

토양과 곤충 사체로부터 곤충병원성 선충의 분리 및 동정

한 상 미 · 한 명 세

(경북대학교 농과대학 곤충병리연구실)

적 요 - 우리나라의 다양한 지역에서 100개의 토양과 곤충사체에서 누에 trap을 이용하여 곤충병원성 선충을 분리하였으며, 위생해충인 털검정과리유충(*Calliphora vomitoria*)과 농업해충인 멸강나방유충(*Pseudaletia separata*), 북방플노린재(*Palomena angulosa*) 그리고 왕풍덩이유충(*Melolontha incana*)에 대하여 20~80%의 살충력을 나타내며, 누에(*Bombyx mori mori*) 유충과 번데기에 대한 살충력은 100%인 선충 30계통을 선발하였다. 선발한 선충 30계통은 형태적 특징에 따라 Rhabditidae, Heterorhabditidae, Diplogasteridae, Steinernematidae, Tylenchidae의 5개 분류군으로 나누어졌다. 선충의 동정법 개선 및 분자생물학적 분류기준의 검토를 위하여 random primer 130개 중에서 20개의 primer를 선발하고, genomic DNA의 RAPD-PCR을 수행한 결과 유사도 0.853에서 형태적 분류기준과 일치하였다. 유사도계수를 이용한 5개 분류군에 속하는 선충 계통간의 유전적 근연관계는 Rhabditida에서 Steinernematidae는 경우 동일 목의 Heterorhabditidae 및 Rhabditidae와는 유사도 0.819로서 거리가 멀고, 다른 목인 Tylenchidae와는 0.827로서 보다 더 근연이었다. 또한 Rhabditidae 분류군은 유사도 0.863에서 다시 2개의 분류군으로 나누어졌으나 형태적 차이는 명확하지 않았다. 형태적 분류를 참조한 genomic DNA의 RAPD 결과 유사도의 적절한 응용은 생물적 방제를 위한 곤충병원성 선충의 선발 및 동정에 있어서 형태적 단순성에 기인하는 자연분류의 한계를 보완 또는 극복할 수 있는 분자생물학적 동정법으로서 유용할 것이다. 또한 RAPD에 의한 동정은 생태환경에서 다수의 개체를 확보하기 쉬운 dauer larvae 또는 infective juvenile 등 유충기의 선충을 이용할 수 있다. 그러므로 노력이 소요되는 성충의 채집과 표본제작 등이 생략되므로 선충의 동정에 매우 안정적이며 효율적인 방법으로 판단되었다.

서 론

곤충병원성 선충은 인축에 해가 없고, 숙주범위가 넓으며 숙주 탐색 및 추적능력이 뛰어나므로 수목의 권엽성 해충은 물론 과실내 및 토양 등 농약의 사용에 제한을 받는 환경에서 우수한 살충효과를 발휘할 수 있다(Han *et al.* 1998; Poinar *et al.* 1983). 그러므로 옥수수, 벼, 채소 등 농작물을 가해하는 해충의 생물적 방제에 곤충병원성 선충이 이용된다(Woodring & Kaya 1988). 토양에서 분리되는 선충중에서 감염력과 증식률이 우수한 곤충병원성 선충을 선발할 수 있다면 다른 생물살충제보다 토양을 비롯한 실외의 환경에 대한 적응력이 뛰어나며, 미생물농약보다도 생산가격이 저렴하고 운반 및 제제화에 유리하다(Kaya 1987). 그러나 현재 상품화된 선충은 stein-ernematid와 heterorabditid로서 전량 외국에서 수입해야 되며, 이러한 선충이 실제 우리나라의 기후와 토양에 적합할지도 미지수이다. 따라서 토양 생

물자원의 개발 차원에서 우리나라 토양으로부터 유용한 선충을 분리하여 사용한다면 방제효율이나 비용면에서 유리할 것이다.

선충은 외견상 단순하므로 형태적 분류기준에 의존하는 관행 방식(Wouts *et al.* 1982; Poinar 1979a)은 많은 종의 분류 및 동정에 큰 제한요인이 된다(Akhurst 1987). 최근에는 선충에 대한 분자생물학적 분류가 시도되어 종 및 계통분류를 위한 정밀한 정보가 확보될 수 있다(Pinochet *et al.* 1994; Ibrahim *et al.* 1994). Random primer를 사용하여 다양한 band pattern을 비교하는 Randomly Amplified Polymorphic DNA(RAPD)는 열저항성 DNA 중합효소처리에 의한 DNA의 denaturation, primer의 annealing과 polymerization을 반복한 결과, 특정 DNA부위에서 PCR로 증폭된 DNA 단편의 다형성에 의해 계통 간의 유연관계에 대한 객관적이며 정확한 해석이 가능하다(Haymer & McInnis 1994).

따라서 본 연구에서는 곤충병원성 선충의 효율적 검색 방법을 확립하는 동시에 분자생물학적 방법을 도입

한 유연관계 구명을 시도하였다. 우리나라 토양으로부터 선충을 분리하고 곤충에 대한 병원성을 조사하여 병원력이 강한 계통을 선발하여, 생물살충제로서의 유용성을 검증하였다. 또한 선발된 선충은 형태적 분류와 더불어 RAPD 분석을 통하여 신속한 분자생물학적 동정법의 확립을 위한 primer를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 공시 시료로부터 선충의 분리 및 선발

토양의 선충 탐색은 1996년 9월 부터 1998년 4월 까지 남한 전역의 논, 밭, 과수원 등의 경작지와 산림, 해변의 유희지 등을 대상으로 100개 지역의 토양표본을 채집하였다. 토양시료는 표면의 건조한 부위를 제거하고 다소 수분을 함유하는 깊이 10 cm 이내에서 0.5~1 kg 정도 채취하고 비닐봉지에 넣어 운반하여 5°C에 보관하였다. 선충 탐색용 trap은 토양시료 200 g을 20×10×8 cm의 반투명 플라스틱상자(가로×세로×높이)에 넣고 증류수를 분무해 고무 섞은 후 filter paper를 1장 덮어서 trap의 치사 곤충을 수거할 때 비병원성 선충의 오염 기회를 방지토록 하였다. 그 다음, 멸균 증류수를 보충하여 여과지가 충분히 젖은 다음 번데기 시기의 누에 10두씩을 투입하고 25±1°C에서 24 시간 간격으로 치사한 개체를 조사하였다. 치사한 번데기는 petri dish로 옮기고, 2~3일 경과한 사체는 White trap(White 1929)에서 선충을 분리하였다.

