

경작지 근권 토양내 곤충병원성 선충의 검출 및 정량적 평가

황경숙* · 한상미¹ · 김윤지 · 남필원 · 한송이

목원대학교 생명과학부 미생물학과, ¹농촌진흥청 농업과학기술원

The Detection and a Quantitative Evaluation of Entomopathogenic Nematodes in Cultivated Rhizosphere Soil

Kyung-Sook Whang*, Sang-Mi Han¹, Yun-Ji Kim, Pil-Won Nam and Song-Yi Han

Department of Microbiology, Mokwon University, Daejeon, 302-729, Korea

¹National Institute of Agricultural Science and Technology, Suwon, 441-857, Korea

Abstract - The direct count and MPN (Most Probable Number) methods were used to measure the number of nematodes in soils collected from cultivated and non-cultivated fields. As a result, the number of nematodes from cultivated soils was higher than the non-cultivated soils (NC-1, NC-2). On the other hand, upon measuring the value from the organo farming cultivated soils (OC, OR) and conventional cultivated soils (CC, CR), the former showed 16 times higher than the latter. These results indicate that nematode population which can multiply in the organic compounds abundantly exist in the organo farming cultivated soil. Isolated entomopathogenic nematodes are composed of two orders, which were *Rhabditida* and *Diplogasterida*. To determine the pathogenicity of them using the 5th larvae and pupae silkworm, and the following mean LD₉₀ values were found: 24 to 30 hours in *Rhabditida* and 36 to 48 hours in *Diplogasterida* nematode, respectively. This study indicates that nematodes are sensitive to this kind of environmental disturbance. Isolated entomopathogenic nematodes were suggested that are quite within the realms of possibility for biological control agents.

Key words : entomopathogenic nematode, *Rhabditida*, *Diplogasterida*, MPN

서 론

선충은 미소동물로써 전 세계적으로 거의 모든 생물권에서 발견되며 특히 해양과 토양내에 주로 서식하고 있다. 그중 많은 종이 사람과 가축을 포함한 모든 동식물에 기생하며 질병을 일으키기도 하고 경제적인 큰 피

해를 주기도 한다 (Maggenti 1991).

토양은 선충의 가장 적합한 서식지로서, 토양 입자 주변의 얇은 수막에 존재하기도 하지만 대부분 식물체의 뿌리 부분에 가장 많이 서식하는 것으로 알려져 있다 (Ingham and Detling 1984). 이들 선충은 토양생물의 10% 이상을 차지하며 일부 지역에서는 토양 1g 당 수천 마리의 선충이 서식하는 것으로 알려져 있다 (Suarez and Lorenzo 2000). 토양내 식물기생성 선충은 직접 병을 일으킬 뿐만 아니라 식물조직의 상처를 통해 다른

* Corresponding author: Kyung-Sook Whang, Tel. 042-829-7593, Fax. 042-829-7590, E-mail. kswhang@mokwon.ac.kr

병원체의 침입을 조장하거나 병원체를 매개하는 등 간접적인 피해를 주어 그 방제에 관한 많은 연구가 행해져 왔다(Ingham and Delting 1984; Yeates *et al.* 1993). 토양 중에는 이들 식물기생성 선충 뿐만 아니라 유기물의 분해자로서 자유생활을 하는 선충과 곤충에 절대적 또는 임의적 내부기생자로서 토양생태계에 중요한 역할을 담당하는 유익 선충류도 있다. 이중 곤충기생성 선충은 농작물 해충방제를 위한 화학적 농약을 대신할 생물농약으로 주목 받고 있다(Bedding and Miller 1981; Bird *et al.* 1998; Mirto *et al.* 2002; Sanyal 2000).

선충의 생태학적 연구는 극히 저조한 편으로, 특히 자유생활 선충이나 곤충기생성 선충에 대한 정량적 평가 및 분류학적 연구는 매우 미흡한 실정이다(Jorgenson 1984; Adamson 1987; Griffin *et al.* 2000). 토양 생태계의 중요한 생물적 인자라 볼 수 있는 선충군집에 관한 연구가 절실히 필요한 실정이다(Choi 1996).

