

곤충병원성 선충을 이용한 인삼 해충방제 및 대량배양법 개발

황경숙* · 한상미**

(*목원대학교 자연과학대학 미생물학과 · **농촌진흥청 농업과학기술원)

Use of Entomopathogenic Nematode to Biological Control of the Insects of Korean Ginseng and Development of Large Scale of Culturing.

Whang, Kyung-Sook* · Han, Sang-Mi**

*Dept. of Microbiology, Coll. of Natural Science, Mokwon Univ., Daejeon 302-729

**National Institute of Agricultural Science and Technology, Rural Development Administration.

적 요

국내 경작지 및 산림토양으로부터 곤충병원성 선충 100여 계통을 분리하였다. 분리한 선충은 인삼의 주요해충인 큰검정풍뎅이(*Holotrichia morosa*), 참검정풍뎅이(*Holotrichia diomphalia*) 및 밀방아벌레(*Ectinus sericeus*) 유충에 대한 병원력 검정을 통해 28계통의 선충을 선발하였다. 그중에서 2025, 2027, 2028, 2034, 2039 및 2057의 선충은 병원력과 증식률이 뛰어났다. 이들 선충계통의 두부, 식도 및 생식기의 형태적 특징을 검토한 결과 *Sterinenma carpocapsae*와 *Diplogaster lethier*로 각기 분류되었다. 또한 선충의 genomic DNA ITS부위를 PCR 증폭하여 염기서열을 분석한 결과 *Sterinenma carpocapsae* 및 *Diplogaster lethier*와 95% 이상의 상동성을 나타내어 이들 선충은 *Sterinenma carpocapsae* 와 *Diplogaster lethier*로 동정되었다.

큰검정풍뎅이(*Holotrichia morosa*), 참검정풍뎅이(*Holotrichia diomphalia*) 및 밀방아벌레(*Ectinus sericeus*) 유충에 우수한 병원력을 나타낸 곤충병원성 선충의 대량배양 시스템을 구축하기 위해 유기성 폐기물을 이용한 배양방법과 값이 저렴한 인공배지를 개발하기 위한 기초 실험을 수행한 결과 *Diplogaster lethier*로 동정된 2027, 2028과 2057 선충은 증식이 매우 우수하였다.

I. 서론

우리나라의 대표적 약용작물인 인삼은 한 곳에서 장기간 재배해야 하는 작물생리적 특성을 지니기 때문에 병해충 피해가 매우 심각하다. 특히 딱정벌레목의 큰검정풍뎅이(*Holotrichia morosa*), 참검정풍뎅이(*Holotrichia diomphalia*)등 풍뎅이 유충과 밀방아벌레

(*Ectinus sericeus*)로 인한 피해가 큰 것으로 보고되고 있다. 인삼 재배농가는 해충방제를 위한 농약을 대량 살포해 왔고, 농약사용이 늘수록 저항성 해충의 출현도 계속 증가되는 악순환이 되풀이되고 있다. 살충제 사용량의 지속적 증가는 병해충의 천적을 절멸시킬 뿐만 아니라 환경오염을 심화시킴으로써 중국에는 우리나라 농업생산의 기반마저 파괴하고 말 것이다.

화학농약 사용량이 지속적으로 늘면서 그로 인한 부작용이 확대되는 현실은 비단 우리나라만의 문제가 아니다. 유엔환경개발회의(UNCED)는 2004년 말까지 각국의 화학농약 사용량을 25%씩 줄이도록 권장하고 있으며, 우리나라도 2010년까지 화학비료는 40%, 합성농약은 50%까지 사용량을 감축시키겠다고 발표한 바 있다. 화학농약과 합성농약의 사용량을 대폭 감축하면서도 농업생산력을 유지하기 위해서는 대체농약의 개발이 불가피한 바, 생물농약은 화학비료와 합성농약을 대체할 유일한 대안이라고 할 수 있다. 생물농약은 병해충에 대한 독성작용이 화학·합성농약과 다르기 때문에, 소량으로도 우수한 살충효과를 거둘 수 있고 또한 환경친화적인 특성을 지닌다.

본 연구의 대상인 곤충병원성 선충은 천적농약 중에서도 특히 병해충 방제에 효과적인 것으로 알려져 있다. 곤충병원성 선충은 적용해충의 범위가 넓고 기주 선택성이 매우 높기 때문에 목적 해충 이외의 생물에 해가 없으며, 기주 탐색능력이 탁월하고 기주 치사속도도 빠르기 때문에 병해충 방제에 특히 효과적인 것이다. 본 연구의 목적은 우리나라 토양에서 분리한 곤충병원성 선충 중에서 인삼의 주요 해충인 큰검정풍뎀이, 참검정풍뎀이 및 밀방아벌레 유충에 대한 감염력과 증식률이 우수한 선충을 선발하여 방제 효과를 검토하고 이들 곤충병원성 선충의 대량배양 방법을 검토하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험용 곤충 사육

누에는 인공사료를 사용 표준사용법에 준하여 사육하고, 용화 후 5일 경과한 번데기를 곧바로 실험에 사용하거나 4℃ 냉장 보관 후 사용하였다. 살충력 검정을 위해 사용한 큰검정풍뎀이(*Holotrichia morosa*), 참검정풍뎀이(*Holotrichia diomphalia*)와 밀방아벌레(*Ectinus sericeus*) 유충은 직접 인삼 포장에서 채집하여 실험에 사용하였다.

