

감염태 곤충병원선충 (*Steinernema carpocapsae* Weiser)의 효과적 회수법

이성섭 · 김용균 · 한상찬

(안동대학교 자연과학대학 생명자원과학부)

An Improved Collecting Method of the Infective Juveniles of the Entomopathogenic Nematode, *Steinernema carpocapsae* Weiser

Lee, Sungseob, Yonggyun Kim and Sangchan Han

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

ABSTRACT

We report here an improved collecting method of the infective juveniles multiplied in the host insect with the entomopathogenic nematodes, *Steinernema carpocapsae* Weiser. The specific characteristics of this method involved the opening of the host insect hemocoel after the population of their infective juveniles reached at the maximum (6 days at 25°C after nematode treatment to nonimmunized host insects) to facilitate the escape of the multiplied nematodes. It also used 'Baermann funnel' method to select the infective juveniles effectively. This improved 'Baermann funnel' method was compared with a traditional collecting method, which was characterized with a combination of untreated host insects and 'White trap' collecting method, in both yield and pathogenicity of the collected infective juveniles to the fifth instar larvae of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner). More than 95% of the nematode populations collected by the two methods represented the morphological infective juveniles. To prove the nematodes to be infective juveniles functionally, pathogenicity and infective activity were compared in the nematodes collected by the two methods. They were not different in both pathogenicities and infective activities which were measured by the numbers of nematodes penetrated into the hemocoel of the insect hosts after exposure for the specific times to the same dose of infective juveniles. Significant difference between two collecting methods was found in the total yields of the infective juveniles per host insect. About 50,000 infective juveniles per infected fifth instar larva of *S. exigua* after 6 day incubation at 25°C were collected only for 2 days by the improved 'Baermann funnel' method, while about 20,000 infective juveniles per host were collected for 10 days by the classical 'White trap' method.

Key words: Entomopathogenic nematode, nematode-collecting method, 'Baermann funnel', 'White-trap', beet army-worm

서 론

환경에 대한 안전성과 다양한 분류군의 해충에 살충력을 발휘한다는 유리한 양면성 때문에 최근 곤충병원선충이 생물살충제로서 보편화되기 위해 활발히 연구되고 있다 (Gaugler 1981, Akhurst 1990, Han *et al.* 1996). 이러한 곤충병원선충의 병원성은 기주 곤충의 입, 기문, 항문 등 자연 개구부를 통한 침입으로부터 시작된다. 일단 곤충의 혈강에 침투하면 48시간 이내에 곤충을 치사시키게 된다

(Gaugler *et al.* 1981). 기주 치사의 직접적인 원인은 곤충병원선충의 종마다 다르지만 일반적으로 선충의 장내에 서식하는 공생세균에 기인된다 (Kaya and Gaugler 1993). 이러한 곤충병원선충과 공생세균 사이에는 밀접한 공생관계를 가지게 되는데, 곤충병원선충은 주로 공생세균을 기주의 혈강안으로 안내해주고, 이러한 도움을 받은 공생세균은 선충이 발육하는데 좋은 기주환경으로 유지시켜준다 (Thomas and Poinar 1979). 공생세균을 섭식하면서 선충은 감염태에서 성충으로 발육하고 다시 알, 유충을 거쳐 다시 감염태

유충으로 발육한 후 기주의 사체를 빠져나와 다시 다른 기주를 찾게 된다 (Kaya and Gaugler 1993).