본 연구에서는 경작지 근권 토양내에 서식하는 선충의 정량적 평가를 수행하고, 토양내 유용 선충군인 곤충병원성 선충의 분포율과 우점 선충군의 분류학적 위치를 검토하였다. 특히 토양내 선충의 정량적 평가는 해부현미경 하에서 직접검경을 통해 계수하는 직접계수법(Sturhan and Mrack 2000)과 토양미생물의 계수에 사용되고 있는 MPN(Most Probable Number)법(Alexander 1982)을 이용하여 비교 평가하였다.

재료 및 방법

1. 토양시료

충청남도 금산군의 10년 이상 유기농법을 실시해온 배추재배지 근권토양(OC), 무재배지 근권토양(OR)과 화학비료를 주로 사용하는 관행농법을 실시해온 동일작물재배지 근권토양(CC, CR)을 대상으로 작물의 근권부분 3개 지점으로부터 토양시료를 채취하였다. 대조구 토양으로는 비경작지 토양(NC-1, NC-2)을 선정하여 시료를 채취하였다.

2. 선충의 분리

채취한 토양시료를 골고루 섞은 후 10g의 토양을 90 ml의 증류수에 넣고 토양 입단을 잘 현탁한 후 토양속의 선충이 상층부로 부유하도록 정치하였다. 30 mesh체를 이용하여 유기물과 굵은 모래 등을 골라내고, 체를 통과한 현탁액을 용기에 받아 토양 입자를 침전시킨 후 상층액을 325 mesh체로 거르는 과정을 2~3회 반복하

였다. 선충이 포함된 현탁액 45 ml와 80%의 설탕물 5 ml를 섞어 원심분리기로 분리하였다. 이때 원심분리기는 4000 rpm에서 3분간 수행하였다. 수집된 선충을 직경 2 cm 되는 시험관에 옮겨 시료로 사용하였다.

3. 선충의 밀도 조사

선충을 시계접시에 담아 도립현미경(DMIL, Leica) 하에서 검경하며 직접계수 하였다(Sturhan and Mrack 2000). 토양 시료 10 g을 90 ml의 증류수에 넣어 잘 혼합한 후, 9 ml의 증류수가 들어있는 blank 시험관에 10⁻¹부터 10⁻⁴까지 순차적으로 연속 희석액을 만들고, 각 희석액으로부터 시료를 100 µl씩 취하여 96 well microplate를 이용하여 각각 8개의 well에 희석액을 접종하였다. 이후 계산법은 Alexander(1982)의 방법에 준하였다.

4. 곤충병원성 선충의 분리 및 동정

토양으로부터 선충의 분리는 silkworm trap을 사용하였다(한과 한 1999). 치사한 누에 번데기는 petri dish로 옮기고 실온에서 2~3일 경과한 후 white trap(White 1929)을 설치하여 누에 번데기로부터 곤충병원성 선충을 분리하였다.

분리한 선충은 FG 4-1(formalin : glycerin : 증류수 = 10 : 1 : 89) 고정액으로 고정하고 seinhorst's solution II(glycerin : 96% alcohol = 5 : 95)를 첨가하여 40°C의 항온기에서 24시간 두어 순수 glycerin으로 탈수, 고정하여 표본을 제작하였다. 표본 제작한 선충은 image analyser를 사용하여 선충의 두부, 식도 및 생식기의 형태를 관찰하여 동정하였다.

5. 곤충병원성선충의 병원성 검정

10φ petri dish에 2장의 filter paper를 깔고, 공시 선충 500마리/2 ml의 접종액을 준비하여 전량 주입한 다음 누에 유충과 상족후 10일 경과한 번데기 10마리를 투입하였다. 6시간 간격으로 치사율을 조사하였다.