2. 토양으로부터 곤충병원성 선충 분리 및 선발

가. 토양시료 채취

국내 전역의 논, 밭, 과수원 및 인삼포장등의 경작지와 산림토양 등을 대상으로 2002년 3월부터 7월 까지 100점의 토양표본을 공시하였다(Table 1). 먼저 표면의 건조한 흙을 걷어낸 다음 식물의 식생상태, 토양색의 차이등을 고려하여 지름 2m정도 안에서 5개의 채집 지점을 임의로 선정하였다. 다소 수분을 함유하는 깊이 10cm 이내의 흙을 0.5~1kg 정도 채취하여 골고루 혼합한 후 토양은 비닐봉지에 넣어 운반하였고, 실험 전까지 4℃ 냉장 보관하였다.

나. 토양으로 부터 곤충병원성 선충 분리

1) silkworm trap 설치

선충 분리는 토양시료를 20×10×8cm(가로×세로×높이)의 반투명 플라스틱상자에 넣고 증류수를 분무하고 잘 섞은 다음 표면을 평평하게 다듬었다. 토양표면은 가장자리에 여백이 없도록 크기가 맞는 filter paper를 1장 깔고 멸균 증류수를 보하여 충분히 적신 다음 누에 번데기 10마리를 투입하고 실온(20~28℃)에서 24시간 간격으로 치사한 개체를 조사하여 치사율과 증식률을 구하였다.

2) 치사한 번데기로부터 곤충병원성 선충 분리: 변형한 white trap 설치

직경 90mm의 petri dish내에 직경 13mm의 2% 한천 배지를 중앙에 놓고 증류수로 채웠다. 한천배지위에 치사한 누에 번데기를 올려놓고 증류수내로 모인 선충을 모아 계대 배양하여 실험에 사용하였다.

다. 분리한 곤충병원성 선충의 살충력 검정

1) Filter-paper bioassay

10cm petri dish에 2장의 filter paper를 깔고, 공시 선충 150마리/2ml의 접종액을 준비하여 전량 주입한 다음 2령 및 3령 1일재 누에 유충 30두, 4령 및 5령 1

Table 1. Localities and the date of soils collected on the isolation of entomopathogenic nematodes by silkworm trap from various biotopes in South Korea

Code	Localities of the Soil	Date	Code	Localities of the Soil	Date
2001	경북 문경시 돈달산	24 Mar	2026	경북 울진 나지	14 Apr
2031	경남 함천 논둑	28 Apr	2056	서울 서울대학 야산	26 May
2002	대구시 산격동 경북대 상전	24 Mar	2027	경북상주잠사곤충사업장상전	14 Apr
2032	경북 경산 북송아 과수원	28 Apr	2057	충남 천안 포도밭	26 May
2003	경북 경산 옥산동 성암산	24 Mar	2028	강원도 춘천 원종장 상전	14 Apr
2033	경남 창원군 채소밭	28 Apr	2058	전남 장흥 마늘밭	2 Jun
2004	대구 계성초등 운동장 주변	24 Mar	2029	경남 밀양대학교 상전	14 Apr
2034	대구 범어동 야산	28 Apr	2059	전남 장흥 인삼포	2 Jun
2005	경북 김천 조마면 채소밭	24 Mar	2030	대구 칠곡 포도 과수원	14 Apr
2035	대구 대덕산	28 Apr	2060	전북 남원 인삼포	2 Jun
2006	경북 청송 현서면 화단	24 Mar	2061	전남 화순 딸기온실포장	9 Jun
2036	대구 상인동 야산	28 Apr	2081	충남 서산 간척지 논	23 Jun
2007	경북 포항 북구 화단	24 Mar	2062	전남 화순 논	9 Jun
2037	경기도 농촌진흥원 본관	28 Apr	2082	경남 거창 공원화단	30 Jun
2008	대구 산격동 경북대 야산	24 Mar	2063	전남 고흥 유자시험장	9 Jun
2038	충남 예산 덕산온천 주변	28 Apr	2083	울산 해안가 갈대밭	30 Jun
2009	대구 효목동 잔디밭	24 Mar	2064	경북 구미 공장주변	9 Jun
2039	충남 서산 마늘밭	28 Apr	2084	경남 진해 해안가	7 Jul
2010	대구 동호동 채소밭	24 Mar	2065	부산 금정 화단	9 Jun
2040	충남 서산 유채밭	28 Apr	2085	경북 의성 청화성	7 Jul
2011	경북 문경 돈달산	7 Apr	2066	경북군 사과연구소포장	9 Jun
2041	대구 시설원예포장	5 May	2086	경북 의성 마늘밭	7 Jul
2012	대구 파동 야산	7 Apr	2067	경남 가야산	9 Jun
2042	경북 구미 강둑	5 May	2087	경북 영주 인삼밭	7 Jul
2013	경북 안동 채소밭	7 Apr	2068	대구 두류산	15 Jun
2043	경남 밀양 감나무 과수원	5 May	2088	강원 영월 조밭	14 Jul
2014	대구 지산동 야산	7 Apr	2069	대구 고모령 화단	15 Jun
2044	경남 영남작물시험장 수도포장	5 May	2089	강원 정선 배추밭	14 Jul
2015	대구 팔공산	7 Apr	2070	대구 대덕산	15 Jun
2045	경북 경주 묘소 주변	5 May	2090	충남 금산 배추밭	21 Jul
2016	경북 청송 채소밭	7 Apr	2071	대구 입류사 주변	15 Jun
2046	경북 군위 채소밭	5 May	2091	충남 금산 옥수수포장	21 Jul
2017	충북 황간 채소밭	7 Apr	2072	대구 조야동 야산	15 Jun
2047	경북 군위 사과 과수원	5 May	2092	충남 금산 공장주변	21 Jul
2018	경북 경주 석굴암 주변 산림	7 Apr	2073	경북 군위 참외온실포장	16 Jun
2048	경북 영일 해안가	5 May	2093	충남 금산 잔디밭	21 Jul
2019	경남 거창 공수동밭	7 Apr	2074	경북 군위 수박온실포장	16 Jun
2049	제주도 서귀포 감귤농장	19 May	2094	충남 서산 인삼밭	21 Jul
2020	경북 금호강 둑 주변	7 Apr	2075	경북 청도 운문사	16 Jun
2050	제주도 남제주 성산일출봉주변	19 May	2095	전북 익산 마늘밭	28 Jul
2021	경북 가창면 정대계곡	7 Apr	2076	경북 문경 문경세계	16 Jun
2051	제주도 공항 화단	19 May	2096	전북 군산 해안가	28 Jul
2022	경남 밀양 논	14 Apr	2077	경북 점촌 야산	16 Jun
2052	대전 충남대학 야산	26 May	2097	충남 서산 생강밭	30 Jul
2023	대구시 대곡동 야산	14 Apr	2078	경북 영일 야산	16 Jun
2053	충남 태안 해안가 솔밭	26 May	2098	충남 서산 발벼포장	30 Jul
2024	경북 월성 채소밭	14 Apr	2079	충북 단양 수수밭	23 Jun
2054	인천 부평 아파트 화단	26 May	2099	경남 밀양 대추나무과수원	30 Jul
2025	경북 청도 채소밭	14 Apr	2080	충남 안면 고추밭	23 Jun
2055	경기 성남 야산	26 May	2100	경남 밀양 자두나무과수원	30 Jul

