

Nematode에 寄生하는 真菌의 分離

유 관 희 · 최 영 희 · 이 형 환

建國大學校 生物學科 分子生物學教室

Isolation of Nematode Destroying Fungi

Kwan-Hi Yoo, Young-Hi Choi and Hyung-Hoan Lee

Department of Biology, Kon Kuk University, Seoul 133, Korea

Abstract:: Nematode destroying-fungi from ginseng field were isolated and then identified on 2% wateragar and malt extract agar media.

1. Six strains of *Arthrobotrys* sp. and three strains of *Harposporium* sp. were isolated and identified. 2. *Arthrobotrys* sp. formed trapping apparatus when they were cultured with Nematode and appeared to be destroying fungi. 3. *Harposporium* sp. appeared to be endoparasitic fungi. 4. Both *Arthrobotrys* sp. and *Harposporium* sp. were grown well on nutrient agar and malt extract agar.

緒 論

化學殺蟲劑의 使用은 農林害蟲에 많은 抵抗性을 가져왔고, 또한 環境汚染의 주요한 要因이 되었기 때문에 害蟲의 防除에 새로운 方法의 開發을 考慮해야 할 必要性을 느끼고 있었으나(Summers *et al.*, 1975) 微生物殺蟲劑(microbial pesticides)의 使用이 오늘날 가장 유망한 生物學的 防除法으로 考慮되고 있다. 微生物殺蟲劑로는 昆蟲바이러스인 Baculovirus가 利用이되고 있으며(Summers *et al.*, 1975; Lee and Miller 1979; Lee *et al.*, 1980) 그 외에 박테리아의 toxin이 利用되고 있고(De Barjac, H. and A. Burgerjon, and A. Bonnefoi, 1966), 真菌類 등의 利用도 많이 報告되어 있다.(Bell and Hamalle, 1980)

Fresenius(1852)가 Nematode(線蟲)에 寄生하는 真菌 *Arthrobotrys*를 1世紀 前에 發見한 이래 많은 研究報告가 나왔다. Drechsler (1934, 1935a, 1941, 1975)는 이 真菌에 대한 分類의 基礎를 세웠고, 또한 이 真菌이 포식균(Predatory Fungi)임을 밝혔으며, Muller (1958)는 *Arthrobotrys aligospora*가 끈끈한 網으로 線蟲을 捕獲하는 것을 報告한 바 있으며, Duddington (1962)과 Barron(1975a)도 捕食真菌에 의해서 線蟲類

의 구제可能性을 암시하였다.

우리나라의 人蔘栽培밭에 線蟲의 寄生이 심하여 人蔘栽培에 많은 損失을 가져오고 있기 때문에 이 線蟲類의 구제방법으로 새로운 生物學的防除法의 必要性이 요구되어 본 研究에서는 線蟲에 寄生하는 真菌類를 分離同定하였다.

實驗材料 및 方法

1. 實驗用 線蟲類와 真菌의 分離

本 實驗에 使用된 線蟲類와 真菌은 경기도 김포군 김포읍 통리 人蔘밭 土壤을 무작위로 1980년 10월 1일에 採取하여 다음과 같이 分離하여 使用하였다.

1) 真菌의 分離

① 2%의 water agar 평판매지 10개에 線蟲培養液을 2방울씩을 떨어뜨린 後 人蔘밭 土壤을 접시당 1g을 뿌린 후 27±0.5°C 배양기에서 7~10일간 培養하였다.

線蟲을 捕獲한 真菌에서 형성된 分生胞子를 微細針을 利用하여 分離해 내어 malt extract agar 培地에 移植하여 순수 分離하였으며 分離된 菌株을 K₁, K₂, K₃, K₄, K₅, K₆로 命名하였다.

② Barron(1969)의 方法을 利用하여 3菌株을 分離하여 K₇, K₈, K₉로 命名하였다.

2) 線蟲의 分離 및 培養

Guima and Cooke(1972)의 Baermann Funnel 方法을 利用하여 土壤으로부터 線蟲을 分離하였으며 分離된 線蟲은 Nigon's media(Dougherty, 1960)에 옮겨 실온에서 培養하였다.(Dougherty, 1960)

2. Trap 형성 관찰

A, B, C, D, 4개의 멸균된 사례를 준비한 후 접종 1日前 A와 B에는 2% water agar를 넣고, C와 D에는 malt extract agar를 채웠다.