곤충사체에서의 선충채집은 버섯파리(*Bradysia* sp.), 뒤영벌(*Bombi impatiens*) 및 어리호박벌(*Xylocopa appendiculata*)을 이용하였으며, 수집한 곤충의 사체가 실온에서 1~2주 경과한 다음 White trap에서 선충을 분리하였다.

2. 계통 선발 및 병원성 검증

선충의 초대배양과 증식 및 분리는 25±1°C에서 실시하였으며, 10 cm petri dish에 2장의 filter paper를 깔고, 선충은 500마리/2.0 ml로 조정된 접종액 전량을 주입하고, 번데기 시기의 누에 10마리를 공시하였다. 치사한 곤충은 개체별로 1주일간 격리후 White trap에서 선충을 분리하였다. 선발을 겸한 2대 및 3대째 배양은 숙주 1두당 20마리를 접종하였다.

4대부터의 누대배양은 누에 1두씩 6 well plate에 넣고, IJ(infective juvenile) 단계의 선충 접종량은 숙주당 1 마리 및 2 마리 구를 병행하였다. 24시간 마다 치사한 숙주를 조사하여 개체별로 격리 배양하고, 조기 감염치사 및 증식이 양호한 계통을 위주로 선발하였다. 1주일

간 100마리 이상의 선충이 분리되는 시험구 중 가능한 1 마리 접종구를 우선으로 계대하고, 1개월 간격으로 4~5회 누대선발하여 계통이 수립된 다음의 누대사육은 숙주 1두당 선충 5마리씩 접종하였다.

곤충에 대한 병원성이 우수한 선충 선발은 2령과, 3, 4, 5령의 1일째 누에 유충과 상족후 10일 경과한 누에 번데기를 사용하였고, 숙주 : 선충의 접종량은 일정하게 1:5의 비율로 하였다. 6시간 간격으로 치사율을 조사하여 2~3일 경과 후 White trap에서 선충의 분리를 확인하였고, LT₅₀값과 LT₁₀₀값을 구하였다. 털검정파리유충(*Calliphora vomitoria*)과 멸강나방유충(*Pseufoaletia separata*)은 1마리당 선충 100마리의 비율로 IJ를 접종하였다. 활동성이 강한 북방폴도린재(*Palomena angulosa*)의 병원성 검증은 위의 방법에 준하되, 10×10×5 cm의 반투명 플라스틱상자(가로×세로×높이)에서 시험하였다. 왕풍뎡이유충(*Melolontha incana*)은 직경 5 cm 높이 20 cm인 유리병에 멸균한 토양(123°C, 45분)을 10 cm 높이가 되도록 채워 1000마리/10 ml로 조정된 선충을 주입하고 모든 실험은 대조구와 함께 3반복으로 수행하였다.

3. 형태적 분류 및 PCR-RAPD.

선충표본 제작은 Choi & Ra (1994)의 방법에 준하였으며, Nikon eclipse E600 현미경으로 관찰하고, Image-Pro Plus 화상분석 시스템(Media Cybernetics)으로 형태와 크기를 측정하였다.

White trap에서 분리된 IJ단계 선충을 실체현미경을 사용하여 well slideglass로 2~3마리씩 옮기고 증류수로 충분히 세정하고 멸균증류수를 주입한 새로운 well slideglass로 옮겨 pin머리로 마쇄하여 template DNA로 사용하였다(Genetik et al. 1996; Nasmith et al. 1996; Pinochet et al. 1994).

30종의 primer(arbitrary primer set; (주) 바이오니아)와 UBC사의 random primer set(University of British Columbia RAPD Primer Set #4)로 RAPD-PCR을 실시하였다. PCR 반응액은(주)바이오니아의 20μl Premix-Top [250 μm dNTP, 50 mM Tris-HCl(pH 9.0) 40 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂]을 사용하였고, 준비한 template DNA와 random primer 20 pmole을 첨가하였다. DNA 시료는 먼저 95°C에서 2분간 변성시킨 후 96°C에서 1분간 재변성시켰고, 37°C에서 1분간 annealing 하였다. 그 다음, 72°C에서 2분간 extension하여 DNA를 증폭시키는 과정을 1 cycle로 하여 45회 증폭하고, 마지막으로 72°C에서 10분간 last extention 후 4°C로 유지하는 조건으로 PCR을 실시하였다. PCR 산물은 1.2% agarose

Table 1. Nucleotide sequence and GC content of random primers used for PCR of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis in the nematodes

Primers*	Sequence (5' to 3')	GC content (%)
303	GCGGGAGACC	80
304	AGTCCTCGCC	70
314	ACTTCCTCCA	50
331	GCC TAGT CAC	60
341	CTGGGGCCGT	80
344	TGTTAGGCAC	50
351	CTCCCGGTGG	80
352	CACAACGGGT	60
356	GCGGCCCTCT	80
358	GGTCAGGCC	80
360	CTCTCCAGGC	70
364	GGCTCTCGCG	80
370	TCAGCCAGCG	70
371	TCTCGATTGC	50
378	GACAACAGGA	50
382	ATACACCAGC	50
386	TGTAAGCTCG	50
387	CGCTGTCGCC	80
#24	CTGGCGGCTG	80
#27	TGACGCGCTC	70

* Primers 304~387, taken from 100 of the RAPD Primer Set # 4 of UBC (University of British Columbia); Primers #24 and # 27, taken from 30 arbitrary primers (BIONEER, Korea).

gel과 TBE buffer를 이용하여 5 V/cm로 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하여, UV사진을 촬영하였으며, band 양상이 뚜렷한 20개의 primer를 선발하였다 (Table 1).

RAPD 결과는 단순일치계수 (simple matching coefficient)에 근거한 유사도 Ntsys-pc로 유사도계수 (coefficient; UN1)를 구하고, 비가중 평균결합법 (UPGMA)에 의한 집괴분석으로 유연관계를 해석하였다 (Avers 1989; Rohlf 1988).

