

곤충병원선충 (*Steinernema carpocapsae* Weiser)의 냉동저장법

Cryopreservation of the Entomopathogenic Nematode, *Steinernema carpocapsae* Weiser

이승화 · 김용균 · 한상찬

Seung Hwa Lee, Yong Gyun Kim and Sang Chan Han

Abstract - Cryopreservation of infective juveniles of entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae* Weiser, was conducted at -190°C liquid nitrogen and its efficacy was analysed on nematode survival and pathogenicity with glycerol pretreatments and storage periods. Infective juveniles were pre-treated before being frozen by incubating the nematodes in 22% glycerol for each of 6, 12, and 24 h, followed by 70% methanol at 0°C for 10 minutes. Just after glycerol and methanol incubations, subsamples of the nematodes were resuspended in 0.85% saline and maintained during 24h for viability determination. Different glycerol incubation periods significantly affected the nematode susceptibility to methanol infiltration. Six hour incubation in glycerol resulted in much less nematode survival than did 12 h or 24 h incubation. About 70% of the infective juveniles frozen at -190°C for 5 months, preincubated in glycerol at least for 12h, were able to survive after being resuspended in 30°C saline. They did not also show any change in their pathogenicity during cryopreservation. These results suggest an improved technique for long-term storage of the entomopathogenic nematodes.

Key Words - Entomopathogenic nematodes, Cryopreservation, Beet armyworm

초 록 - 곤충병원선충 (*Steinernema carpocapsae* Weiser)의 감염태 유충에 대한 액체질소 (-190°C) 냉동 저장하는 방법을 개발하기 위하여, 냉동보관 전처리 과정 및 저장기간에 따른 선충생존율과 감염력 변이를 조사하였다. 냉동저장 전에 22% 글리세롤로 선충을 6, 12, 24시간 동안 배양한 후 70% methanol (0°C)안에 10분간 유지하였다. 글리세롤과 methanol에 넣어 둔 샘플을 0.85% 식염수에 넣어 24시간 유지한 후 생존능력을 측정하였다. 글리세롤 배양시간에 따른 선충 생존율의 차이는 없었으나, methanol처리에서는 글리세롤 처리 시간이 길수록 선충 생존율이 높게 나타났다. 냉동저장에 따른 선충의 생존율은 글리세롤 배양시간이 짧았던 처리(6시간)를 제외하고는 5개월 동안 평균 70% 이상으로 높게 나타났다. 냉동저장 되었던 선충의 곤충감염율은 저장기간에 관계없이 90% 이상을 나타내었다. 이상의 결과는 곤충병원선충이 냉동저장에 의해 장기간보존이 가능하다는 것을 제시한다.

검색어 - 곤충병원선충, 냉동보관, 파밤나방

곤충병원선충은 토양에서 발견되며 곤충에 대한 높은 병원성과 치사효과가 있다고 알려져 왔다(Kaya and Gaugler, 1993; Han *et al.*, 1999). 이러한 곤충병원선충은 Steinernematidae와 Heterorhabditidae의 두 과

에 속하며, 각 병원선충 중에 특이적으로 공생하는 세균에 의해 기주 곤충내에서 그들의 병원력을 발휘한다(Akhurst and Dunphy, 1993).

곤충병원선충은 곤충에 대해 특이적으로 살충력을

안동대학교 자연과학대학 생명자원과학부 농생물학전공 (Major in Agricultural Biology, School of Bioresource Sciences, College of Natural Sciences, Andong National University, Andong, Korea)

보이고 척추동물이나 식물에 대해 안전하기 때문에 생물적 방제인자로서 주목을 받아왔다(Poinar, 1979; Akhurst, 1990; Han *et al.*, 1996). 실제로 곤충병원선충을 이용한 해충의 생물적 방제법 개발이 여러 해충에서 시도되어 왔다(Poinar, 1979; Gaugler and Kaya, 1990).

그러나, 곤충병원선충이 해충의 생물적 방제인자로서 이용되기 위해서는 경제적인 대량증식법, 장기보관법 및 야외포장에서 적용력 제고 등의 문제점이 해결되어야 한다(Grewal, 1998). 대량증식법으로는 액체배지(Friedman, 1990; Han, 1996)와 고체배지(Bedding, 1981; Wouts, 1981) 상태의 기내배양법이 개발되었다. 이러한 방법으로 대량 증식된 곤충병원선충 감염태 유충을 물에 농축하여 저온에 보관하여 왔다. 이러한 방법은 물의 탈 이온화로 인하여 장기간 보관하기 어렵다. 또한 선충을 2.5×10^5 IU/ml로 농축하여 저장할 경우에도 3개월 이상의 보관이 어렵다(Popiel and Vasquez, 1991).