곤충병원선충증에서 *Steinernema carpocapsae* Weiser는 공생세균으로 *Xenorhabdus nematophilus*를 가지고 특히 다양한 나비목 곤충에 탁월한 치사효과를 준다고 보고되었다 (Akhurst 1980, Park et al. 1999). 다른 곤충병원선충과 마찬가지로 *St. carpocapsae*도 곤충기주를 이용하여 대량배양이 용이하고 (Han et al. 1999), 배양된 감염태 유충은 실내 장기간 보존이 가능했다 (Park et al. 1998). 하지만 병원력을 발휘하는 감염태 유충의 수거에 번거로움을 가지고 있다. 기존의 'White trap' 수거방법은 증식된 기주를 트랩에 올려 놓고 스스로 기주체를 뚫고 빠져나오는 선충을 수거함으로 수거시간이 비교적 오래 소요되었다. Han et al. (1999)은 이 선충을 파밤나방 (*Spodoptera exigua* (Hübner))이나 담배거세미나방 (*Sp. litura* (Fabricius))에 접종한 후 25°C에서 6일간 배양할 때 기주체내에 대부분 감염태 유충으로 증식했다고 보고했다. 본 연구는 이를 기초하여 기주체내에 가장 감염태 선충의 밀도가 높을 때 기주를 해부하여 혈관을 노출시켜 감염태 선충의 탈출을 도와줌으로 수거시간을 단축시키겠다는 가설하에 새로운 수거방법을 모색하게 됐다. 특히 기주체내에서 인위적으로 선충의 탈출을 유도함으로써 파생되는 발육태의 혼재를 어느 정도 막기 위해 'White trap'보다는 'Baermann' 깔대기법을 수거방법으로 선택하였다. 이렇게 해서 고안된 새로운 수거방법은 기존의 방법과의 효율면에서 비교하기 위해 수거방법간 감염태 선충의 회수율과 병원력, 침입력의 차이를 분석하였다.

재료 및 방법

시험동물증식

곤충병원선충 (*Steinernema carpocapsae*)을 곤충기주에 국부접종 후 25°C 항온기에서 6일간 증식시켰으며 (Han et al. 1998) 이를 증식된 기주체로 수거방법에 따른 선충회수 효과 분석실험에 사용하였다. 분리된 감염태 유충은 병원력 검정을 위해 사용될 때까지 15°C에 보관하였다 (Park et al. 1998). 기주곤충인 파밤나방 (*Spodoptera exigua* (Hübner))은 인공사료 (Gho et al. 1993)를 이용하여 실내에서 누대 사육하였다. 곤충의 사육조건은 온도 25±1°C, 광주기 16:8h(L:D)이었다.

감염태 선충분리

본 연구에서 비교된 두 가지 수거방법은 증식기주의 처리방법에 따라 분류된다. 일반적으로 증식된 기주를 해부하지 않고 스스로 기주체를 빠져나오게 하는 기존의 방법과 증식된 감염태 유충의 탈출을 용이하게 하기 위해 기주체의 혈관을 해부를 통해 노출시켜주는 방법으로 구분

된다. 감염태 선충의 수거는 무처리 기주체의 경우 감염태 유충이 스스로 빠져나오는 데는 수일이 소요됨으로 일반적으로 많이 이용되고 있는 'White-trap'법 (Bedding and Akhurst 1975)으로, 해부기주체로부터 감염태 유충수거는 일시에 수거가 간편한 'Baermann' 깔대기법 (Kaya and Stock 1997)을 이용하였다. 두 방법 모두 25°C 상온에서 증식된 기주 사체로부터 빠져나오는 유충을 여과시키는 원리를 이용한다. 차이점은 기존의 'White-trap'법에서는 증식된 기주 사체를 아무런 처리 없이 여과지(직경 90 mm: Advantec #2, Toyo, Japan)가 깔려있는 기주접시(50×10 mm: 직경×높이) 위에 올려놓았다. 다시 이 기주접시는 주위에 살균수로 채워진 수거용 용기(150×20 mm: 직경×높이)에 넣어졌다. 이 상태에서 사체로부터 빠져나오는 감염태 유충을 주위의 살균수로 모아졌고 이 살균수를 수거처리 후 10일 동안 매일 1회씩 교체해주었다.

개발된 'Baermann' 깔대기법에서는 증식된 기주 사체를 여과지(107×210 mm: 가로×세로, Kimwipes® S-150, Yuhan-Kimberly, Korea)에 올려놓고 기주의 혈관이 노출되도록 표피를 해부하였다. 이렇게 처리된 여과지는 철투과망(직경 50 mm, 30 mesh) 위에 고정되었다. 이 복합체를 살균수로 채워진 유리깔대기(60×60×8 mm: 입구직경×길이×출구직경, Duran, Germany)에 올려 놓고 깔대기의 출구는 고무튜브와 집게로 조절하게 했다. 여과지를 통과하여 깔대기 출구쪽으로 모아지는 선충은 0.5-1시간 간격으로 비이커에 모아지고 깔대기는 새로운 살균수로 채워졌다. 이러한 수거는 2일동안 진행되었다. 밤기간중에는 깔대기내의 살균수를 제거하고 기주체주위를 습식처리하여 선충의 생존을 유지시키면서 수거를 일시 중단하였고 다음날 살균수를 깔대기에 채우면서 수거과정이 계속 진행되었다.

