAAAAAATTTTGTATAAATTAATTAATTTA
TTTATATTAATAAATAATTTTTTATAATTTTTTATTTTTTTTTATTTTTTTAAAAAAAATAATTTAA
```


TTATAATTATTTATTTAAATTTAATAATTAATATAAAAATTTTTTATTAAATAAATTTAATAATA
AATGTTTTTTAAATTCCTTGAGGTTTTGATTTTTGATTTTTGTTTCTGCTCATTGTTAAAGA
AAAGCACTTTTAGCGTGATTGGTCAAAGGTAAAGGGCGAATTCTGCAGATATCCATCACA
CTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATCCCCCTATA

<고구마뿌리혹선충 race-1, Florida>

GATCCACCTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGCCCTTGGTCAATGTTCAGAAAT
TTGTGGTATTAATCATTCAATTTATACCAATTTTGGTTGAAATTACTTTATTTGATTTTTTTAA
GTTAAATTTATTAACATAATTGATTATTTTATTTTGTGAAGCAAGAGAAAATACTAGCTGTT
TAAATTTTTTTTATTAGTTTTTAAAAATAATAAAAAATGTTTTTAAGTGATTAGGGATTAATTA
ACAATTGTATTATTTATTATTATAAGTTTTTTGAATATTATTTTGTATTTTTGTTGTTAATTTT
TTTTTTTTGTATTAATTTATTTTATATTTTTGTTAATTTTAAATTTTTTATATTTGTAATTTTAT
CTATAATAATTTGTTAAAATTTTTTCTAATTTGGGTGAATTAATAATTAGAGATGAATTGATT
AGATTTTTTTTTGTATTATTAATATCATTTTTATTTATTATTAGGATATTTTCAATTGGTTGTG
TTAATCATTCTTTATTAGATCGGGGTTAATAACGGGTCTTTATTGTGTTAATTATTAATAAT
ATTATTTTGGTTTTTTAGTGAAATTTTTTATTTAATTTATTTTTATACG-AAAAATTATTAGGG
AAAATATTTTGTATTTTTGTTATTTAGAGTTTAAAGTTCTTTATAGAACAAAATTTTTTATCTTT
TTAGTATTCTATTGAAATAGAAGAATTATAAATTAGTTAATTCTAATTTTATTTATTTTATATG
GATTATATAAAATTTTAAATTTTTTGTATTTAGTTTATTTACGTATTTAGTTGATTTTTTAATA
GATTTAGTTCATCTGTTGATGTAACACAGAGTGGCTCTTTAGTTAATTTACCTGAAGTAAA
AATGGCCAATTATATGATATAACTTTTTGGTTATCATCAAGAATTTTTAAGGAAATTATGGT
GCCCATCCTGATAAAGATCGTAATTTTTATAGTTGTGATATTGTTATACGTCAATCACAAGC
TTTAGAAGAATATCATAATGAATTAATCMATCTGtAGTGAAAAAATAGTTATTTTTATTAA
TAGAGATATAAGGAGATTTAATTTTTAAGTTAAATCCAATTCGTAATGTTGGGAATTTACCA
AGGTAGAATTACACGTCAAATTTAGAAGAATTGTGGAAAAGAATGAATTCTTAATGGAAC
AGTAAGGATATTTTTATATAATTATTTTAAATAATTAATAAAATAAAGCTATTAATTTCAATT
GAATTTTTTATTGTGATTAATAAAGTTTTTGGCTAAATTTTTTTTAGATTCTTTTTATTGTT
GAAAAATTAATAAATAAATTGTTTTTACAATAATTAATAATTTATAATTTCAATTTTTAATT
TTTAGTTTTAAATAAATAAATTACAAATATGAAAAATAAAAAATTTTGTATAAATTAATTAAT
TTATTTATATTAATAAATTTTTTTATAATTTTTATTTTTTTATTTTTTTAAAAAAAATAATTT

AATTATAATTATTTATTTAAATTTAATAATTAATATAAAAATTTTTTATTAATAAATTTAATAA
TAAATGTTTTTTAAATTCCTTGAGGTTTTGATTTTTGATTTTTGTTTCTGCTCATTGTAAA
GAAAAGCACTTTTAGCGTGATTGGTCAAAGGTAAAGGGCGAATTCTGCAGATATCCATCA
CACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGGGGAGCC

<고구마뿌리혹선충 race 4, Florida(1)>

ACTATAGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGAT
ATCTGCAGAATTCGCCCTTGGTCAATGTTTCAAGAAATTTGTTGTTAATCATTCAATTTATAC
CAATTTTGGTTGAAATTACTTTATTTGATTTTTTTAAGTTAAATTTATTAATAATTGATTATT
TTATTTTTGTTGAAGCAAGAGAAAATATTAGCTGTTTAAATTTTTTTTATTAGTTTTAAAAAT
AATAAAAAATGTTTTTAAGTGATTAGGGATTAAATTAACAATTGTATTATTTATTATTATAAG
TTTTTTGAATATTATTTGATTTTTTGTGTTAATTTCTTTTTTTTGTATTAAATTTTTTTAT