일째의 누에와 상족후 10일 경과한 번데기 10마리당 50마리의 선충을 투입하였다. 병원성 검정은 6시간 간격으로 치사율을 조사하였고, 각기 3반복 수행하였다.

2) Sand-well bioassay

6cm의 petri dish에 멸균된 토양을 15mm 깊이로 채운다. 감염기 유충 단계의 분리한 곤충병원성 선충을 각기 16,000, 8000, 4000, 2000, 1000 과 500을 5mL의 멸균 증류수와 함께 주입한다. 토양 위에 2마리의 누에 번데기를 올려놓고 72시간 후 곤충 치사를 확인한다. 실험은 각기 6반복 수행한 후 선충의 기주 인식 능력이 뛰어난 선충을 선발한다.

라. 주요해충에 대한 병원성 검정

직경 5cm, 높이 20cm인 유리병에 멸균한 토양을 10cm 높이가 되도록 채운 후 큰검정풍뎡이, 참검정풍뎡이 및 밀방아벌레의 유충을 각기 10두씩 주입하고, 1000 마리/10mL로 조정된 곤충병원성선충을 접종한다. 12시간 간격으로 기주의 치사 여부를 확인하고 치사한 유충은 white trap을 설치하여 분리되는 선충으로 감염 여부를 확인하였다.

3. 선발된 곤충병원성 선충의 동정

가. 형태학적 분류

선발된 곤충병원성 선충은 병원력이 우수한 2025, 2027, 2028, 2034, 2039 및 2057 선충 계통에 대해 선충의 두부, 식도 및 생식기의 형태를 관찰하였다.

나. ITS sequence를 통한 계통분류

White trap에서 분리된 감염기 유충 단계 선충을 실체현미경으로 확인하여 e-tube에 10mg을 모은 후 TRIzol 용액을 사용하여 DNA를 분리하였다.

ribosomal DNA의 ITS 영역을 증폭하기 위하여 사용한 primer는 Table 2와 같다(Fig. 1). PCR반응은 100ng/dml genomic DNA를 각각의 primer 50 pmole 및 100 uM dNTPs와 섞은 후 TaKaRa의 10 X buffer 용액을 넣고 2.5Unit Tag DNA polymerase를 가한 다음 전체 반응액을 100ul로 하였다.

PCR 반응 조건은 95°C에서 2분간 initial denaturation 처리 후, 95°C/60초, 55°C/60초, 72°C/60초로 40 cycle 반응시켰고 72°C에서 7분간 final extension하였다. PCR 증폭산물의 DNA는 Gene Clean II kit를 사용하

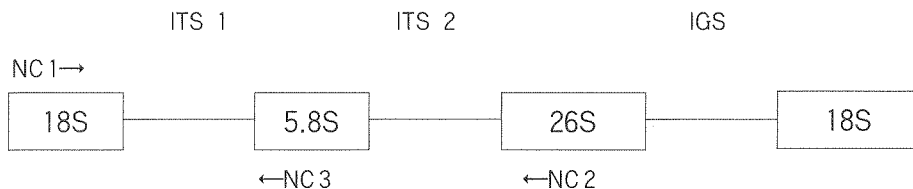


Fig 1. Schematic representation of the ribosomal DNA repeat unit including 18S, 5.8S and 26S rRNA. The arrows denote the position of the PCR primer

Table 2. Nucleotide sequence of ITS primer used for PCR in the nematodes

Primer	Sequence (5'-3')	Region	size
NC 1	GTA GGT GAA CCT GCG GAA GGA TCA TT	ITS1-5.8S-ITS2	870bp; 1250bp
NC 2	TTA GTT TCT TTT CCT CCG CT		
NC 1	GTA GGT GAA CCT GCG GAA GGA TCA TT	ITS1	200bp; 1000bp
NC 3	TTA GTT TCT TTT CCT CCG CT		

여 회수한 후 Perkin Elmer automatic sequencer로 염기서열을 결정 하였다.

