

선충포획성 *Arthrobotrys*속균에 의한 소나무재선충 포획 특성

이각중¹ · 구창덕^{1*} · 성주한²

¹충북대학교 농업생명환경대학 산림학과,
²국립산림과학원 산림생태과

Characteristics of Pinewood Nematode Trapping by Nematophagous *Arthrobotrys* spp.

Gak-Jung Lee¹, Chang-Duck Koo^{1*} and Joo Han Sung²

¹Department of Forest Science, Chungbuk National University, Cheongju-si, Chungbuk 361-763, Korea

²Department of Forest Environment, Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Korea

(Received April 3, 2008. Accepted August 3, 2008)

ABSTRACT: Pinewood nematode (PWN) trapping by nematophagous fungi, *Arthrobotrys conoides*, *A. dactyloides* and *A. oligospora* and the fungal growth were characterized. The three *Arthrobotrys* species each was inoculated into the PWN cultured on *Botrytis cinera* fungal colony on potato dextrose agar (PDA). The effects of temperature, pH, PWN inoculation density and nutrients on the growth of the three *Arthrobotrys* spp were measured. *A. conoides* grew fast, 13.9 mm/day while *A. dactyloides* grew slow, 3 mm/day. PDA medium was the best for the fungal growth at 25°C and pH 4.5. The *Arthrobotrys* spp growth was stimulated by 500 nematodes inoculation but not by 1000 inoculation. *A. dactyloides* did not grow below pH 4.5 and at high PWN density. *A. conoides* and *A. oligospora* formed trapping organs with thick constricting hyphal network only when PWN present, while *A. dactyloides* formed the organ with circular hyphae constitutively. *A. conoides* formed trapping organs faster than *A. oligospora* did. The nematode trapping hyphae of the fungi penetrated into PNW inside to form many tiny infection bulbs and to digest the nematode. However, *A. dactyloides* formed a few trapping organs but no trapping was observed. Infection rate of PWN was 95% by *A. conoides*, 80% by *A. oligospora* and 92% by the combination inoculation of *A. conoides* and *A. oligospora*. In contrast *A. dactyloides* increased PWN density without infection. There was no interaction effect in any combination inoculation of the three *Arthrobotrys* spp. *A. conoides* enhanced PWN infection rate by rapid hyphal growth and early trapping, while *A. oligospora* did it by increasing hyphal density. In conclusion *A. conoides* is the most effective in both hyphal growth and infection, and thus these characteristics can be utilized as a biological control of PWN.

KEYWORDS: *Arthrobotrys conoides*, *A. dactyloides*, *A. oligospora*, Nematode trapping fungi, Pinewood nematode (PWN)

우리나라 산림은 소나무류가 30%를 차지하며 대부분의 소나무가 고급용재로 쓰이고 그 자태도 아름다워 조경수로도 널리 사용되고 있다. 특히 금강송은 재질이 우수하기 때문에 문화재 복원용으로 사용되며 숲의 공익적 기능과 사회적, 역사적 가치를 고려한다면 소나무림의 가치는 수십조에 이를 것이다.

하지만 이런 소나무들이 소나무재선충병으로 죽어가고 있으므로 이에 대한 대책이 시급하다. 소나무재선충은 크기 20 $\mu\text{m} \times 600 \sim 1000 \mu\text{m}$ 인 선충의 일종으로 매개충인 솔수염하늘소에 의해 전파되며(Mamiya and Enda, 1972) 소나무뿐만 아니라 해송과 잣나무 등에도 피해를 주고 감염된 소나무는 솔잎이 처지며 시들고 끝내 고사된다(Mamiya, 1982). 우리나라는 1988년 부산에서 최초 발생

한 후 1997년부터 매년 피해가 확산되어 최근 서울을 비롯한 수도권의 잣나무에 까지 피해를 주고 있다(국립산림과학원, 2007). 확산되는 소나무재선충병 방제를 위하여 벌채훈증, 토양관주, 수간주사, 항공살포 등의 화학적 방제와 벌채소각, 파쇄, 위생간벌 등의 임업적 방제가 많이 이용되고 있다(국립산림과학원, 2006). 하지만 이들 방법은 환경오염, 생태계 파괴를 초래하며 막대한 비용이 든다. 이에 대한 대안으로 천적을 이용한 생물적 방제가 있지만 이제 시작 단계이거나 활용되지 못하고 있는 실정이다. 따라서 환경적, 경제적 한계를 극복할 수 있는 방안으로 생물적 방제의 확대가 요구된다. 소나무재선충의 생물적 방제 수단인 매개충의 천적으로서 몇 가지 종류가 알려졌지만 기존의 토양 선충을 죽이는 천적으로 살선충곰팡이가 있다.

살선충곰팡이는 토양 속에 서식하는 사상균으로 병꼴균,

*Corresponding author <E-mail : koocdm@chungbuk.ac.kr>

Table 1. *Arthrobotrys* spp. sources

Strain	Scientific name	Trophic mode	Trapping mode	Origin ^a
60369	<i>Arthrobotrys oligospora</i>	nematode trapping fungi	Adhesive net	KCCM
60152	<i>Arthrobotrys dactyloides</i>	nematode trapping fungi	Constricting ring	KCCM
6280	<i>Arthrobotrys conoides</i>	nematode trapping fungi	Adhesive net	KRIBB

^aKCCM, Korean Culture Center of Microorganisms); KRIBB, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology

난균, 접합자균, 불완전균 등을 포함하며 이들은 기생성이거나 포식성이다(Barron, 2004). 소나무재선충은 균식성으로 사상균을 먹이로 하지만(Kobayasi, 1975), 이들 살선충균은 선충, 원생동물류 등을 포획기관으로 잡아서 죽인 후 양분을 취하는 독특한 생활방식을 갖는다. 그러나 이들은 절대적 포식균이 아니라 선충이 없을 땐 부생적으로도 살아갈 수 있다. 살선충곰팡이는 여러 종류가 있는데 크게 선충을 잡아먹는 포식성곰팡이와 선충 내부에 기생하는 기생성곰팡이로 약 150종 이상이 있다(Cooke and Godfrey, 1964; Barron, 1977). 이들 곰팡이는 전 세계적으로 거의 모든 지역에서 분포하며 산림, 농경지, 분뇨더미 등 다양한 조건에서 살아갈 수 있다(Duddington, 1956; Gray, 1983).

일반적으로 널리 알려진 살선충곰팡이는 *Arthrobotrys*, *Dactylaria*, *Dactylella*, *Monacrosporium*속 등으로 이들은 불완전균이다(Barron, 2004). 이 중 포식성곰팡이인 *Arthrobotrys*속의 토양내에서 밀도는 *A. oligospora* 25.5%, *A. dactyloides* 10.0%, *A. conoides* 9.5% 순으로 높다(김등, 2001). 특히 *A. oligospora*는 세계적 우점종으로 pH, 인산함량, 무기물(K⁺, Ca⁺) 등 토양 조건에 크게 영향을 받지 않으며, 성장속도가 빠르고 토양내 경쟁력도 높다고 알려져 있다(Barron, 1977). 살선충곰팡이의 포획기관의 형태는 다양한데 *A. oligospora* 등이 형성하는 점착성 그물망이 가장 많으며(72.5%) 그 밖에 *A. dactyloides*는 수축성올가미를, *M. ellipsosporium* 등은 끈끈이 붓을 형성한다(Eastey and Olthof, 1965).

