

곤충병원선충 (*Steinernema carpocapsae*)의 최적보관을 위한 환경요인

박영진 · 김용균 · 이영근 · 한상찬
(안동대학교 자연과학대학 생명자원과학부 농생물학전공)

Optimal Storage Conditions of the Entomopathogenic Nematode, *Steinernema carpocapsae*

Park, Young-Jin · Yong-Gyun Kim · Young-Keun Yi · Sang-Chan Han
(Major in Agricultural Biology, School of Bioresource Sciences,
College of Natural Sciences, Andong National University, Andong, Korea)

ABSTRACT

Effects of temperature, pH, and salt concentration on the preservation of the infective juvenile entomopathogenic nematodes, *Steinernema carpocapsae*, were analyzed. The effects of acclimation to sublethal low temperature and glycerol concentrations on rapid cold hardening of the nematodes were also evaluated to set up the conditions for their cryopreservation. All tested environmental factors could change the storage effectiveness of the nematodes. These analyses indicated that the optimal storage condition for the nematodes consisted of 15°C, pH 8.5, and 0.5-1.0% salt concentration. The nematodes showed a rapid cold hardening in response to 5°C for 2h. Glycerol induced the nematodes to increase the cold hardiness. Its high concentration over 10%, however, gave a harmful effect on the nematode survival.

Key words : *Steinernema carpocapsae*, preservation, temperature, pH, salt concentration, cold hardiness

서 론

인시목 곤충에 기생하는 주요 곤충병원선충인 *Steinernema carpocapsae*는 Nemata강, Secernentea 아강, Rhabditida목의 Steinernematidae과에 속한다 (Tanaka and Kaya 1993). 이 병원선충은 높은 감염력과 넓은 기주범위로 많은 종류의 곤충들을 감

염시키고 48시간안에 기주를 치사시킨다 (Poinar 1979, Kaya 1985). 기주의 치사는 선충의 장내에 서식하는 공생세균인 *Xenorhabdus nematophilus*에 의해 이뤄지며 병원선충의 성장과 발육에 필수적이다 (Forst *et al.* 1997). 선충의 몸을 통하여 곤충 체내로 침입한 세균은 곤충 혈액의 폐혈증을 유발시켜 치사에 이르게 한다 (Kaya and Gaugler 1993).

이 병원선충은 해충의 생물적 방제인자로서 주목을 받아왔다. 미국 중서부와 뉴잉글랜드의 지방에서 발생되어 호박류에 많은 피해를 일으켜 작물의 경제적 가치를 떨어뜨리는 명나방과의 *Diaphania nitidalis*의 방제에 *S. carpocapsae*를 적용하여 크게 방제효과를 나타내었다 (Shannag et al. 1994). Broadbent와 Olthof (1995)는 온실내에 발생하는 주요한 해충인 굴파리과의 *Liriomyza trifolii*가 살충제에 대해서 넓은 저항성을 가지고 있어서 이를 방제하기 위하여 1988년부터 *Steinernema*와 *Heterorhabditis* 속의 병원선충을 이용하였고 국화에 발생하는 *L. trifolii*의 방제를 위하여 국화잎에 *S. carpocapsae*를 처리하였을 때 2령충에서 85%이상의 효과적인 방제효과를 나타내었다.

요즘 우리 농업이 당면한 현실은 대량의 유기합성농약 살포로 인하여 환경오염이 발생하고 농산물의 가격 경쟁력 문제가 대두되고 있다 (김과 추 1994, 김과 장 1996). 이러한 현실을 극복하기 위해 곤충병원선충과 같은 천적을 이용한 생물적 방제법 개발이 최근에 여러 해충에 시도되고 있다 (Choo et al. 1996). 본 연구실에서도 파밤나방 (*Spodoptera exigua*)의 방제요인으로서 *S. carpocapsae*를 이용하여 48시간 이내에 100%의 치사효과를 나타내는 결과를 얻었다 (한 등 1996). 이렇듯 곤충병원선충은 넓은 범위의 약제저항성을 가진 여러 해충들의 방제에 효과적인 가능성을 시사했다.

그러나 곤충병원선충들이 확실한 생물적 방제인자로서 종합방제의 일환으로 이용되기 위해서는 경제적인 대량증식법, 장기보관법 및 야외포장에서 적용력 제고 등의 문제점을 가지고 있다. 본 실험에서는 이러한 선결과제 중에서 *S. carpocapsae*의 장기보관 환경을 결정하여 줌으로 보다 효과적인 생물적 방제인자로서 *S. carpocapsae*의 활용을 높이고자 하였다.