결과 및 고찰

1. 선충 분리 및 계통 선발

우리나라 전역을 대상으로 채집한 100개 지역의 토양 시료는 누에 trap에서 모두 선충이 분리되었으며, 대조구의 누에 번데기는 7~10일 후에 우화하였다. 대조구의 숙주는 20일 이상 생존하였고, 치사 후 선충이 분리되지 않았으나, 선충이 분리된 토양에 투입된 누에 번데기의 평균 생존일수는 11 ± 0.5 일이었다. 대조구에 비하여 시험구에서 숙주의 수명이 1/2 정도로 단축된 것은 선충 감염에 따른 영향으로 인정되었다. 100개의 시험구

는 White trap에서 평균 5 ± 0.4 일 후에 선충이 분리되었고, 토양시료 채취 후 분리하기까지 실온에 보존한 기간은 최단 1일 이내에서 최장 120일까지 다양하지만, 검출 빈도는 100%로서 매우 높게 나타났다. 그 중에서 누에 유충과 번데기에 대하여 병원력이 우수하고 증식률이 높은 28계통의 선충을 선발하였다 (Table 2). 한편, 곤충의 사체에서도 3종의 시험구에서 모두 선충이 분리되었으며, 2계통의 선충을 선발하였다 (Table 3).

선발된 30계통의 선충은 누에 발육단계별 LT_{50} 은 2령 유충에서 28.8 시간, 3령과 4령 유충에서는 32.1 및 31.9 시간, 5령 유충은 42.4시간이었으며, 번데기 시기의 LT_{50} 은 83.2 시간이었다. 2령 유충과 5령 유충의 LT_{50} 은 5령 유충에서 10시간 이상 연장되었으나, 2령과 3령 그리고 4령 간의 차이는 3시간 정도에 불과하였다. 누에의 체구가 커질수록 LT_{50} 값은 증가하지만, 3령과 4령간에는 적용되지 않았고, 번데기 때에는 유충기 보다 40시간 이상 더 길어졌다.

LT_{100} 은 2령 유충이 44.9시간, 3령과 4령 유충이 47.9, 및 49.2시간이었으며, 5령 유충은 61.9시간, 번데기 시기는 120.6시간이었다. LT_{100} 에서도 LT_{50} 과 같이 2, 3, 4령에서는 그 값에 유의차가 없으나 5령 유충에서는 15시간 정도 길어졌고, 번데기 때에는 3배 이상 길어져서 병원성의 저하가 크게 나타났다.

북방폴노린재 성충, 멸강나방 유충, 왕풍뎅이 유충 및 털검정파리유충의 선충에 대한 치사율은 50% 이상으로서 대체적으로 우수한 병원성이 입증되었다 (Table 4).

각 지역에서 채집한 토양 및 곤충의 사체에서 분리된 선충 중에서 곤충에 대한 병원성이 강한 선발계통의 비율은 약 30%로서, 우리나라에서 보고된 4.6% (Choo *et al.* 1996)보다 현저하게 높았다. 이는 표면의 마른 흙을 제거하고 10 cm 이내에서 표본을 채취한 방법과 trap 용 곤충으로 꿀벌부채명나방 (*Galleria mellonella*) 대신 집누에를 사용한 차이에 기인하는 것으로 간주할 수 있다. 집누에 (*Bombyx mori mori*)는 장구한 세월동안 (6,000년 이상으로 추산) 실내에서만 사육되어 선충과의 접촉없이 진화된 결과, 저항성 계통이 선발될 기회가 부여되지 않았기 때문일 것이다. 집누에 trap을 이용한 곤충병원성 선충 검색법은 해충의 생물적 방제에 유리한 토착 선충종의 발굴과 제품화 등 생태환경기술 개발의 가능성을 시사하였다.

2. RAPD와 선충의 동정

20종의 primer를 선발하여 30계통 선충에 대한 genomic DNA의 PCR 결과 RAPD band를 (Figs. 1, 2) 근거로 계통 간의 유연관계를 나타내는 유사도 계수 (Similarity

Table 2. Entomopathogenic nematode strains selected through in vivo culture by silkworm pupae after isolation from the soil sample of various biotopes

Nematode strains	Localities of soil samples	Date of sampling	Storage time of soil samples (day)	Lethal time of host on the trap (day)	Time for IJ appears after setting of White trap (day)
0602	대구시 산격동 경북대 상전	28 Sep. 96	1	4	6
0605	경북 김천 조마면 채소밭	29 Sep. 96	6	12	3
0607	포항시 북구 우방타운 화단	29 Sep. 96	6	13	2
0610	대구시 동호동 경북대 상전	3 Oct. 96	1	7	9
0614	대구 지산동 녹원맨션 야산	16 Oct. 96	1	8	11
0620	경북 금호강 독 주변	27 Oct. 96	2	14	9
0621	경북 가창댐 정대계곡	28 Oct. 96	17	22	6
0625	경북 청도군 소라리 채소밭	3 Nov. 96	29	13	10
0627	상주 잠사곤충사업장 상전	3 Nov. 96	3	16	7
0628	강원도 원종장 잠업계 상전	4 Nov. 96	2	8	11
0629	경남 밀양산업대학교 상전	6 Nov. 96	1	17	5
0633	경남 창녕군 채소밭	7 Nov. 96	6	9	6
0634	대구시 수성구 범어동 뒷산	10 Nov. 96	6	21	6
0638	경기도 농촌진흥원 본관	29 Nov. 96	2	14	6
0639	충남 예산군 덕산온천 주변	3 Dec. 96	4	17	8
0701	경남 영남 작물시험장	7 Jan. 97	1	17	3
0705	경북 영일군 경북대 수련원	27 Mar. 97	100	17	1
0713	서울시 서울대학 관악캠퍼스	23 Aug. 97	3	8	4
0717	전남 장흥군 금산 밭	16 Oct. 97	1	8	3
0719	전남 화순군 화순읍 밭	16 Oct. 97	1	11	2
0721	경북 구미시 장천면 사과원	17 Oct. 97	1	13	1
0725	경북 군위군 비닐하우스 내	2 Nov. 97	1	7	3
0727	부산시 금정구 동산 화단	2 Nov. 97	2	10	1
0737	경북 청도군 운문사	9 Nov. 97	101	6	3
0741	충북 단양 대강면 남천리 밭	13 Nov. 97	113	15	11
0745	울산 정자동 바닷가 갈대밭	31 Dec. 97	4	7	2
0811	강원 정선군 동면 건천리*	28 Mar. 98	10	13	
0812	전남 고흥 유자시험장	23 Apr. 98	13	10	2

Table 3. Occurrence of nematode infection found on the dead insects collected from field