소나무재선충의 생물적 방제를 위해서 우리나라와 중국에서는 개미침벌 같은 기생봉을 응용(최 등, 2007) 하고 있다. 그리고 일반 선충 방제에 *Arthrobotrys*속에 관한 연구와 이용에 대한 연구도 많이 있다. 우리나라에서 살선충 곰팡이를 이용한 생물학적 방제 연구는 박(1999)이 뿌리혹선충의 방제를 시도 하였다. 그 실험에서 살선충 곰팡이를 처리한 결과 토마토 육묘의 뿌리혹 형성이 감소하였고 작물의 생장이 증진되었다고 하였으며 선충의 방제율이 80~90%에 이른다고 하였다. 그러나 *Arthrobotrys*속의 살선충균이 소나무재선충을 포획하기 위한 포획기관의 형성과 그 기작, 재선충 내의 침입, 감염기작, 그리고 포획, 감염효과에 대한 연구는 거의 없으며 우리나라에서는 전무한 상태이다.

따라서 본 연구의 목적은 *Arthrobotrys*속의 대표적 살선충곰팡이인 *A. oligospora*, *A. dactyloides*, *A. conoides*의

성장속도 및 살선충 기작을 알아보고, 소나무재선충에 대한 감염능력을 알고자 하는 것이다.

재료 및 방법

소나무재선충 증식방법

소나무재선충(*Bursaphelenchus xylophilus*)은 2006년 국립산림과학원 남부 연구소에서 분양 받아 PDA(Potato dextrose agar, 39 g/l) 배지가 있는 직경 85 mm 페트리 플레이트에 잿빛곰팡이(*Botrytis cinerea*)를 접종하여 25°C 항온기에 두고 균사가 플레이트 전체에 퍼질 때 까지 배양시켰다. 배양된 잿빛곰팡이가 있는 배지 위에 잿빛곰팡이와 함께 분양 받은 소나무재선충을 접종하여 25°C 항온기에 두고 소나무재선충이 잿빛곰팡이 균사를 섭식하면서 배지 전체에 퍼질 때 까지 증식시켰다.

*Arthrobotrys*속 균종별 균사 성장량 측정

2007년 한국미생물보존센터(KCCM)와 한국생명공학연구원(KRIBB)으로부터 분양 받은 *Arthrobotrys*속 3종(*A. oligospora*, *A. dactyloides*, *A. conoides*)의 균사(Table 1)를 PDA 배지에 접종하여 25°C 항온기에 두고 배양시켰다. 한천배지에 *Arthrobotrys*속 균을 1 cm² 크기로 잘라서 접종하여 25°C, pH 5.6에서 배양하였다. 균사의 성장량 측정은 처음 접종 크기를 포함하여 콜로니의 장-단경의

Table 2. Ingredient of media for culturing *Arthrobotrys* spp.

Ingredient	Media			
	PDA	MMN	GYA	CMA
agar (g)		15	15	
glycerol (ml)			5	
yeast extract (g)			2	
K ₂ HPO ₄ (g)			1	
KH ₂ PO ₄ (g)		0.5		
CaCl ₂ (mg)		50		
NaCl (mg)		25		
(NH ₄) ₂ HPO ₄ (mg)		250		
MgSO ₄ ·7H ₂ O (mg)		150		
Thiamine HCl (mg)		0.1		
Malt extract (g)		3		
1% EDTA (ml)		6		
Glucose (g)		10		
CMA (g)				17
PDA (g)	39			
DDW (l)	1	1	1	1

평균 성장 길이를 측정하였고 각 처리는 3반복 하여 평균 하였다. 탄소원 및 질소원이 이 균들의 성장에 미치는 영향을 알기 위하여 PDA, CMA(Corn meal agar) 배지, 질소원이 많아 버섯 균사 배양에 이용되는 MMN (Modified Melin-Norkran's) 배지, 그리고 GYA(Glycerol yeast extract agar)의 총 4종류 배지(Table 2)를 사용하였으며 2일 마다 10일간 성장량과 균밀도를 측정하였다. 그리고 온도가 이들 균사 성장에 미치는 영향을 알기 위하여 항온기 15°C, 20°C, 25°C, 30°C에서 2일마다 10일간 측정하였다. 그리고 균사생장에 대한 pH 영향을 알기 위하여, PDA에서는 malic acid와 phosphate buffer, NaOH를 사용해 pH값을 낮추었고, MMN배지는 phosphate buffer로 조절하였다. PDA배지의 pH는 4.0, 5.6, 10.0의 수준으로 하였으며 MMN배지는 4.5, 5.5, 7.5 수준으로 2일마다 10일간 측정하였다. 소나무재선충 수에 따른 균사 성장량을 측정하기 위하여 바이에르만 깔대기 법으로 재선충을 분리하여 모은 후 10 µl pipet 안의 재선충 수를 세어 10, 100, 500, 그리고 약 5000~10000마리의 수준으로 *Arthrobotrys*속 균종과 같이 접종하여 2일 마다 10일간 균사 성장량을 측정하였다. 영양 조건에 따른 균사 성장량 측정하기 위하여 PDA를 50%, 10%, 순수 한천으로 하여 *Arthrobotrys*속 균종을 접종하고 2일마다 10일간 성장량을 측정하였다.

Arthrobotrys속 균종별 포획기관 및 포획기작 관찰

Arthrobotrys 균의 선충 포획기관을 관찰하기 위하여 PDA배지에서 배양된 *Arthrobotrys*속 3종의 균에 재선충이 있는 PDA 배지를 떼어 접종하였다. 재선충이 접종된 배지를 25°C의 항온기에 넣고 6시간 후부터 6시간 간격으로 1% acid fuchsin 염색약을 포획기관이 있는 배지 절편에 떨어뜨리고 2~3분 후 알코올로 희석시켜 광학현미경으로 포획기관을 관찰하였다. *Arthrobotrys*속의 포획기관을 주사전자현미경으로 관찰하기 위해 재선충의 포획이 의심되는 곳의 배지 절편을 서울대 농업과학공동기기센터 (2005)과 충북대 식물외과학과 실험실의 전처리 과정에 따라 처리하였다.

Arthrobotrys속 균종 조합별 소나무재선충 성장영향 측정

*Arthrobotrys*속 균사를 PDA 배지 플레이트 전체에 자라게 한 후, 여기에 잿빛곰팡이에서 자란 재선충을 플레이트 반 크기로 접종하였다. 7일 후 배지 전체를 믹서기로 분쇄하고 바이에르만 깔대기법으로 분리하였다. 분리된 재선충을 원심분리기에 넣고 2000 rpm에서 약 5분간 돌려 모여진 재선충만을 뽑아 1 ml씩 microtube에 넣고 흔들어 섞은 후 피펫으로 10 µl씩 3회 추출하여 슬라이드글라스에 놓고 저배율의 광학현미경으로 보며 재선충 수를 세었다. 각 10 µl안에 있는 재선충 수에 100배를 하고 평균을 하여 한

Table 3. Matrix of fungal combinations to test predatory ability of nematophagous fungi on pinewood nematode

Fungal combination	A	B	C	ABC
A	A	AB	AC	ABC
B		B	BC	
C			C	
ABC				

※ A, *A. oligospora*; B, *A. dactyloides*; C, *A. conoides*

플레이트 내의 재선충의 수를 세었다. 비교를 위해 잿빛곰팡이에도 재선충을 접종하였으며 균종별로 5반복 하였다. 재선충 수로 대조군과 감염능력을 비교하였다. 균종 조합은 Table 3과 같다. 비병원성 선충에 대한 *Arthrobotrys* 균의 영향을 측정하기 위하여 이들 균이 자란 PDA 배지에 비병원성 선충(BM: *Bursaphelenchus mucronatus*)을 앞에서 서술한 소나무재선충 처리방법으로 접종하고 분리하여 소나무재선충(BX: *B. xylophilus*)과 비교하였다.