ATTTTTGTTAATTTAATTTTTTATATTTGTAATTTATCTATAATAATTTGTTAAAATTTTTT
TCTAATTTGGGTGAATTAATAATTAGAGATGAATTGATTAGATTTTTTTTTGTATTATTAATAT
CATTTTTATTTATTATTAGGATATTTCAATTGGTTGTGTTAATCATTCTTTATTAGATCGGG
GTTAATAATGGGTTCTTTATTGTGTTAATTATTAATAATTTTTGGTTTTTTAGTGAAATT
TTTTATTTAATTTATTTTTATACGAAAAATTATTAGGGAAAAATTTTTGATTTTTTGTATTTA
GAGTTTAAGTTCTTTATAGAACAAAATTTTTATCTTTTTAGTATTCTATTGAAATAGAAGAA
TTATAAATTAGTTAATTCTAATTTATTTATTTTATATGGATTATATAAAATTTTAAATTTTTTG
ATTTAGTTTATTTACGTATTTAGTTGATTTTTTAATAGATTTAGTTCATCTGTTGATGTAAC
ACAGAGTGGCTCTTTAGTTAATTTACCTGAAGTTAAAAATGGTCAATTATATGATATAACTT
TTGGTTATCATCAAGAATATTTAAGGAAATTATGGTGCTCATCCTGATAAAGATCGTAATT
TTTATACGTCAATCACAAGCTTTAGAAGAATATCATAATGAATTAATCAATCTGTTAGTGA
AAAAATAGTTATTTTTATTAATAGAGATATAAGGAGATTTAATTTTTAAGTTAAATCCAATTC
GTAATGTTTGAATTTACCAAGGTAGAATTACATGTTAAATTTAGAAGAATTGTTGAAAAGA
ATGAATTCCTAATGAAACAGTAAGGATATTTTTTATATAATTATTTTTAATAATATTAATAA
AAAGCTATTAATTTCAATTGAATTTTTTATTGTGATTAAAAAaGTTTTTTGGCTAAATTTTTT
TTTAGATTCTTTTTTATTGTTGAAAAAATTAATAAATAATTGTTTTTTACAATAATTAATAATTT
ATAATATTTCAATTTTAATTTTATTTAGTTTTAAATAAAAAATTACAAATATGAAAAATAAAAAAT
TTTGTATAAATTAATTAATTTATTTATATTAATAAATAATTTTTTATAATTTTTTATTTTTTTATT

TTTTTAAAAAAAAAATAATTTAATTATAATTATTTATTTAAATTTAATAATTAATATAAAAATTT
TTTATTAATAAAATTTAATAATAAATGTTTTTTAAATTCTTTGAGGTTTTGATTTTTGATTTTT
TGTTTCTGCTCATTGTTAAAGAAAAGCACTTTTAGCGTGATTGGTCAAAGGTAAAGGGCGA
ATTCCAGCACACTGGCGGCCGTTACTA

<고구마뿌리혹선충 race 4, Florida(2)>

GCGGCCAGTGAATTGGAATCGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATGC
TCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCGCCCTTGGTCAATGTTTCAGAAA
TTTGTGGTATTAATCATTCAATTTATACCAATTTTGGTTGAAATTACTTTATTTGATTTTTTTAA
GTTAAATTTATTAATAATGATTATTTTATTTTGTGAAAGCAAGAGAAAATATTAGCTGTT
TAAATTTTTTTTATTAGTTTTTAAAAATAATAAAAAATGTTTTTAAGTGATTAGGGATTAATTA
ACAATTGTATTATTTATTATAAGTTTTTTGAATATTATTTTGTATTTTTTGTGTTAATTTTC
TTTTTTTTGTATTAAATTATTTTTATTTTTTGTAAATTTAATTTTTTATATTTGTAATTTTAT
CTATAATAATTTGTTAAAATTTTTTCTAATTTGGGTGAATTAATAATTAGAGATGAATTGATT
AGATTTTTTTTTGTATTATTAATATCATTTTTTATTATTATTAGGATATTTTCAATTGGTTGTG
TTAATCATTCTTTATTAGATCGGGGTTAATAATGGGTTCTTTATTGTGTTAATTATTAATAAT
ATTATTTTGGTTTTTTAGTGAAATTTTTTATTTAATTTATTTTTATACGAAAAATTATTAGGGA
AATATTTTGTATTTTTGTTATTTAGAGTTAAGTTCTTTATAGAACAAAATTTTTTATCTTTT
TAGTATTCTATTGAAATAGAAGAATTATAAATTAGTTAATTCTAATTTTATTTATTTTATATGG
ATTATATAAAATTTTAAATTTTTTGTATTTAGTTTATTTACGTATTTAGTTGATTTTTTAATAG
ATTTAGTTCATCTGTTGATGTAACACAGAGTGGCTCTTTAGTTAATTTACCTGAAGTTAAAA
ATGGTCAATTATATGATATAACTTTTGGTTATCATCAAGAATATTTTAAGGAAATTATGGTG
CTCATCCTGATAAAGATCGTAATTTTTATACGTCAATCACAAGCTTTAGAAGAATATCATAA
TGAATTAATCAATCTGTTAGTGAAAAAATAGTTATTTTTATTAATAGAGATATAAGGAGATT
TAATTTTTAAGTTAAATCCAATTCGTAATGTTTGAATTTGCCAAGGTAGAATTACATGTTA