재료 및 방법

선충증식. 곤충병원선충 (*S. carpocapsae*)은 안동대학교 농생물학과에서 사육하고 있는 파밤나

방 5령충에 100마리의 감염선충 (Infective Juveniles: IJs)을 국부처리 방법으로 접종하여 25℃ 배양기에서 6일간 배양시킨 후 기주를 해부하여

Baermann 깔대기법으로 시험선충을 수거했다. 분리된 약 200,000 IJs를 50ml의 살균수가 담긴 보관플라스크 (75cm², Corning, USA)에 옮기고 10℃의 항온기에 보관하였다. 보관된 선충은 Baermann 깔대기법으로 살아있는 감염선충을 다시 분리하여 실험에 이용하였다.

온도조사. 각 시험플라스크 (25cm³, Corning, USA)에 1,000마리의 감염선충이 포함된 15ml의 살균수를 넣었다. 감염선충을 포함한 15개의 시험플라스크를 5종류의 보관온도 (0℃, 5℃, 10℃, 15℃ 및 25℃)에 3반복씩 처리하였다. 생존수 조사는 5일 간격으로 한달 동안 실시됐다.

pH조사. 각 pH완충용액은 Henderson-Hasselbalch 공식에 따라 0.01M NaH₂PO₄와 0.01M Na₂HPO₄의 상대 비율에 의해 조성되었다. 감염선충 (1,000 IJs)과 8종류의 서로 다른 pH 완충용액 (8.5, 8.2, 7.9, 7.7, 7.5, 6.8, 6.3 및 6.1) 15ml를 각 시험플라스크에 3반복으로 할당된 후 15℃의 항온기에 보관하였다. 생존수는 5일 간격으로 한달 동안 조사하였다.

염농도조사. NaCl을 멸균된 이차증류수에 용해하여 4종류의 서로 다른 NaCl농도 (0.5%, 1.0%, 2.5% 및 5.0%)로 조성하였다. 감염선충 (1,000 IJs)이 포함된 15ml의 NaCl용액을 각 시험플라스크에 3반복으로 처리한 후 15℃의 항온기에 보관하였다. 생존수는 5일 간격으로 한달 동안 조사하였다.

내한성조사. 내한성조사는 1ml 살균수에 상온에서 분리된 100마리의 감염선충을 넣고 -10℃와 -20℃에 2시간 및 4시간 동안 각각 3반복 처리한 후 실온에서 1시간 방치 후 살아있는 선충수를 현미경하에서 관찰함으로써 실시되었다. 저온순화처리하는 5℃에서 2시간 선 처리한 후 내한성조사를 실시하였다. 내동결 물질로서 글리세롤이 선충의 내한성 증가에 미치는 영향을 조사하기 위해 각 농도 (1.0%, 5.0%, 10% 및 20%)의 글리세롤 1ml에 2시간 동안 내한성조사를 실시하였다.

결 과

보관기간에 따른 온도가 감염태 곤충병원선충 (*S. carpocapsae*)의 생존력에 미치는 영향을 분석하였다. 대부분의 온도에서 보관기간에 따라 생존율이 감소하였다 (Fig. 1 and Table 1). 그러나 처리된 0°C에서 25°C까지의 5종류의 온도 가운데 15°C에서, 조사한 한달동안 가장 높은 생존율이 유지되었다 ($F=1.65$, $df=5, 17$, $P=0.2200$). 그 다음으로 10°C에서 높은 생존율을 보였다. 0°C와 5°C는 10°C와 비교하여 상대적으로 낮은 생존율을 나타내었으며, 25°C에서 생존율이 가장 저조하였다.