Arthrobotrys속 균종별 성장속도와 재선충 감염율간 관계 조사

*Arthrobotrys*속 균사가 자란 PDA 배지 1 cm²를 소나무재선충 만연한 플레이트에 접종하고 25°C 항온기에 두어서 날마다 7일 동안 균산생장량을 면적(cm²)으로 측정하였다. 그리고 배지 전체를 바이에르만 깔대기에 넣어 재선충을 분리하고 재선충 수를 세었다. 접종은 균종별로 3반복 하였다. 그리고 성장속도와 감염율간의 상관 관계를 조사하였다. 한번 포획되어 감염된 선충은 움직이지 못하므로 분리되지 않은 선충은 모두 감염된 것으로 간주하였다. 감염율은 다음 공식으로 구하였다.

$$\text{감염율(\%)} = \frac{(\text{대조군 재선충 개체수} - \text{균종별 분리된 재선충 개체수})}{\text{대조군 재선충 개체수}} \times 100$$

결과 및 고찰

영양조건에 따른 Arthrobotrys속 균의 균사 성장

PDA배지에서 한천을 제외한 농도를 50%, 10%, 0% 수준으로 낮추면 그에 따라서 균사신장 속도도 느려졌지만(Fig. 1A) 농도에 비례하지는 않았으며, 대신 균사의 밀도가 낮아졌다(Table 4).

배지에 따른 Arthrobotrys속 균의 균사 성장

서로 다른 영양원이 들어있는 4가지 배지의 균사 성장량은 Fig. 1B와 같다. MMN 배지를 제외한 3가지 배지에서 *A. conoides*의 균사 성장량이 가장 빨랐으며(12.9 mm/day), 모든 배지에서 *A. dactyloides*의 균사 성장량은 가장 느렸다(2.4 mm/day). 박(1982)은 CMA배지에서 *A. conoides*보다 *A. oligospora*가 성장속도가 더 빠르다고 하였는데,

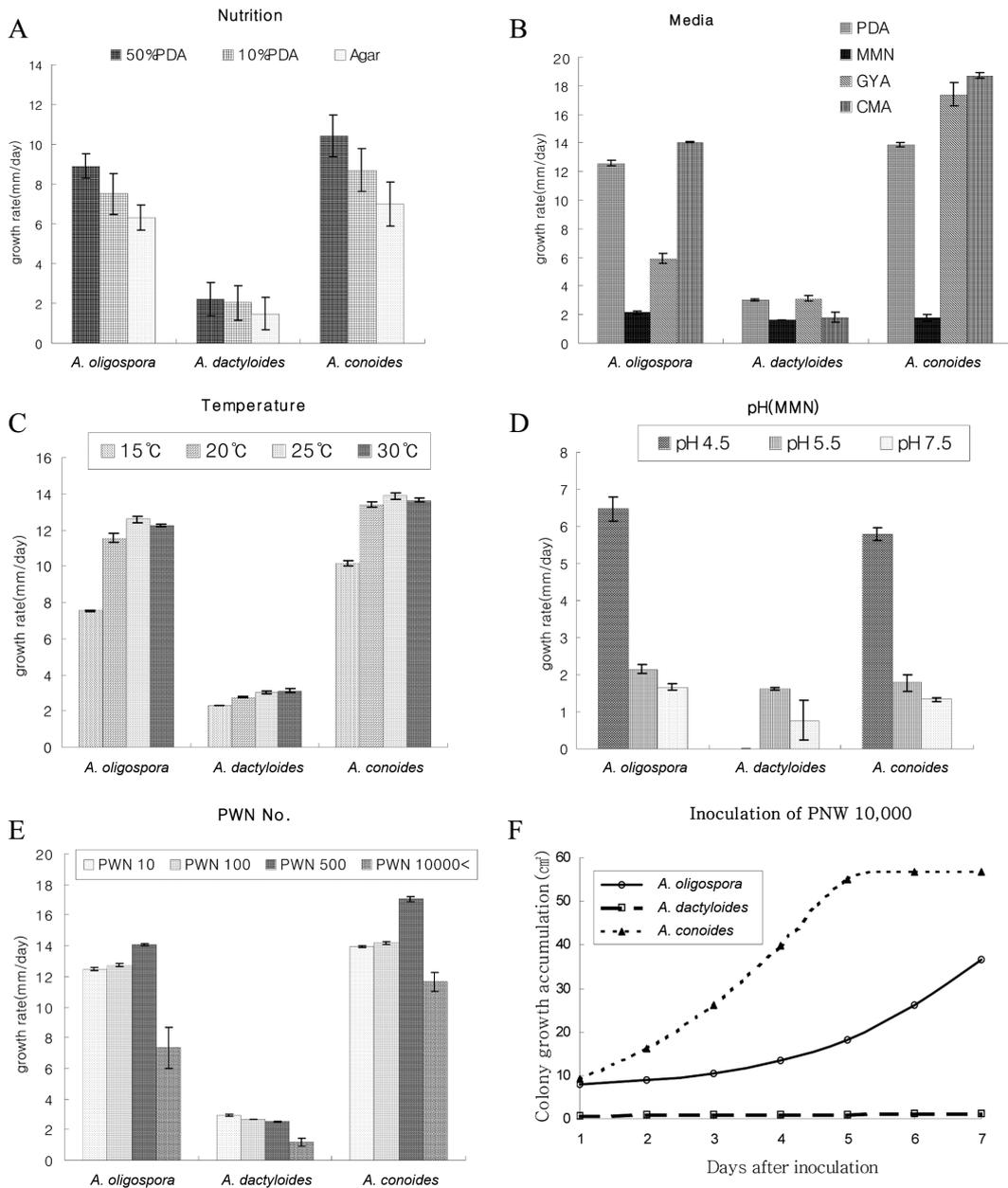


Fig. 1. Mycelial growth rate per day of *Arthrobotrys* spp according to cultural conditions. A, nutrition; B, media; C, temperature; D, pH; E, inoculated pinewood nematode (PWN) numbers; and F, accumulated growth of *Arthrobotrys* spp. after 10,000 PWN inoculation.

이 연구에서는 *A. conoides* 가 더 빠르게 자랐다. 성장 속도로 보아 *A. dactyloides*는 부생성이 약하여 잘 경쟁할 수 없다고 한 박(2005)과 일치하였다(Table 4). 탄소원이 많은 PDA와 CMA배지에서 *A. dactyloides*를 제외한 두 균종은 6일만에 페트리플레이트 전체에 퍼질 만큼 높은 성장을 보였지만 균밀도가 낮아서 콜로니가 희미하였다. 반면 질소원 함량이 많은 MMN 배지에서는 균사들이 매우 느리게 성장하였으며 탄소원과 질소원이 모두 있는 GYA 배지에서는 *A. oligospora*의 생장은 느렸으나 *A. dactyloides*의 생장은 빨라졌다. 이것은 dextrose 등의 탄

소원이 Malt extract등의 질소원 보다 균사 생장에 많이 이용이 된다고 여겨지며 탄소원이 질소원보다 포획기관 형성에 유리하다고 한 Persson and Beath(1992)과 박(1982)의 연구와 일치하였다. 4가지의 배지 중 가장 효과적인 것으로는 PDA배지로 생장이 균일하고 균밀도가 높았다(Table 4). 또한 MMN외의 배지에서 균사생장은 균종간에 그리고 배지간에 차이가 현저하였다($p < 0.01$).

온도에 따른 *Arthrobotrys*속 균의 균사 성장

온도에 따른 균사 성장량은 종에 따라 차이는 있었지만,

Table 4. Mycelial density of *Arthrobotrys* spp. by culture conditions for 10 days

<i>Arthrobotrys</i> spp.	Media				pH			PWN number				Nutrition (%)		
	PDA	MMN	GYA	CMA	4.5	5.5	7.5	10	100	500	10000	50	10	0
<i>A. oligospora</i>	++	++	+	-	+	++	++	++	++	+++	+++	++	+	+
<i>A. dactyloides</i>	+++	++	+	-	*	++	-	++	++	++	+	++	+	+
<i>A. conoides</i>	+++	++	+	-	+	++	+	++	++	++	++	++	+	+

+++, high density; ++, middle density; +, low density; -, very low density; *, no growth.