AATTTAGAAGAATTGTTGAAAAGAATGAATTCTTAATGGAAACAGTAAGGATATTTTTTATA
TAATTATTTTTAATAATATTAATAAATAAAGCTATTAATTTCAATTGAATTTTTTATTGTGATTA
AAAAAGTTTTTGGCTAAATTATTTTTTTAGATTCTTTTTTATTGTTGAAAAAATTAACAAA
TTGTTTTTTACAATAATTAATAATTTATAATTTCAATTTTTAATTTTTAGTTTTAAATAAAAAAT
TACAAATATGAAAAATAAAAAAATTTTGTATAAATTAATTAATTTATTTATATTAATAAATAT

TTTTATAATTTTTATTTTTTTTATTTTTTTAAAAAAAATAATTTAATTATAATTATTTATTTA
AATTTAATAATTAATATAAAAATTTTTATTAATAAATTTAATAATAAATGTTTTTTAAATTCT
TTGAGGTTTTGATTTTTGATTTTTGTTTCTGCTCATTGTTAAAGAAAAGCACTTTTAGCGT
GATTGGTC

<고구마뿌리혹선충-Korea>

TTTTAAGTTAAATCCAATTCGTAATGTTTGAATTTACCAAGGTAGAATTACACGTAAATT
TAGAAGAATTGTTGAAAAGAATGAATTCTTAATGGAAACAGTAAGGATATTTTTTATATAAT
TATTTTTAATAATATTAATAAATAAGCTATTAATTTCAATTGAATTTTTTATTGTGATTAATA
AGTTTTTGCTAAATTATTTTTTTAGATTCTTTTTTATTGTTGAAAAAATTAATAAATAAATTGT
TTTTTACAATAATTAATAATTTATAATATTTCAATTTTTAATTTTTAGTTTTAATAAATAAATTACA
AATATGAAAAATAAATAAATTTTGTATAAATTAATTAATTTATTTATATTAATAAATAATTTTTT
ATAATTTTTATTTTTTTTATTTTTTTAAAAAAAATAATTTAATTATAATTATTTATTTAAATTT
AATAATTAATATAAAAATTTTTTATTAATAAATTTAATAATAAATGTTTTTTAAATTCTTTGA
GGTTTGATTTTTGATTTTTGTTTCTGCTCATTGTTAAAGAAAAGCACTTTTAGCGTGATTG
GTCATAGGTAAAGGGCGAATTCCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTC
GGACCAAGCTGCG

<땅콩뿌리혹선충-Korea(1)>

ATCATAATGGATTAATCCATCTGTTAGTGAAAAATAGTTATTTTTATTAATAGAGATATAA
GGAGATTTAATTTTTAAGTTAAATCCAATTCGTAATGTTTGAATTTACCAAGGTAGAATTA
CACGTAAATTTAGAAGAATTGTTGAAAAGAATGAATTCTTAATGGAAACAGTAAGGATATT
TTTTATATAATTATTTTTAATAATATTAATAAATAAGCTATTAATTTCAATTGAATTTTTTATTG
TGATTAATAAAGTTTTTGGCTAAATTATTTTTTTAGATTATTTTTTATTGTTGAAAAAATTA
AAACAAATTGTTTTTACAATAATTAATAATTTATAATATTTCAATTTTTAATTTTTAGTTTTAA
TAAAAATTACAAATATGAAAAATAAATAAATTTTGTATAAATTAATTAATTTATTTATATTA
AAAATATTTTTTATAATTTTTATTTTTTTATTTTTTTAAAAAAAATAATTTAATTATAATTAT
TTATTTAAATTTAATAATTAATATAAAAATTTTTTATTAATAAATTTAATAATAAATGTTTTTT
AAATTCTTTGAGGTTTTGATTTTTGATTTTTGTTTCTGCTCATTGTTAAAGAAAAGCACTTT
TAGCGTGATTGGTCAAAGGTAAAGGGCGAATTCCAGCACACTGGCGGCCGTTACTGGTG

GATCCGAGCTCGGACCAAGCTG

<땅콩뿌리혹선충-Korea(2)>

CAGCTTAGAAGAATATCATAATGAATTAATCCATCTGTTAGTGAAAAATAGTTATTTTTATTA
ATAGAGATATAAGGAGATTTAATTTTTAAGTTAAATCCAATTCGTAATGTTTGGAAATTTACCAA
GGTAGAAATACACGTAAATTTAGAAGAATTGTTGAAAAGAATGAATTCTTAATGGAANCAGT
AAGGATATTTTTTATATAATTATTTTTAATAATATTAATAATAAGCTATTAATTTCAATTGAATTT
TTTATTGTGATTAATAAAGTTTTTTGGCTAAATTTTTTTTTTAGATTATTTTTTATTGTTGAAAA
ATTAATAACAAATTGTTTTTACAATAATTAATAATTTATAATATTTCAATTTTTAATTTTTAGTTTT
AAATAATAAATTACAAATATGAAAAATAAAAAATTTTTGTTATAAATTAATAATTTATTTATATTA
AAAATATTTTTTATAATTTTTTATTTTTTATTTTTTAAAAAATAAATTTAATTATAATTATTTA
TTTAAATTTAATAATTAATAATAAAATTTTTTATTAAATAAATTTAATAATAAATGTTTTTAAATTC