병원선충의 살충력검정

병원선충의 살충력을 분석하기 위해 페트리디쉬 생물검정법 (Han et al. 1996)을 이용하였다. 이러한 생물검정은 여과지(90 mm, Advantec #2, Toyo, Japan)가 깔려진 페트리디쉬(90×15 mm: 지름×높이)에 25마리(0.5 ml 증류수)의 감염태 유충을 처리한 후 3마리의 파밤나방 5령충과 인공사료(약 1g)를 놓았다. 같은 처리는 10반복되었으며 처리된 사육용기들은 항온기(온도 25±1°C, 광주기 16:8h(L:D))에서 48시간 경과한 후 사망률을 조사하였다.

결과 및 고찰

개발된 'Baermann' 깔대기법 및 기존의 'White trap' 방법인 두 가지 선충수거방법에 따라 수거된 선충은 형태적으로 감염태 유충을 확인하였다. 특히, 감염태 유충은 4령충과 구분하기 위해 입술부위에 작은 돌기가 없으며, 크기

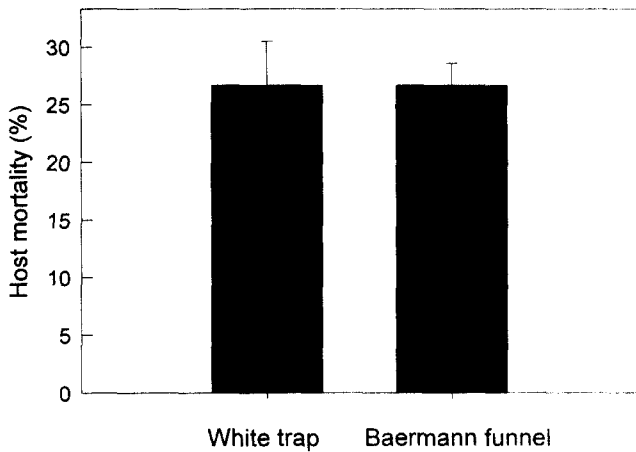


Fig. 1. Comparison of the infective juveniles collected by either classical 'White trap' or improved 'Baermann funnel' methods in their pathogenicities to the fifth instar larvae of *Spodoptera exigua* by petri-dish (90 × 15 mm: diameter × height) assay. Each treatment consisted of 10 petri-dish, each of which had 3 insect larvae on filter paper (90 mm diameter, #2 Avantec, Toyo, Japan) with 25 nematodes. Mortality was assayed at 48 h after the treatment. The vertical bars represent the standard deviations.

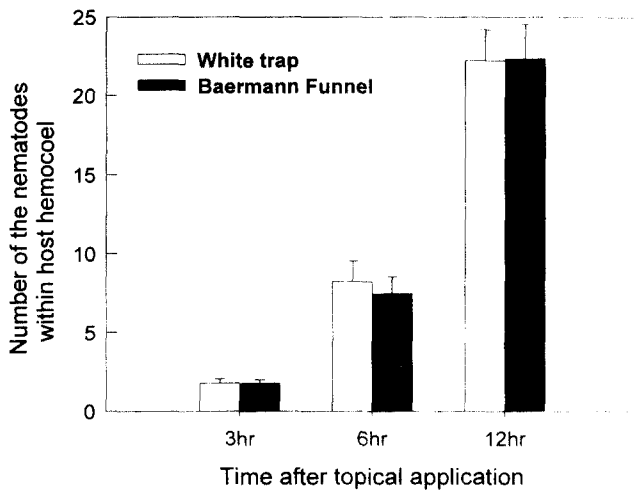


Fig. 2. Comparison of the infective juveniles collected by either classical 'White-trap' or improved 'Baermann funnel' methods in their penetrating activities into the fifth instar larvae of *Spodoptera exigua*. The penetrating activity was measured by the number of the nematodes found in the hemocoel of the larvae treated for the specific times on the filter paper (90 mm diameter, #2 Avantec, Toyo, Japan) with 500 infective juveniles.