4. 선발된 선충의 대량 배양

가. 건조 잠용을 이용한 배양

양잠 부산물인 건조 잠용은 70°C에서 12시간 열풍 건조한 다음 실온에 보존한 후 사용 전에 멸균수로 포화시킨 여과지로 1시간 정도 싸 두어 수분을 충분히 흡수시켰다. 흡수 및 연화로서 배양에 적합한 상태가 된 용잠에 선충을 접종하였다. 접종은 10cm petri dish에 여과지를 깔고, 선충 1,000마리/2.0ml 증류수의 농도로 조정된 접종액을 주입한 다음, 흡수 처리한 번데기를 10마리씩 투입하여 (숙주당 100마리) 25°C에서 3일간 배양하였다. 접종 후 용잠의 표면은 멸균 증류수로 2~3회 씻은 다음 새 petri dish에 옮겨서 같은 온도로 2주일간 white trap에서 분리 배양을 병행하였다.

나. 유기성 폐기물을 이용한 선충의 대량 배양

음식물 쓰레기 발효퇴비, 축산폐기물인 닭내장을 이용하여 선충 배양용 배지 제조하였다. 먼저 닭내장을 깨끗이 씻어 100g당 증류수 500mL을 가하고 5 × 10 × 0.2cm의 스폰지와 함께 약한 불로 2시간 동안 삶은 다음, 액즙이 침투된 스폰지를 petri dish로 옮겨서 접종한다. 음식물 발효퇴비는 고르게 퍼 넣은 다음 5mL의 증류수와 함께 선충을 주입하고 실온에서 배양한다. 2주일 간 배양 후 변형한 white trap을 설치하여 선충의 증식과 수를 조사한다.

III. 결과 및 고찰

1. 곤충병원성 선충의 분리

누에 번데기를 기주로 사용한 silkworm trap을 이용하여 채취한 토양내의 곤충병원성 선충을 분리하여 표 3과 같이 토양시료의 고유번호를 그대로 식별

번호로 부여하여 나타내었다.

설치한 silkworm trap으로부터 10마리의 누에 유충이 치사하는데 소요되는 시간은 2002계통의 경우 4일로 가장 짧았고, 2034계통은 21일로 가장 길었다. 그러나 대체적으로 10일 내외의 시간이 경과되었고, 이는 토양내 선충의 밀도가 다양하며 선충이 기주를 인식하고 침투하는데에 시간의 차이가 있음을 보여 준다.

치사한 누에 번데기를 white trap을 사용하여 기주 체내에서 증식한 선충의 수와 1세대를 보내는데 소요되는 대략적인 시간을 알아보았다(Table 3). 빠르게는 1일 만에 감염단계의 유충이 분리되는 것으로 이는 기주체에서 증식했다기보다는 침투한 선충이 분리된 것으로 사료되고 대체적으로 5일에서 10일 사이의 시간을 보였으며 이는 선충 증식의 1세대에 필요한 시간으로 간주할 수 있다.

2. 분리한 곤충병원성 선충의 살충력 검정

공시 선충 접종액을 준비하여 전량 주입한 다음 2령 및 3령 1일째 누에 유충 30두, 4령 및 5령 1일째의 누에와 상족후 10일 경과한 번데기를 사용하여 살충력을 검정하였다. 기주당 50마리의 선충을 주입하여 6시간 간격으로 치사율을 조사한 결과를 table 4에 나타내었다.

기주치사의 50%를 보이는 시간과 100%를 보이는 시간을 지표로 기주 침투력과 살충력을 알아보았다. 선충 계통에 따라, 기주 발달 단계에 따라 차이를 보였으며 이는 선충의 기주 침투가 살충력을 나타내는데 우선한다는 것을 보여준다. 2002, 2027 및 2045계통의 선충은 기주 침투력이 매우 우수하였다. 또한 2027, 2041, 2081 및 2098 선충은 기주 침투력은 다소 떨어지나 침투 후 살충력이 우수한 것으로 보여진다.

3. 주요해충에 대한 병원성 검정

선발한 28개의 곤충병원성선충을 인삼의 주요해충인 큰검정풍뎀이(Holotrichia morose), 참검정풍뎀이(Holotrichia diomphalia) 및 밀방아벌레(Ectinus

sericeus)에 대한 병원성을 검정하였다.

이들 유충을 각기 10두씩 주입하고, 1000마리/10mL로 조정한 곤충병원성 선충을 접종한 후 12시간 간격으로 기주의 치사 여부를 확인하고 치사한 유충은 white trap을 설치하여 분리되는 선충으로 감염 여부를 확인하였다.

표 5에서 보는 바와 같이 선발한 28개의 곤충병원성 선충은 다소 병원력에 차이는 있었으나 큰검정풍뎅이, 참검정풍뎅이 및 밀방아벌레에 대부분 살충력

을 나타내었다. 특히 2002와 2059계통이 큰검정풍뎅이와 참검정풍뎅이에 강한 살충력을 보였다.

4. 선발된 곤충병원성 선충의 동정

병원력과 증식률이 우수한 2025, 2027, 2028, 2034, 2039 및 2057의 6계통의 선충을 선발하여 형태학적 분류와 ITS sequence를 통한 계통학적 분류를 시행하였다.

