

 (19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0081371 (43) 공개일자 2016년07월08일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>A01N 65/20</i> (2009.01) (21) 출원번호 10-2014-0195122 (22) 출원일자 2014년12월31일 심사청구일자 2014년12월31일	(71) 출원인 충남대학교산학협력단 대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교) 주식회사 아미텍 충청남도 금산군 추부면 추풍로 241 (㈜아미텍) (72) 발명자 윤민호 대전광역시 서구 계룡로583번길 12 리가아파트 101동 204호 류효승 대전광역시 서구 계룡로583번길 12 리가아파트 101동 305호 (74) 대리인 김원준

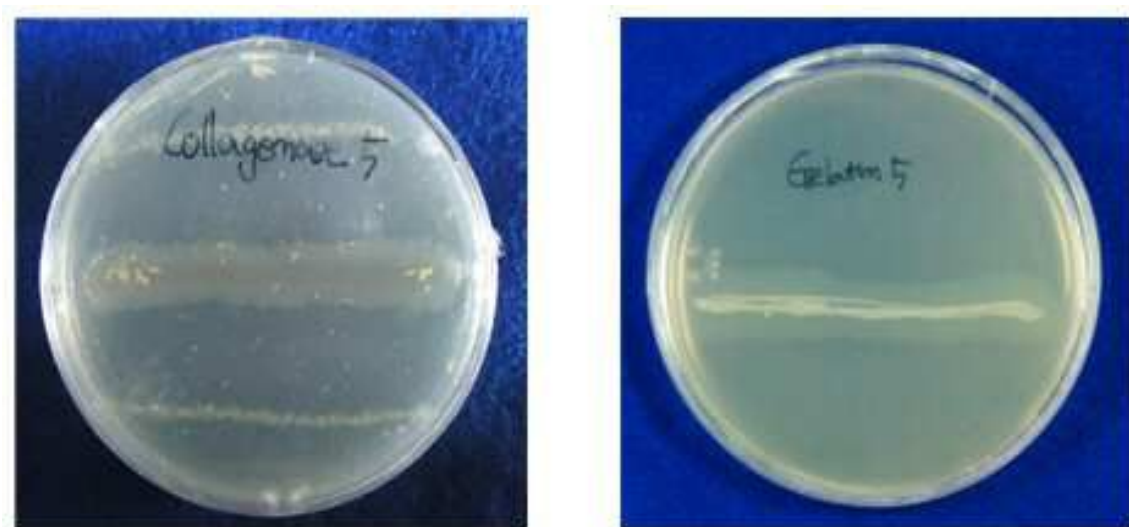
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 네마황 추출물을 함유하는 선충방제용 조성물

(57) 요약

본 발명은 방제효과가 탁월하며, 친환경적인 선충 방제용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 물 및 C1~C3의 저급 알콜로 이루어진 용매로부터 선택된 하나 또는 둘 이상의 혼합물을 사용하여 추출한 네마황 추출물을 유효 성분으로 함유하는 선충 방제용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014-1405-15

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 2014 산학공동기술개발과제(LINC)

연구과제명 천연 상선휘물질 탐색 및 선충방제제 개발

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교 LINC사업단

연구기간 2014.07.01 ~ 2014.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

물 및 C1~C3의 저급 알콜로 이루어진 용매로부터 선택된 하나 또는 둘 이상의 혼합물을 사용하여 추출한 네마황 추출물을 유효성분으로 함유하는 선충 방제용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 추출물은 건조된 네마황을 사용하여 추출한 것을 특징으로 하는 선충 방제용 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

콜라겐과 젤라틴 분해능이 있는 미생물 또는 그 배양액을 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 선충 방제용 조성물.

청구항 4

제 3 항에 있어서,

상기 미생물은 *Bacillus subtilis*인 것을 특징으로 하는 선충 방제용 조성물.

청구항 5

제 3 항에 있어서,

님오일을 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 선충 방제용 조성물

청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 선충은 뿌리혹 선충인 것을 특징으로 하는 선충 방제용 조성물.

청구항 7

제 6 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 뿌리혹 선충은 고구마뿌리혹 선충인 것을 특징으로 하는 선충 방제용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 방제효과가 탁월하며, 친환경적인 선충 방제용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 토양 해충 중 선충류는 연작 장애의 중요한 요인으로 인식되고 있으며, 그 중에서도 뿌리에 기생하여 혹을 형성하는 뿌리혹선충류는 시설재배 채소류 및 화훼류에서 가장 피해가 큰 해충의 하나이다. 우리나라에서 주로 발견되는 뿌리혹선충은 당근뿌리혹선충, 고구마뿌리혹선충, 자바뿌리혹선충, 땅콩뿌리혹선충 등이며, 연작을 통해 시설재배지에서 재배되는 과채류 생산에서 가장 방제가 어렵고 피해가 큰 해충이다.