가 400 μm 이하인 것으로 판별하였다 (Kaya and Stock 1997). 이렇게 해서 얻어진 유충이 기능적으로 감염태 능력을 소유하고 있는지를 분석하기 위해 이들 유충들의 기

Table 1. Age distribution of the nematodes collected from the fifth instar larvae of *Spodoptera exigua* which were infected with *Steinernema carpocapsae* and incubated for 6 days at 25°C. Nematode collection was conducted by either classical 'White trap' or improved 'Baermann funnel' method

Developmental ages of nematodes	Number of nematodes/host according to collecting methods	
	'White trap'	'Baermann funnel'
Larva 2nd	0	0
3rd	21.028 ± 5.765.0	54.522.3 ± 4.315.4
4th	101.7 ± 49.2	309.3 ± 50.0
Adult	0	0

주 살충력을 분석하였다.

분석된 감염태 선충농도는 일반적으로 약 25%의 치사율을 보이는 것으로 (Han *et al.*, 1999) 비교적 낮은 치사율에서 두 방법으로 분리된 선충의 치사율의 차이를 극대화시키기 위함이다. 이렇게 처리한 후 48시간 뒤에 선충에 의한 기주치사율을 조사하였다 (Fig. 1). 두 방법으로 수거된 감염태 선충은 기주치사율에 있어 차이를 보이지 않았다 ($X^2=0.001$; $df=1$; $P=0.98$).

다시 수거방법에 따른 이들 감염태 유충의 기주 침입력의 차이를 알아보았다. 페트리디쉬 검정법과 유사한 방법으로 감염태 유충 500마리를 0.5 ml의 증류수와 함께 여과지에 시간별로 파밤나방 5령충 (평균 체중: 136.8 ± 16.2 mg)을 3반복으로 처리하였다 (Fig. 2). 두 방법 모두에서 처리시간이 증가할수록 침입된 선충의 수는 증가했으며 이들 상호간에 차이가 없었다 ($F=0.04$; $df=1, 48$; $P=0.85$).

수거 방법에 따른 수거량의 차이가 있는지를 알아보기 위하여, 페트리디쉬 검정법과 유사하게 400마리의 감염선충을 파밤나방 5령충에 처리한 후 온도 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 에 6일간 배양하였다. 이때 두 가지 수거방법으로 모든 선충을 수거한 후 선충의 발육시기별로 구분하였으며 3반복으로 수행하였다. 두 방법 모두 95% 이상이 감염태 유충인 3령충으로 수거되었다 (Table 1). 그 이외에 4령충이 일부 수거되었고 다른 발육태는 수거되지 않았다. 그러나 두 가지 수거 방법은 감염태 수거밀도와 수거소요기간에 있어 현격한 차이를 나타냈다. 기주의 혈관을 노출시키고 감염태 선충을 수거했던 개량된 'Baermann' 깔대기법은 단지 2일의 수거기간을 통해 기주체 마리당 약 50,000마리가 수거되었다. 반면에 아무런 처리없이 감염태 선충이 기주체를 탈출하도록 고인된 기존의 'White-trap'방법은 10일의 수거일을 통해 불과 약 20,000마리의 수거를 보였다.

이상의 결과로 보아 수거 방법에 따른 형태적 감염태 유충은 병원력과 기주 침입력에는 차이가 없는 것으로 판명되었다. 그러나 새로이 변형된 'Baermann' 깔대기법이 기존의 'White-trap' 방법에 비해 수거시간이 단축되고 감

염태 유충의 수거밀도가 높아 기주 곤충으로부터 곤충병원선충을 대량 증식시킬 경우 개량된 'Baermann' 깔대기법이 더욱 효율적인 수거방법이라고 본 연구결과는 제시한다.