결과 및 고찰

1. 근권 토양내 선충의 정량적 평가

근권 토양에 분포하는 선충은 경작지 토양이 비경작지 토양에 비하여 높은 분포율을 나타내었으며, 경작지 토양의 경우에도 유기농법을 시행해 온 토양이 관행농법을 시행한 토양보다 높은 분포율을 나타내었다(Fig.

1). 특히 유기농법을 시행한 배추재배지 근권토양(OC)의 경우 토양 1g 당 평균 3700마리의 선충이 조사되어 가장 높은 분포율을 보인 반면, 관행농법으로 경작한 무재배지 근권토양(CR)의 경우 평균 200마리 g⁻¹ soil 미만의 선충이 검출되어 16배 이상의 차이를 나타내었다. 비경작지 토양(NC-1, NC-2)에서는 평균 30~180마리 g⁻¹ soil의 선충만이 검출되었다. 이와 같이 경작지 토양과 비경작지 토양, 유기농법을 시행한 토양과 관행농법을 시행한 각 토양중의 선충 밀도 차이는 토양내 유기물질

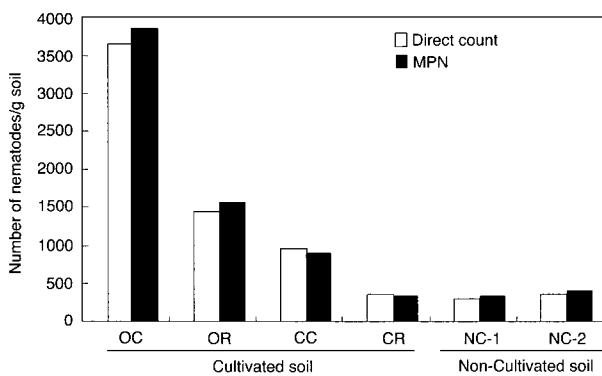


Fig. 1. Comparison of the direct count and MPN method for measure the number of nematode in cultivated and non-cultivated soil. OC: organo farming-chinese cabbage rhizosphere soil, OR: organo farming-radish rhizosphere soil, CC: conventional cultivated-chinese cabbage rhizosphere soil, CR: conventional cultivated-radish rhizosphere soil, NC: non-cultivated soil.

량의 차이에 따른 결과라 판단되며, 유기농법 토양환경이 선충의 생존에 상대적으로 유리하게 작용했기 때문으로 판단되었다. 또한 관행농법 토양의 경우 작물 재배시 과도한 화학비료사용과 화학농약 살포 등으로 토양환경의 변화에 기인한 결과라고 생각된다(Suarez and Lorenzo 2000).

MPN법을 이용하여 선충수를 계수한 결과 직접계수법에 의한 결과와 비슷하게 조사되었다(Fig. 1). 따라서 선충 밀도조사에 토양미생물 계수에 사용되고 있는 MPN법을 이용한다면 종래에 사용하던 직접계수법 보다 간편하고 신속하게 수행할 수 있어 직접검정에 의하지 않고 쾌속하게 계수할 수 있음이 확인되었다.

2. 곤충병원성 선충의 분리 및 동정

곤충병원성 선충은 경작지와 비경작지 토양 모두에서

Table 1. Isolation and classifying of entomopathogenic nematode from each soil

Order	Cultivated soil				Non-cultivated soil	
	OC	OR	CC	CR	NC-1	NC-2
<i>Rhabdoid</i>	12*	8	9	8	10	ND
<i>Diplogasteroid</i>	13	10	14	12	15	ND
Total	25	18	23	20	25	0

*Number of identified entomopathogenic nematodes for *Rhabdoid* or *Diplogasteroid*.
ND; No detected