[0003] 뿌리혹선충은 알에서 부화된 제2령 유충이 작물의 뿌리 성장점 부근으로 침입하고 식물체 내에서 3회 탈피하여 성충이 되며 제3령, 제4령충은 구침이 없어졌다가 성충시에 다시 나타나는 특징을 가지고 있다. 뿌리혹선충은 식물의 뿌리 내에서 양분을 흡수하면서 성장하는데 이 과정에서 선충이 분비하는 호르몬의 작용으로 기생부위의 식물세포 수가 증가되고 비대현상이 일어나 작물의 뿌리가 혹 모양으로 변하게 된다. 선충의 뿌리내 기생은 뿌리의 생육을 억제하게 되며 병원성 미생물의 복합감염을 촉진하여, 생육이 불량해지고 과실의 수량도 감소할 뿐 아니라 결국에는 식물의 고사를 유발한다.

[0004] 토양내 선충의 서식 밀도가 낮은 경우에는 식물기생성 토양선충에 의한 피해가 경미하지만, 작물이 성장하면서 재배기간이 경과함에 따라 선충의 서식 밀도가 높아지고, 특히 연작을 하거나 토양환경을 인위적으로 바꾸었을 때 기생 밀도가 급격히 증가하여 기주식물에 치명적인 손상을 입힌다. 식물기생성선충은 한번 감염된 지역에서는 완전방제가 어렵고, 선충피해를 입은 작물은 대부분 다른 병해충에 감염되어 품질과 생산성을 떨어뜨리므로 효과적인 방제가 우선되어야 한다.

[0005] 이러한 식물기생성 토양선충에 의한 피해를 경감시키고자, 토양선충을 방제하기 위하여 화학적 방법, 재배적 방법, 물리적 방법 및 생물학적 방법 등 다양한 방법들이 시도되고 있다.

[0006] 재배적 방제 방법으로는 일정기간 동안 경작을 하지 않는 휴경, 경작지를 논과 밭으로 번갈아 이용하는 침수처리법, 생태 특성이 다른 여러 작물을 돌려 짓는 윤작, 재식시기의 조정, 저항성 품종의 재식, 유인식물을 재식하는 방법 등이 적용될 수 있다. 그러나, 이러한 방법들은 토지의 이용 효율이 낮고, 작목 선택에 제한이 있어 실질적으로 적용하기에는 치러야 하는 경제적인 대가가 너무 크다. 게다가 재배적 방제 방법은 피해를 완화하고 경감시키는 정도에 불과하여 근본적으로 토양선충을 방제할 수 있는 것은 아니다.

[0007] 물리적인 방제 방법으로는 태양열이나 전열선, 자외선 또는 초음파를 가하여 경작지를 살균하는 열탕소독법, 전열가온법, 자외선 조사법 및 초음파 방제법이 있다. 물리적인 방제 방법은 모두 작물을 경작하지 않는 시기를 이용하여 제한적으로 시도할 수 밖에 없으며, 열탕소독법은 햇볕이 강한 하절기에만 적용이 가능하고, 다른 방제법들은 시설 및 유지비용이 과다하게 소요되는 문제점이 있다. 또한, 토양선충의 도피능력을 감안하면 물리적인 방제 방법은 그 효율성이 미미하다.

[0008] 화학적 방제 방법은 약제를 사용하여 방제하는 것으로, 대개의 경우 아세틸콜린에스테라제의 활성을 억제하는 유기인산계열의 화합물에 의해 신경계의 신경전달물질의 일종인 아세틸콜린의 양을 증가시키는 방식으로 살충작용을 한다. 그러나 이러한 유기인산계 살충제는 대부분 유해물질로 규정되어 있어 사용에 제약이 있다. 선충탄입제, 에토프입제(모캡), 싸이론훈증제, 아조포유제(호스타치온), 브롬화메틸·이브롬화에틸렌·디클로로프로펜 등과 같은 화학적 약제를 사용하는 방법은 약제의 가격이 비교적 고가일 뿐만 아니라, 초기 밀도를 감소시킨 이후에는 밀도가 다시 증가하는 것으로 보고되어 있다. 더구나 최근 Aldicarb, Fenamiphos, Methyl bromide, DBCP, EDB 등이 인체 및 자연환경에 유해성이 있다고 밝혀지면서 살선충제 농약 등록이 취소된 바 있다.