25°C에서 가장 높았으며 30°C에서는 성장속도가 낮았다. 따라서 *Arthrobotrys*속 균의 성장온도범위는 재선충의 활동 온도 범위와 비슷하여 살선충하는데 알맞다고 생각된다(Fig. 1C).

pH에 따른 *Arthrobotrys*속 균의 균사 성장

MMN 배지에서는 pH 4.5에서는 *A. dactyloides* 를 제외한 균들이 특히 높은 성장을 하였지만 pH 7.5에서는 거의 성장하지 않았다(Fig. 1D). 이는 박(1982)이 *A. conoides*의 실험에서 알칼리보다 산성쪽에서 생장이 높다는 결과와는 일치하였지만 pH 7.5에서 성장율이 가장 높다는 것과는 반대 결과였다. 특히 *A. oligospora*는 pH 4.5에서 *A. conoides* 보다 빠른 성장을 하였는데 이 결과로 *A. oligospora*는 넓은 pH 범위를 갖는다는 것을 알 수 있었다. pH 4.5에서 두 균 모두 큰 차이 없이 잘 성장하였지만 pH 5.5에서 보다 균밀도는 낮아졌다(Table 4).

소나무재선충 수에 따른 *Arthrobotrys*속 균의 균사 성장

10~100마리 정도의 적은 양의 재선충을 넣었을 때는 선충을 넣지않은 무처리와 비교하여 차이가 나지 않았으나 500마리의 재선충을 넣었을 때는 *A. oligospora*와 *A. conoides*의 생장이 모두 빨라졌다(Fig. 1E). 하지만 *A. dactyloides*의 경우는 선충 수가 많을 때 오히려 생장이 줄었다. 이는 일정 수 이상이 재선충이 있으므로 재선충에서 나오는 화학적 접촉물질이 많아져서 균사가 인식할 수 있을 만큼의 양이 되어야 균사가 포획기관을 형성하고 선충을 포획하여 영양분을 섭취해 성장에 이용할 수 있다고 생각되지만, *A. dactyloides*에서는 선충이 균사 성장을 방해한다고 판단된다. 그러나 성장 초기에 10,000마리 이상의 많은 재선충을 한 번에 넣었을 때는 오히려 균사 성장량이 줄어들었다(Fig. 1E, 1F). 이것은 초기 적은 균사에서 많은 수의 포획기관을 만드는데 많은 양의 에너지를 소비함으로써 생장이 느려지는 것이라 생각된다.

***Arthrobotrys* 균종별 포획기관의 해부 및 광학 현미경 관찰**

*A. oligospora*와 *A. conoides*의 포획기관은 모두 점착성 입체적 망상구조의 형태로 일반균사가 곁가지들 내고 그것이 구부러져 고리 모양이었다(Fig. 2A, 2B, 2C). 이 고리는 모균사나 이웃하는 또 다른 고리와 상호반응으로

융합하여 더 큰 고리를 만들거나 수많은 고리가 융합하여 나중에는 전체적으로 서로 엮혀 망상고리를 형성하였다. 즉 입체적인 망의 구조를 하고 있어 잡힌 선충은 빠져나오지 못하였다(박, 2005). 하지만 앞의 두 균이 같고리 형태를 하는 반면에 *A. dactyloides*는 압축성고리(constricting ring)의 형태로 이 고리는 완전한 원의 형태를 띄고 고리끼리 서로 융합하지 않았다 (Fig. 2D, 2F). 이 압축고리 안으로 선충이 들어오면 고리가 빠른 시간 내에 수축하여 잡는다. 압축고리는 3개의 세포로 이루어져 있으며 이 세포가 팽창하여 고리안에 들어온 선충을 조인다(Barron, 1981).

*A. oligospora*와 *A. conoides* 배양에서는 재선충을 넣었을 때만 포획기관이 형성되었다. 이는 선충 혹은 단백질 을 넣었을 때 포획기관이 형성된다고 한 Couch(1937)의 연구와 같았다. 따라서 소나무재선충에도 다른 선충과 같이 표면에 있는 점착물질 역시 단백질 등의 화학물질이라고 생각된다. *A. dactyloides*는 재선충 없이도 포획기관이 형성되었다(Cooke and Godfrey, 1964; Barron, 1977).

포획기관인 고리균사는 다른 균사와는 확연히 구별되었는데 그 모양뿐만 아니라 균사의 굵기가 약 4~5 μm로 다른 균사와 비교하여 1.5배 이상 굵었다 (Fig. 3A, 3B, 3C, 3D). 이 부분에서는 포획기관 표면의 점착물질 때문에 두껍게 보인다는 견해(박, 1982)도 있지만 뚜렷하게 굵었다.

재선충을 접종 후 6시간 마다 포획기관의 형성을 관찰하였는데 *A. conoides*는 접종 후 약 6시간 후부터 포획기관이 조금씩 형성되기 시작하였으며 12시간 이후 부터는 비교적 많은 수의 포획기관이 형성되었고 그 후로 더 많은 포획기관이 형성되었다. 균사가 재선충의 움직임이나 분비물 등으로 인한 화학적, 물리적 자극을 받아 재선충의 존재를 인식하기 시작하면 수초에서 수분 내에 재선충이 있는 곳뿐만 아니라 페트리 플레이트 전체로 포획기관이 조금씩 형성되었다. 하지만 *A. oligospora*는 약 2일 후부터 포획기관의 수가 많아지기 시작하였다.

재선충이 없는 곳에서의 *A. conoides*의 분생포자는 균을 배지에 접종한 후 균사가 배지 전체에 퍼진 후인 7일 후에 형성되었지만, 재선충이 있는 배지에서는 포획기관이 형성된 다음날인 균 접종 후 2~3일 후 형성되었다. *A. oligospora* 역시 재선충이 있는 배지에서 포자 형성이 빨라졌다. 하지만 *A. dactyloides*는 포자를 형성하지 못하였다. 이들 균의 분생포자는 분생자경 위에 포도송이처럼