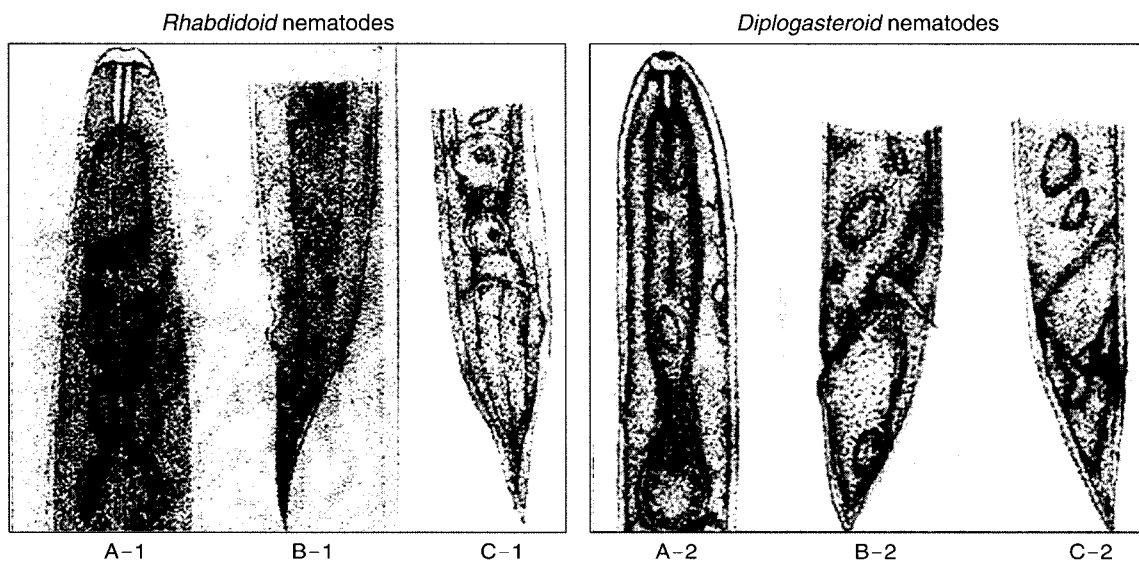


Fig. 2. Morphological characteristics of *Rhabdoid* and *Diplogasteroid* nematodes. (A) Anterior region, (B) Male tail, (C) Female tail.

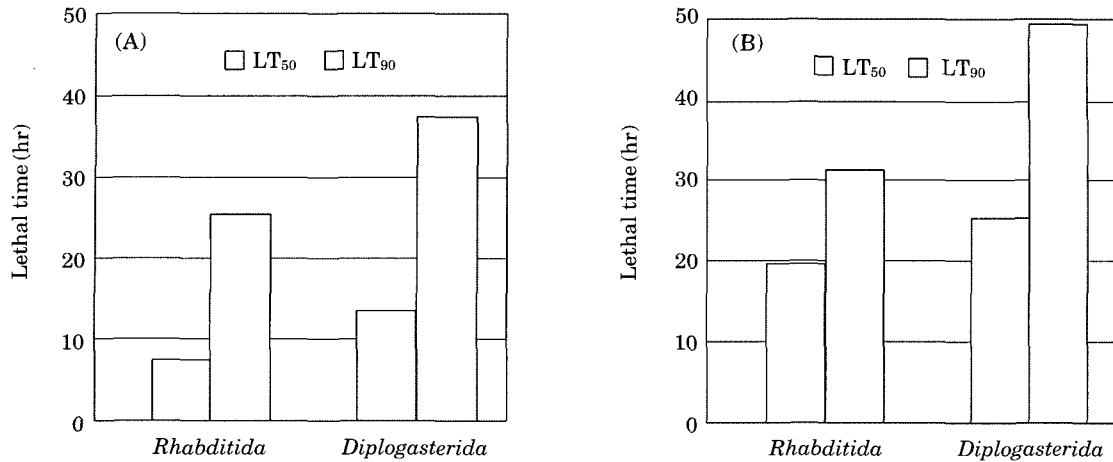


Fig. 3. LT₅₀ and LT₉₀ (hr) of the 5th larvae (A) and pupae (B) silkworm exposure to isolated entomopathogenic nematode strains. The lethal time was measured by the insect mortality time of 10 insects to 50 infective juveniles. LT₅₀ = 50% lethal time, LT₉₀ = 90% lethal time.