[0009] 화학 농약의 지속적 사용은 병해충의 저항성 문제를 유발하며, 토양선충뿐만 아니라 토양내에서 작물과 공생관계 등을 통해 작물의 성장에 유익하거나 생태계를 유지하는 곤충이나 미생물을 사멸시키고, 염류가 집적되는 등 토양오염과 수질오염을 발생시켜 경작 자체를 곤란하게 한다. 또한 수확물에 유해한 농약이 잔류하여 소비자의 건강을 위협하거나 식품으로서의 가치가 상실되어 수확물을 출하하지 못하고 폐기하게 되는 피해가 빈번하게 발생하고 있는 실정이다.

[0010] 생물학적 방제법은 포식성선충이나 곤충, 세균을 이용한 방법으로 농약살포시 야기되는 약해문제, 토양오염 및 농약잔류의 문제가 없는 장점이 있다. 그러나 이러한 생물적 방제제는 화학제제에 비하여 방제효과가 매우 낮으

며, 특히 미생물을 이용한 방제효과는 실내검정에서는 우수한 결과를 나타내었으나 토양 적응성 문제로 인하여 방제가가 포트나 포장검정에서 감소하는 경향을 보인다. 이러한 문제점들로 인하여 아직까지는 여러 가지 단점에도 불구하고 화학농약을 가장 선호하는 경향이 있다.

[0011] 이러한 문제를 해소하기 위해서는 방제효과가 탁월한 동시에 친환경적인 제품의 개발이 절실하나, 아직까지도 이에 대한 결과는 미진한 상태이다.

[0012] 네마황은 휴경지에 작목한 후 지상부를 갈아엎어 녹비로 사용하는 경관녹비작물의 하나로, 휴경지에 아름다운 경관을 유지할 수 있도록 하는 한편, 장기간 경장 시 여러 종의 선충에 높은 억제효과가 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 네마황 추출물을 활용한 선충 방제제에 대해서는 아직 보고되지 않은 상태이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명은 종래의 화학농약을 대체할 수 있는 효과적인 친환경 선충 방제제 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0014] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 물 및 C1~C3의 저급 알콜로 이루어진 용매로부터 선택된 하나 또는 둘 이상의 혼합물을 사용하여 추출한 네마황 추출물을 유효성분으로 함유하는 선충 방제용 조성물에 관한 것이다.

[0015] 네마황은 뿌리에서 줄기까지 어느 부분을 사용하여도 좋으며, 수확 후 그대로 또는 건조된 상태의 것을 잘게 자르거나 분말 상태로 하여 추출할 수 있다. 다만 네마황의 보관 및 유통 상의 편의 및 추출의 효율을 고려하면 건조된 상태의 것을 활용하는 것이 더 바람직하다. 하기 실시예에서는 80% 메탄올 추출물을 사용한 예만을 기재하였으나, 물, 메탄올, 에탄올, 프로판올로부터 이루어진 군으로부터 선택된 하나 또는 둘 이상의 용매의 혼합물을 사용하여 추출한 경우에도 유사한 방제 효과를 얻을 수 있었다. 상기 추출물의 제조 시 하기 실시예에서는 환류하여 추출한 것을 기재하였으나, 상온에서 침지하거나 가온하여 추출할 수 있음도 당연하다.

[0016] 본 발명의 조성물은 콜라겐과 젤라틴 분해능이 있는 미생물 또는 미생물 배양액을 추가로 함유할 수 있다. 콜라겐은 선충의 표피 구성성분이며, 젤라틴은 알집의 구성성분으로 이들에 대한 분해능이 있는 미생물은 선충에 대한 방제 작용을 한다. 네마황 조성물에 미생물 또는 배지를 혼합하여 사용하는 경우, 각각을 처리하는 것보다 모든 처리농도에서 상승작용을 나타내어 실제 포트에서 90% 이상의 우수한 방제효과를 나타내었다.

[0017] 상기 미생물로는 살선충 및 선충방제에 대한 효과가 알려져 있으며, 토양내에서 정착성이 우수하여 농업용 미생물제로 사용되고 있는 *Bacillus subtilis*균을 사용할 수 있다.

