

宿主昆虫을 이용한 담배거세미나방核多角體病바이러스의 大量生産

In Vivo Mass Production of *Spodoptera litura* Nuclear Polyhedrosis Virus

任大準¹·崔鏡文¹·李文弘¹·陳炳來²·姜錫權²

Dae Joon Im¹, Kui Moon Choi¹, Moon Hong Lee¹, Byung Rae Jin², and Seok Kwon Kang²

ABSTRACT Mass production of *Spodoptera litura* nuclear polyhedrosis virus (SINPV) was carried out on massively reared host insects. The yield of SINPV was maximal with 6.7×10^9 PIBs per larva on the 8th day post inoculation, when 5th instar larvae were inoculated with 1.1×10^7 PIBs per ml, and 2 g of artificial diet was sufficient for food consumption of a larva. The moribund larvae were more suitable for handling and mass production of virus than the completely dead larvae. The larvae, when treated with methoprene (Manta®), prolonged their larval period and consequently became bigger to result in higher yield (about 15%) of virus.

KEY WORDS *Spodoptera litura*, nuclear polyhedrosis virus, mass production, methoprene

抄 錄 담배거세미나방核多角體病바이러스 大量生産 연구에서, 5齡虫에 1.1×10^7 다각체/ml로 접종 후 8일에 收穫했을 때 한마리당 6.7×10^9 다각체를 생산할 수 있었으며, 이때 飼料는 한마리당 약 2g의 人工飼料로 충분하였다. 合成幼若 호르몬인 methoprene (Manta®)을 처리했을 때 終齡幼虫期間이 1~2日 연장되었으며, 바이러스 생산에 있어서도 무처리에 비해 약 15% 증가되었다.

檢 索 語 담배거세미나방, 核多角體病바이러스, 大量生産, 合成幼若호르몬

最近 國內에서도 生物農藥의 필요성이 대두되면서 많은 연구가 수행되고 있다. 化學殺虫劑의 代替農藥으로 昆虫病原性細菌製劑나 昆虫바이러스製劑가 害虫防除利用으로 이미 商品化가 되고 있다. 특히 後者는 昆虫에만 感染되는 바이러스로 人畜에 대한 毒性이 전혀 없고 宿主昆虫에 대한 特異性 때문에 自然生態系의 파괴를 極少化할 수 있는 방제수단이 될 수 있다.

昆虫 바이러스를 害虫防除에 이용하기 위해서는 바이러스의 增殖特性에 따른 大量生産體系確立과 생산된 바이러스의 收穫에서부터 製劑化에 이르는 과정에 대한 연구가 이루어져야 한다. 특히 효율적인 量産體系 확립은 바이러스 製劑의 生産價와 밀접한 관계가 있으므로 중요하다.

현재 바이러스 大量增殖 方法은 宿主昆虫의 대량사육을 통한 生體增殖 方法이 주로 이용되

고 있으며, 昆虫細胞培養系를 이용한 量産體系도 시도되고 있으나 경제적인 문제로 실용화되지 못하고 있다(Mckinnon 등 1974, Kurstak 1982).

生體增殖에 의한 바이러스의 증식 목적은 숙주곤충의 組織을 최대한 이용하는 동시에 病原성이 높은 바이러스를 생산함에 있다. 이를 위해서는 바이러스와 숙주곤충 및 환경에 관련된 연구 즉, 숙주곤충의 飼料(Shapiro 등 1980), 飼育條件(Bell 등 1980), 바이러스 接種液의 純度(Martignoni 1979), 活性(Ignoffo & Anderson 1979), 濃度 및 投與量(Hedlund & Yendol 1974), 接種時期(岡田 1977), 收穫時期(Vail 등 1973) 등 많은 요소들이 바이러스 생산성을 최대화할 수 있도록 결정되어야 한다.

따라서 본 시험은 담배거세미나방의 微生物的防除을 위해 核多角體病바이러스의 大量生産體系를 확립하여 微生物殺虫劑 製劑化를 위한 기초자료를 얻고자 수행되었다.