TTTGAGGTTTTGATATTTGATTTTTGTTTCTGCTCATTGTTAAAGAAAAGCACTTTTAGCGT
GATTGGTCAAAGGTAAAGGGCGAATTCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGA
GCTCGGACCAAGCTGCGA

<땅콩뿌리혹선충-Korea(3)>

GCGGCCAGTGGATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCACGC
TCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCGCCCTTACCTTTGACCAATCAC
GCTAAAAGTGCTTTTCTTTAACAATGAGCAGAAACAAAAATCAAAAATCAAAACCTCAAAG
AATTTAAAAGACATTTATTATTAATTTATTTAATAAAAAATTTTATATTTAATTATTAATTTAAT
AAATAATTATAATTAATTTATTTTTTTTTAAAAAATAAAAAATAAAAAATTATAAAAAATTTTT
TAATATAAATAAATTAATTTAATTTATAACAAAATTTTTTTATTTTTTCATATTTGTAATTTTTATTTA
AAACTAAAAATTAATAATTGAAATATTATAAATTTAATTATTGTAAAAAACAATTTGTTTTAAT
TTTTTCAACAATAAAAAATAATCTAAAAAATAATTTAGCCAAAAACTTTTTTAATCACAATAA
AAAATTCAATTGAAATTAATAGCTTTATTTTTAATATTATTAATAAATAATTATATAAAAAATATCCT
TACTGTTTCCATTAAGAATTCATTCTTTTCAACAATTCCTTCTAAATTTAACGTGTAATTCTACC
TTGGTAAATTCCAAACATTACGAATTGGATTTAACTTAAAAATTAATCTCCTTATATCTCTATT
AATAAAAAATACCTATTTTTCACTAACAGAT

<땅콩뿌리혹선충-Korea(4)>

ATCACAAGCTTAGAAGAATATCATAATGAATTAATCCATCTGTTAGGGAAAAAATAGTTATTT
 TTATTAATAGAGATATAAGGAGATTTAATTTTTAAGTTAAATCCAATTCGTAATGTTTGGAAATTT
 ACCAAGGTAGAATTACACGTTAAATTTAGAAGAATTGTTGAAAAGAATGAATTCTTAATGGAA
 ACAGTAAGGATATTTTTATAAAATTATTTTTAATAATATTAATAAAAGCTATTAATTTCAATT
 GAATTTTTTATTGTGATTAATAAAGTTTTTGGCTAAATATTTTTTTTAGATTATTTTTTATTGTT
 GAAAAATTAATAACAAATTGTTTTTTACAATAATTAATAATTTATAATATTTCAATTTTTAATTTT
 TAGTTTTAAATAAAATTACAAATATGAAAAATAAAAAATTTTGTATAAATTAATTAATTTATT
 TATATTAATAATTTTTTTATAATTTTTATTTTTTTATTTTTTTAAAAAAAATAATTTAATTATAAT
 TATTTATTTAAATTTAATAATTAATAATAAAATTTTTTATTAATAAATTTAATAATAAATGTTTTTT
 AAATTCTTTGAGGTTTTGATTTTTGATTTTTTATTTCTGCTCATTGTTAAAGAAAAGCACTTTT
 AGCGTGATTGGTCAAAGGTAAAGGGCGAATTCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGT
 CCGAGCTCGGACCAAGCTGGC

<Informative site-국내 고구마뿌리혹선충의 race 동정>

	1756	1770
자바뿌리혹선충-Florida	TTCTGCAGATATCCA	
고구마뿌리혹선충 race-1, Florida	TTCTGCAGATATCCA	
고구마뿌리혹선충 race-4, Florida	TT-----CCA	
고구마뿌리혹선충 Korea	TT-----CCA	

주어진 sequence data내에서 볼 때 국내종의 땅콩뿌리혹선충의 종내 변이는 관찰되지 않았으며, 고구마뿌리혹선충과 구별이 가능한 부분을 찾을 수 있었다. 한편, 미국종 중 고구마뿌리혹선충 race-1과 race-4의 sequence 간에도 두 race를 구별할 수 있는 informative site를 확인할 수 있었다. 이러한 sequence상의 특징을 통해서 볼때, 본 실험에서 이용된 국내 고구마뿌리혹선충은 race-4로 동정이 되었다. 따라서 race에 대한 관별 역시 정확한 sample의 확보와 sequence data의 누적자료가 제시된다면 가능한 것으로 예상된다.

4. 결과 요약

1) 뿌리혹선충 유충 및 암컷의 DNA 분석을 통한 신속정확한 동정체계가 확립하여 국내에서 뿌리혹선충의 동정 시 주로 암컷, 수컷 및 유충의 형태적 특징이나 판별기주식물을 이용한 동정체계를 개선하였다.

2) 국내에 분포하는 뿌리혹선충류에 대해 암컷의 효소표현형을 이용한 정확한 종 동정체계를 확립하여 DNA polymorphism을 이용한 PCR 동정체계를 확립함으로써 국내 분포 뿌리혹선충류의 신속하고 정확한 동정기술을 개발하였다.

3) 토양 또는 식물체 뿌리로부터 뿌리혹선충 암컷 또는 유충이 검출될 경우 암컷에 대해서는 효소표현형 동정법, 유충에 대해서는 PCR동정법을 활용하여 종 동정에 필요한 소요시간을 단축하였다.