보관용액속에 (0.01M 인산완충용액) 포함된 수소이온농도에 따라 병원선충의 생존력변이를 조사하였다. 수소이온농도 범위는 pH 6.1~8.5로 일반적인 생체내 pH범위를 대상으로 하였다. 수소이온농도에 따라 선충의 보관중 생존력의 변이가 현저하였다 (Fig. 2 and Table 1). 생존율이 pH

Table 1. ANOVA on environmental factors for preservation of *S. Carpocapsae*

Source	df	SS	MS	F	P
Temperature					
Temp ¹	4	13543522.22	3385880.56	35.70	0.0001
Time ²	5	1529245.56	605849.11	3.23	0.0121
Temp * Time	20	2650904.44	132545.22	1.40	0.1597
Error	60	5689933.33	94832.22		
Total	89	23413605.56			
pH					
pH ³	7	80185.86	11456.12	65.87	0.0001
Time	5	102934.75	20586.95	118.38	0.0001
pH * Time	35	11525.81	329.31	1.89	0.0121
Error	96	16695.33	173.91		
Total	161	211341.75			
Salt					
Salt ⁴	4	7730566.73	1932641.68	397.55	0.0001
Time	5	671510.23	134302.05	27.63	0.0001
Salt * Time	20	236523.27	11826.16	2.43	0.0042
Error	60	291680.67	4861.34		
Total	89	8930280.90			

¹ Temp represents the treated temperatures of 0, 5, 10, 15, 20, and 25°C.

² Time represents the storage periods of 5, 10, 15, 20, 25, and 30 days.

³ pH represents the hydrogen ion concentrations (pH 6.1, 6.3, 6.8, 7.5, 7.7, 7.9, 8.2, and 8.5) in 0.01M phosphate buffer.

⁴ Salt represents the NaCl concentrations (0, 0.5, 1, 2.5, 5%) in the distilled water.

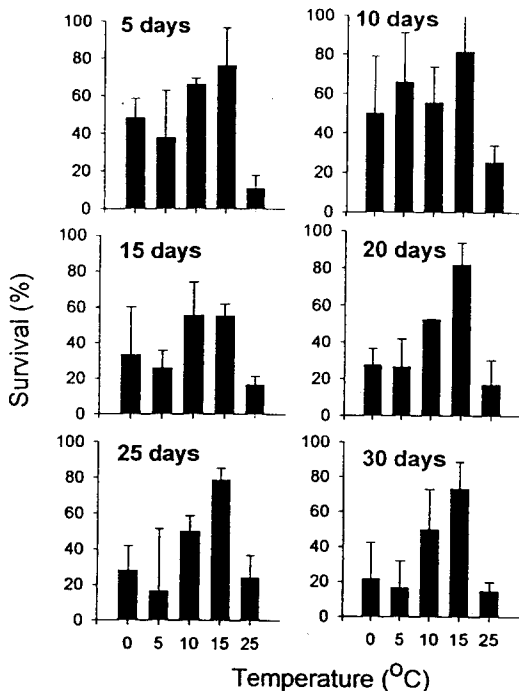


Fig. 1. Effect of temperature on preservation of infective juveniles of *S. carpocapsae*. The vertical bars above solid mean bars represent standard deviations.

8.5에서 가장 높았고 산성으로 갈수록 생존율이 낮아지는 것으로 나타났다.

염농도에 대한 선충의 생존율 조사에서는 NaCl 염을 이용하여 곤충의 생리식염수의 농도를 기준으로 처리염농도를 구성했다. 보관용액내 염농도에 따라 이 병원선충의 생존력은 달랐다 (Fig. 3 and Table 1). 무처리에 비해 염농도가 0.5%와 1.0%의 보관용액에서 이 병원선충의 생존력이 높았으며 이 이상의 염농도는 유해하였다.

병원선충이 저온에 견디는 내한성이 조사되었다. 상온 (25°C)에서 직접 빙점이하의 온도인 -10°C와 -20°C로 처리하였을 때 5% 이하의 생존력을 보였다 (Fig. 4). 온도가 낮을수록 노출시간이 증가함에 따라 생존력은 더욱 감소하였다. 그러나 빙점이하의 온도로 처리하기 전에 5°C에서 2시간의 순화과정을 거친 경우 순화과정이 없었던