그리고 A와 C에는 線蟲을 培養하고 B와 D에는 線蟲을 넣지 않은 상태에서 *Arthrobotrys* sp.를 접종하여 培養器에서 27+0.5°C로 배양하면서 3일이 지난후부터 매일 광학현미경으로 관찰하였으며 현미경 사진을 준비하였다.

3. 眞菌 同定 方法

순수 배양된 眞菌의 群落 형태를 조사하였고, conidia 및 conidiophore의 형태는 슬라이드에 培養하여 광학현미경 下에서 형태와 크기를 관찰 측정하였다.

*Arthrobotrys*는 Drechsler(1973)의 方法을 利用하여 同定하였으며, *Harposporium*도 Drechsler(1941)의 方法을 利用하였다.

4. 培地

1) 2% water agar

distilled water 1,000ml agar 20g넣고 15 Lb, 121°C에서 멸균하여 使用하였다.

2) malt extract agar는 malt extract 분말 25g와 agar 15g을 증류수 1,000ml에 혼합한 後 앞에서와 같이 멸균하여 使用하였다.

3) Nigon's media는 MgSO₄ 0.75, K₂HPO₄ 0.75, NaCl 2.75, KNO₃ 3.0, peptone 2.5, lecithin 1.0, agar 15g을 증류수 1,000cc에 넣은 후 앞에서와 같이 멸균하여 使用하였다.

結 果

1. Trap 형성의 관찰

2%의 한천배지와 malt extract agar배지에 線蟲을 培養하면서 眞菌 *Arthrobotrys*를 接種하여 觀察한 結果 Fig. 1과 Fig. 2에서는 둥근 모양의 덫(trap)이 형성되지 않았으나 Fig. 3과 Fig. 4에서는 線蟲을 捕獲하기 위한 둥근 모양의 덫을 형성하는 것을 觀察하였다.

2. 分離한 眞菌의 形態

nutrient agar와 malt extract agar에서 生長한 K₁, K₂, K₃, K₄, K₅, K₆ 菌株의 形態의 特徵은 群集의 모양이 흰솜 또는 양털이 수북히 쌓인 모양을 나타내며, 균사에는 격막이 있고, 무색이며, 불규칙적으로 분지되어있으며, 直徑이 2.0~2.5μ의 크기를 나타내고 있으며 氣菌絲를 形成하였다. conidiophore는 200~500μ의 길이로 하단부는 直徑이 4~6μ이고, substratum에서 직립해 있었다.(Fig. 5).

conidia는 장타원형으로 크기는 길이가 20~23μ, 폭이 10~14.5μ이었고, 횡단으로 격벽이 있어 두 세포로 구성되며 선단 세포폭이 약간 길었다(Fig. 6).

색깔은 무색 또는 담오렌지색을 나타냈으며, 이상의 결과로 Dreschler가 發見한 *Arthrobotrys* sp.로 同定하였다.

Table I. Growth rate of *Arthrobotrys* sp. on N.A., M.E.A. and C.D.A.

Media	strain	days							
		1	2	3	4	5	6	7	
N.A.	K ₁	—	0.9	2.0	3.0	4.0	4.8	5.0	
	K ₂	0.3	1.0	2.3	2.9	3.3	4.0	4.0	
	K ₃	0.2	1.1	2.0	2.6	3.5	3.9	4.0	
M.E.A.	K ₁	0.1	0.6	0.7	2.6	2.6	3.5	4.1	
	K ₂	0.1	0.7	1.3	2.1	2.8	3.9	4.5	
	K ₃	0.1	0.7	1.2	2.1	2.7	3.8	4.5	
C.D.A	K ₁	0.15	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	
	K ₂	0.1	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	
	K ₃	0.15	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	

N.A.; nutrient agar, M.E.A.; malt extract agar. C.D.A.; Czapeck's dox agar.

The numbers are cultured-colony sizes measured in cm.

Fig. 7과 Fig. 8의 그림은 K₇, K₈, K₉ 3菌株의線蟲에寄生한 사진이다. 3菌株들은 평판배지상에 넓게 퍼지지 않았으며 축생으로形成되고 conidiophore는線蟲의 여러부분의 체벽을 뚫고 나왔으며(Fig. 7), 이곳에서 작은 구형 또는 subspherical phialide를 하나 또는 여러개形成된 것을 볼 수 있었다 conidia는 phialide에서形成되었으며, Hyaline이었고, 단세포이었다. 모양은 고리모양으로 구부러져 초생달 形態를 나타내었다(Fig. 8).