따라서 금후 원예작물 및 기타 작물에서의 뿌리혹선충 화학적 방제기술개발, 천적을 이용한 생물적방제기술 개발, 저항성품종의 육성, 검역 시 뿌리혹선충 동정방법 적용 등 각 분야에서 신뢰도 높은 뿌리혹선충 동정체계를 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야의 기여도

1. 연차별 연구개발목표와 내용 및 달성도

구 분	주요개발내용 및 범위	달성도 (%)
1차년도 (2001-2002)	<ul style="list-style-type: none"> ○16S rRNA에 의한 세균의 분류체계확립 ○ITS에 의한 세균의 분류체계확립 ○주요 과채류 재배지 분포 뿌리혹선충의 효소패턴 분석 ○뿌리혹선충의 단백질 및 효소분석에 의한 분류체계확립 ○세균과 뿌리혹선충간의 생물학적 특성분석 ○토마토 뿌리를 이용한 세균의 대량배양기술개발 ○세균의 생물적특성유지를 위한 제형재료 선발 ○세균의 제형(단체/혼합제)에 따른 방제효과비교검정 	<ul style="list-style-type: none"> 100 100 100 100 100 100 100 100
2차년도 (2002-2003)	<ul style="list-style-type: none"> ○단백질분석에 의한 세균의 분류체계확립 ○RAPD 및 RFLP를 이용한 세균의 분류체계확립 ○RAPD 및 RFLP를 이용한 뿌리혹선충의 분류체계 확립 ○토마토 뿌리를 이용한 세균의 대량배양기술개발 ○세균과 뿌리혹선충간의 생물학적 특성분석 ○형질전환 모상근을 이용한 세균의 대량배양기술개발 ○세균의 제형(단체/혼합제)이 세균에 대한 물리,화학적 영향 구명 ○최적방제를 위한 처리방법(표면살포/토양살포 등) 개발 	<ul style="list-style-type: none"> 100 100 100 100 100 100 100 100
3차년도 (2003-2004)	<ul style="list-style-type: none"> ○Proteins 및 DNA를 이용한 세균의 제형의 조기동정기술개발 ○DNA probes를 이용한 토양내의 <i>Pasteuria</i> 밀도 monitoring 기술개발 ○Proteins 및 unique isozyme pattern probes를 이용한 선충의 조기동정 기술 개발 ○세균의 효과적인 선충부착기술개발(원심분리법, 침강법등) ○식물뿌리를 이용한 세균의 대량배양기술개발 ○형질전환 모상근을 이용한 세균의 대량배양기술개발 ○제형별(수화제/분제) 세균에 대한 물리, 화학적 영향구명 ○제형의 안전성평가 ○제형(단체/혼합제, 수화제/분제)이 세균의 생존율에 미치는 영향 	<ul style="list-style-type: none"> 100 100 100 100 100 100 100 100 100

2. 연구개발목표의 관련분야의 기술발전에 대한 기여도

국내의 시설재배지에서 많은 경제적 피해를 주는 뿌리혹선충(*Meloidogyne* spp.)을 방제하기 위하여 다양한 방법이 시도 되고 있다. 물리적방제법으로 토양객토, 태양열소독, 윤작 등, 화학적방제로는 국내에 등록된 화학약제를 이용하여 뿌리혹선충을 방제법이 있으나, 모두 고 비용이고, 방제효과가 짧은 등 원인으로 효과적으로 방제할 수 없었다. 그리고 최근에는 *Pasteuria*세균을 이용한 뿌리혹선충 방제가 방제효과가 길고 비용이 적게 들며, 효과적으로 방제할 수 있어 각광을 받고 있다. 따라서 본 실험을 통하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

*P. penetrans*를 이용한 뿌리혹선충 방제를 위하여 *Pasteuria*세균의 분류체계를 확립하고, *Pasteuria*세균의 조기진단기술개발을 개발하였다. 또한 *P. penetrans* KW-1, KW-2의 유연관계를 분석한 결과 국내에서 분리된 두 균주(KW-1, KW-2)간에는 91%의 유연관계를 나타내었고, 유전적으로 다양성을 가지는 있는 것으로 확인하였다. 또한 *P. penetrans*의 16S rRNA 유전자에서 특이적인 염기서열을 확인하고, PasF-R을 제작하여, 특이 Probe로 사용 가능한 것을 확인 하였다. 더 나아가 특이 probe를 이용하여 토양에서의 *Pasteuria* spp.의 밀도분석에 사용할 수 있을 것으로 확인되었다.

*Pasteuria*세균을 이용하여 참외, 상추, 토마토에 *Meloidogyne* spp.에 대한 방제실험에서 모두 일정한 방제효과를 확인하였으며, 이러한 방제효과는 작물의 연작 재배 시 방제효과가 상승하는 것으로 나타났다. 또한 *P. penetrans*은 10~70℃의 온도 범위와 pH 4~10의 범위 내에서 안전하게 생존할 수 있는 것으로 관찰되어 일반적인 온도와 pH 조건에서 안전하게 생존할 수 있어 다양한 토양조건에서 쉽게 정착되어 뿌리혹선충을 방제할 수 있을 것으로 사료된다. *P. penetrans* 수화제 형태로 제품화 후에도 활성을 유지할 수 있어 앞으로 대량 증상에서의 제품화가 가능할 것으로 판단되었다.

P. penetrans 수화제 형태로 제품화한후 rat를 이용한 독성실험에서 LD₅₀은 > 1.7×10⁸endospores인 것으로 나타나고, 경구에 투입 후 1일 후에 분변을 통하여 92% 이상이 체외로 배출되었고, 21일 후에도 체내의 소장, 대장, 위 등 장기에 모두 잔존하지 않았으며, 출혈이나 갈변증상이 나타나지 않았고, rat의 입주위에 혈흔이나, 혈루증, 항문이나 생식기 주위, 털의 변색이 발견되지 않아 안전한 것으로 판단되었다.

*P. penetrans*를 대량 증식 시, 먼저 *P. penetrans*와 *Meloidogyne* spp.을 50℃ 조건에

서 *P. penetrans*을 60 분간 활성화한 다음, *P. penetrans*을 뿌리혹선충과 혼합하여 centrifuge (3000rpm, 5분)한 후 shaking (140rpm, 12hrs)하여 가장 효과적인 부착을 유도할 수 있으며, *P. penetrans*가 부착된 *Meloidogyne spp.*을 토양과 혼합하여 15,000 J2 수준으로 12주령의 토마토뿌리 주변에 주입하면 40-50일 후 대량의 *P. penetrans*를 수확할 수 있는 것으로 확인되었다.