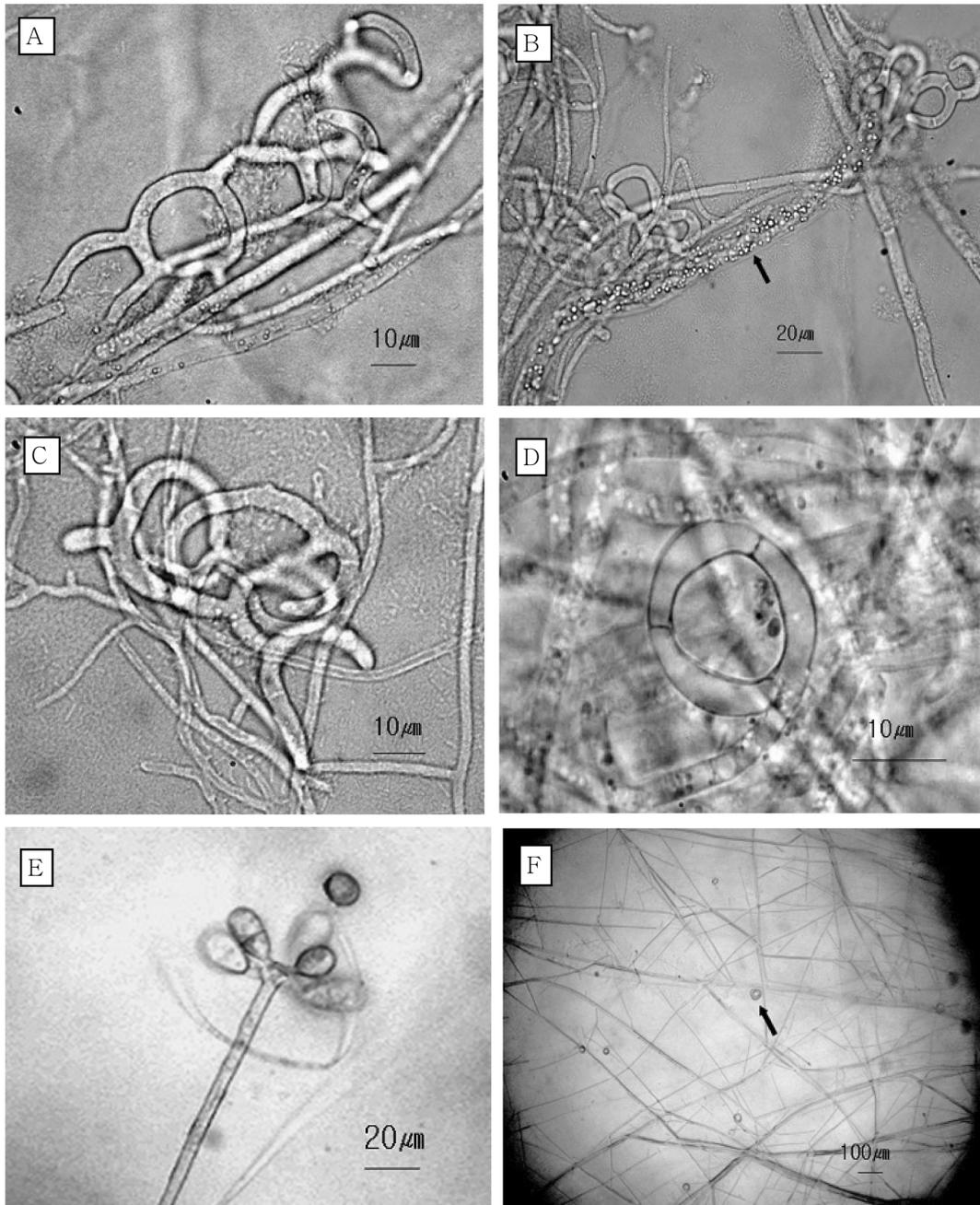


Fig. 2. Nematode trapping adhesive fungal structures of *Arthrobotrys* spp. A: adhesive hyphal network of *A. conoides*, B: pinewood nematode (arrow) trapped by *A. conoides* hyphal network; C, open adhesive hyphal network of *A. oligospora*; D, single constricting ring of *A. dactyloides*; E, conidiophore of *A. dactyloides* with spores; F, hyphae and constricting ring (arrow) of *A. dactyloides*.

6~12개 정도가 모여 달렸으며 각 포자의 형태는 표주박모양이나 긴타원형이었다(Fig. 2E). 크기는 약간의 차이는 있었지만 $25\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ 로 대개 두 개의 세포로 이루어져 있었으나, 한 개의 세포로 이루어져 있는 것도 있다(박, 1982; Singh *et al.*, 2005).

*A. oligospora*와 *A. conoides*에서 포획기관에 의한 기작은 일단 한번 잡힌 재선충은 빠져나오려고 해도 재선충 주위로 계속 포획기관을 만들어 꼼짝 못하게 만들며 선충

이 접촉되면 포획기관은 더 많은 점착물질을 분비하여 재선충에서 분비하는 점착물질과 화학적 결합이 일어난다. 포획구사 표면에서 나오는 점착물질인 렉틴(lectin)은 특수한 단백질로써 탄수화물과 결합능력이 있는 당단백질 종류로 다당류와의 공유결합 한다. 즉, 렉틴은 재선충에서 나오는 다당류와 결합하여 점착성이 더 강해진다고 할 수 있다. 하지만 각 균주마다 가지고 있는 렉틴은 결합 특이성이 있어 어떤 당류를 분비하는 선충은 잘 잡지 못하거

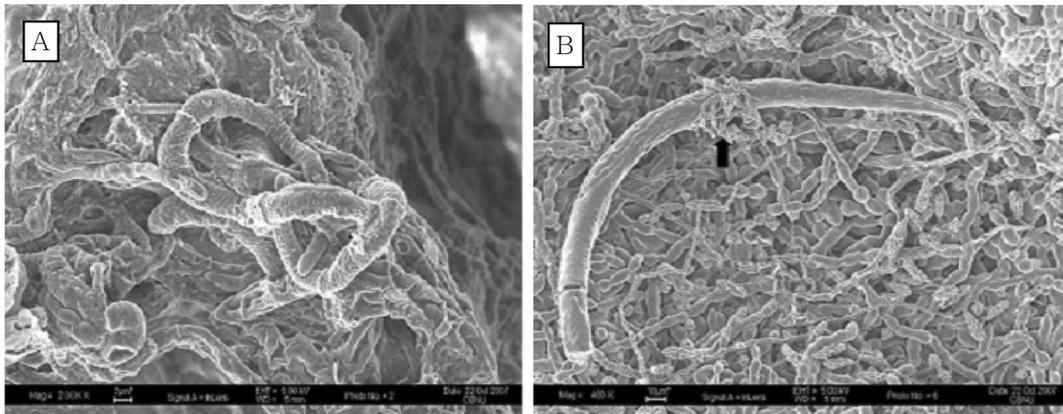


Fig. 3. Scanning electron microscopy. A, hyphal network formed by *Arthrobotrys conoides* for trapping nematodes; B, a pinewood nematode trapped by the nematode trapping network.

나 효율이 떨어질 수 있다. 예를 들면 어떤 렉틴은 선충에서 나오는 당류를 인식하지 못하고 N-acetylgalactosamin과 결합하여 O-연결형 당류가 되고 이는 점착성이 없어 진다(Tunlid *et al.*, 1992; Nordbring-Hertz, 1978). *A. oligospora*와 *A. conoides*에서 재선충을 포획하는 효과가 차이가 있는 것도 이런 이유 때문이라고 생각된다.

포획된 재선충은 포획기관마다 침입 균사를 형성하여 재선충의 큐티클층을 뚫고 들어간 후 선충 내부에 작은 물방울 같은 둥근 침입구(infection bulb)를 형성하였다(Fig. 2B). 박(1982)은 침입구의 길이가 선충 굵기와 비슷하다고 하였고 한 포획기관에서 하나 또는 두 개의 침입구를 형성한다고 하였으나 재선충내의 것은 재선충 굵기의 반 미만의 길이였으며 균사가 침입 후 자라면서 여러 개의 침입구를 형성하였다. 하지만 침입구가 직접 선충을 죽인다기 보다는 침입한 균사에서 나온 독소나 소화효소가 선충을 죽인다는 이론이 많다(Duddington, 1956; Balan and Lechevalier, 1972). 최종적으로 재선충은 균사에 의해 소화되고 분해되어 선충 표면인 큐티클만 희미하게 남겨나 전부 없어졌다. 그리고 죽은 선충부위에서 포자를 생성하기도 하였다(Nordbring-Hertz, 1978).

반면 *A. dactyloides*는 포획기관은 형성하였지만 재선충을 포획하지는 못하였는데, 그 이유로는 압축고리의 지름이 10~15 μm 정도로 작아 재선충이 그 고리로 들어갈 수 있는 확률이 작으며 결정적으로 포획기관의 수가 1~2/5 mm² 정도로 매우 적었다(Fig. 2D, 2F). Balan and Lechevalier(1972), Kumer and Singh(2005) 등은 낮은 영양조건에서 *A. dactyloides*의 포획기관은 풍부하게 형성된다고 하였으나 50%와 10%PDA 그리고 한천배지에서 포획기관 형성을 실험한 결과 포획기관 수만 소수 증가하여(5~6/5 mm²) 차이가 없었다.