적 요

본 연구는 곤충기주에서 증식된 감염태 곤충병원선충 (*Steinernema carpocapsae* Weiser)을 회수하는데 새로이 개량된 방법을 소개한다. 이 수거방법은 기주곤충에 감염태 선충을 접종 후 25°C에서 증식시켰을 경우 최대의 감염태 밀도를 보이는 시기(6일후)에 기주곤충의 혈강을 노출시켜 수거함으로 빠른 속도로 감염태 유충을 회수하려는 데 목적을 두었다. 또 이렇게 해서 빠져나오는 선충들중 가능하면 감염태 유충만 선별하여 걸러지도록 수거하게 했다(개량된 'Baermann' 깔대기법). 기존의 방법은 증식된 기주를 처리없이 'White trap'에 설치하여 놓고 스스로 표피를 뚫고 나오는 감염태 유충을 수거하여 왔다. 개량된 수거방법과 기존의 수거방법을 통해 나오는 감염태 유충의 총수거율과 병원력을 파밤나방 (*Spodoptera exigua* (Hübner)) 5령 유충을 이용하여 비교하였다. 두 방법 모두에서 회수된 선충은 95% 이상이 형태적으로 감염태 유충이었다. 이들 감염태 선충의 기능적 분석을 위해 두 방법에서 회수된 감염태 유충을 파밤나방 (*Spodoptera exigua* (Hübner)) 5령충에 동일한 밀도로 처리했다. 이때 두 방법 모두 기주 살충력이나 일정시간 동안 기주 혈강속으로 침입하는 선충활동력에서 차이가 없었다. 그러나 감염태 유충의 총 수거밀도와 소요기간에 있어서는 차이를 보였다. 기존의 'White trap' 수거방법은 25°C에서 6일동안 증식된 기주 파밤나방 1마리 당 10일 동안의 수거기간을 통해 약 20,000마리의 감염태 유충을 수거한 반면, 개량된 'Baermann' 깔대기법을 이용한 수거방법은 불과 2일의 수거기간 동안 약 50,000마리의 총 수거 감염태 선충밀도를 보였다.

검색어: 곤충병원선충, 선충수거방법, 'Baermann' 깔대기법, 'White trap'법, 파밤나방

사 사

본 연구의 수행에 지도와 충고를 하여주신 경상대학교 추호렬교수와 이동원박사에게 감사드립니다. 이 논문은 농림부에서 시행한 농림수산특정연구사업의 연구결과입니다.

인 용 문 헌

- Akhurst, R.J. 1980. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoplectana* and *Heterorhabditis*. *J. Gen. Microbiol.* **121**: 303-309.
- 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.L. Laird, A. Lacey and E.W. Davidson. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Bedding, R.A. and R.J. Akhurst. 1975. A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. *Nematologica* **21**: 109-110.
- Gaugler, R. 1981. Biological control potential of neoplectanid nematodes. *J. Nematol.* **13**: 241-249.
- Gho, H.G., S.G. Lee, 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.
- Han, S., S. Lee and Y. Kim. 1999. Pathogenicity and multiplication of entomopathogenic Nematode, *Steinernema carpocapsae* Weiser, on beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner) and tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Fabricius). *Korean J. Appl. Entomol.* **38**: (In Press).
- Han, S., Y. Kim and B. Lee. 1996. Biological control of vegetable insect pests with entomopathogenic nematodes. *Korean J. Soil Zool.* **1**: 81-88.
- Kaya, H.K. and S.P. Stock. 1997. Manual of techniques in insect pathology. pp. 297-301 in Techniques in insect nematology. Academic Press, New York.
- Kaya, H.K. and R. Gaugler. 1993. Entomopathogenic nematodes. *Annu. Rev. Entomol.* **38**: 181-206.
- Park, Y., Y. Kim, Y. Lee and S. Han. 1998. Optimal storage conditions of the entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae*. *Korean J. Soil Zoology* **3**: 10-16.
- Park, Y., Y. Kim and Y. Lee. 1999. Identification and characterization of a symbiotic bacterium associated with *Steinernema carpocapsae* in Korea. *J. Asia-Pacific Entomol.* **2**: 105-111.
- Thomas, G.M. and G.O. Poinar, Jr. 1979. *Xenorhabdus* gen. nov., a genus of entomopathogenic nematophilic bacteria of the family Enterobacteriaceae. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **29**: 352-360.