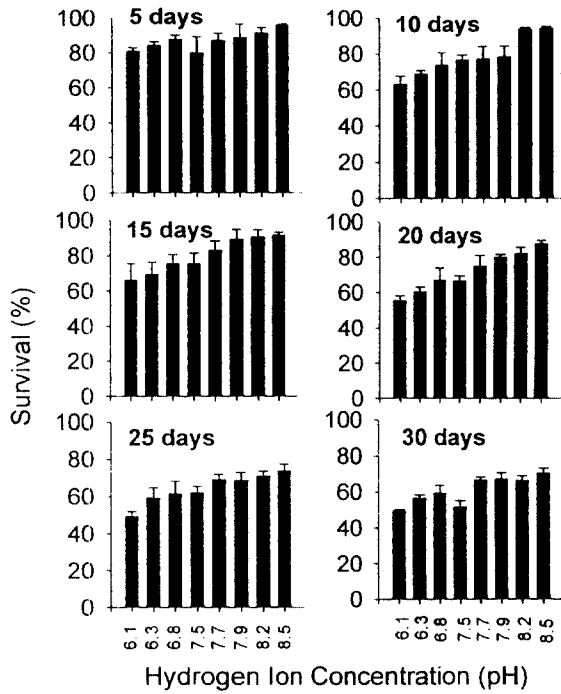


Fig. 2. Effect of hydrogen ion concentration (pH) on preservation of infective juveniles of *S. carpocapsae*. The vertical bars above solid mean bars represent standard deviations.

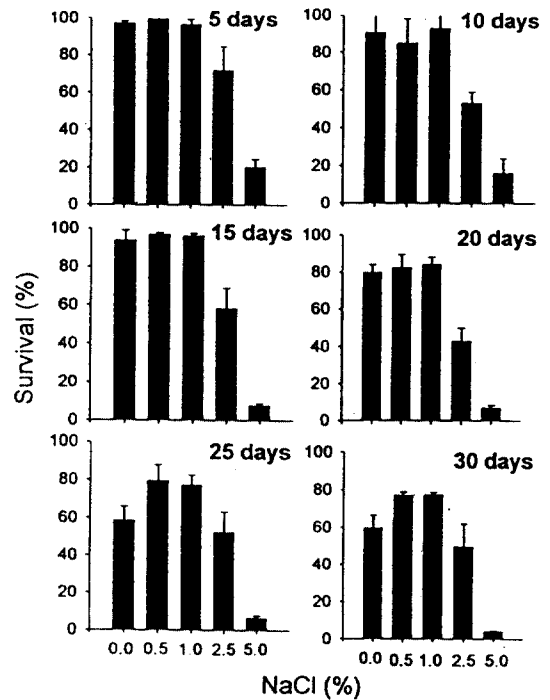


Fig. 3. Effect of salt concentration on preservation of infective juveniles of *S. carpocapsae*. The vertical bars above solid mean bars represent standard deviations.

선충보다 높은 생존율을 나타내었다 (Table 2). 또한 글리세롤을 처리한 내한성실험에서는 5%

Table 2. ANOVA of the cold acclimation effects on *S. Carpocapsae* at 5°C

Source	DF	SS	MS	F	P
TEMP ¹	1	273.38	273.38	41.79	0.0001
TIME ²	1	234.38	234.38	35.83	0.0001
ACCL ³	1	70.04	70.04	10.71	0.0048
TEMP • ACCL	1	117.04	117.04	17.89	0.0006
TIME • TEMP	1	77.04	77.04	11.78	0.0034
TIME • ACCL	1	15.04	15.04	2.30	0.1489
TIME • TEM P • ACCL	1	63.38	63.38	9.69	0.0067
Error	16	104.67	6.54		
Total	23	954.96			

¹ TEMP represents the temperatures (-10°C and -20°C) used for cold bioassay of *S. carpocapsae*.

² Time represents the exposure periods (2h and 4h) of *S. carpocapsae* to the bioassay temperatures

³ ACCL represents the low temperature acclimation of *S. carpocapsae* at 5°C before cold bioassays

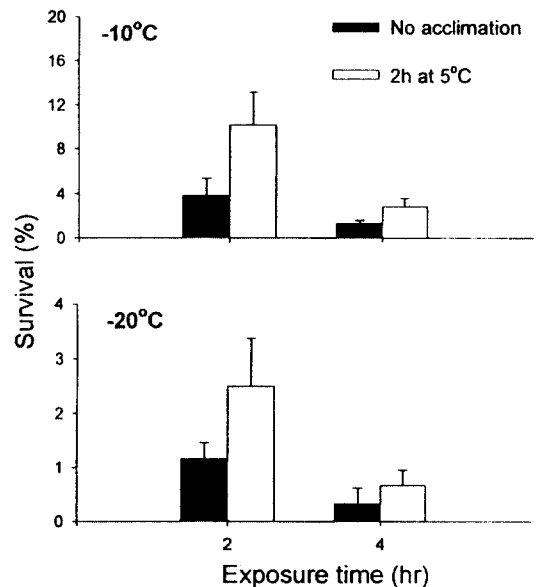


Fig. 4. Cold tolerance and low temperature acclimation of infective juveniles of *S. carpocapsae*. The vertical bars above solid mean bars represent standard deviations.