재선충이 포획된 곳에 1% acid fuchsin으로 염색한 결과 점착물질이 있는 포획기관이 더 붉게 염색되었다. 이 염료는 산성 물질을 염색시키므로 점착물질인 렉틴은 산

성의 당단백질임을 알 수 있었다.

*A. oligospora*의 영양조건에 따른 포획기관의 양은 Persson and Beath(1992)가 보고하였는데 일정 농도까지는 균사생장과 포획기관의 수는 비례한다고 하였으며 질소원 보다 탄소원에서 많은 포획기관을 형성한다고 하여 질소원이 포획기관 유도물질이라고 한 Nordbring-Hertz(1973)의 결과와는 차이점이 있었다. 박(1982) 또한 *A. conoides*에서 질소원은 탄소원에 비해 포획기관 형성에 효과가 적다고 하였으나 낮은 영양조건에서 포획기관 형성이 잘 된다고 하였고 Migunova and Byzov(2005)도 *A. oligospora*의 포획기관 형성은 낮은 영양배지에 있는 포자에서만 관찰되고 선충의 존재시 낮은 생장과 높은 포자생산을 한다고 하였다. Kumer and Singh(2005) 역시 *A. dactyloides*의 포획기관은 영양이 좋은 토양에서 억제되었다고 하였다. 하지만 Nansen *et al.* (1988) 등은 영양보다는 선충 수가 많았을 때 포획기관이 빠르게 유도되어 선충을 잡는다고 하였다.

Veenhuis *et al.*(1985)에 의하면 포획기관의 구조는 이웃하는 포획기관의 두 고리세포가 상호반응하여 하나의 고정장치를 만든다고 하였다. 이 반응은 즉각적으로 일어나고 이어서 두 포획기관의 세포 중 하나 혹은 둘 다에서 침입관을 형성하여 침입 후 선충 내용물을 소화한다고 하였다. 그 전에 Nordbring-Hertz(1978)는 침입 후 선충 내부에 감염구(infection bulb)를 형성한다고 하였으며 Borrebaeck *et al.*(1985) 등과 같이 *A. oligospora*의 포획기관에서 분리한 렉틴(lectin)과 그 수용체에 대해서 연구하였다. 렉틴은 특별한 단백질로써 오직 포획기관에서만 발견되며 선충에서 나오는 렉틴의 수용체는 렉틴과의 친화성이 포획능력과 관련된다고도 하였다. 이 두 균이 렉틴에 의해 선충을 인식하고 유인하여 잡는(Tunlid *et al.*, 1992) 반면에 *A. dactyloides*는 처음부터 포획기관인 압축고리를 만들고(Cooke and Godfrey, 1964; Barron, 1977; Kumer and Singh, 2003), 이 때 접촉과 전기적 자극에 의

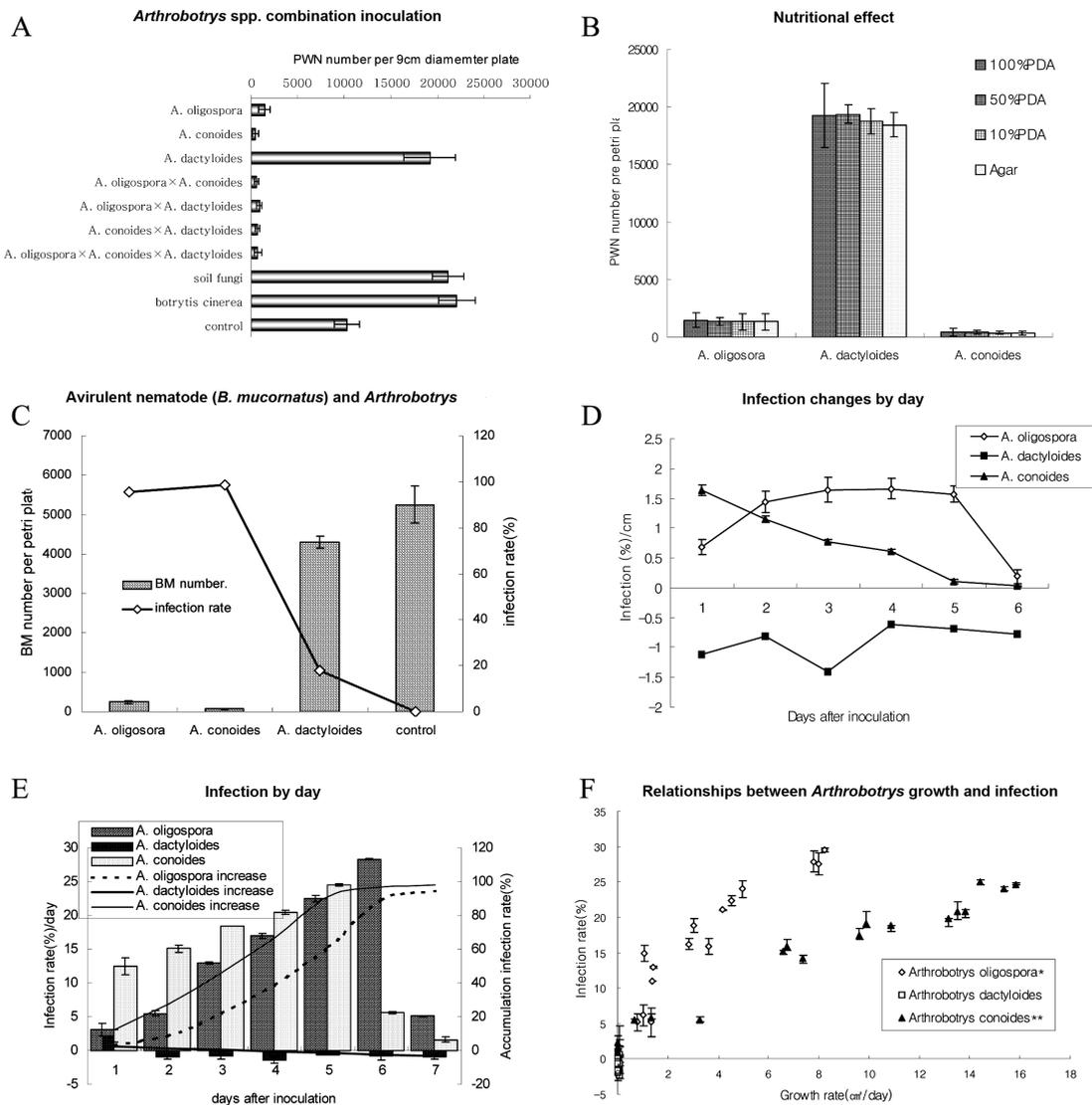


Fig. 4. Infection rate of pinewood nematode (PWN) by *Arthrobotrys* spp. according to treatments. A, *Arthrobotrys* spp. combination inoculation; B, nutritional effect with potato dextrose; C, avirulent nematode (*Bursaphelenchus mucronatus*) infection by *Arthrobotrys*; D, infection rate change of nematode per cm² by ages (days) after inoculation of PWN; E, infection rate by day and accumulated infection rates; F, relationship between *Arthrobotrys* growth and infection rate.

한 압축고리의 세포팽창으로 선충을 포획하며 균사세포는 에너지를 소비하지는 않는다(Higgins and Pramer, 1967). 또한 Barron(1981)은 압축고리를 구성하는 세포 안쪽 벽에 연약한 부분이 줄로 이어져 있어 그 부분을 자극하면 세포벽이 물을 빠르게 흡수하여 부풀어 오른다고 하였다. 하지만 Chen(2001)은 압축고리의 팽창기작이 G-protein의 활성화 유무에 따라 다르다고 하였다. 즉, G-protein이 활성화 되면 압축고리의 세포가 팽창하여 선충을 잡을 수 있고 억제자에 의하여 활성화 되지 못하면 세포팽창이 억제 되어 선충을 잡을 수 없다고 하였다.