1 農業技術研究所 昆虫科(Entomology Division, Agricultural Sciences Institute, RDA, Suwon. Korea)

2 서울대학교 農科大學(College of Agriculture, Seoul National University, Suwon. Korea)

材料 및 方法

人工飼料 攝食量 및 核多角體病바이러스 増殖量

供試한 담배거세미나방核多角體病바이러스와 담배거세미나방 人工飼料는 任 等(1988)의 보고에서와 같다.

인공사료(5 ± 0.2 g) 표면에 500 μl의 바이러스를 처리한 후 탈피직후의 5령 유충 10 마리를 완전히 섭식시켰다.

접종 3일 후(6령 1일) multi-well plate(100 mm², 25wells, Flow Lab.)에 well당 2g의 사료를 넣어 바이러스를 침식시킨 유충을 개체사육하면서 유충 1 마리당 인공사료섭식량 및 바이러스 증식량을 조사하였다.

바이러스 증식량 조사는 접종 6일 후부터 9일까지 사충수를 조사한 후 -20°C의 냉동고에 동결시켜 바이러스를 수확하였다. 수확한 사충은 체중 g당 10배(v/w)의 증류수를 가한 뒤 Teflon homogenizer로 마쇄한 후, 血球計數器로 多角體數를 계수하여 산출하였다.

合成幼若 호르몬의 바이러스 増殖效果

合成幼若 호르몬 처리가 바이러스 증식에 미치는 효과를 조사하기 위하여 養蠶用 合成幼若 호르몬인 methoprene(Manta[®]; Isopropyl(2E, 4E)-11-methyl-3, 7, 11-trimethyl-2, 4-dodecadienoate, 1.25 mg/ml)을 아세톤으로 500배 희석하여 사용하였다.

처리 및 조사방법은 바이러스 증식량 조사에서와 같은 방법으로 바이러스를 접종한 후, 3일 뒤(6령 1일) methoprene 희석액을 인공사료 표면에 100 μl씩 처리하여 개별 침식시켰다. 접종후 6일부터 4일 동안 감염유충을 수확하여 조사하였다.

또한 methoprene이 바이러스를 접종하지 않은 건강한 담배거세미나방 유충에 경과일수, 용화율 및 용중에 미치는 영향도 함께 조사하였다.

結果 및 考察

人工飼料 攝食量

Table 1. Weight of the artificial diet fed by a *Spodoptera litura* larva^a

(Unit : gram)

Inoculum(PIBs/ml)	Days of post inoculation		
	3	5	7
1.1 × 10 ⁶	0.52	1.40	2.04
1.1 × 10 ⁷	0.54	1.24	1.79
1.1 × 10 ⁸	0.50	1.18	1.59

^a Larvae were inoculated with NPV just after 4th ecdysis.

Table 2. Comparison of *Spodoptera litura* nuclear polyhedrosis virus productivity in infected larva depending on physical status^a

Status	PIBs/larva	PIBs/g of larval wt.
Living infected	0.900 × 10 ⁹	1.281 × 10 ⁹
Moribund	5.700 × 10 ⁹	8.399 × 10 ⁹
Dead	6.649 × 10 ⁹	11.343 × 10 ⁹

^a A larva was inoculated with 100 μl of 1.1 × 10⁸ PIBs/ml just after 4th ecdysis and then harvested on 8th day post inoculation.

담배거세미나방 5령 유충에 核多角體病바이러스를 1.1 × 10⁶⁻⁸ 다각체/ml로 접종한 후, 經過日數別로 사료섭식량을 조사한 결과, 접종 후 3일까지는 接種濃度에 관계없이 약 0.5 g으로 비슷하였다. 그러나 접종 후 5일부터 차이가 나타나기 시작하였고 접종농도가 높을수록 人工飼料 攝食量이 감소되었다(표 1).

Hedlund와 Yendol(1974) 및 Shapiro(1980)는 바이러스가 처리된 사료를 48시간 동안 집시나방에 침식시킨 후 새로운 사료를 급여한 것과 바이러스를 처리한 사료를 처음부터 收穫日까지 계속 침식시킨 것과는 바이러스 생산에 있어서 비슷한 결과를 얻었다고 보고하였다.