이러한 이유로 본 실험에서는 *Steinernema carpocapsae*를 장기간 보관하기 위하여 액체질소에 냉동보관하면서 저장기간 중 선충의 생존율과 감염력 변이를 조사하였다.

재료 및 방법

시험동물

곤충병원선충의 감염태 유충을 기주 곤충인 파밤나방(*Spodoptera exigua* (Hübner))에 국부 처리하여 6일간 항온기($25 \pm 1^\circ\text{C}$)내에서 Baermann 깔대기법(Han *et al.*, 1999)으로 증식시켜 수거하여 사용하였다. 증식된 선충은 사용될 때까지 15°C 에서 보관하였다(Park *et al.*, 1998). 기주 곤충증식은 인공사료(Gho *et al.*, 1990)를 이용하여 항온기(온도 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 광주기 16:8 h(L:D))에서 누대 사육하였다. 이 곤충의 성충 먹이로 10% 설탕물이 산란상자에 공급되었다.

냉동저장법

냉동보관의 전처리 과정으로 글리세롤과 methanol 처리가 필요하다(Popiel and Vasquez, 1991). 글리세롤 안에서 *Steinernema carpocapsae* 감염태 유충의 최적 배양시간을 결정하기 위하여, 22% (w/v) 글리세롤에 선충을 2×10^5 /ml로 접종하였다. 이것을 250 ml 플라스크에 선충이 담긴 글리세롤 용액 10 ml를 넣고 rotary shake에 100 rpm으로 25°C 에서 각각 6, 12, 24시간 동안 유지시켰다. 배양한 선충은 1,000 rpm으로 원심분리하여 글리세롤을 제거하였다. 이 선충은 70% methanol (0°C)에 넣어 얼음 위에서 10분간 유지하고, 이것을 다시 원심분리하여 methanol을 제거하였다. 글

리세롤과 methanol에 배양한 선충을 각각 0.85% 식염수(0.85%, NaCl)에 넣어 15°C 에서 24시간 유지한 후 생존능력을 측정하였다.

Methanol 안에 든 선충현탁액을 1.5 ml 튜브에 1 ml 씩 넣고 -190°C 액체질소통에 각각 1, 10, 20, 30, 60, 150일간 냉동보관하였다. 샘플을 녹일 때는 0.85% 식염수(30°C)에 넣어 완전히 녹을 때까지 흔들어서 주고, 선충을 가라앉혀 식염수에 10회 이상 희석하였다. 생존능력은 녹인 후 15°C 에서 24시간 유지한 후 조사하였다. 선충의 생존은 50배 배율의 해부현미경하에서 미침으로 충격후 자생적으로 움직이는 선충을 판별 기준으로 정했다.

기주 곤충감염율

냉동저장되었던 병원선충의 기주 곤충감염율을 알아보기 위해 petri dish(지름×높이: 90×15 mm)에 여과지(#2 Advantec, Toyo, Japan)를 깔고, 동결 저장하여 녹인 선충 현탁액(400 IU/0.5 ml)을 여과지에 접종한 다음 인공사료와 함께 파밤나방 5령충을 3마리씩 3반복하여 처리하였다. 이후 처리된 petri dish들은 항온기(온도 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 광주기 16:8 h(L:D))에 두고 48시간 후에 선충에 의한 기주 사망률을 조사하였다.

결 과

곤충병원선충(*Steinernema carpocapsae*)의 냉동보관을 위해 우선 전처리 과정으로 글리세롤의 체내 침적이 요구됐다. 글리세롤 배양시간에 따른 선충의 생존율을 조사한 결과, 22% 글리세롤 안에 6, 12, 24시간 배양된 선충을 1,000 rpm으로 원심분리하여 글리세롤 상층액을 제거한 후 선충 생존율을 조사하였을 때 배양시간에 관계없이 높은 생존율을 유지하였다(Table 1). 그러나 methanol을 처리한 후 생존율을 조사하였을 때는 글리세롤 안에서 12, 24시간 배양한 선충시료가 6시간 배양시료에 비해 선충 생존율이 현저히 높아 글리세롤에서 배양시간이 길수록 methanol 처리

Table 1. Effect of glycerol preincubation for freeze storage on the survival of *Steinernema carpocapsae*

Incubation time (h) in 22% glycerol	Nematode survival (%)	
	Before methanol methanol	After treatment treatment
6	96.7±1.6a ¹	46.7±5.8a
12	96.3±0.7a	86.6±4.1b
24	93.7±2.4a	91.7±0.6b

¹Means followed by different letters indicate the significant in each column at $\alpha=0.05$ (LSD test)