[0018] 또한 본 발명의 조성물은 님오일을 추가로 포함할 수 있다. 통상 미생물을 이용한 방제는 미생물의 토양 적응성 문제로 인하여 방제가가 실내검정에서보다 포트에서 감소하는 경향을 나타내지만, 님오일을 추가로 함유하는 조성물을 사용한 경우 포트에서도 99%의 방제율을 나타내어 네마황 추출물과 님오일은 그 자체의 방제효과와 더불어 미생물의 토양 적응성을 향상시키는 효과가 있는 것으로 사료된다.

[0019] 본 발명의 조성물은 농약보조제로서 제제화에 일반적으로 사용되는 담체, 부형제, 기타 보조제 등을 배합하여, 유제, 현탁제, 분제, 입제, 정제, 수화제, 수용제, 수액, 유동제, 과립 수화제, 에어로졸제, 페이스트제, 유탁제, 혼연제 등의 여러 형태로 제제할 수 있다. 이들 제제의 실제 사용 시에는, 그대로 사용하거나, 또는 물 등의 희석제로 소정 농도로 희석하여 사용할 수 있다. 본 발명의 화합물을 유효성분으로 함유하는 여러 제제, 또는 그 희석물의 시용은, 통상 일반적으로 행하고 있는 시용방법, 즉 살포, 수면시용, 상시용, 토양시용, 표면시용, 침지 등에 의해 행할 수 있다. 본 발명의 조성물은 적용되는 토양의 선충의 피해 정도, 작물의 형태, 제형, 적용방법 등에 따라 사용량을 적절히 결정할 수 있으나, 적용되는 조성물 중 네마황 추출물의 농도가 0.01 중량% 이상인 것이 바람직하다. 네마황 자체는 녹비작물로 토양이나 작물에 유해한 성분이 아니므로 과량을 사용하여도 유해한 효과를 나타내지는 않으나 경제성을 고려하면 0.5 중량% 이하의 농도로 사용하는 것이 바람직하다.

발명의 효과

- [0020] 이상과 같이 본 발명의 조성물은 인체에 독성이 없고 토양을 황폐화하지 않으면서도 선충에 대한 방제효과가 우수하여 친환경적인 선충방제제로 유용하게 이용할 수 있다. 또한 본 발명의 조성물은 조성물 중 함유된 미생물의 토양 적응성을 향상시켜 실제 포트에서 화학방제제에 버금가는 방제효과를 나타낼 수 있다.
- [0021] 본 발명의 조성물에 의하면 연작이 가능하여 휴경에 의한 경작효율성의 저하 문제를 해소할 수 있으므로, 특히 선충의 피해가 큰 과채류의 생산성 향상에 크게 기여할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 분리균 CP5의 단백질 분해능을 보여주는 배양 사진.
 도 2는 단백질 분해균 CP5에 대한 16s rDNA의 서열.
 도 3은 단백질 분해균 CP5의 상동성 분석에 의한 계통표.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 이하 첨부된 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.

[0024] 실시예

[0025] 실시예 1 : 뿌리혹 선충의 분리 및 동정

- [0026] 경북 성주군 선남면 참외농가와, 충남 공주군 우성면 토마토 농가 중 뿌리혹 선충 피해가 극심한 하우스 10개동에서 각 4주씩 기주식물과 토양을 직경 20cm, 높이 30cm인 포트에 옮겨와서 실험에 이용하였다. 선충 분리는 Bearmann의 깔때기법(Viglierchio *et al.*, J. Nematol. 15(3): 438-444, 1983)을 이용하였다. 보다 구체적으로, 잘게 자른 기주식물 및 토양 시료를 고무튜브를 연결한 깔대기 위에 놓은 후 물을 가득 채웠다. 24시간 후 고무튜브 밑에 모인 선충을 확인하고 집계를 열어 튜브를 분리하였다.
- [0027] 선충의 동정을 위하여 분리된 현탁액 중 2령 유충을 광학현미경 $\times 160$, $\times 250$, $\times 400$ 하에서 관찰하였다. 2령 유충의 길이는 $350 \sim 400\mu\text{m}$, 꼬리부분의 길이는 $40 \sim 50\mu\text{m}$, 구침의 길이는 $10 \sim 11\mu\text{m}$ 였다. 형태적으로는 머리부분은 넓고, 몸통과 구획되어 있지 않으며, 꼬리는 가늘어지면서 뾰족한 구조를 가지고 있었다. 이러한 형태적인 관찰을 통하여 분리된 선충은 *Melodogyne incognita* 로 동정되었다.