농도를 처리한 선충집단이 무처리집단보다 -10°C 에서 5배이상의 높은 생존율을 나타내었다 (Fig. 5). 그러나 10%이상의 글리세롤은 오히려 생존력이 낮아져 지나친 글리세롤의 농도는 선충에게 유해했다.

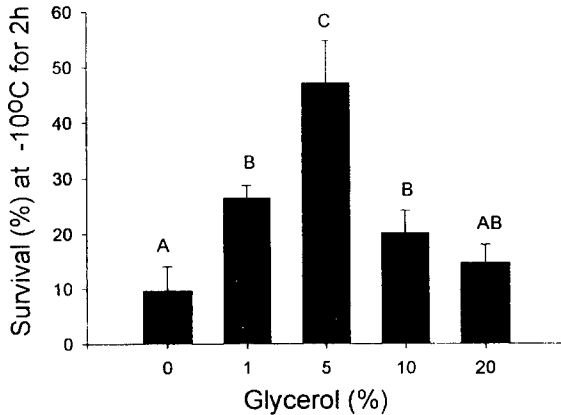


Fig. 5. Effect of glycerol on cold hardiness of infective juveniles of *S. carpocapsae*. The vertical bars above solid mean bars represent standard deviations. Different letters above the error bars were different at $\alpha=0.05$ (LSD test).

고 찰

곤충병원선충 (*S. carpocapsae*)의 장기보관을 위한 온도, 수소이온농도 및 염농도 등의 비생물적 환경요인들이 감염태의 선충 생존력에 변동을 주었다. 온도는 15°C 에서 조사기간중 생존율의 변동이 적어 최적의 보관온도로 밝혀졌다. 특히 25°C 의 고온에서 선충의 생존율이 저온인 0°C 와 5°C 에 비하여 낮은 것으로 조사되어 온도가 올라감에 따라 상대적으로 대사속도의 증가로 체내 저장 에너지의 빠른 소모가 생존율 감소의 원인으로 추정된다. 이러한 가정은 곤충병원선충류의 보관기간이 진행됨에 따라 체내 지질의 함량이 감소하면서 생존율과 감염력이 낮아진다는 보고 (Robinson *et al.* 1987, Fitters *et al.* 1997)에서 연유된다. 즉 고온에 따라 생존율의 감소는 체내 에너지 축적적인 지질함량의 감소와 연결을 지을 수

있으며 이를 증명하기 위한 연구가 진행중에 있다.

일반적으로 곤충의 혈장 수소이온농도 (pH)가 6.2~7.8이고 특별히 나비목 곤충류의 경우 약간 산성 (약 6.6)인 점을 (Blum 1985) 고려하여 이 농도를 기준으로 병원선충의 최적 보관 pH를 조사한 결과 오히려 알칼리일수록 높은 생존력을 보여 조사된 범위의 최대 pH에서 가장 최적 보관조건을 가리켰다. 추후 이후의 pH 범위에 대한 이 병원선충의 생존력반응도 조사하여야 할 것으로 사료된다. 이러한 기주조건과 최적보관조건과의 차이점은 병원선충이 발육시기에 따라 서로 다른 환경조건에서 생존을 유지시킨다는 점에서 기주 생체내 조건이 곧 병원선충의 보관조건이라는 등식은 성립되지 않는다고 여겨진다. 즉, 어린 유충과 성충은 기주 생체내에 유지되나 감염성의 3령 유충기는 토양속에서 보내면서 기주를 탐색하고 있다 (Kaya and Gaugler 1993).

염농도도 선충의 보관중 생존력에 영향을 주었다. 조사한 염농도 중 0.5-1.0%의 범위에서 최적의 병원선충 생존력이 기록되었다. 이는 Kim과 Kim (1997)이 조사한 기주인 파밤나방 혈장이 약 200mOsm/Kg이고 이를 NaCl의 %농도로 환산하면 (1% = 171mOsm/Kg) 1.17%가 된다. 즉 염농도는 기주의 생체내 염농도와 거의 유사한 조건이 최적임을 의미한다.