따라서 바이러스를 접종하여 수확일까지 처음부터 급여한 사료를 그대로 두는 것이 경제적이기 때문에 感染虫의 飼料攝食量 조사는 바이러스 대량증식의 필수적인 선행조건이라 할 수 있다.

本 實驗에서는 1.1 × 10⁷⁻⁸ 다각체/ml로 바이러스를 접종하여 접종 후 7~8일에 수확하면 飼料給與量은 2 g 이하로 해도 감염유충의 성장과 바이러스 증식에 충분함을 알 수 있다.

Table 3. Physical status and weight of *Spodoptera litura* larvae depending on inoculum concentration and harvesting day p.i.

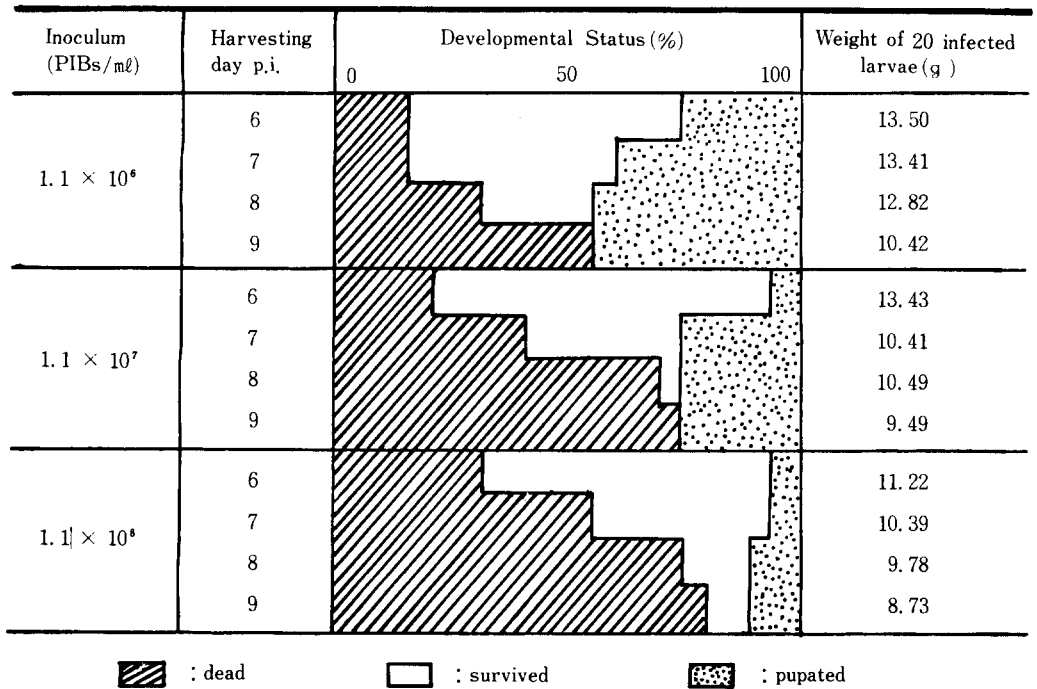


Table 4. Yields of *Spodoptera litura* nuclear polyhedrosis virus at different inoculum concentration and harvesting day against 5th instar *S. litura* larvae

Inoculum (PIBs/ml)	Harvesting days p.i.	PIBs/larva	PIBs/g larval weight
1.1 × 10 ⁶	6	1.324 × 10 ⁹	1.961 × 10 ⁹
	7	2.176	3.247
	8	2.312	3.605
	9	2.906	5.578
1.1 × 10 ⁷	6	2.531	3.770
	7	3.456	6.644
	8	6.724	11.212
	9	4.612	9.720
1.1 × 10 ⁸	6	3.862	6.888
	7	3.979	7.656
	8	5.187	10.612
	9	4.289	9.825

감염虫의罹病程度에 따른 바이러스生産量

접종 후 감염층의 이병 정도에 따른 바이러스 생산량의 차이를 비교하기 위하여 1.1 × 10⁸ 다각체/ml의 접종액을 유충 1 마리 100 μl당씩 접

종한 후 個體飼育하였다. 접종 8일 후에 完全斃死虫, 瀕死虫 및 感染生存虫으로 구분하여 각각의 바이러스 생산량을 조사하였다(표 2).