[0028] 실시예 2 : 단백질 분해능을 갖는 균주의 분리, 배양 및 동정

- [0029] 전국 20지역으로부터 500여개의 근권토양 시료를 채집하여 nutrient skim milk agar(NSKA: nutrient broth 0.8%, agar 1.5%, skim milk 1%[Difco]) 배지 상에서 $10^{-3} \sim 10^{-5}$ 의 농도로 희석평판한 후 30°C incubator에서 24 시간 배양하여 halo zone이 생긴 균을 1차 선발하였다.
- [0030] 1차 선발된 균주를 사용하여 NSKA 배지에 희석을 갖고 30°C incubator에서 24hr 배양한 후 halozone 크기를 측정하는 것에 의해 단백질 분해능이 우수한 2차 균주 7종을 선발하였다.
- [0031] 2차 선발된 7종의 균주로부터 선충 표피 구성성분인 콜라겐과 알집의 구성성분인 젤라틴 분해능이 우수한 균을 선발하기 위해 NCA(nutrient collagen agar: nutrient broth 0.8%, agar 1.5%[Difco], collagen 1%[Sigma aldrich])와 NGA(nutrient gelatin agar: nutrient broth 0.8%, agar 1.5%[Difco], gelatin type B 1%[Sigma])을 이용하여 2차 선발과 같은 방식으로 3차 균주를 선발하였다. 하기 표 1은 7종의 균주의 단백질 분해능을 보여주는 결과이며, 도 2는 이 중 콜라겐(왼쪽) 및 젤라틴(오른쪽) 분해능이 우수한 CP5의 배양 사진

이다. 하기 표 1에서 halozone의 크기는 다음과 같다; + : <2mm, ++ : 2~3mm, +++ : 3~4mm, ++++ : 4<

표 1

Strains	Skim milk	Gelatin	Collagen
CP1	+	+	+
CP2	+	++	+
CP3	++	+++	+
CP4	++	++	++
CP5	++	+++	++++
CP6	+	++	+
CP7	+	++	++

[0032]

[0033]

상기 방법에 의해 최종적으로 선발된 CP5의 계통학적 위치를 확인하기 위하여 16S rDNA를 27F(서열번호 1 : 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')과 1492R(서열번호 2 : 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGC-3') 프라이머를 사용하여 PCR증폭하였다. PCR은 다음 조건은 다음과 같다; 94℃ 5분간 반응한 다음 94℃ 변성 30초, 55℃ 어닐링 30초, 72℃ 확장 1분을 35회 반복 후 72℃에서 7분간 최종 확장. 증폭 산물을 Qiagen PCR Purification Kit (Qiagen Inc)로 정제한 후 염기서열을 결정하고(892 bp), NCBI/GENEBANK의 Blast 프로그램을 이용하여 상동성 검색을 수행하였다. 상기 CP5의 16s rDNA 서열분석 결과(서열번호 3) CP5는 *Bacillus subtilis*와 99.9%의 상동성을 나타내어 *Bacillus subtilis*로 동정되었다. 도 2는 CP5의 16s rDNA의 서열이며, 도 3은 상동성 분석에 의한 계통표이다.

[0034]

실시예 3 : 네마황 추출물의 제조

[0035]

1) 열수 추출물의 제조

[0036]

충남 예산군 농업기술원에서 채취하고 건조하여 제조한 네마황 분말 50g을 20배의 물을 사용하여 24시간 열수추출한 후 동결건조하여 조추출물 7g을 얻었다.

[0037]

2) MeOH 추출물의 제조

[0038]

1)과 동일한 네마황 분말 50g을 20배의 80% MeOH(v/v)로 환류하며 24시간 추출한 후 40℃에서 감압농축하여 네마황 조추출물 5g을 얻었다.

[0039]

실시예 4 : 살선충 활성의 실내 검정

[0040]

1) 단백질 분해 균주의 살선충능 검정

[0041]

상기 실시예 2에서 선발한 CP5를 YMB(Yeast malt broth) 배지에서 30℃, pH 6, 진탕배양(회전수 150rpm) 조건으로 48hr 배양한 후 0.2μm syringe filter로 filtering하였다.

[0042]

실시예 1에서 분리한 선충을 96 well plate에 200마리씩 분주하고, 각 웰에 상기 배양 여액을 0.1%, 0.5%, 1%(v/v) 농도로 첨가하였다. 이후, 24hr, 48hr, 72hr, 96hr 쯤 각 웰에서의 선충의 수를 계수하여 살선충능을 검정하고 그 결과를 표 2에 기재하였다. 살선충률은 (치사 선충수 / 전체 선충수) × 100 (%) 로 계산하였다.