No.	Host insects	No. of hosts investigated	No. of hosts infected	Percent. of infected host
0E001	<i>Bradysid</i> sp.	30	5	16.7%
0E002	<i>Bombus impatiens</i>	103	47	45.6%

coefficient)가 산출되었다. 이 값을 기초로 NTSYS의 UPGMA(Unweighed Pair-Group Method with Arithmetic average) 방법으로 수지도를 작성하였다(Fig. 3). 공시 선충계통은 유사도 0.819에서 2개의 대집단으로 구분되며, 그중 규모가 큰 집단에는 23계통 비교적 작은 집단에는 7계통이 소속된다. 대집단은 유사도 0.827에서 0.939까지 다양한 유연관계의 선충이 존재하였으므로, 수지도에서 유사도 0.827, 0.841, 0.853, 8.863 등을 분기점으로 다시 세분할 수 있었다. 따라서, 전체 선충계통은

기준이 되는 유사도에 따라 0.819에서는 2개 집단으로, 0.827에서는 3개 집단, 0.841에서는 4개 집단, 0.853에서는 5개 집단으로 분류되었다. 따라서, 0.853을 잠정적인 기점으로 설정하여 성립된 5개 분류군은 수지도의 우상단으로부터 I, II, III, IV, V 등으로 표기하였다. 각 분류군에 포함되는 선충은 일반적으로 2~5 계통에 불과하지만, I분류군에는 19 계통의 많은 선충이 포함되므로, 유사도 0.863 기점에서 Ia 및 Ib 등의 아단위로 세분할 수 있었고, Ia군에는 14계통 Ib군에는 5 계통의 선충이 포함되었다. I분류군은 공통적으로 두부 선단이 계단식으로 좁아진 offset 형이며, 구순이 융합되지 않고 갈라져 있어서 다른 group과 구별되었다. 식도는 rhabdoid 형(Choi & Ra 1994)이며, 식도협세부가 뚜렷하게 관찰되었다. I분류군에서는 암컷의 음순이 함몰되어 있었고, 수컷에는 교접낭이 존재하였으며, 교접낭은 선충 계통별로 형태와 크기가 다양하였다. 교접돌기의 위치와 수는 각 계통에 따라 다르게 나타났으나, 교접자가 쌍으로서 선

Table 4. Pathogenicity and multiplicity of nematode strains to the adult of *Palomena angulosa*, *Pseufaletia separata*, *Melolontha incana*, and *Calliphora vomitoria*

host nema	<i>Palomena angulosa</i>		<i>Pseufaletia separata</i>		<i>Melolontha incana</i>		<i>Calliphora vomitoria</i>	
	Mortality (%)	Reproduction	Mortality (%)	Reproduction	Mortality (%)	Reproduction	Mortality (%)	Reproduction
0E01	69±0.0	3,800± 26.5	100±0.0	3,210±58.3	90±5.8	134,000±1,352.7	95±5.8	350± 6.9
0E02	78±0.0	60,900±144.3	82±8.8	20±56.0	75±1.2	8,000± 245.9	75±1.3	980±40.9
0602	66±0.0	84,000±198.0	70±3.3	590±32.3	80±0.9	9,900± 144.3	83±5.8	830± 5.8
0605	85±13	7,500± 69.2	92±0.9	2,700±11.5	85±1.3	7,500± 69.2	57±1.3	430±11.5
0607	78±1.2	870± 17.3	88±0.9	2,870±17.3	78±1.3	12,000± 692.8	63±1.1	300±30.5
0610	59±0.9	78,200±577.3	78±0.3	1,200±47.9	77±0.9	18,200± 577.3	48±1.0	380±13.2
0614	70±1.2	5,400±248.2	86±0.3	2,800±31.7	83±0.3	101,200± 479.2	56±8.3	450± 5.7
0620	89±0.3	32,000± 57.7	92±0.3	2,200±47.9	76±0.3	63,200± 317.5	50±1.3	860±51.9
0621	0	0	81±0.0	3,010±63.5	85±1.3	7,500± 69.2	54±1.0	660±17.3
0625	75±3.5	8,660±346.4	79±6.6	2,000±51.9	87±0.3	112,000± 958.4	51±1.2	870±35.7
0627	0	0	75±0.3	1,200±47.9	75±1.2	75,400± 259.8	57±2.0	480± 8.6
0628	87±1.5	780± 20.2	50±1.0	670±30.5	55±0.3	3,200± 461.8	66±1.2	420±49.6
0629	52±2.5	2,200±115.4	92±0.3	3,000±11.5	59±0.3	5,300± 86.6	66±0.9	330±30.5
0633	82±1.3	112,000±692.8	78±3.5	660±38.6	82±0.3	52,000± 132.7	55±3.5	560±23.0
0634	82±0.3	3,200±461.8	77±3.9	850±11.5	75±3.5	8,660± 346.4	72±1.2	1,000±34.6
0638	71±1.2	7,000±121.2	87±1.5	780±20.2	72±1.2	5,870± 17.3	57±1.7	280±10.3
0639	93±1.9	8,600± 46.1	79±0.3	1,200±36.3	87±1.5	12,200± 20.2	55±5.0	250± 5.8
0701	0	0	62±0.3	200±31.7	53±1.9	8,600± 473.4	82±0.7	1,100±57.7
0705	86±0.3	97,200± 62.9	80±0.9	1,400±20.2	45±0.0	790± 37.5	75±1.1	1,570±28.8
0713	92±0.3	72,200±230.9	75±3.5	1,280±34.6	32±0.0	850± 60.6	85±3.5	1,500±51.8
0717	68±0.3	1,200± 47.9	86±0.3	3,100±30.5	55±2.5	780± 115.4	85±1.3	2,000±52.5
0719	61±1.2	850± 53.1	15±1.5	400±58.3	80±0.3	1,200± 62.9	60±0.3	1,000±35.7
0721	76±0.3	200± 31.7	37±1.5	570±11.5	25±1.2	150± 14.4	62±1.3	270±13.2
0725	92±0.3	52,000±132.7	55±2.0	660±11.5	38±0.3	2,200± 230.9	68±1.3	700±17.3
0727	87±1.9	3,800± 39.2	12±1.2	850± 5.7	68±0.9	6,660± 502.2	62±1.3	2,000±52.5
0737	65±3.5	1,000± 35.7	23±3.5	50±14.4	35±3.5	1,000± 8.6	65±3.5	660±34.6
0741	75±3.5	5,800± 92.3	68±1.5	1,560±23.0	61±1.2	5,850± 53.1	71±1.2	870±35.7
0745	92±0.9	56,660±502.2	65±3.5	800±11.5	55±3.5	850± 34.6	72±0.3	920±47.9
Cont.	0.	0	0	0	7±0.3	0	0	0

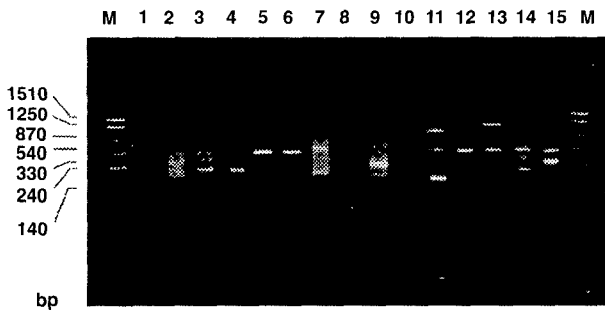


Fig. 1. RAPD profiles generated by primer 341 with various nematode strains (1, 0E01; 2, 0E02; 3, 0602; 4, 0605; 5, 0607; 6, 0610; 7, 0614; 8, 0620; 9, 0621; 10, 0625; 11, 0627; 12, 0628; 13, 0629; 14, 0633; 15, 0634; M, DNA marker).