검출되었으나, 비경작지 토양인 NC-2 지역의 토양에서는 전혀 검출되지 않았다 (Table 1). 검출된 곤충병원성 선충은 식도의 형태 (Poinar 1979; Arkhurst 1989; Dolinski *et al.* 1998; Lee 2002)에 따라 크게 *Rhabditida*목과 *Diplogasterida*목으로 분류되었다 (Fig. 2). *Rhabditida*목으로 분류된 선충의 특징으로는 구강벽이 뚜렷하게 3개로 나뉘어져 있고, 이빨이 없으며 *Rhabditida*목의 특징인 실린더형의 corpus가 관찰되었고 (A-1), 암컷의 선충은 반전된 2개의 난소를 갖고 (C-1), 미부는 길고 뾰족하였다 (B-1). *Diplogasterida*목으로 분류된 선충에서는 median bulb가 뚜렷하지 않았고, 판으로 되어 있지 않은 end bulb가 관찰되었다 (A-2). 수컷의 교점자는 길게 밖으로 돌출된 특징을 갖고 있었고 (C-2), 미부는 비교적 짧은 특징을 갖고 있었다 (B-2).

모든 경작지 토양에서 상기의 2개 목의 선충이 검출되었는데, *Rhabditida*목 선충은 39~48%, *Diplogasterida*목 선충은 52~68%의 비율로 검출되어 *Diplogasterida*목 선충이 우점을 이루었다. 분리된 *Diplogasterida*목 선충은 임의기생자로서 환경조건에 따라 유기물을 분해하며 자유생활을 하기도 하는 곤충병원성 선충으로서 생존력이 뛰어나 대체적으로 높은 점유율을 보인 것으로 생각된다 (Luong *et al.* 1999).

3. 곤충병원성 선충의 병원성 검정

분리된 *Rhabditida*목 선충과 *Diplogasterida*목 선충의 살충력을 검정한 결과 숙주상태 (유충세대, 번데기세대)에 따라 살충력의 차이를 보였다. *Rhabditida* 선충을 누에 5령 유충에 접종한 결과 24시간 이내에 90% 이상

의 살충력을 보였고, 누에 번데기에 접종한 결과 48시간 이내에 90% 이상의 높은 살충력을 보였다. *Diplogasterida*목 선충도 누에 유충에서는 36시간, 번데기에서는 60시간 이내에 90% 이상의 살충력을 보였다 (Fig. 3).

현재 농작물 해충방제를 위한 생물학적 방제제로 개발되어 상업적으로 이용되고 있는 *Steinernematidae* 선충과 *Heterorhabditidae* 선충의 경우 곤충 기주체에 침입한 후 48시간 이내에 숙주를 치사시키는 것으로 알려져 있다 (Akhurst 1989). 본 연구에서 분리된 *Rhabditida* 선충과 *Diplogasterida* 선충은 48시간 이내에 90% 이상의 높은 살충력을 보여 토양 해충에 대한 생물학적 방제제로서의 활용성이 매우 우수하리라 기대되며, 보다 다양한 종류의 해충에 대한 살충력검정이 필요하다고 판단된다.

적 요

유기농업을 수행해온 배추와 무의 근권토양과 관행농법의 근권토양 및 비경작지 토양으로부터 토양시료를 채취하여 선충의 밀도를 조사하고, 토양내 유익선충인 곤충병원성 선충의 분포상황을 검토하였다. 경작지 토양내 선충 분포율이 비경작지에 비하여 높았고, 유기농업 토양이 관행농업 토양보다 선충의 밀도가 높게 나타났다. 선충의 정량적 평가법으로 직접계수법과 MPN법을 비교 조사한 결과 MPN법이 신속하고 정확한 방법임이 확인되었다. 각 토양으로부터 분리된 곤충병원성 선충은 *Rhabditida*목 선충과 *Diplogasterida*목 선충으로 분류되었다. 이들 선충 중 *Diplogasterida*목 선충이 50% 이

상을 차지하여 높은 점유율을 나타내었다. 누에를 기주체로 사용한 살충력 검정에 있어 24~36시간 이내에 90% 이상의 기주 치사율을 보여 농작물 해충방제를 위한 생물농약으로의 활용 가능성을 나타내었다.