표 2

Treatment	%	살선충능 (%)			
		24hr	48hr	72hr	96hr
CP5	0	0	0	0	0
	0.1	21	26	32	34
	0.5	29	37	52	56
	1.0	31	37	53	57

[0043]

[0044]

표 2에서 배양여액 0.5% 와 1%를 첨가한 경우, 첨가 72시간 이후 50% 수준의 치사율을 보였으며 두 농도의 활성 간에는 유의한 수준의 차이가 없었다.

[0045]

내생포자를 형성하는 *Bacillus subtilis*균은 토양내에서 정착성이 우수하여 농업용 미생물제로서 사용되고 있는 대표적인 미생물로 살선충 및 선충방제에 대한 효과가 알려져있다. 따라서 선발균 *Bacillus subtilis* CP5는 배양액 0.5% 농도 수준에서 사용 시 선충방제 효과가 기대되었다.

[0046]

2) 네마황 추출물의 살선충능 검정

[0047]

실시에 3에서 제조한 네마황의 메탄올 조추출물을 70% MeOH(v/v)로 희석하여 1%(w/v)의 stock solution을 제조하였다.

[0048]

CP5의 배양 여액 대신 상기 stock solution을 멸균수로 희석하여 0.01%, 0.025%, 0.05%, 0.1%(w/v)로 처리한 것을 제외하고는 1)과 동일한 방법에 의해 살선충능을 검정하고 그 결과를 표 3에 기재하였다.

표 3

Treatment	%	살선충능 (%)			
		24hr	48hr	72hr	96hr
네마황 추출물	0	0	0	0	0
	0.01	13	15	18	19
	0.025	27	28	29	29
	0.05	76	79	79	80
	0.1	81	85	88	87

[0049]

[0050]

표 3으로부터 네마황 추출물 0.05%와 0.1% 농도로 첨가한 72시간 후, 79% 와 88%의 높은 치사율을 나타내어, 네마황 추출물의 살선충효과를 확인할 수 있었다.

[0051]

3) 단백질 분해 균주 및 네마황 추출물 혼합 처리의 살선충능 검정

[0052]

네마황 추출물과 *B. subtilis* CP5 혼합 처리시 살선충 상승작용과 CP5 균주의 생존여부를 확인하였다.

[0053]

CP5 배양 여액 대신 CP5 배양액 0.5%과 2)의 네마황 추출물 용액 0.01%, 0.025%, 0.05%, 0.1%를 함께 처리한 것을 제외하고는 1)과 동일한 방법에 의해 살선충능을 검정하고 그 결과를 표 4에 나타내었다.

표 4

Treatment	%	살선충능 (%)			
		24hr	48hr	72hr	96hr
	0	0	0	0	0
CP5 0.5% +	0.01	27	30	32	33
네마황	0.025	51	59	67	70
추출물	0.05	89	91	91	92
	0.1	96	96	97	98

[0054]

[0055]

CP5의 배양액 0.5%에 네마황 추출물을 농도별로 첨가한 혼합 처리구에서는 실험한 전 농도구간에서 살선충 효과의 상승작용이 나타났으며, 처리 72시간 후 네마황 0.05%와 0.1% 농도에서 각각 91%와 97%의 높은 방제효과를 보였다.

[0056]

또한 분리균 CP5는 네마황 추출물 0.1% 첨가한 처리구에서 90시간 이후에도 생존이 가능하여 식물체 추출물과 혼용이 가능하여 미생물 복합제로 활용가치가 있음을 확인하였다.

[0057]

실시예 5 : 살선충 활성의 포트 검정

[0058]

네마황 추출물과 *B. subtilis* CP5 혼합 처리 시 살선충 효과를 확인하기 위하여 뿌리혹 선충감염토양을 이용한 선충방제 포트실험을 수행 하였다. 공시 토양은 충남 공주시 우성면의 토마토 시설하우스 재배토양 중 고구마 뿌리혹선충(*Meloidogyne incognita*)이 감염된 토양(유기물함량 2.52g/kg, pH6.4, EC 2.5 ds/m, A-P 221 ppm, Ex. K 0.59%, T-N 0.03%, 무기태-N 0.01%)을 이용하였고, 포트는 직경 10cm, 높이 8.5cm의 플라스틱 화분을 이용하였다. 포트당 선충 밀도는 2령유충 약 200마리, 선충알 약200알 수준으로 맞추었다. 공시작물은 토마토(슈퍼도태당, 코레콘종묘)를 이용하였고, 40공 프러그 포트에서 본엽 3~4엽기까지 육묘한 후 포트에 이식하였다. 토양에 존재하는 뿌리혹선충 종의 판별은 Hartman과 Sasser의 방법을 이용하였다(An advanced treatise on Meloidogyne, Vol. II, pp 69-77, 1985). 대조군으로는 살선충제로 선충탄(동부한농, a.i. Fosthiazate 5%)을 최종농도 0.01%, 0.025%, 0.05%, 0.1%(v/v)로 희석하여 사용하였으며, 식물체 추출물인 님오일(*Azadirachtin indica* Juss, 80%, 인도산)도 같은 농도로 희석하여 타실험구와 비교하였다.