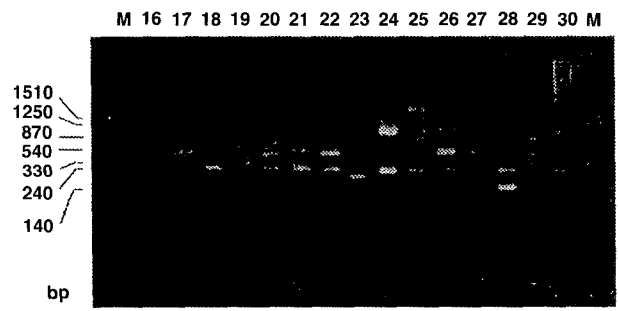


Fig. 2. RAPD profiles generated by primer 341 with various nematode strains (16, 0638; 17, 0639; 18, 0701; 19, 0705; 20, 0713; 21, 0717; 22, 0719; 23, 0721; 24, 0725; 25, 0727; 26, 0737; 27, 0741; 28, 0745; 29, 0811; 30, 0812; M, DNA marker).

단이 분리되어 있고 부자를 갖는 점 등을 분류기준과 대조한 결과, Rhabditida의 Rhabditidae로 동정되었다(Nickle 1984; Poinar 1979c). I분류군에는 1난소형인 선충과 2난소형인 두가지 유형의 선충계통이 공존하였

다. I분류군의 선충은 식별번호에 Rhabditidae의 R을 인용하고, 난소의 유형에 따라 고유번호 첫자리의 0 대신 R1(1난소형) 및 R2(2난소형)를 부가하였다. 분자생물학적 유사도 0.863 기점에서 분류되는 Ia 및 Ib 아군은

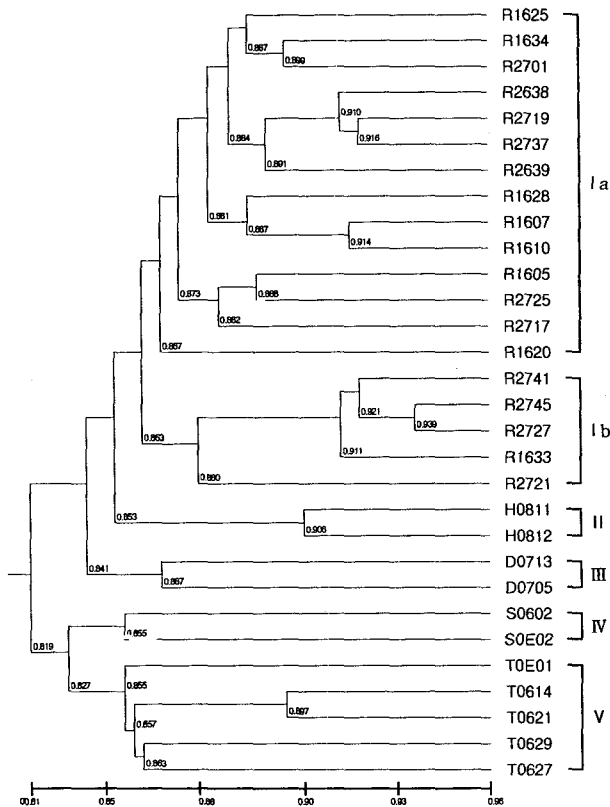


Fig. 3. UPGMA dendrogram derived from RAPD data of nematodes.

난소형에 따른 분류와 일치하지는 않았으나, Ia는 1난소형과 2난소형이 50%로 분포하며, Ib는 2난소형이 80%로서 다수를 차지하였다.

I아군에서 1난소형의 *Rhabditis* sp. R1605은 *Rhabditis* sp. R1610보다 암컷의 크기가 1.8배 정도 크지만, 수컷의 크기는 두 계통 간에 비슷한 경향을 나타내었다. Ia 아군 중에서 분자생물학적 유연관계는 *Rhabditis* sp. R1620이 유사도 0.867로서 가장 낮았고, Ib아군 중에서는 *Rhabditis* sp. R2721이 다른 계통보다 거리가 먼 계통이었다. 1난소형은 배출공이 후부식도구와 비슷한 위치에서 관찰되었고, 신경환은 배출공 앞에 위치하였으며, 장과 직장을 연결하는 부위에는 3개의 직장선이 있었다. 수컷의 경우 교접자는 교접낭밖으로 복부쪽을 향해 있으며, 10쌍의 교접돌기가 있었으며, 암컷의 꼬리 모양은 group 내에서 계통별 변이가 관찰되었다.

II분류군에 포함되는 선충 2계통은 유사도가 0.906으로서 비교적 근연관계였다. 두 선충의 공통적인 특징은 두부가 둥글고 구순은 다소 돌출되었으며, 중부식도부와 식도협세부는 뚜렷하지 않으나 후부식도부는 명료하였고, 신경환은 배출공 앞에 위치하였다. 수컷의 꼬리 주위

에 교접낭과 9쌍의 교접돌기를 갖고 있으며, 교접자는 쌍으로 분리되어 있었고, 부자가 존재하였다. 암컷의 난소는 쌍이었으나, 수컷은 두부쪽으로 반전된 1개의 정소를 지녔다. 이러한 특징은 *Heterorhabditidae*의 분류기준과 일치하였다(Gaugler & Kaya 1990; Poinar 1979e). 따라서, 이들 선충은 *Heterorhabditis* sp.로 동정하였다. *Heterorhabditis* sp. H0812의 암컷은 3,350 μm로서 공식 선충 30 계통 중 현저하게 체구가 크고, *Heterorhabditis* sp. H0811의 암컷도 동등한 크기였다. 두 선충은 교접돌기의 배열방식이 명확하게 구별되며, *Heterorhabditis* sp. H0812는 항문 앞쪽에 3쌍, 뒤쪽으로 6쌍의 교접돌기가 관찰되었다. *Heterorhabditis* sp. H0811의 교접돌기는 4열로 배열되었고, 몸통 쪽에서 미부 선단을 향하여 제 1열은 1쌍, 제 2열은 2쌍, 제 3 및 4열은 각각 3쌍이 존재하며, 처음 1쌍은 다른 쌍에 비하여 크기가 작고 그 외는 모두 비슷하였다.