포획기관의 주사전자현미경(SEM) 관찰

주사전자현미경으로 포획기관을 관찰한 결과(Fig. 3A)

포획기관의 굽기가 광학현미경으로 관찰하였을 때 보다 다소 가늘어 보였는데 이것은 아마도 균사를 전처리하는 과정에서 점착물질이 탈수 되었거나 포획기관 세포가 수축되었다고 생각된다. 재선충의 표면에는 수많은 주름과 몇 개의 구멍이 있었는데(Fig. 3B) 이 구멍에서 다당류 등의 점착물질을 분비하는 것으로 보인다.

***Arthrobotrys*속 균종별 소나무재선충 증식에 미치는 영향**

*Arthrobotrys*속 균종의 조합처리에서 중에서 가장 적은 수의 재선충이 검출된 균은 *A. conoides*로 감염율이 약 95%였으며, 다음으로는 *A. oligospora*와 *A. conoides*의 조합에서 감염율이 94%였다(Fig. 4A). 하지만 *A. dactyloides*

는 배양배지에서 대조군인 접종수 보다 더 많은 재선충이 나왔는데, 이 결과는 이 균은 먹이가 되어 재선충을 증식시킨다고 생각된다. 재선충을 잡는 *A. dactyloides*의 포획기관의 수가 매우 적은 이유는 배지의 환경에 따라 혹은 선충의 종류에 따라 특징적인 차이가 있기 때문이라 생각된다.

*Arthrobotrys*속 균종 조합 중에서 *A. dactyloides*를 제외한 모든 조합에서 재선충이 높이 감염있고 유의적인 차이는 없었으나 *A. conoides*가 가장 살선충 효과가 높았다. 그러나 균종 조합은 균종간 경쟁에 의해 그 효과가 낮아진다고 생각된다.

PDA 배지에서 한천을 제외한 영양조건을 50%, 10%, 0%의 수준에 따라 포획되지 않은 재선충 수를 측정 한 결과 100% PDA 배지와 비교하여 영양조건이 낮아질수록 검출된 재선충의 수는 감소하는 경향이 있었지만 유의성은 없었다(Fig. 4B). 이는 *A. oligospora*에서 낮은 영양조건에서만 포획기관의 형성이 잘 일어난다는 Migunova and Byzov(2005)의 결과와는 차이가 있었다. 낮은 영양조건에서는 비록 포획기관이 조금 더 잘 형성될 지라도 생장이 느리고 특히 균밀도가 낮기 때문에 전체적인 포획기관의 수는 비슷하다고 생각된다. *A. dactyloides*의 경우에도 포획기관의 수는 약간 증가하고 재선충의 검출 수가 조금 줄었으나 통계적으로 유의하지 않았으며, 양분부족으로 먹이인 균사량이 적어서 재선충이 증식하지 못하였다고 생각된다.

선충 종류에 따라 *Arthrobotrys*속 균의 포획능력이 차이가 있는지를 알기 위해, 소나무시들음병을 일으키지 않은 비병원성 선충인 *B. mucronatus*에도 같은 실험을 한 결과 *A. conoides*와 *A. oligospora* 균은 선충을 98% 이상 감염시켰고, 재선충을 거의 포획하지 못하였던 *A. dactyloides*는 이 비병원성 선충을 약 20% 감염시켰다(Fig. 4C). 이것은 *A. dactyloides*는 선충의 종류에 따라 포획능력에 차이를 보인다고 할 수 있다.

Arthrobotrys속 균종별 성장속도와 재선충 감염율간 관계

성장 단위 면적당 재선충 감염율은 *A. oligospora*의 경우 처음은 낮았다가 균밀도가 높아지면서 감염율도 높아졌으며 5일 이후 부턴 재선충 수가 줄면서 낮아졌다(Fig. 4D). 하지만 *A. conoides*는 처음부터 감염율이 가장 높았고 점점 감소하였다.

10,000마리 이상으로 많은 재선충을 접종하였을 때 *Arthrobotrys* 균사 성장량은 모두 낮아졌다. 특히 *A. oligospora*의 성장량이 많이 줄었다. 하지만 재선충의 수는 재선충 접종 후 처음 2일간 경과기를 거친후 3일째부터는 빠르게 감소하였다(Fig. 1F). 이는 재선충을 접종 후 *A. oligospora*의 생장은 느려졌지만 대신 균밀도가 높아짐에 따라 포획기관의 수가 많아져 포획 효율이 높아졌기 때문이라고 생각된다. 또한 *A. conoides*도 성장량이 줄었

는데도 재선충 접종 후 5일째까지 계속 감염율이 증가하였다. 하지만 *A. conoides*는 *A. oligospora*와는 다르게 균밀도는 그다지 높아지지 않았으며 빠르게 많은 포자를 형성하였다. 또한 재선충 접종 후 다음날부터 높은 감소율을 나타내었으며 7일까지 항상 가장 높은 감염율을 보였다. 이것은 *A. oligospora* 균보다 재선충 인식과 그에 따른 포획기관 형성이 빠르고 성장량이 조금 느려지는 대신 그 에너지로 많은 포자를 만들어 발아된 포자는 길이 생장보다는 포획기관을 많이 형성한다고 여겨진다. 이 두 균 모두 1~2일의 차이는 있었지만 재선충 접종 후 5~6일에서 높은 재선충 감소율을 나타냈으며 7일 이후부터는 감소율이 급격히 떨어졌다. 이 결과는 포획기관의 수가 5~6일에서 최대에 이르며 재선충이 줄어들면서 포획기관이 감소되거나 더 이상 형성하지 않는다는 것을 암시한다(Fig. 4E). 이로써 두 균이 재선충에 반응하는 생리적 차이는 *A. oligospora*는 생장이 느려지는 대신 균밀도를 높였으며 *A. conoides*는 초기 포획기관의 형성율을 높인다는 것을 알 수 있었다.

균사성장률과 재선충감염률 간의 관계는, *A. oligospora*, *A. conoides* 모두 성장률이 높아질 수록 감염율도 높아지는 정의 상관이 있었고 *A. dactyloides*는 성장할수록 재선충의 수는 늘어났으나 상관관계는 거의 없다고 보여진다. 대체로 *A. conoides*는 성장률이 *A. oligospora*보다 높았지만 감염률은 차이가 없었다(Fig. 4F).

결국 균사성장률과 재선충감염율이 모두 높은 균종은 *A. conoides*로 초기 감염률도 가장 높았다. *A. conoides*의 장점은 재선충이 증가되는 속도보다 빠른 시간 내에 성장하고 많은 포획기관을 형성하므로써 재선충의 살선충 효과가 크다고 생각된다. 이런 *A. conoides*의 특성을 소나무재선충의 생물학적 방제에 응용할 수 있을 것이라 생각된다.