토마토의 종자를 이용하여 멸균상태에서 어린잎을 배양한 후 *Agrobacterium rhizogene* (strain A4)을 이용하여 토마토 모상근을 획득하였다. *P. penetrans*과 뿌리혹선충을 shaking (140rpm, 12hrs)하여 부착시킨 후 0.5% sodium hypochlorites solution을 이용하여 표면살균한 다음 토마토의 모상근 주위에 주입하여 35일 후 대량의 *P. penetrans*을 증식할 수 있어 포장에서 소요되는 49일에 비하여 12일간 앞당겨 대량 증식할 수 있었다. 그러나 모상근을 이용하여 *P. penetrans*을 증식할 수 있으나 배지가 쉽게 오염되고, 모상근이 갈변하면서 영양부족에 따른 증상을 나타내는 등 재현성이 낮은 문제점과 고비용이란 단점이 작용하고 있어 더욱 심도있는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

뿌리혹선충 유충 및 암컷의 DNA 분석을 통한 신속정확한 동정체계가 확립하여 국내에서 뿌리혹선충의 동정 시 주로 암컷, 수컷 및 유충의 형태적 특징이나 판별기주식물을 이용한 동정체계를 개선하였다. 국내에 분포하는 뿌리혹선충류에 대해 암컷의 효소표현형을 이용한 정확한 종 동정체계를 확립하여 DNA polymorphism을 이용한 PCR 동정체계를 확립함으로써 국내 분포 뿌리혹선충류의 신속하고 정확한 동정기술을 개발하였다. 또한 토양 또는 식물체 뿌리로부터 뿌리혹선충 암컷 또는 유충이 검출될 경우 암컷에 대해서는 효소표현형 동정법, 유충에 대해서는 PCR동정법을 활용하여 종 동정에 필요한 소요시간을 단축할 수 있는 것으로 판단된다.

제 5 장 연구개발 결과의 활용계획

- P. penetrans*를 이용한 뿌리혹선충 방제를 위하여 *Pasteuria*세균의 분류체계를 확립하고, *Pasteuria*세균의 조기진단기술개발을 개발
- Pasteuria* 16S rRNA 유전자에서 특이적인 염기서열을 확인하였고, PasF-R을 제작하여, 특이 Probe로 사용 가능한 것을 확인
- 토양 내에서의 *Pasteuria* spore 분리하여 토양에서의 *Pasteuria* spp.의 밀도분석에 사용
- 참외, 상추, 토마토에 *P. penetrans*를 이용하여 *Meloidogyne* spp.을 효과적으로 방제
- P. penetrans* 은 10~70℃의 온도 범위와 pH 4~10의 범위 내에서 안전하게 생존
- P. penetrans* KW-1 수화제가 rat에 대하여 낮은 독성을 나타내는 것으로 확인
- P. penetrans*와 뿌리혹선충을 50℃ 조건에서 *P. penetrans*을 60 분간 활성화한 다음, *P. penetrans*을 뿌리혹선충과 혼화하여 centrifuge (3000rpm, 5분)한 후 shaking (140rpm, 12hrs)하여 효과적인 부착을 유도
- P. penetrans*가 부착된 *Meloidogyne* spp.을 토양과 혼화하여 15,000 J2 수준으로 12주령의 토마토뿌리 주변에 주입하면 40-50일 후 대량의 *P. penetrans*를 수확
- 토마토의 모상근을 이용하여 포장에 비하여 12일간 앞당겨 대량의 *P. penetrans*을 증식할 수 있으나 배지가 쉽게 오염되고, 모상근이 갈변하면서 재현성이 낮음
- 뿌리혹선충 유충 및 암컷의 DNA 분석을 통한 신속정확한 동정체계가 확립
- 국내에서 종 동정체계를 확립하여 DNA polymorphism을 이용한 PCR 동정체계를 확립

- 뿌리혹선충 암컷 또는 유충이 검출될 경우 암컷에 대해서는 효소표현형 동정법, 유충에 대해서는 PCR동정법을 활용하여 종 동정에 필요한 소요시간을 단축
- 농약살포량을 줄일 수 있어 농약 저항성균주 출현 및 토양환경오염을 줄일 수 있어 청정 강원도 고랭지 농업환경과 농산물 유지에 기여
- *P. penetrans*를 상품화하여 품목등록을 유도하여 농민들이 뿌리혹선충의 방제제로 이용할 수 있음

제 6 장 참고문헌

- 김동근, 최성국. 2001. 살선충제의 처리방법에 따른 뿌리혹선충 방제효과. *K. J. Appl. Entomol.* 40(1):89-95.
- 김형환, 추호렬, 박정규, 이상명, 김준범. 1998. 식물의 추출물을 이용한 당근뿌리혹선충의 생물적방제. *K. J. Appl. Entomol.* 37(2):199-206.
- 김지인, 한상찬. 1988. 태양열을 이용한 뿌리혹선충 방제효과. *K. J. Appl. Entomol.* 27(1):1-5.
- 박소득, 박선도, 권태영, 최부술, 이원식, 최연영. 1995. 시설과채류(오이, 참외)의 QN리혹선충 종합방제에 관한 연구. *K. J. Appl. Entomol.* 34(1):75-81.
- 박소득, 최연대, 정기채, 심용구, 최영연. 1993. 몇종의 선충천적진균과 화학약제를 이용한 약용작물 뿌리혹선충 방제효과 검토. *K. J. Appl. Entomol.* 32(1):105-114.
- 정영호, 김장억, 김정환, 이영득, 임치환, 허장현. 2000. 최신농약학. 시그마플러스.
- Baker B., P. Zambryski, B. Staskawicz, and S.P. Dinesh-Kumar. 1997. Signaling in plant-microbe interactions. *Science* 276:726-733.