III분류군도 다른 모든 분류군에서와 같이 구침은 없으나, 구강에는 2개의 긴 이빨을 가지고 있었고, 식도는 전형적인 rhabdoid형으로서, 전부식도는 좁고 중부식도로 확장되며, 식도협세부는 특히 좁았다. 암컷의 꼬리는 대체로 가늘며 길었고, 음문은 앞쪽으로 돌출되었고, 난소는 쌍으로 반전되어 있었다. 수컷은 정소가 1개로서 반전되어 있었고, 교접낭은 갖고 있지 않았고 교접자는 쌍이며, 부자는 짧고 끝이 갈고리 모양처럼 휘어져 있었다. 이와같은 형태적 특징을 참조할 때 *Diplogasteridae*에 속하는 선충으로 판단되었다(Poinar 1979b). *Diplogasteridae* D0705는 9쌍의 생식돌기를 갖고 있으며 교접자는 갈색이었으나, *Diplogasteridae* D0713의 교접자는 갈색을 띄지 않았다.

IV분류군의 두 계통의 유사도는 *Rhabditida*보다는 *Tylenchida*와 더 근연이지만, 암컷은 난소가 쌍이며 반전되어 있으며, 수컷은 꼬리에 교접낭이 없고 생식돌기가 있으며, 교접자는 2개이며 서로 분리되어 있고 부자를 지닌 점은 IV분류군의 경우와 같으며, 이는 RAPD에서도 두 분류군이 근연인 점과 같은 경향을 나타내었다. 구순은 모두 융합되어 있고, 식도는 전형적인 rhabdoid형으로 *Rhabditida*의 특징과 일치하였다(Gaugler & Kaya 1990; Nickle 1984; Poinar 1979a). 식도협세부 주위는 신경환이 싸고 있으며, 배출공은 신경환 앞에 위치하였다. 이와같은 특징을 대조할 때, *Rhabditida* 중에서 *Steinernematidae*에 속하는 것으로 결정되었다(Nickle 1984; Poinar 1979d). 그러므로 0E02 및 0602 계통은 *Steinernema* spp. S0E02 및 S0602로 명명하였으며, 유사도가 높은 두 계통은 수컷의 꼬리 모양을 제외한 특징은 거의 일치하였다. 미부의 차이점으로서, *Steiner-*

Table 5. Variation of RAPD fragment bands and specific patterns with arbitrary primers on the discrimination for the nematode groups of 30 strains

Primers	Total no. of bands/primer	Average no. bands/strain	No. band patterns	Strain specific band patterns	No. divisiable groups	Section of nematode groups
303	80	2.7±1.56	24	21	2	IV/Ia Ib II III V
304	65	2.2±0.91	15	13	5	Ia Ib/II/III/IV/V
314	83	2.8±2.06	23	20	2	II/Ia Ib III IV V
331	67	2.2±0.97	16	13	3	III/IV/IaIb II V
341	82	2.7±1.55	17	9	2	II/IaIb III IV V
344	59	1.9±1.07	18	14	2	II/Ia Ib III IV V
351	84	2.8±1.95	21	17	3	II/V/Ia Ib III IV
352	79	2.6±1.59	22	17	4	IV/Ia Ib V/II III
356	79	2.6±2.07	21	17	4	III/IV/V/Ia Ib II
358	115	3.8±2.11	25	22	4	III/IV/V/Ia Ib II
360	57	1.9±1.04	18	11	2	II/Ia Ib III IV V
364	64	2.1±1.11	21	14	1	Ia Ib II III IV V
370	59	1.9±0.85	20	16	5	Ia Ib/II/III/IV/V
371	79	2.6±1.27	22	16	1	Ia Ib II III IV V
378	69	2.3±2.02	19	14	1	Ia Ib II III IV V
382	55	1.8±1.09	19	15	3	III/IV/Ia Ib II V
386	78	2.6±1.27	23	17	2	II/Ia Ib III IV V
387	71	2.4±1.33	24	19	4	II/III/IV/Ia Ib V
#24	82	2.7±2.64	10	7	2	II/Ia Ib III IV V
#27	44	1.5±0.63	16	9	3	II/IV/Ia Ib III V

Table 6. Selection of two primers unable to identify 30 nematode strains by combination of RAPD profiles following the result of PCR with 20 of individual primer

Primers	303	304	314	331	341	344	351	352	356	358	360	364	370	371	378	382	386	387	#24	#27	
303	-																				
304	-	-																			
314	-	-	-																		
331	-	-	-	-																	
341	-	-	-	-	-																
344	±	-	-	-	-	-															
351	-	-	-	-	-	-	-														
352	±	-	-	-	±	±	⊙	-													
356	±	-	-	-	-	-	±	-	-												
358	●	-	⊙	-	±	±	±	⊙	±	-											
360	-	-	-	-	-	-	-	±	-	±	-										
364	±	-	-	±	±	-	-	±	±	±	-	-									
370	-	-	-	-	-	-	-	±	-	±	-	-	±								
371	±	-	±	±	-	±	-	±	±	±	-	±	-	-							
378	-	-	-	-	-	-	±	±	-	±	-	-	-	±	-						
382	-	-	-	±	-	-	-	±	±	±	-	±	±	±	-	-					
386	-	±	-	-	-	±	⊙	±	±	-	-	±	±	±	±	±	-				
387	⊙	-	-	-	±	-	-	±	-	±	-	±	±	±	-	±	-	-			
#24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
#27	-	-	-	-	-	-	±	-	-	±	-	±	-	±	-	-	±	±	-	-	-

●, 30 strains of nematodes were distinctly identifiable without marker DNA; ⊙, easily discriminable with markers; ±, indispensable of marker DNA; -, impossible of discrimination by two primers.

nema sp. S0602는 수컷의 교접자 끝이 뾰족하고 배부쪽을 향해 활모양으로 휘어있었고, 암컷의 꼬리는 짧은 원뿔형이며 음문은 가로 홈이 있고 다소 돌출되어 있었다.