적 요

*Arthrobotrys*속 균은 불완전균으로 토양선충을 포획하는 살선충 곰팡이다. 본 논문에서는 선충포획성 균종인 *A. oligospora*, *A. dactyloides*, *A. conoides*의 균사성장, 선충 포획기작의 특성, 그리고 소나무재선충에 대한 감염능력을 이해하여 살선충 효과가 높은 균종을 알고자 하였다. 소나무재선충은 잣빛곰팡이(*Botrytis cinera*)에 접종해 증식시켰으며 여기에 *Arthrobotrys*속 3종 각각의 균사배양체 1 cm²씩 접종하고 배지, 온도, pH, 소나무재선충 접종밀도, 영양조건이 균사의 생장에 미치는 영향을 측정하였다. 그 결과 전체적으로 *A. conoides*의 생장이 가장 빨랐으며(13.9 mm/day, PDA) *A. dactyloides*가 가장 느렸다(3 mm/day, PDA). 3가지 균의 생장은 PDA배지, 25°C, pH 4.5의 조건에서 가장 양호하였다. *A. conoides* 균과 *A. oligospora* 균은 500마리의 재선충 접종으로 생장이 촉진됐으나, 10,000마리 접종으로는 느려졌다. *A. dactyloides*

는 산성에서 생장하지 않았으며 재선충이 많을수록 더 느렸다. *A. conoides*와 *A. oligospora*의 선충포획기관은 균사보다 굵은 고리들의 망상 구조로서 선충 존재시만 형성되었으나, *A. dactyloides*의 포획기관은 단일한 원모양으로 선충이 없어도 형성되었다. *A. conoides*가 *A. oligospora*보다 포획기관 형성이 빨랐으며, 재선충 포획 후 균사가 재선충 내부로 침입하여 작고 많은 침입구(infection bulb)를 만들고 선충을 소화하였다. 그러나 *A. dactyloides*는 포획기관의 수가 적었고 포획도 하지 못하였다. *A. conoides*의 재선충 감염율은 95%였고, *A. oligospora*의 감염율은 80%였다. 그리고 위 두 균의 조합접종에 의한 선충감염율은 92%였다. 그러나 *A. dactyloides*는 오히려 재선충의 밀도를 증가시켰다. *A. conoides* 균은 빠른 생장률과 초기 포획으로, *A. oligospora*는 균밀도를 증가시켜서 재선충 감염율을 높였다. 결론적으로 *A. conoides*균은 균사생장률과 재선충감염율이 높으므로 소나무재선충의 생물학적 방제에 이용될 수 있을 것이라 생각한다.

감사의 글

이 연구는 산림청의 ‘산림과학기술개발사업(과제번호 S110707S0501101)’과 2007년도 충북대학교 학술연구비 지원에 의한 것입니다. 이 연구를 위한 재선충과 잣빛곰팡이에 대하여 도움을 주신 국립산림과학원의 한혜림 박사님과 남부산림연구소의 문일성 박사님, 충북대 식물의학과 물리큐트연구실 여러분께 감사드립니다.

참고문헌

국립산림과학원. 2006. 소나무재선충병. 소나무재선충과 솔수염하늘소. 산림청, 산림과학속보. 06-13. p. 24.
 국립산림과학원. 2007. 잣나무림에서의 소나무재선충병 피해특성 및 방제전략. 산림청, 산림과학속보. 07-01. p. 12.
 균류생물학번역위원회. 2006. 균류생물학 (Fungal biology by J. Deacon). 월드사이언스. 서울. pp. 358-363.
 김동근, 배수곤, 신용습. 2001. 서식환경에 따른 선충잡이 곰팡이의 종류와 분포. 한국균학회지 29:123-126.
 박용근. 1982. *Arthrobotrys conoides*의 선충포획기작에 관한 연구. 고려대학교.
 박현철. 1999. 뿌리혹 선충에 대한 선충포식성 곰팡이의 생물학적 방제효과 검증, 밀양대학교, 농지연보 3:57-60.
 박희문. 2005. 기초균류학. 4판. 월드사이언스. pp. 427-431.
 서울대학교. 2005. 주사전자현미경의 원리 및 생물학적 응용, 주사전자현미경의 워크숍.
 최광식, 최원일, 신상철, 정영진, 이상길, 김철수. 2007. 신 산림해충도감. 국립산림과학원 연구신서 제 25호. 서울. p. 458.
 Barron, G. L. 1977. The nematode trapping fungi. Canadian Biological Publication Guelph. Ontario, Canada. p. 140.
 Barron, G. L. 1981. Parasites and predators of microscopic animals. pp. 167-199. In G. T. Cole and B. Kendrick, Eds. Biology of Conidial Fungi. vol. 2. Academic Press, New York.
 Barron, G. L. 2004. Fungal parasites and predators of rotifer, nematodes and other invertebrates. pp. 435-450. In G. M.

Mueller, G. F. Bills and M. S. Foster. eds. Biodiversity of Fungi Inventory and Monitoring Methods. Elsevier, A. P. Amsterdam.
 Borrebaeck, C. A. K., Matiasson, B. and Nordbring-Hertz, B. 1985. A fungal lectin and its apparent receptors on a nematode surface. FEMS Microbiology Letters 27:35-39.
 Chen, T.-H. 2001. Heterotrimeric G-protein and signal transduction in the nematode trapping fungus *Arthrobotrys dactyloides*. Planta 212:858-863.
 Cooke, R. C. and Godfrey, B. E. S. 1964. A key to the nematode destroying fungi. Trans. Brit. Mycol. Soc. 47:61-74.
 Couch, J. N. 1937 The formation and operation of the traps in the nematode catching fungus, *Dactylella bembicodes*, Drechsler, Jour. Elisha Mitchell Sci. Soc. 53:301-309.
 Duddington, C. L. 1956. The predaceous fungi : Zoopagales and Moniliales. Biol. Rev. 31:152-193.
 Duddington, C. L. 1954. Nematode destroying fungi in agricultural soil. Nature 168:38-39.
 Estey, R. H. and Olthof, H. A. 1965. The occurrence of nematophagous fungi in Quebec. Phytoprotection 46:14-17.
 Gray, N. F. 1983. Ecology of nematophagous fungi. pp. 501-509.
 Higgins, M. L. and Pramer, D. 1967. Fungal Morphogenesis: Ring formation and closure by *Arthrobotrys dactyloides*. Science 155(3760):345-346.
 Kobayasi, T. 1975. The pinewood nematode, fungi and their vector pine sawyer. Forest Pests 24:199-202.
 Kumar, D. and Singh, K. P. 2005. Effect of Fertilizers and Neem Cake Amendment in soil on spore germination of *Arthrobotrys dactyloides*. Mycobiology 33:194-195.
 Mamiya, Y. 1982. Ecology and pathology of the pinewood nematode. For. Pests 183-223.
 Mamiya, Y. and Enda, N. 1972. Transmission of *Bursaphelenchus lignicolus* N. sp by *Monochamus alternatus*. Nematologica 18:159-162.
 Migunova, V. D. and Byzov, B. A. 2005. Determinant of trophic modes of the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora* interacting with bacterivorous nematode *Caenorhabditis elegans*. Pedobiologia 49:101-108.
 Nansen, P., Gronvold, J., Henriksen, S. A. and Wolstrup, J. 1988. Interactions between the predacious fungus *Arthrobotrys oligospora* and third-stage larvae of a series of animal parasitic nematodes. Vet. Parasitol. 26:329-337.
 Nordbring-Hertz, B. 1973. Peptide-induced morphogenesis in the nematode trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. Physiol. Plant 29:223-233.
 Nordbring-Hertz, B. 1978 Attraction of nematodes to living mycelium of nematophagous fungi. pp. 89-93.
 Persson, Y. and Beath, E. 1992. Quantification of mycoparasitism by the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora* on *Rhizoctonia solani* and the influence of nutrient levels. FEMS Microbiology Ecology 101:11-16.
 Singh, R. K., Kumar, N. and Singh, K. P. 2005. Morphological variations in conidia of *Arthrobotrys oligospora* on different media. Mycobiology 33:118-120
 Tunlid, A., Jansson, H. B. and Nordbring-Hertz, B. 1992. Fungal attachment to nematodes. Mycol. Res. 96:401-412.
 Veenhuis, M., Nordbring-Hertz, B. and Harder, W. 1985. An ultrastructural study of cell-cell interactions in capture organs of the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*. FEMS Microbiology Letters 30:93-98.