병원선충은 -10°C 이하의 빙점 온도에서 노출 시간에 따라 생존율이 감소했다. 이러한 동결치는 저온 순화와 내동결성 물질인 글리세롤에 의해 약화되어 이 곤충병원선충이 저온순화를 보유한 내한성을 나타냈다. 이러한 저온 순화와 글리세롤의 내한성 증진 효과는 추후 이 선충의 냉동 장기보관을 위한 중요한 요인으로 이용될 수 있을 것이다.

적 요

감염태 곤충병원선충 (*Steinernema carpocapsae*)의 장기보존조건을 결정하기 위해 온도, pH 및 염농도와 같은 환경인자를 분석하였고, 선충의 동결보관을 위해 선충의 내한성 증진 요인으로서 아치

사 저온순화와 글리세롤 효과를 나누어 분석하였다. 조사된 모든 환경인자가 이 병원선충의 보관 중 생존율에 영향을 미쳤다. 이들 환경인자들을 기준으로 이 병원선충의 최적 액체 보관조건은 온도 15°C, pH 8.5 및 염농도 0.5-1%로 판명되었다. 이 병원선충은 저온순화반응을 보였으며 내동결 물질인 글리세롤은 내한성을 증진시켰다. 그러나 10%이상의 글리세롤 농도는 오히려 유해하였다.

검색어 : 곤충병원선충, 보관, 온도, 수소이온농도, 염농도, 내한성

사 사

본 연구의 수행에 이용된 곤충병원선충을 제공하여 주신 경상대학교 농생물학과 추호열교수님과 대학원생들에게 감사를 드립니다. 이 논문은 농림부에서 시행한 농림수산물특정연구사업의 연구결과입니다.

인 용 문 헌

- Blum, M. S. 1985. Fundamentals of insect physiology. 598 pp. John Wiley & Sons, NY.
- Broadbent, A. B. and TH. H. A. Olthof. 1995. Foliar application of *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae) to control *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) larvae in chrysanthemums. Environ. Entomol. 24: 431-435.
- Choo, H. Y., J. B. Kim and D. W. Lee. 1996. Entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from Korea with a key to *Steinernema*. Korean J. Soil Zoology. 1: 28-36.
- Fitters, P. F. L., E. M. J. Meijer, D. J. Wright and C. T. Griffin. 1997. Estimation of lipid reserves in unstained living and dead nematodes by image analysis. J. Nematol. 29: 160-167.
- Forst, S., B. Dowds, N. Boemare and E. Stackebrandt. 1997. *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bug that kill bugs. Annu. Rev. Microbiol. 51: 47-72.
- 한상찬, 김용균, 이분조. 1996. 곤충병원선충을 이용한 채소해충의 생물적 방제. 한토동지. 1: 81-88.
- Kaya, H. K. 1985. Susceptibility of early larval stages of *Pseudaletia unipuncta* and *Spodoptera exigua* (Lepidoptera : Noctuidae) to the entomogenous nematode *Steinernema feltiae* (Rhabditidae : Steinernematidae). J. Invertebr. Pathol. 46: 58-62. Kaya, H. K. and R. Gaugler. 1993. Entomopathogenic nematodes. Annu. Rev. Entomol. 38 : 181-206.
- 김용균, 추일. 1994. 안동지역의 농업현황과 U.R. 대책. 안동대학교 농업과학연구소 논문집. 1: 23-31.
- 김용균, 장동걸. 1996. 배추좀나방(*Plutella xylostella* L.)의 deltamethrin 저항성 기작에 관한 에스테라제의 역할. 한용곤지. 35: 74-79.
- Kim, Y. and N. Kim. 1997. Cold hardiness of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). Environ. Entomol. 26: 1117-1123.
- Poinar, G. O. Jr. 1979. Nematodes for biological control of insect. 277 pp. CRC, Boca Raton, FL.
- Robinson, M. P., H. P. Atkinson and N. R. Perry. 1987. The influence of soil moisture and storage time on the mobility, infectivity, and lipid utilization of second-stage juveniles of the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. Revue de Nematologie 10: 343-348.
- Shannag, H. K., S. E. Webb and J. L. Capinera. 1994. Entomopathogenic nematode effect on

pickleworm (Lepidoptera: Pyralidae) under laboratory and field conditions. J. Econ. Entomol, 87: 1205 - 1212.

Tanaka, Y. and H. K. Kaya. 1993. Insect pathology. pp. 462 - 478. Academic press, NY.

(1998년 1월 23일 접수)