이상의 形態의 特徵을 볼때 Dreschler가 發見한 *Harposporium* sp.가 아닌가 생각된다.

3. *Arthrobotrys* sp.의 성장속도

分離해낸 *Arthrobotrys*의 菌株에대한 세가지 培地에서의 성장율은 Table I과 같다.

그 結果 K₁, K₂, K₃의 세 菌株들은 nutrient agar와 malt extract agar에서 성장이 잘됐고, Czapek's dox agar 培地에서는 성장이 매우 저조했다.

考 察

線蟲은 土壤안에 1m²당 2천만 마리 이상이棲息하고 있으며, 경제물인 人蔘이나 그 이외에 食糧資源으로利用되는 감자, 토마토, 고추등 여러 作物에 피해를 주고 있으므로 線蟲을 驅除하는 研究는 중요한 의미를 갖는다.

본 研究에서는 線蟲에 寄生하여 致死시키는 *Harposporium* sp.와 *Arthrobotrys* sp.를 分離하여 寄生性を 調査하였다.

分離해낸 *Harposporium* sp.는 Dreschler(1941)가 發見한 것과 비슷하고, Soprunov(1958)는 이 菌株를 endoparasite group에 속한다고 報告한 바 있다.

Arthrobotrys sp.는 Dreschler(1937)가 發見한 것과 비슷하였으며, Soprunov(1958)은 이 菌株를 predatory group라고 報告했다.

線蟲이 자라는 培地에서 *Arthrobotrys* sp.는 trapping 기구를 形成하였으나, 線蟲이 存在하지 않는 곳에서는 *Arthrobotrys* sp.가 trapping기구를 形成하지 않았다.

이 점은 印東弘玄(1942)이 *Arthrobotrys*는 線蟲이 存在할 때에 捕獲기관을 形成하고 存在하지 않을 때 形成되지 않는다는 結果와 유사하며, 또 이와 유사한 結果를 羅 瑑俊(1980)은 소나무 材線蟲의 捕捉菌을 觀察 報告하였다.

本 실험의 觀察에서는 線蟲이 있을 때는 *Arthrobotrys*가 捕獲기관을 形成하여 線蟲을 捕獲하는 것을 觀

察할 수 있었다.(Figs. 3, 4).

그러나 羅는 P.D.A. 培地에서 純粹培養 되고 있는 *Arthrobotrys* sp.의 균중에 材線蟲을 넣을 경우 線蟲을 捕捉하지 않는다는 상이한 結果를 報告하였다.

本 실험에서는 觀察도중 trapping기구가 形成된 곳에 線蟲들이 觀察되었으며 菌絲가 발달되지 않은 곳에서는 線蟲이 觀察되지 않은 점은 線蟲이 있는 곳에서 眞菌이 捕獲기관을 形成하는 것인지 아니면 眞菌 자체에서 線蟲 유인물질을 分泌하는 것인지 좀더 生理學的인 면에서 면밀히 研究되어야 할 것 같다.

Arthrobotrys sp.의 培地別 生長관계에서의 실험에서 nutrient agar와 malt extract agar에서 純粹培養이 잘 되었으나, Czapek's dox agar에서 培養이 잘 되지 않은 점으로 보아 天然培地에서 生長이 잘 되는 것으로 추측되며, 이런 점으로 미루어 볼때 대량생산인 경우 培地의 경제성으로 보아 좀 더 값싸고 구하기 쉬운 培地에 對한 研究도 先決되어야 될 것으로 생각된다.

결론적으로 우리나라에서도 線蟲의 害는 극히 클 것으로 추정되나 상세한 研究는 거의 이루어져 있지 않으며, 특히 作物과 線蟲, 더우기 線蟲을 捕獲하는 사상균과의 相互關係를 調査하여 응용방법을 研究하는 것은 사람에게 대한 無害성과 그 效果의 永續性を 고려할 때 토마토의 害蟲을 거미에의해서 防除하듯이 Nematode-destroying fungi를 biological control 方法으로 研究할 價値가 크다고 생각된다.

要 約

1) 人蔘밭 土壤중에서 nematode-destroying fungi에 속하는 6균주의 *Arthrobotrys* sp.와 세 菌株의 *Harposporium* sp.를 分離, 同定하였다.

2) *Arthrobotrys* sp.는 線蟲이 存在하는 곳에서는 捕獲기관을 形成하였으나, 線蟲이 없는 곳에서는 捕獲기관을 形成하지 않았다.