- Baum T. J., A. Hiatt, W. A. Parrott, L. H. Pratt, and R. S. Hussey. 1996. Expression in tobacco of a functional monoclonal antibody specific to stylet secretions of the root-knot nematode. *Mol. Plant Microbe Interact.* 9:382-387.
- Böckenhoff A. and F. M. W. Grundler, 1994. Studies on the nutrient uptake by the beet cyst nematode *Heterodera schachtii* by *in situ* microinjection of fluorescent probes into the feeding structures in *Arabidopsis thaliana*. *Parasitology* 109:249-254.
- Brown C. R., H. Mojtahedi and G. S. Santo. 1989. Comparison of reproductive efficiency of *Meloidogyne chitwoodi* on *Solanum bulbocastanum* in soil and in vitro tests. *Plant Dis.* 73:957-959.
- Chen, Z. X., Dickson, D. W., 1997. A case study of nematode biocontrol using *Pasturia penetrans*. *J. Nematol.* 29, 573.
- Chen, Z. X., Dickson, D. W., McSorley, R., Mitchell, D. J., Hewlett, T. E., 1996. Suppression of *Meloidogyne arenaria* race 1 by soil application of endospores of *Pasturia penetrans*. *J. Nematol.* 28, 159-168.
- Dropkin, V. H. 1989. Introduction to plant nematology. Wiley, New York.

- Dropkin, V. H., J. P. Helgeson and C. D. Upper. 1969. The hypersensitivity reaction of tomatoes resistant to *Meloidogyne incognita*: reversal by cytokinins. J. Nematol. 1:55-61
- Erickson P. I., L. M. Cello, L. W. Froelich and J. T. Bahr. 1990. Rhizogenic response of tomato genotypes to *Agrobacterium rhizogenes* inoculation. J. Hortic Sci. 65:333-337.
- Faulkner L. and F. MeElroy. 1964. Host range of northern root-knot nematode on irrigated crop plants and weeds in Washington. Plant Dis. 48:190-193.
- Gaskin T, and H. Critenden. 1956. Studies of the host range of *Meloidogyne hapla*. Plant Dis 40:265-270.
- Goodey J. B., M. T. Franklin and D. J. Hooper. 1965. The nematode parasites of plants cataloged under their hosts. Farnham Royal, Bucks, UK.
- Hanna, H. Y., Colyer, P. D., Kirkpatrick, T. L., Romainem D. J., Cernon, P. R., 1994. Feasibility of improving cucumber yield without chemical control in soils susceptible to nematode buildup. Hortic. Sci. 29, 1136-1138.
- Hanounik S. B., and W. W. Osborne. 1975. Influence of *Meloidogyne incognita* on the content of amino acids and nicotine in tobacco grown under gnotobiotic conditions. J. Nematol. 7:332-336.
- Huang, J. S. 1985. Mechanism of resistance to root-knot nematodes, pp. 165-174, *In* An advanced treatise on *Meloidogyne*, Vol. I, ed. Sasser, J. N., and C. C. Carter. North Carolina state University Graphics, USA. 422 pp.
- Jung, C. 1987. Breeding for nematode resistance in sugar beet. Ann. Biol. 3:15-25.
- Jung, C. D. Cai and M. Kleine. 1998. Engineering nematode resistance in crop species. Trends Plant Sci. 3:266-271.
- Jung, C. and U. Wyss, 1999. New approaches to control plant parasitic nematode. Appl. Microbiol. Biotechnol. 51, 439-446.
- Lownsbery B. F., C. S. Huang and R. N. Johnson. 1967. Tissue culture and maintenance of the root-lesion nematode, *Pratylenchus vulnus*. Nematologica 13:390-394.
- Mathur A, J. Mohan and U. Kant. 1980. Growth and phenolic contents of root gall and normal tissues of *Lycopersicon esculentum* in tissue culture. Indian J. Mycol. plant

Pathl. 10:44.

- Milligan S. B., J. Bodeau, J. yaghoobi, I. kaloshian, P. Zabel and V. M. Williamson 1998. The root-knot nematode resistance gene *Mi* gene from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. *Plant cell*, 10:1307-1320.
- Mitkowski, N. A. 2001. Characterization of northern root-knot nematode (*Meloidogyne hapla*) from the vegetable growing regions of New York state: species identity, pathogenicity, virulence and genetic diversity. PhD thesis, Cornell University, Ithaca, N. Y.
- Mitkowski, N. A. and G. S. Abawi. 2000. Pathogenicity and virulence of *Meloidogyne hapla* populations from vegetables in new York State. *J. Nematol.* 32:446.
- Mitkowski, N. A. and G. S. Abawi. 2002. Monoxenic maintenance and reproduction of root-knot nematode (*Meloidogyne hapla*) on multiple-species in vitro root culture systems. *Plant Cell Reports*, 21:14-23,
- Netsher, C., Sikora, R. A., 1990. Nematode parasites of vegetables. *in* plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture(Eds.), Luc, M., Sikora, R. A., Bridge J. CAB International, Wallingford, UK, pp. 237-283.
- Oostendorp, M., Dickson, D. W., and Mitchell, D. J., 1991. Population development of *Pasturia penetrans* on *Meloidogyne arenaria*. *J. Nematol.* 23, 58-64.
- Orion D. 1973. Studies on plant root-knot nematode interrelationships. *Bull OEPP* 9:67-71.
- Orion D. and G. Minz. 1969. Rearing of the root-knot nematode *Meloidogyne* spp. on plant tissue culture. *Isr J. Zool.* 18:119-120.