[0059]

실험구는 ① 무처리구 ② 대조약제 처리구 (선충탄 a.i. Fosthiazate 5%) ③ 네마황 추출물 단독처리구(0.01%, 0.025%, 0.05%, 0.1%) ④ CP5 배양액 0.5%와 네마황 추출물(0.01%, 0.025%, 0.05%, 0.1%) 혼합 처리구 ⑤ CP5 배양액 0.5%, 네마황 추출물(0.01%, 0.025%, 0.05%, 0.1%)과 님오일(0.01%, 0.025%, 0.05%, 0.1%) 혼합 처리구, ⑥ 님오일 단독처리구(0.01%, 0.025%, 0.05%, 0.1%)로 하였다. 시험은 이식 직후부터 처리구당 각 희석액을 포트 토양에 10ml 씩 주 2회 스프레이로 살포하여 3반복으로 실시하였다. 배양 기간 중 토양내의 선충 밀도 변화를 보기 위해 Baermann의 깔때기법으로 배양기간별 선충 유충을 분리한 후 선충수를 조사하였으며, 살선충률은 (치사 선충수 / 전체 선충수) × 100 (%) 로 계산하였다.

표 5

Treatment	%	Nematicidal activity (%)			
		24hr	72hr	96hr	144hr
네마황 추출물	0	0	0	0	0
	0.01	10	16	19	18
	0.025	23	26	33	37
	0.05	41	42	44	47
	0.1	59	62	65	65
CP5 0.5% + 네마황 추출물	0	0	0	0	0
	0.01	21	23	28	29
	0.025	35	45	63	63
	0.05	86	87	88	90
	0.1	89	91	91	92
CP5 0.5% + 네마황 추출물 + 넴오일	0	0	0	0	0
	0.01	61	60	60	63
	0.025	79	78	79	81
	0.05	97	98	97	96
	0.1	98	99	99	99
선충탄	0	0	0	0	0
	0.01	4	5	7	10
	0.025	11	15	17	21
	0.05	25	100	100	100
	0.1	100	100	100	100
넴오일	0	0	0	0	0
	0.01	5	7	11	16
	0.025	18	29	32	35
	0.05	29	31	36	38
	0.1	53	56	57	59

[0060]

[0061] 네마황 추출물 단독처리구는 0.1% 농도에서 처리 72시간 후 60% 수준의 방제효과를 보여, 넴오일의 56%보다 다소 높았다. 네마황 추출물과 분리균 CP5의 혼합처리구는 0.05% 와 0.1% 농도에서 처리 72시간 이후 88% - 92%의 방제효과를 나타냈으며, 네마황 추출물, 분리균 CP5와 넴오일의 혼합처리구는 같은 농도에서 96% 이상의 높은 방제 효과를 보였다. 이상의 결과를 통해 네마황 추출물 단독으로 사용하는 것 보다 길항 미생물과 혼용 사용시 살선충 활성이 높았으며, 특히 0.025% 이하의 농도에서는 대표적 살선충제인 선충탄(동부한농, a.i. Fosthiazate 5%)과 친환경 살선충제인 넴오일 보다 방제효과가 높아 생물학적 방제제로 효과적으로 이용 가능함을 나타내었다.