3) *Arthrobotrys* sp.는 nutrient agar와 malt extract agar에서 매우 잘 生長하였다.

References

- Barron, G.L., (1969): Isolation and maintenance of endoparasitic nematophagous Hypomycetes. *Canadian J. of Bot.* 47: 1899~1901.
- Barron, G.L., (1975a): Detachable adhesive knob in *Dactylaria* trans. *Brit. Mycol. Soc.* 65: 311~312.

- Bell, J.V., and R.J. Hamalle. (1980): *Heliothis zea* larval motility time from topical and *per os* dosages of *Nomurae rileyi* conidia. *J. Invert. Path.* 35: 182~185.
- DeBarjac, H., and A. Burgerjon, and A. Bonnefoi. (1966): The production of heat-stable toxin by nine peratyper of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invert. Path.* 8: 536~538.
- Dougherty, E. (1960): Cultivation of *Aschelminthes*, especially *Rhabditis nematodes*. In: *Nematology*. (J. N. Sasser and W.R. Jenkins. Eds.) University of North Carolina Press, Chapel Hill.
- Drechsler, C., (1934). Organs of capture in some fungi preying on nematodes. *Mycologia* 26: 135~144.
- Drechsler, C., (1935a): A new mucedinaceous fungus capturing and consuming *Amoeba verrucosa*. *Mycologia* 27: 216~223.
- Drechsler, C., (1937): Some hyphomycetes that prey on free living terricolous nematodes. *Mycologia* 29: 447~552.
- Drechsler, C., (1941): Some hyphomycetes parasitic free-living terricolous nematodes. *Phytogathology* 31: 773~801.
- Drechsler, C., (1975): A nematode-destroying hyphomycete forming parallel multiseptate hayline conidia in circular arrangements. *Amer. J. Bot.* 62: 1073~1077.
- Duddington, C.L., (1962): Predaceous fungi and the control of eelworms. In: *Viewpoints in Biology*. vol. 1 (C.L. Duddington and J.D. Carthy, Eds.) Butterworths. London.
- Fresenius, G., (1852): *Beiträge zur Mykologie*. Heft. 1-2. pp. 1~80.
- Guima, A.Y., and R.C. Cooke. (1972): Some endozoaic parasites on soil nematodes. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 59: 213~218.
- Lee, H.H. and L.K. Miller. (1978): Isolation of genotypic variants of *Autographa californica* NPV. *J. Virol* 27: 754~767.
- Muller, H.G., (1958): The constricting ring mechanism of two predacious Hypomycetes. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 41: 341~364.
- Soprunov, F.F., (1958): Predaceous Hypomycetes and their application in the control of pathogenic nematodes. *Acad. Sci. Turkmen. S.S.R.* Ashabed. p. 1~365. English Translation. 1968. Israel Program for Scientific translations.
- Sumers, M., R. Engler, L.A. Falcon and P. Vail (1975): *Baculoviruses for insect pest control: Safety consideration*. Ed. by Asn.
- 나용준 (1980): 소나무 科線蟲의 捕捉菌 *Kor. J. Mycol.* 8: 73~74.
- 이형환, 이경로, 민은숙, 정혜경, 엄미옥 (1980): 미생 물살충제인 곤충바이러스의 분리와 전자현미경적 연구 *K.J. Virol.* 10: 27~32.
- 印東弘玄 (1942): 植研 18: 645.

(Received October 18, 1981)

Explanation of the Plates

1. Morphology of *Arthrobotrys* sp. on 2% water agar without Nematode. C; indicates conidia, CP: conidiophore, H: hypha. ($\times 10$)
2. Morphology of *Arthrobotrys* sp. on malt extract agar without Nematode. ($\times 10$).
3. Morphology of *Arthrobotrys* sp. on 2% water agar with Nematode. T: indicates trapping apparatus for nematode, N: Nematode ($\times 10$).
4. Morphology of *Arthrobotrys* sp. on malt extract agar with Nematode ($\times 10$).
5. Erected conidiophore on substratum of *Arthrobotrys* sp. on 2% water agar. CP: conidiophore. ($\times 10$)
6. Magnified conidia of *Arthrobotrys* sp. on malt extract agar. C: conidia, S: septum, H: hypha ($\times 40$)
7. Morphology of *Harposporium* sp. on 2% water agar with Nematode. N: Nematode. C: conidia ($\times 10$).
8. Magnified conidia of *Harposporium* sp. on 2% water agar with Nematode. MC: magnified conidia, ($\times 40$).