Table 3. Entomopathogenic nematode strains selected through in vivo culture by silkworm pupae after isolation from the soil sample of various biotypes

Nematode Strains	Lethal time of host on the trap(day)	Time for U appears after setting of White trap(day)
2002	4	6
2005	12	3
2007	13	2
2010	7	9
2014	8	11
2020	14	9
2021	22	6
2025	13	10
2027	16	7
2028	8	11
2029	17	5
2033	9	6
2034	21	6
2038	14	6
2039	17	8
2041	17	3
2045	17	1
2053	8	4
2057	8	3
2059	11	2
2061	13	1
2065	7	3
2067	10	1
2071	6	3
2075	15	11
2081	7	2
2087	13	1
2098	15	2

가. 형태학적 분류

2025, 2034, 2039 계통의 선충은 다음과 같은 형태학적 특징을 갖고 있어 Rhabditidae 선충으로 동정하였다. 이들 선충은 두부 선단이 계단식으로 좁아진 offset형이며, 구순이 융합되지 않고 갈라져 있었다.

또한 식도는 rabdoid형이며 식도협세부가 뚜렷하게 관찰되었다. 암컷의 음순이 함몰되어 있었고, 난소는 쌍으로 반전되어 있었다. 신경환은 배출공 앞에 위치하였으며, 장과 직장을 연결하는 부위에는 3개의 직장선이 있었다. 수컷은 교접낭이 존재하며, 교접자는 교접낭 밖으로 복부쪽을 향해 있으며, 10쌍의 교접돌기가 확인되었다. 이러한 형태학적 특징으로 미루어 Rhabditidae 계통으로 분류하였다(Table 6).

2027, 2028, 2057 계통의 선충은 구침은 없으나 구공에는 2개의 긴 이빨을 가지고 있었고, 식도는 전형적인 rabdoid형으로서, 전부식도는 좁고 중부식도로 확장되며, 식도협세부는 특히 좁았다. 암컷의 꼬리는 대체로 가늘며 길었고, 음분은 앞쪽으로 돌출되고, 난소는 쌍으로 반전되어 있었다. 수컷은 정소가 1개로서 반전되어 있었고, 교접낭은 갖고 있지 않았고, 교접자는 쌍이며, 부자는 짧고 끝이 갈고리 모양처럼 휘어져 있는 형태학적인 특징으로 미루어 이들 선충은 Diplogasteridae 계통으로 분류할 수 있었다(Table 7).

나. ITS sequence를 통한 계통학적 분류

형태학적 분류에서 Rhabditidae 계통의 형태학적 수

치 범위를 벗어나지 않는 2025, 2034, 2039 계통의 선충 중에서 2025 계통에 대한 ITS 에 대한 염기서열분석을 수행한 결과 *Sterinenma carpocapsae*(AF331913)와 96% 이상의 상동성을 나타내어 *Sterinenma carpocapsae*으로 동정되었다 (Fig 2).

2027, 2028, 2057 계통의 선충은 형태학적 특징으로 Diplogasteridae 계통으로 분류되었으며 그중 2027에 대한 ITS 1, 2에 대한 염기서열분석결과 *Diplogaster lethier*(AF036643)으로 나타났으며, 99%의 상동성을 나타내어 *Diplogaster lethier*으로 동정되었다 (Fig 3).

5. 곤충병원성 선충의 대량배양

가. 건조 잠용을 이용한 배양

병원력이 우수한 곤충병원성 선충의 대량배양을 위하여 양잠 부산물인 건조 잠용을 건조 분말 처리하여 배지로 이용한 경우, 선발된 선충계통은 대체적으로 건조 잠용배지에서도 증식이 가능하였으나, 유충 및 용기의 생체에 접종한 경우보다는 증식은 열등하였다 (table 8).

Table 4. LT₅₀ and LT₁₀₀ (hr) of the silkworms at different stage of development following expose to various nematode strains

Nematode Strains	LT ₅₀ ^{a)}					LT ₁₀₀ ^{b)}				
	2nd	3rd	4th	5th	pupae	2nd	3rd	4th	5th	pupae
2002	13.2	18.5	20.5	36.0	57.4	30	24	18	56	136
2005	30.3	33.9	33.9	38.0	68.5	50	52	52	64	112
2007	34.2	35.7	36.9	39.2	64.5	52	52	44	66	84
2010	24.4	31.7	29.3	49.4	110.6	44	50	48	68	148
2014	42.8	30.0	41.9	49.8	91.5	48	54	70	72	116
2020	30.0	28.0	23.4	36.0	48.7	40	42	42	50	144
2021	32.8	32.3	32.3	39.3	88.4	46	54	58	64	112
2025	33.3	38.0	35.4	31.8	67.3	48	52	52	68	108
2027	24.6	32.3	29.4	21.5	48.1	40	50	44	42	96
2028	29.3	33.7	36.0	31.9	84.0	44	46	48	50	136
2029	24.6	33.0	37.7	50.9	65.5	49	48	56	66	144
2033	35.7	35.7	36.0	59.7	137.6	46	50	54	78	184
2034	29.0	31.0	27.2	35.7	104.4	38	40	40	56	108
2038	28.4	32.8	37.2	40.0	120.6	40	46	56	60	120
2039	27.5	31.8	29.5	32.8	114.0	44	44	44	46	144
2041	25.1	31.5	32.8	49.2	46.0	38	42	54	68	92
2045	22.9	21.9	26.2	49.8	52.1	34	34	38	68	108
2053	28.2	35.4	35.4	43.5	60.5	44	50	54	54	86
2057	39.3	45.3	45.6	35.7	116.1	48	68	60	76	152
2059	33.9	32.2	36.0	51.0	124.2	50	56	56	70	120
2061	36.0	37.5	32.8	60.0	96.0	56	56	50	64	168
2065	31.5	31.9	39.0	56.5	79.9	45	50	56.7	1	128
2067	26.7	30.0	28.4	38.4	94.5	40	44	44	60	108
2071	23.5	29.5	23.7	39.8	96.8	38	42	40	54	112
2075	33.3	31.2	32.8	51.2	98.3	50	52	56	66	120
2081	30.0	35.7	36.0	42.0	94.6	52	48	52	60	98
2087	30.9	33.3	35.7	36.0	74.5	50	52	60	54	96
2098	24.0	31.2	23.4	46.4	59.6	46	44	44	56	92

a), LT₅₀ = 50% lethal time (hr), b), LT₁₀₀ = 100% lethal time(hr)