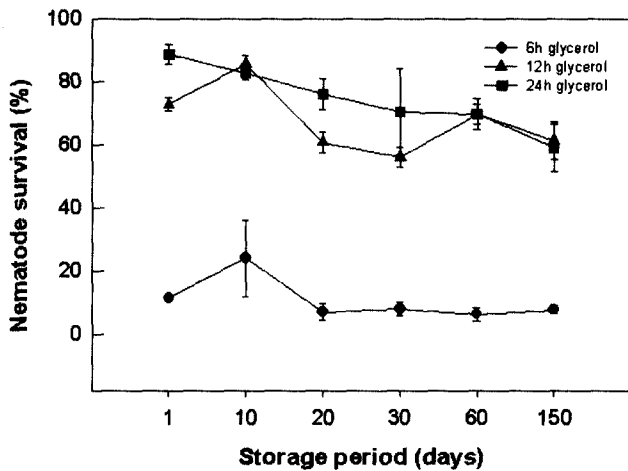


Fig. 1. Storage effect in liquid nitrogen on survival of *Steinernema carpocapsae* with glycerol preincubation time.

Table 2. Infectivity of *Steinernema carpocapsae* recovered after freeze storage in liquid nitrogen into the fifth instar larvae of *Spodoptera exigua*

Storage period (days)	Incubation time (h) in 22% glycerol	Infectivity to <i>Sp. exigua</i>	
		N	Mortality (%)
0		36	88.9
1	12	9	88.9
	24	9	100
10	12	9	100
	24	9	100
20	12	9	88.9
	24	9	88.9
30	12	9	88.9
	24	9	100
60	12	9	100
	24	9	88.9
150	12	9	100
	24	9	88.9

에 대한 높은 생존율을 나타내었다 (Table 1).

Methanol 처리가 끝난 선충 시료는 약 -190°C 의 액체 질소 통에 보관되었으며, 이후 보관기간에 따른 선충의 생존율이 조사되었다 (Fig. 1). 글리세롤 배양시간은 선충의 냉동보관에 뚜렷한 영향을 미쳤다. 냉동 보관하기 전에 methanol에 대해 감수성이 높았던 6시간 글리세롤 처리 시료는 보관초기부터 매우 낮은 생존율을 보였다. 반면에 12시간과 24시간의 글리세롤 처리 시료는 두 처리 사이에 차이가 없이 ($F=4.02$; $df=1, 51$; $P=0.0504$) 냉동 보관초기부터 150일까지 약 70%의 높은 생존율을 유지했다.

액체 질소 안에 냉동 보관한 곤충병원선충을 녹여 파밤나방 5령충을 이용하여 기주 감염율을 조사하였다 (Table 2). 본 연구에서 조사 한계시기인 150일까지 냉동 보관한 곤충병원선충은 저장기간에 관계없이 ($F=0.06$; $df=1, 11$; $P=0.8166$) 90% 이상의 높은 치사감염율을 보였다.

고찰

본 연구는 곤충병원선충의 장기보관법 개발에 궁극적 목적을 두고 감염태 선충의 냉동보관방법의 적용가능성을 분석하였다. 이에 대한 실질적 방법을 Popiel and Vasquez (1991)가 제시하였고, 이를 경남 동래에서 채집된 *St. carpocapsae*에 적용하였다.

선충 냉동보관에 있어서 매우 중요한 요인은 생체 냉동전의 전처리과정이다 (James, 1985). 냉동을 통한 세포의 건조치사 및 삼투압의 급격한 변화가 주된 동결치사의 원인이 된다 (Lee and Denlinger, 1991). 이를 막기 위해 세포에 물분자와 유사한 성질을 갖는 냉동결물질의 보충이 요구된다. 이를 위해 냉동시키기 전에 글리세롤이 생체내로 충분히 침적되어야 한다. 그러나 높은 농도의 글리세롤 자체가 무해하지 않기 때문에 (Park et al., 1998) 본 연구에서는 바로 이 글리세롤 전처리 과정의 전처리 과정의 시간을 줄이려는 데 연구의 초점을 두었다. Popiel and Vasquez (1991)의 연구결과에서도 글리세롤의 처리 시간이 길어짐에 따라 선충의 초기 치사율이 높아졌다.

본 연구 결과에서는 선충의 최적 냉동보관을 위해서는 글리세롤 처리과정이 최소한 12시간 이상이 요구되었다. Popiel and Vasquez (1991)는 이 글리세롤 처리 단계가 선충의 냉동보관에 가장 중요한 단계라고 지적했으며, 그들이 분석했던 시간대의 최소 단위인 24시간을 기준으로 이 이상의 글리세롤 처리를 제시했다. 우리의 결과는 이러한 글리세롤 처리 시간을 12시간으로 단축해도 선충의 냉동 보관에 큰 차이가 없음을 나타냈다.