한편, *Steinernema* sp. S0E02는 교접자와 부자는 갈색을 띠고 있었으며, 수컷의 미부가 원뿔형으로 끝이 뾰족하였다. 두 계통의 공통점은 식도협세부와 후부식도구가

명료하게 관찰되며, 신경환은 후부식도구 앞에 위치하였으며, 암컷의 자궁 내에 난과 1령 유충이 혼재하는 경우가 관찰되었다. IV분류군의 한 유형으로 제시한 *Steinernema* sp. S0602는 속까지 동정되었으며, 형태적 특성은 *Steinernema carpocapsae* (Poinar 1979d)와 일치하였다. 그러나, *Steinernema* sp. S0602의 미부에 mucron이 없으므로, 우리나라에서 보고된 곤충병원성 선충으로서 동종의 *S. carpocapsae*가 미부의 돌기를 지닌 점과는 명확히 구별되었다 (Stock *et al.* 1997).

V분류군에 속하는 선충은 수컷의 꼬리에 교접낭 및 미부돌기가 없고, 교접자는 쌍으로서 분리되어 있었으며 정소는 1개였다. 암컷의 난소 역시 1개로서 두부 쪽으로 반전되어 있었다. 중부식도구는 존재했으며, 기부에 구침을 갖지 않는 등 형태적 특징을 종합해 볼 때 Tylenchida에 속하는 것으로 판단되었다 (Poinar 1979f). 그러므로 이들 선충계통의 식별기호는 Tylenchida의 T를 참조하여 각각 T0E01, T0614, T0621, T0629, T0627 등으로 표기하였다. Tylenchida T0E01은 곤충에서 분리된 계통으로서 토양에서 분리된 다른 계통과 유사도가 비교적 낮았으며, V분류군 중에서 가장 근연인 Tylenchida T0614와 T0621은 꼬리 모양이 비슷하고, 점차적으로 끝이 뾰족해졌으며, 다른 선충에 비하여 장과 항문이 퇴화되어 있었다. 한편, Tylenchida T0E01, T0627, T0629 계통은 공통적으로 꼬리가 둥글면서 끝에 미돌기 (mucron)를 갖고 있으며, Tylenchida T0627 및 T0629는 배출공이 신경환 앞쪽에서 관찰되었다. 특히 분자생물학적 유연관계가 상대적으로 먼 Tylenchida T0E01의 경우 배출공이 관찰되지 않는 등, 동일 분류군 내에서도 분자생물학적 유사도와 형태적 특징 간에 일정한 연관성이 인정되었다. 성숙한 암컷의 경우 체강에는 발육단계의 난으로 채워져 있었고, 크기는 350~356 μm 로서 다른 계통의 선충과 비교할 때 체형은 현저한 차이를 보였다.

선충의 형태적 분류의 어려움을 보완 또는 개선할 수 있는 방법을 강구하기 위하여, 각 분류군의 식별에 관련된 RAPD pattern을 primer 별로 조사하였다 (Table 5). primer 304 및 370의 결과를 대조하므로써 30계통의 선충이 5개 군으로 구분되었으나, 각 분류군 내의 선충 간에는 band pattern이 중복된 경우가 있었다. 그러므로, I분류군 내에서 Ia 및 Ib아군의 구별은 물론 1난소형과 2난소형의 구분은 모두 불가능하였다. 그 밖의 primer는 2~4분류군으로 구별되거나, 분류군 간의 식별이 전혀 불가능한 경우도 있었다. 그러나, 303, 314, 341, 351, 358, #24, 등의 primer는 30계통의 선충에서 증폭된 DNA 단편의 총 band 수가 80종 이상으로 상당히 많은

특성이 확인되었다. 이와 같은 primer는 선충 계통에 따라 고유한 bend pattern을 다수 나타내며, primer 303과 358 단독으로 분별가능한 계통 수는 30계통 중 각각 21 및 22 계통이었다. 따라서 두 개의 primer만으로 30계통을 완전히 식별할 수 있는 가능성이 제기되었고, 20개 primer에서 관찰되는 band pattern을 비교하여 이상적인 조합을 선발하였다 (Table 6). 그 결과, Marker DNA를 동시에 전기영동할 경우 공시 선충 30계통을 모두 식별할 수 있는 조합은 6개였고, maker DNA 없이도 분별할 수 있는 이상적인 primer로서 303 및 358의 조합이 확인되었다. Primer 303과 358은 개별적인 PCR 결과만으로는 각각 21 및 22개의 선충이 식별되지만, 두 결과를 동시에 비교할 경우 30계통의 선충에 대한 개별적인 동정이 가능하였다.

선충은 동물계 중에서도 크기가 매우 작아서 현미경으로 관찰하는 어려움이 있고, 외견상 단순하므로 관행의 형태적 분류는 수많은 종의 분류에 큰 제한요인이 된다 (Freckman & Baldwin 1990). 또한, 현미경 관찰을 위해 필수적인 선충 표본 제작에는 숙련된 기술과 시간이 소요되고 (Tanada & Kaya 1993), 형태의 단조로움 때문에 생식기의 유형이 주요 분류기준이므로, 동정에는 생식기가 분화된 성충이 반드시 필요하다 (Maggenti 1991). 그러나, RAPD를 도입한 동정법은 손쉽고, 생활사를 통하여 균일한 발육단계의 개체를 다수 확보할 수 있는 daur larvae 또는 infective juvenile 등 유충기의 선충을 이용할 수 있으므로 매우 효율적이다. 그리고, 선충의 분류를 위한 starch gel electrophoresis (Akhurst 1987) 등에 비하여 결과가 안정적이었다.

참 고 문 헌

- Akhurst RJ (1987) Use of starch gel electrophoresis in the taxonomy of the genus *Heterorhabditis* (Nematoda: Heterorhabditidae). *Nematologica* 33 : 1-9.
- Avers CJ (1989) Measures of genetic relationships among organisms. pp. 353-366 *In* Process and pattern in evolution (Avers CJ ed). Oxford University Press. Oxford.
- Choi YE & YJ Ra (1994) Plant nematology. pp. 202-206. Hyang Moon Sa. Seoul.
- Choo HY, JB Kim & DW Lee (1996) Entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from Korea with a key to the *Steinernema*. *Korean J. Soil Zoology* 1 : 28-36.
- Freckman DW & JG Baldwin (1990) Nematoda. pp. 155-168. *In* Soil biology guide (Dindal DL ed). John Wiley & Sons. New York.
- Gaugler R & HK Kaya (1990) Biology and taxonomy. pp.