나. 유기성 폐기물을 이용한 배양

대체물질을 이용한 인공배양 기술 개발의 가능성을 검토하기 위하여 닭내장, 누에가루 폐엽품, 음식물 발효퇴비등 유기성 폐기물을 활용한 배지에 접종하여 선충의 증식을 확인한 결과 2027, 2028, 2057 계통의 선충에서만 증식이 확인되었다. 대표적으로 2027 계통의 선충은 2주일 경과후 white trap에 설치하여 10일 간격으로 선충을 수집하여 계측한 결과, 10g의 음식물 쓰레기 발효 퇴비에서 120일간 분리된 선충은

Table 5. Pathogenicity of nematode strains to the larva of *Holotrichia morosa*, *Holotrichia diomphalia* and *Ectinus sericeus*

Nematode Strains	<i>Holotrichia morosa</i>	<i>Holotrichia diomphalia</i>	<i>Ectinus sericeus</i>
2002	80±0.9	95±5.8	69±0.3
2005	85±1.3	75±1.3	78±0.9
2007	78±0.9	83±5.8	66±1.2
2010	83±0.3	57±1.3	85±1.2
2014	77±0.9	63±1.1	78±0.9
2020	76±0.3	48±1.0	59±1.2
2021	85±1.3	56±8.3	70±0.3
2025	87±0.3	50±1.3	89±0.3
2027	75±1.2	54±1.0	0
2028	55±0.3	51±1.2	75±3.5
2029	59±0.3	57±2.0	0
2033	82±0.3	66±1.2	87±1.5
2034	75±3.5	66±1.2	52±2.5
2038	72±1.2	55±0.9	82±1.3
2039	87±1.5	72±1.2	82±0.3
2041	53±1.9	57±1.7	71±1.2
2045	45±0	55±5.0	93±1.9
2053	32±0	82±0.7	0
2057	55±2.5	75±1.1	86±0.3
2059	80±0.3	85±3.5	92±0.3
2061	25±0.9	85±1.3	68±1.2
2065	38±3.5	60±0.3	61±1.2
2067	68±1.2	62±1.3	76±0.3
2071	35±3.5	68±1.3	92±0.3
2075	61±0.3	62±1.9	87±0.3
2081	55±5.8	65±3.5	65±3.5
2087	90±1.2	71±1.2	75±3.5
2098	75±0.3	72±0.3	92±0.9

Table 6. Charcater (n=20) 2027, 2028 and 2057 strain on the body sharpe of female and males

Sex	Character (n=20)	Value	
		Mean 0 SE	Range
Female	Body length(μm)	2,680±32.5	1,980-3,210
	Cheatest width	150±8.9	134-189
	Tail length	138±9.9	125-150
	¹⁾ Ratio-a	17±1.3	14-20
	-b	10±3.3	9-12
	-c	19±15.6	13-25
	²⁾ % Vulva	49±1.3	47-51
Female	Body length(μm)	1,900±15.3	1,630-2,290
	Cheatest width	116±5.5	91-150
	Tail length	98±10.1	78-130
	¹⁾ Ratio-a	16±13.6	15-24
	-b	8±5.3	6-13
	-c	19±1.9	13-23
	Spicula length(μm)	97±5.8	89-120

- 1) a, body length divided by greatest width; b, body length divided by tail length; c, distance from head to excretory pore divided by distance form head to pharynx base
 2) Distance from head to vulva / body length X 100

Table 7. Charcater (n=20) 2025, 2034 and 2039 strain on the body sharpe of female and males

Sex	Character (n=20)	Value	
		Mean 0 SE	Range
Female	Body length(μm)	1,320±65.2	1,180-1,650
	Cheatest width	105±21.5	81-120
	Tail length	285±15.6	225-328
	¹⁾ Ratio -a	13±0.6	12-15
	-b	7±0.9	5-9
	-c	5±0.6	4-6
	²⁾ % Vulva	48±0.9	45-51
Female	Body length(μm)	1,060±15.8	780-1,160
	Cheatest width	69±3.9	50-79
	Tail length	135±20.1	124-152
	¹⁾ Ratio -a	15±0.9	14-15
	-b	6±1.2	5-7
	-c	7±0.9	6-8
	Spicula length(μm)	42±3.9	38-49

- 1) a, body length divided by greatest width; b, body length divided by tail length; c, distance from head to excretory pore divided by distance form head to pharynx base.
 2) Distance from head to vulva / body length X 100,


```

aggatcatta ttgagctaat attttccctt ttaatcaagt ttctgctggt cgtttcctaa ctttaacttg atctctaacg
gctttgaaag gtttctacag atgtttggag cagttgtagt agcgtgactg tgctgatgaa cattgtacat tgttatctaa
gcgcttctgc gtttctgaa tgcttagtga tgagaattaa agaggtctgc tgactccca ttcttgatt gctaacaana
acgttttgtt tcgataattg tgcactcgt tgatgcattt tttaattatc aagcttctac ggtggatcac tcggttcgta
ggctgatgaa aaacggggca aaaaccgtta ttggcgtga atlgcagaca tatlgagcgc taaaatttg aacgcaaatg
gcactaacag gtttttattt gtttagtatg tcaattgagg gtctttgac tagaatctgg caatcgctgc tgattgcttt
ttcgtaagc tactttgctt ttgtgaagta cttttcggt atggctattt gattgtctaa tggatgtctg gctagctggt
tctttgctag acgtctgcaa tcatttggca ttgcgtagtg ttgattaat ggtttagcgc gtttcttct aactgacttt
tacacaagca agtgaataac gtttctaaa gtcagctcat taatcaatgt ggttttctga cttgattgt cggtcaattg
tgctatgctc tgctaactt ttccaactag acct (754 bp)
    
```