完全斃死虫에서 가장 많은 바이러스를 생산할 수 있었으며, 瀕死虫에서는 完全斃死虫과 큰 차이를 나타내지 않았다. 그러나 感染生存虫에 있어서는 완전 폐사층과 비교할 때 1 마리당 생산량에 있어서는 7 배 이상, 虫體重은 1 g당 8 배 이상으로 나타나 현저히 낮은 바이러스 생산량을 나타내었다.

Heliothis zea 幼虫에서도 감염생존층에 비해 폐사층에서 약 6~12배의 바이러스 생산량이 높았다고 했으며, 이때 폐사층에서 얻은 바이러스의 병원성이 더 강하다고 하였다(Ignoffo & Shapiro 1978).

이러한 사실로 보아 수확시의 이병 정도는 바이러스 생산과 병원성에 중요함을 알 수 있다. 그러나 폐사층의 경우 폐사 직후 수확되지 않았을 때는 虫體表皮의 봉기로 多角體의 손실 뿐만 아니라 각종 細菌의 오염으로 인하여 製劑化

Table 5. Effect of methoprene on pupation of *Spodoptera litura* larvae*

Methoprene (2.5 µg/ml)	No. of tested insect	Numbers of pupae at each day										Pupation (%)	Pupal wt.(g)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Treated	56						22	10	11	2		80.0	0.468
Untreated	57					19	17	11				82.5	0.391

* A fifth ecdysis larva was treated with 100 µl of methoprene(0.25 µg).

Table 6. Effect of methoprene* on production of *Spodoptera litura* nuclear polyhedrosis virus

Inoculum*(PIBs/ml)	Harvesting days p.i.	PIBs/larva	PIBs/g larval weight	Mortality(%)
1.1 × 10 ⁷	6	2.671 × 10 ⁹	4.515 × 10 ⁹	25.0
	7	3.750	5.748	33.3
	8	7.733	13.010	80.0
	9	5.287	9.086	75.0

* Methoprene treatment was same as in Table 4.

† Inoculum was 50 µl.

과정에서 바이러스의 分離 精製工程에 많은 어려움을 야기시키므로 瀕死虫 상태에서 수확함이 경제적인 것으로 생각된다.

接種濃도와 收穫時期에 따른 死虫率 및 虫體重

5령 유충에 1.1 × 10⁶⁻⁸ 다각체/ml의 바이러스를 접종한 뒤 6, 7, 8, 9일째의 수확시기에 따른 死虫率과 虫體重을 조사하였다(표 3).

사충율과 아울러 蛹化率을 조사한 결과, 바이러스 접종농도가 높고, 접종후 일수가 경과할수록 사충율은 높으며 반면에 蛹化率은 감소하였다.

Shapiro 등(1980)은 너무 낮은 농도로 접종하면 蛹化率이 높아 바이러스 생산이 저하되고 접종농도가 너무 높으며 死虫率은 증가하나 유충의 成長과 發育이 지연되어 바이러스의 最大生産을 얻기가 곤란하다고 하였다.

따라서 바이러스의 최대생산을 위한 最適死虫率을 유도할 수 있는 조건을 결정하여야 한다.

한편 虫體重은 전반적으로 접종농도가 높고, 일수가 경과할수록 총체중의 증가가 둔화되어 死虫率과 밀접한 관계가 있음을 보여 주었다. Hedlund와 Yendol(1974)은 일반적으로 사충율이 높고 수확시의 총체중이 클 때 마리당 및 단위 체중 g당 바이러스 生産量이 높다고 하였다.

따라서 最大虫體重 때 最大死虫率을 유도하는 것이 最大 바이러스 生産 條件이라고 생각된다.

바이러스의 大量生産

효율적인 바이러스 生産條件을 구명하기 위한 바이러스 大量増殖 시험 결과는 표 4와 같다.

1.1 × 10⁷ 다각체/ml 농도에서 접종 후 8일째 수확한 경우 1 마리당 및 총체중 1 g당 생산량이 가장 높았다.

고농도 바이러스 접종에서는 感染程度 및 死虫率이 높았으나, 高濃度로 인하여 感染虫의 발육의 크게 저해되었기 때문에 바이러스 생산량이 낮았다.