- 23-90. In *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control* (Gaugler R & HK Kaya eds). CRC Press, Boston.
- Genetik CG, K Andreas, H Martin, S Ulrich & K Werner (1996) Direct PCR on fruitflies and blood flukes without prior DNA isolation. *Nucleic Acids Research* **24** : 4100-4101.
- Han SM, MS Han & GS Nam (1998) Causal pathogenesis on the silkworm, *Bombyx mori*, associated with entomopathogenic nematoda. *Korean J. Seric. Sci.* **40**: 117-125.
- Haymer D & D McInnis (1994) Resolution of populations of the Mediterranean fruit fly at the DNA level using random primers for the polymerase chain reaction. *Genome*. **37** : 244-248.
- Ibrahim SK, RN Perry, PR Burrows & DJ Hooper (1994) Differentiation of species and populations of Aphelenchoides and of ditylenchus angustus using a fragment of ribosomal DNA. *J. Nematol.* **26** : 412-421.
- Kaya HK (1987) Disease cause by nematodes. pp. 453-470. In *Epizootiology of insect diseases* (Fuxa JR & Y Tanada eds.)
- Maggenti AR (1991) Nemata : Higher classification. pp. 147-187. In *Manual of agricultural nematology* (Nickle WR ed.). Maecel Dekker, New York.
- Nasmith CG, D Speranzini, R Jeng & M Hubbes (1996) RFLP analysis of PCR amplified ITS and 26S ribosomal RNA genes of selected Entomopathogenic nematodes (Steinernematidae, Heterorhabditidae). *J. Nematol.* **28** : 15-25.
- Nickle WR (1984) *Plant and Insect Nematodes*. pp. 628-890. Marcel Dekker, New York and Basel.
- Pinochet PJ, L Cenis, C Fernandes, M Doucet & J Marull (1994) Reproductive fitness and random amplified polymorphic DNA variation among isolates of *Pratylenchus vulnus*. *J. Nematol.* **26** : 271-277.
- Poinar GO Jr (1979a) Key to entomogenous nematodes. pp. 7-10. In *Nematodes for biological control of insects* (Poinar GO Jr ed). CRC Press, Florida.
- Poinar GO Jr (1979b) Diplogasteridae. pp. 82-92. In *Nematodes for biological control of insects* (Poinar GO Jr ed). CRC Press, Florida.
- Poinar GO Jr (1979c) Rhabditidae. pp. 92-95. In *Nematodes for biological control of insects* (Poinar GO Jr ed). CRC Press, Florida.
- Poinar GO Jr (1979d) Steinernematidae. pp. 95-165. In *Nematodes for biological control of insects* (Poinar GO Jr ed). CRC Press, Florida.
- Poinar GO Jr (1979e) Heterorhabditidae. pp. 165-180. In *Nematodes for biological control of insects* (Poinar GO Jr ed). CRC Press, Florida.
- Poinar GO Jr (1979f) Tylenchida. pp. 180-194. In *Nematodes for biological control of insects* (Poinar GO Jr ed). CRC Press, Florida.
- Poinar GO Jr, JS Evans & E Schuster (1983) Field test of the entomogenous nematode, *Neoplectana carpocapsae*, for control of corn rootworm larvae (*Diabrotica* sp., Coleoptera). *Protection Ecol.* **5** : 337-342.
- Rohlf FJ (1988) NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 1.50. Applied Biostatistics Inc.
- Stock SP, HY Choo & HK Kaya (1997) An entomopathogenic nematode, *Steinernem amonticolum* sp.n. (Rhabditida Steinernematidae) from Korea with a key to other species. *Nematologica* **43** : 15-19.
- Tanada Y & HK Kaya (1993) Nematodes, nematomorphs, and platyhelminthes. pp. 459-466. In *Insect pathology* Academic Press, Inc., Tokyo.
- White GE (1929) A method for obtaining infective nematode larvae from culture. *Science* **66** : 302-302.
- Woodring JL & HK Kaya (1988) Steinernematid and Heterorhabditid nematodes: A handbook of biology and techniques, Arkansas Agricultural Experiment Station. pp. 1-30. Fayetteville, Arkansas.
- Wouts WM, Z Mracek, S Gerdin & RA Bedding (1982) *Neoplectana* Steiner, 1929 a junior synonym of *Steinernema* Travassos, 1927 (Nematoda, Rhabditida). *Syst. Parasitol.* **4** : 147-154.

Isolation and Identification of Entomopathogenic Nematodes from Soil and Insect

Sang Mi Han and Myung Sae Han

(*Insect Pathology Lab., College of Agriculture, Kyungpook National University, Daegu, 702-701, Korea*)

Abstract - Nematodes were isolated using silkworm trap through the investigation of 100 soil samples from various biotopes in Korea. The 30 nematode strains from soil and dead insects by the pathogenicity against silkworms (*Bombyx mori mori*) and insect pests of *Calliphora vomitoria*, *Pseudaletia separata*, *Palomena angulosa*, and *Melolontha incana*. Mortality of the silkworm larvae and pupae were as high as 100% by nematode infection, those of insect pests were varied from 20 to 100%. The 30 strains of entomopathogenic nematodes were classified into five groups of Rhabditidae, Diplogatroidae, Heterorhabditidae, Steinernematidae, and Tylenchida by morphological criteria. The genetic relationships among the 30 nematode strains were analyzed by various RAPD bands with twenty primers. The 30 nematode strains were classified into six major subgroups on the basis of the genetic similarity coefficient of 0.853. The grouping by RAPD was agree with those of morphological taxa in discrimination of the higher group, however, was not completely agree in the subgroup. The family Steinernematidae belong to Rhabditida was clarified as closer to the Tylenchida, rather than the other Rhabditida of Heterorhabditidae, Rhabditidae, and Diplogatroidae in genetic distance value. From the result of the morphological classification and RAPD of the genomic DNA showed that genetic relationship analysis furnish information on phylogenetic classification and relationships of entomopathogenic nematodes. The application of genetic similarity will overcome the limitation of taxonomy and classification of morphologically simple nematode. Several primers were confirmed those utility of identification for individual nematode strains, the methods of molecular genetics secured the simplicity, rapidity and accuracy on the selection of entomopathogenic nematodes. [Nematode, Entomopathogenic, Biological control, RAPD].