일단 충분한 글리세롤이 침적된 시료는 냉동보관기간에 차이 없이 높은 생존율과 병원력을 발휘했다. 특히 글리세롤 처리 후 methanol의 처리는 methanol 자체의 빙점이 -97°C (Solomons, 1984)이기 때문에 급속냉동과정속에서 다양한 생체물질의 비동시적 냉동과정속에서 파생될 수 있는 물리적 유해성을 억제해 주며, 생체 유리화 (vitrification) 과정에 적합한 냉각속도를 유지시키며 이 상태에서 다량의 시료를 일시에 결정화시켜 주는 작용을 발휘한다고 할 수 있겠다 (Popiel and Vasquez, 1991; Gho, S., personal communication). 이 methanol의 효과는 본 연구에서는 무처리 에 비교하여 차이점이 조사되지 않았으나 *Heterorha-*

*bditis bacteriophora*의 경우 냉동보관에 있어 생존력에 현격한 상승효과가 있었다 (Popiel and Vasquez, 1991).

본 연구에서는 동래에서 채집된 곤충병원선충 (*St. carpocapsae*)에 대해 냉동보관을 위한 최적 글리세롤 처리시간을 결정하였으며, 이 선충에 대한 효과적인 장기보관법을 제시하였다.

사 사

본 선충의 냉동보관법 연구에 있어서 methanol의 효과에 대해 물리화학적 기작을 자세하게 설명하여 준 안동대학교 화학과 고성운 교수님께 감사드립니다. 이 논문은 농림부에서 시행한 농림수산특정연구사업의 연구결과입니다.

인 용 문 헌

- Akhurst, R.J. 1990. Safety to nontarget invertebrates of nematodes of economically important pests. pp. 234~238. in Safety of microbial insecticides, eds. by M. Laird, L.A. Lacey and E.W. Davidson. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Akhurst, R.J. and G.B. Dunphy. 1993. Tripartite interactions between symbiotically associated entomopathogenic bacteria, nematodes, and their insect hosts. pp. 1~23. in Parasites and pathogens of insects. Vol. 2. eds. N.E. Beckage, S.N. Thompson and B.A. Federici. Academic press, NY.
- Bedding, R.A. 1981. Low cost in vitro mass production of *Neoplectana* and *Heterorhabditis* species (Nematoda) for field control of insect pests. Nematologica 27: 109~114.
- Friedman, M.J. 1990. Commercial production and development. pp. 153-172. in Entomopathogenic nematodes in biological control. eds. R. Gaugler and H.K. Kaya. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Gaugler, R. and H.K. Kaya. 1990. Entomopathogenic nematodes in biological control. pp. 365. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Gho, H.G., B.P. Lee, K.M. Choi and J.H. Kim. 1990. Simple mass-rearing of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), on an artificial diet. Korean J. Appl. Entomol. 29: 180~183.
- Grewal, P.S. 1998. Formulations of entomopathogenic nematodes for storage and application. Jap. J. Nematol. 28: 68~74.
- Han, R.C. 1996. The effects of inoculum size on yield of *Steinernema carpocapsae* and *Heterorhabditis bacteriophora* in liquid culture. Nematologica 42: 546~553.
- Han, S., Y. Kim and B. Lee. 1996. Biological control of vegetable insect pests with entomopathogenic nematodes. Korean J. Soil Zool. 1: 81~88.
- Han, S., S. Lee and Y. Kim. 1999. Pathogenicity and multiplication of entomopathogenic nematodes, *Steinernema carpocapsae* Weiser, on beet armyworm, *Spodoptera litura* (Fabricius). Korean J. Appl. Entomol. 38: (In Press).
- James, E.R. 1985. Cryopreservation of helminths. Parasitology Today 1: 134~139.
- Kaya, H.K. and R. Gaugler. 1993. Entomopathogenic nematodes. Annu Rev. Entomol. 38: 181~206.
- Lee, R.E. and D.L. Denlinger, 1991. Insects at low temperature. pp. 513. Chapman and Hall, NY.
- Park, Y., Y. Kim, Y. Lee and S. Han. 1998. Optimal storage conditions of the entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae*. Korean J. Soil Zool. 3: 10~16.
- Poinar, G.O.Jr. 1979. Nematodes for biological control of insect. 277pp. CRC, Boca Raton, FL.
- Popiel, I. and E.M. Vasquez. 1991. Cryopreservation of *Steinernema carpocapsae* and *Heterorhabditis bacteriophora*. J. Nematol. 23: 432~437.
- Solomons, T.W.G. 1984. Organic chemistry. 3rd ed. pp. 1097. John Wiley & Sons, NY.
- Wouts, W.M. 1981. Mass production of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis heliothidis* (Nematoda: Heterorhabditidae) on artificial media. J. Nematol. 13: 467~469.

(2000년 1월 17일 접수, 2000년 9월 21일 수리)