도면

도면1

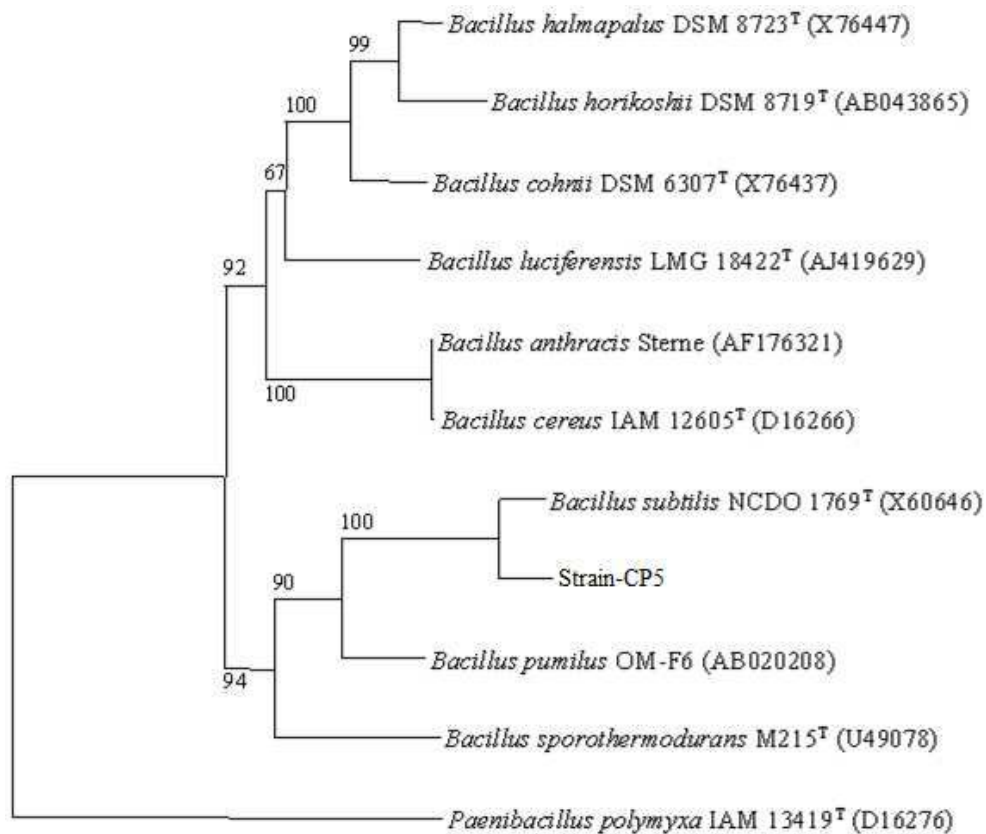


도면2

분리세균의 부분염기서열 (CP-5 16s rDNA : 892 bases)

```
CATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGAATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTA
ACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTTGAACCGCATGGTTCA
AACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGC
TCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGAC
TCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGA
TGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACG
GTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCG
GAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAG
GGTCATTGGAAGTGGGAACTTGAGTGCAGAAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
AGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGG
GAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCC
CCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATT
GACGGGGGGGCCGCAC
```

도면3



0.01

서열목록

- <110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
Ami-Tech Co.,Ltd
- <120> Nematocidal Composition Comprising *Crotalaria Spectabilis* Extract
- <130> P1214-703
- <160> 3
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> primer
- <400> 1
- agagtttgat cctggctcag
- <210> 2
- <211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220

><223> primer

<400> 2

aaggaggtga tccagccgc 19

<210> 3

<211> 892

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 3

catgcagtcg agcggacaga tgggagcttg ctccctgaat gttagcggcg gacgggtgag 60

taacacgtgg gtaacctgcc tgtaagactg ggataactcc gggaaaccgg ggctaatacc 120

ggatgcttgt ttgaaccgca tggttcaaac ataaaagggtg gcttcggcta ccacttacag 180

atggaccgcg ggcgcattag ctagttgggtg aggtaacggc tcaccaaggc gacgatgcgt 240

agccgacctg agagggtgat cggccacact gggactgaga cacggcccag actcctacgg 300

gaggcagcag tagggaatct tccgcaatgg acgaaagtct gacggagcaa cgccgcgtga 360

gtgatgaagg ttttcggatc gtaaagctct gttgttaggg aagaacaagt gccgttcaaa 420

tagggcggca ccttgacggt acctaaccag aaagccacgg ctaactacgt gccagcagcc 480

gcggttaatac gtaggtggca agcgttgtcc ggaattattg ggcgtaaagg gctcgcaggc 540

ggttttctaa gtctgatgtg aaagcccccg gctcaaccgg ggagggtcat tggaaactgg 600

ggaacttgag tgcagaagag gagagtggaa ttccacgtgt agcggtgaaa tgcgtagaga 660

tgtggaggaa caccagtggc gaaggcgact ctctgggtctg taactgacgc tgaggagcga 720

aagcgtgggg agcgaacagg attagatacc ctggtagtcc acgccgtaaa cgatgagtgc 780

taagtgttag ggggtttccg ccccttagtg ctgcagctaa cgcattaagc actccgcctg 840

gggagtacgg tcgaagact gaaactcaaa ggaattgacg gggggcccgc ac 892