Fig 2. Nucleotide sequences of ITS regions of 2025 strain

```

aagcttgctt gctcfaaaga ttaagccatg catgtctaag aacatattg taaacatgaa tctgcgaacg gctcattatt
aacacccgta atctaccag ttttctatc caaacggat atctgcgtta atttggagc taatactgac accaaagcac
cgccagcaat ggtagtgccg acataataga tcaagacctt ttggggcaac ccacttgatg actctgaata tttttgcgga
tcgcatggtc ttgtaccgac gacgtactgg tcgagcgggt gccctatcaa ctattgatgg aagtctatgt gtcttccatg
gttgaacagg gtaaccggaga ataagggttc gactcgggag agctagcctt agaaaaggct atcacatcca aggaaggcag
caggcgcgta aattaccac tcctaatctg aggaggtagt gactatcaat aacgagacag atctcttga ggtctgtcat
tgaaatgagc acaacttaaa gactttaacg aagctatgg gagggcaagt ctggtgccag cagccgcgta atccagctc
ccaactgta taccgctatt gctcgggta aaaagctctg agttggatct aagttcatga ctgtagtctt ccatgtgaga
tactgctagt ctgactgtt tcgcccgttt tccgtagctt cggtcgcggt gactggtgtt gtaacttga ttaaatcaat
gtgattaaaa caggcgtttg ctggaatgct ttatcatgga ataatagaat atgacttcgg tccattctgt ttgtcttggg
attgaagtaa tgattaaaag gaacaactcg ggggcatccg tatcgtcgcg tgagagggtga aattcttga cgcagcggag
acgacctatt gcgaaagcat ttccaagaa tgttttcaat aatcaagaac gaaagtcaag ggatcgaagg cgattagata
ccgcctagt tctgaccgta aactatgcca actagcgtac aggtggagggt agtttagccc tgctggggag ctctcggaa
acgaaagtct tcgggttccg ggggtagtat ggttgcaaat ctgaaactta aaggaaatga cggaaaggca ccaccaggag
tgagcctgcg cttaatitga ctcaacacgg ggaatctcac ccggaccgga cactataatg attgacagat tgatagtctt
ttctgattt ggtggttgggt ggtgcatgac cgttcttagt tcgtggattg atctgtctgg ttattccga taacgaacga
gacttaacc tgctaactag ttgtgcgata gtttctgctg atctactct tagagggata agcgggtgac aaccagttag
attgagtaat aacaggctcg tgatgccctt agatgttcgg ggctgcacgc gcgctacact ggaaagtga gcaagcgtta
tcttcttg cgaaaggctc tgggtaactt ttgaaagct ttctgtttt ggaatagagg attgcaatta tttcttga
acgaggaatt cccagtaagt atgagctatt agctcatgct gattacgtcc ctgcccttg tacacaccgc ccgtcgtgctc
ccgggactga gttgctcga gaaatgcggg gacttctggc gttgggttc cttcactga tagaaaccgc ataatcgcga
gtggcttga cgggcaaaa gtcgtaacaa ggtgcgttag gtgaactgac gaaggatcgg atcc (1744 bp)
    
```

Fig 3. Nucleotide sequences of ITS regions of 2027 strain

Table 8. Number of nematodes produced by incubation at 25 in the dried pupae of silkworms after dampness preparation and inoculation of 100 nematodes per host (data from 3 replicates)

Nematode Strains	Number of nematodes isolated per host (mean SE)			Total
	1-20 day	21-40 day	41-60 day	
2025	18,150 ± 92	11,666 ± 88	2,336 ± 27	32,153 ± 109
2027	15,503 ± 46	34,837 ± 124	5,063 ± 43	54,390 ± 131

Table 9. Multiplicity of nematodes 2027 strain in the culture media prepared by organic wastes of chicken intestine, silkworm powder, and food waste fertilizer

Days of Incubation	Number of nematode isolated from culture media		
	Chicken intestine	Silkworm powder	Food waster fertilizer
10	120	1,600	42,400
20	10,000	28,000	77,700
30	85,000	13,300	375,000
60	148,500	9,500	80,000
90	78,000	2,100	6,200
120	3,700	90	270
Total	325,320	53,150	581,570

581,570마리로서 가장 많은 증식이 이루어졌음을 확인하였다. 같은 양의 누에가루 폐엽품에서 증식된 선충수는 53,150마리로서, 음식쓰레기 발효퇴비의 1/10에 불과하였다. 닭내장 배지는 대체적으로 증식효과는 양호한 것으로 간주할 수 있었으나 정확한 양적 비교는 곤란하였다 (table 9).