- Orion D. and W. P. Wergin and B. Y. Endo 1980. Inhibition of syncytia formation and root-knot nematode development on cultures of excised tomato roots. *J. Nematol.* 12:196-203.
- Orion D., W. P. Wergin and D. J. Chitwood. 1995. Root cortical cell spherical bodies associated with an induced resistance reaction in monoxenic cultures of *Meloidogyne incognita*. *J. Nematol.* 27:320-327.
- Ornat, C., Verdejo-Lucas, S., Sorribas, F. J., 1997. Effect of previous crop on population

- densities of *Meloidogyne javanica* and yield of cucumber. *Nematropica* 27, 85-90.
- Richards B. N. 1976. Introduction to the soil ecosystem. Longman Group Ltd., London. 266 pp.
- Robers, P. A., 1992. Current status of availability, development, and use of host plant resistance to nematodes. *J. Nematol.* 24, 213-227.
- Ross, J. P. 1958. Host-parasite relationship of the soybean cyst nematode in resistant soybean root. *Phytopathology* 48:578-579.
- Rossi M., F. L. Groggin, S. B. Milligan, I. kaloshian, J. D. E. Ullman and V. M. Williamson 1998. The nematode resistance gene *Mi* of tomato confers resistance against the potato aphid. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA.* 95:9750-9754.
- Sandstedt R. and M. L. Schuster. 1965. Host-parasite interaction in root-knot nematode-infected carrot tissue. *Phytopathology* 55:393-395.
- Sasser J. N., Freckmann D. W. 1987. A world perspective on nematology: the role of the society. *In Vistas on nematology.* ed. Veech J. A., Dickson D. W. Society of nematologists, Hyattsville, pp. 7-14.
- Sayre, R. M., M. P. Starr, 1985. *Pasteuria penetrans*(ex Thone 1940) nom. rev. comb. n., sp. n., a mycelial and endospore forming bacterium parasitic nematodes. *Proc. Helminthological Soc. Washington* 52, 149-165.
- Sharma J. 1975. In vivo and In vitro studies on tomato (*Lycopersicon esculentum*) inoculated with root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*). *In Semin recent Adv Plant Sci* (abstr). Association for the advancement of Plant Sciences, Kalyani, India. pp. 66-67..
- Siddiqui Z. A. and I. Mahmood. 1999. Role of bacteria in the management of plant parasitic nematodes: A review. *Bioresouce Technol.* 69:167-179.
- Sijmons P. C., H. J. Atkinson, U. Wyss. 1994. Parasitic strages of root nematodes and associated host cell responses. *Annu Rev phytopathol.*32: 235-259.
- Stirling, G. R., 1991. Biological control of plant parasitic nematodes. Progress, Problems and prospects. CAB international, Wallingford, UK.
- Sudirman J. M. W. 1995. Effect of ammonium ions on egg hatching and second stage juveniles of *Meloidogyne incognita* in axenic tomato root culture. *J. Nematol.*

27:346-352.

- Tanda A., A. Atwal and Y. Bajaj. 1980. Reproduction and maintenance of root knot nematode, *Meloidogyne incognita*, in excised roots and callus cultures of okra, *Abelmoschus esculentus*. Indian J. Exp. Biol. 18:1340-1342.
- Tefer D. 1984. Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. Cell 37:959-967.
- Trudgill D. L. 1991. Resistance to and tolerance of plant parasitic nematodes in plants. Annu. Rev. Phytopathol. 29:167-192.
- Tzortzakakis, E. A., S. Verdejo-Lucas, C. Ornat, F. J. Sorribas, D. E. Goumas, 1999. Effect of a previous resistant cultivar and *Pasteuria penetrans* on population densities of *Meloidogyne javanica* in greenhouse grown tomatoes in Crete, Greece. Crop prot. 18, 159-162.
- Tzortzakakis, E. A., Gowen, S. R., 1994. The evaluation of *Pasteuria penetrans* alone and in combination with oxamyl, plant resistance and solarization for control of *Meloidogyne* spp. on vegetables grown in greenhouses of Crete. Crop prot. 13, 455-462.
- Verdejo S., B. A. Jaffee and R. Mankau. 1988. Reproduction of *Meloidogyne javanica* on plant root genetically transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. J. Nematol. 20:599-604.
- Vos P., G. G. Simons, T. Jesse, J. Wijbrandi, L. Heinen, R. Hogers, A. Frijter, J. Groenendijk, P. Diergaarde, M. Reijans, J. Fierens-Onstenk, Both M de, J. peleman, T. Liharska and J. Zabeau. 1998. The nematode Mi-1 gene confers resistance to both root-knot nematodes and potato aphids. nat. Biotechnol. 16: 1365-1369.
- Wallace, H. R. 1961. The nature of resistance in chrysanthemum varieties to *Aphelenchoides ritzemabosi*. Nematologica 6:49-58.
- Wu Y., T. Jenkins, G. Blunden, N. Von Mende and S. D. Hankins. 1998. Suppression of fecundity of the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica*, in monoxenic cultures of *Arabidopsis thaliana* treated with alkaline extracts of *Ascophyllum nodosum*. J. Appl. Phycol. 10:91-94.

- Wyss U. 1992. Observations on the feeding behaviour of *Heterodera schachtii* throughout development including events during moulting. *Fundam Appl. Nematol.* 15:75-89.
- Wyss U., F. M. W. Grundler and A. Münch. 1992. The parasitic behaviour of second-stage juveniles of *Meloidogyne incognita* in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Nematologica.* 38:98-111.

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 안됩니다.