사 사

본 연구는 대신농촌문화재단 2002년도 연구비 지원사업의 일환으로 수행되었습니다.

참 고 문 헌

- 한상미, 한명세. 1999. 남한 토양에서 곤충병원성 선충의 분리. 한국생태학회. 22:255-263.
- Adamson ML. 1987. Phylogenetic analysis of the higher classification of the Nematoda. Canadian Journal of Zoology. 65:1478-1482.
- 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.
- Arkhurst RJ. 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
- Bedding RA and LA Miller. 1981. Use of a nemaode, *Heterorhabditis heliathidis*, to control black vine weevil, *Otiathynchus sulcatus*, in potted plants. Annals of Applied Biology 99:211-216.
- Bird J, M Larsen, P Nansen, HO Kraglund, J Gronvold, SA Jenriksen and J Wolstrup. 1998. Dung-derived biological agents associated with reduced numbers of infective larvae of equine strongyles in faecal culatures. J. Helminthol. 72:21-26.
- Choi YE. 1996. Nematodes of Korea. Ilisa, Daegu. Korea.
- Dolinski C, G Borgonie, R Schnabel and JG Baldwin. 1998. Buccal capsule development as a consideration for phylogenetic analysis of *Rhabditida* (Nematoda) Development, Genes and Evolution, 208:495-503.
- Griffin CT, R Chaerani, D Fallon, AP Reid and MJ Downes. 2000. Occurrence and distribution of the entomopathogenic nematodes *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis indica* in Indonesia. J. Helminthol. 74:143-150.
- Ingham RE and JK Detling. 1984. Plant-herbivore interactions in a North American mixed grass prairie. III. Soil nematode populations and root biomass on *Cynomys ludovicianus* colonies and adjacent uncolonized areas. Oecologia. 63:307-313.
- Jorgenson EC. 1984. Nematicides and nonconventional soil amendanents in the management of root-knot nematode on cotton. J. Nematol. 16:154-158.
- Lee DL. 2002. The Biology of Nematodes Taylor & Francis, New York, USA.
- Luong LT, EG Platzer, P DeLey and WK Thomas. 1999. Morphological, molecular and biological characterization of *Mehdinema alii* (Nematoda: *Diplogasterida*) from the decorated cricket (*Grylloides sigillatus*). J Parasitol. 85:1053-1064.
- Maggenti AR. 1991. Nemata : Higher classification. pp. 147-187. In Manual of agricultural nematology. Maecel Dekker. USA.
- Mirto S, RT La, C Gambi, RC Danovaro and A Mazzola. 2002. Nematode community response to fish-farm impact in the western mediterranean. Environ. Pollut. 116:203-214
- Poinar GO. 1979. Rhabditidae. pp. 92-180. In Nematodes for biological control of insects. CRC Press. USA.
- Sanyal PK. 2000. Screening for indian isolates of predacious fungi for use in biological control aganinst nematode parasites of ruminants. Vet. Res. Commun. 24:55-62.
- 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 form soil. Folia Parasitol. 47:315-318.
- Suarez VH and RL Lorenzo. 2000. Ecology of the free living stages of cattle nematodes during summer contamination in argentina western pampas. Parasite. 7:255-261.
- White GE. 1929. A method for obtaining infective nematode larvae from culture. Science 66:302.
- Yeates GW, T Bongers, RGM de Goede, DW Feckman and SS Georgieva. 1993. Feeding habits in soil nematode families and genera-an outline for soil ecologists. J. Nematol. 25:315-331.

Manuscript Received: May 9, 2003

Revision Accepted: June 7, 2003

Responsible Editorial Member: Jeong Kyu Kim
(Korea Univ.)