IV. 결론

국내 인삼포장을 비롯한 경작지 및 산림토양 등 100여점의 토양으로부터 누에 trap을 이용하여 곤충병원성 선충 100여 계통을 분리·수집하였다. 분리한 선충은 누에와 인삼의 주요 해충인 큰검정풍뎀이, 참검정풍뎀이 및 밀방아벌레 유충에 대한 병원력을 검정을 통해 28계통의 선충을 선발하였다. 그중에서 2025, 2027, 2028, 2034, 2039 및 2057의 선충은 병원력과 증식률이 뛰어나고 건조 잠용과 유기물 배양에서도 증식이 가능하였다. 이들 선충계통의 형태적 특징을 검토한 결과 *Sterinenma carpocapsae*와 *Diplogaster lethier*로 분류되었다. 또한 선충의 genomic DNA의 ITS부위를 PCR 증폭하여 염기서열 분석결과, *Sterinenma carpocapsae*와 *Diplogaster lethier*와 95% 이상의 상동성을 보여 이들 선충은 *Sterinenma carpocapsae*와 *Diplogaster lethier*로 동정되었다.

인삼의 주요 해충인 큰검정풍뎀이, 참검정풍뎀이 및 밀방아벌레 유충에 대해 병원력이 우수한 곤충병원성 선충의 대량배양 시스템을 구축하기 위해 유기성 폐기물을 이용한 배양방법과 값이 저렴한 인공배지의

개발을 위하여 기초 실험을 수행한 결과 *Diplogaster lethier*로 동정된 2027, 2028과 2057선충은 증식이 매우 우수하였다. 따라서 본 실험에서 분리 선발한 곤충병원성 선충은 유기성 폐기물 또는 음식물 쓰레기 등에서 대량 배양이 가능하여 작물의 비료원료 및 생물학적 살충제로서의 이중 효과를 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

인용 문헌

1. 한상미, 한명세. 1999. 남한 토양에서 곤충병원성 선충의 분리. 한국생태학회. 22(5):255~263.
2. Adamson, M.L., 1987. Phylogenetic analysis of the higher classification of the Nematoda. Canadian Journal of Zoology. 65:1478~1482.
3. Alexander, M., 1982. Most probable number methods for microbial populations, in Methods of soil analysis Part 2: Chemical and Microbiological properties. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin.
4. Arkhurst, R.J., 1989. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. J. Gen. Microbiol. 121: 303~309
5. Bedding, R.A., and L.A. Miller. 1981. Use of a nematode, *Heterorhabditis heliathidis*, to control black vine weevil, *Otiathynchus sulcatus*, in

- potted plants. *Annals of Applied Biology*, 99:211. ~216.
6. Bird, J., M. Larsen, P. Nansen, H.O. Kraglund, J. Gronvold, S.A. Jenriksen, and J. Wolstrup. 1998. Dung-derived biological agents associated with reduced numbers of infective larvae of equine strongyles in faecal cultures. *J. Helminthol.* 72:21~26.
 7. Choi, Y.E., 1996. *Nematodes of Korea*. Ilisa, Daegu, Korea.
 8. Dolinski, C., G. Borgonie, R. Schnabel, and J.G. Baldwin. 1998. Buccal capsule development as a consideration for phylogenetic analysis of Rhabditida (Nemata) Development, *Genes and Evolution*, 208:495~503.
 9. Griffin, C.T., R. Chaerani, D. Fallon, A.P. Reid, and M.J. Downes. 2000. Occurrence and distribution of the entomopathogenic nematodes *Steinernema* spp. and *Heterohabditis indica* in indonesia. *J. Helminthol.* 74:143~150.
 10. Ingham, R.E. and J.K. Detling. 1984. Plant-herbivore interactions in a north american mixedgrass prairie. III. Soil nematode populations and root biomass on *Cynomys ludovicianus* colonies and adjacent uncolonized areas. *Oecologia*, 63:307~313.
 11. Jorgenson, E.C., 1984. Nematicides and nonconventional soil amendanents in the management of root-knot nematode on cotton. *J. Nematol.* 16:154~158.
 12. Lee, D.L., 2002. *The Biology of Nematodes* Taylor & Francis, New York, USA.
 13. Maggenti, A.R., 1991. *Nemata : Higher classification*, pp 147~187. In *Manual of agricultural nematology*. Maecel Dekker, USA.
 14. Mirto, S., R.T. La, C. Gambi, R.C. Danovaro, and A. Mazzola. 2002. Nematode community response to fish-farm impact in the western mediterranean. *Environ Pollut.* 116:203~214.
 15. Luong, L.T., E.G. Platzer, P. DeLey, and W.K. Thomas. 1999. Morphological, molecular and biological characterization of *Mehdinerna alii* (Nematoda: Diplogasterida) from the decorated cricket (*Grylodes sigillatus*). *J Parasitol.* 85:1053~1064.
 16. Poinar, G.O., 1979. Rhabditidae. pp.92~180. In *Nematodes for biological control of insects*. CRC Press, USA.
 17. Sanyal, P.K., 2000. Screening for indian isolates of predacious fungi for use in biological control against nematode parasites of ruminants. *Vet Res Commun.* 24:55~62.
 18. Sturhan, D. and Z. Mrack. 2000. Comparison of the galleria baiting technique and a direct extraction method for recovering *Steinernema* (Nematoda:Rhabditida) infective-stage juveniles from soil. *Folia Parasitol.* 47:315~318.
 19. Suarez, V.H. and R.L. Lorenzo. 2000. Ecology of the free living stages of cattle nematodes during summer contamination in argentina western pampas. *Parasite.* 7:255~261.
 20. White, G.E., 1929. A method for obtaining infective nematode larvae from culture. *Science.* 66:302.
 21. Yeates, G.W., T. Bongers, R.G.M. de Goede, D.W. Feckman, and S.S. Georgieva. 1993. Feeding habits in soil nematode families and genera-an outline for soil ecologists. *J. Nematol.* 25:315~331.