또한 1.1 × 10⁷과 1.1 × 10⁸ 다각체/ml 濃度區에 수확시기에 있어서 접종 후 8일 수확에서 보다 9일 수확시 사충율이 높아졌음에서 생산량이 적게 나타났다. 이는 완전폐사충 상태로 수확시 표피 붕괴로 인한 다각체 손실 때문이라 생각되며 虫體重 변화에서도 입증되었다.

이상과 같이 바이러스 생산에는 接種濃度 및 收穫時期가 중요하게 작용하는데, *H. zea*에서는 1.1 × 10⁷ 다각체/ml, *Trichoplusia ni*에서는 5.0 × 10⁶ 다각체/ml(Ignoffo 1966), 집시나방에서는 3.0~5.0 × 10⁶ 다각체/ml(Smith 등 1976, Shapiro 1980)일 때 宿主昆虫에 최대 성장과 동시에 바이러스의 최대생산을 얻을 수 있는 適正濃度라고 하였다.

또한 收穫時期에 있어서 *Autographa californica* NPV는 접종 후 7일째(Vail 등 1973), *Choristoneura fumiferana* 幼虫에서는 접종 후 8일째(Cunningham 등 1979), *Heliothis* 幼虫

에서는 접종 후 7~9일째 그 생산량이 높은 것과 비슷한 경향이였다.

岡田(1977)은 담배거세미나방 5령에 접종하여 6령중기, 즉 最大虫體重 增加 때 높은 死虫率을 유도할 수 있는 接種농도를 처리하는 조건에서 幼虫 1마리당 8×10^9 다각체를 생산하였음을 보고했다.

바이러스 생산을 위한 合成幼若 호르몬 處理 効果

合成幼若 호르몬 處理가 담배거세미나방 幼虫의 발육에 미치는 영향을 알아보기 위하여 건강한 6령의 탈피 직후 유충에 methoprene 500배 희석액을 처리한 후 蛹化率 및 蛹重을 조사하였다(표 5).

용화율은 처리구와 무처리구 간에 큰 차이는 보이지 않았으나, 終齡 幼虫期間은 호르몬을 처리했을 때 1~2일 정도 길게 나타났다. 또한 蛹重은 무처리구에서 보다 처리구에서 다소 증가하였다.

이와 같은 실험결과는 合成幼若 호르몬처리구 용화지연과 蛹체중 증가로 바이러스 생산에 있어서 다소 효과를 얻을 수 있음을 시사하였다.

바이러스 大量增殖 조사에서와 같은 방법으로 바이러스를 접종 후 合成幼若 호르몬을 처리하고 그 생산량을 조사한 결과는 표 6과 같다.

이는 표 5의 결과와 비교할 때 1.1×10^7 다각체/ml에서 合成幼若 호르몬처리의 경우 전반적으로 약간 높은 바이러스 생산성을 보였다. 특히 접종 후 8일째에 유충 1마리당 바이러스 생산량에 있어서 약 15%가 증가했다.

Boucias와 Nordin(1980)은 *Hyphantria cunea*에서 methoprene (Altosid®) 1, 10, 100 ppm을 먼저 침식한 결과 바이러스에 영향이 없었고 유충의 생육기간이 연장되어 바이러스의 LT_{50} 도 증가한다고 하였다.

이상의 결과를 토대로 담배거세미나방 核多角病體 바이러스의 大量增殖은 큰 어려움이 없다고 볼 수 있다. 그러나 무엇보다 실제 農家에서 利用할 수 있는 생산단계로 가기 위해서는 경제적인 면과 勞動의 절감을 고려치 않을 수 없다.

따라서 人工飼料成分의 低廉化, 飼育體制의 間易化, 바이러스 接種方法 및 羅病虫 수거의 自動化, 바이러스分離 및 保管方法 등 많은 연구가 보충되어야만 利用可能性이 높아질 수 있다.

謝 辭

本 論文은 科學技術處 特定研究 開發費에 의해 遂行하였음.

引 用 文 獻

- Bell, R.A., C.D. Owens, M. Shapiro & I.R. Tardif. 1980. In [The gypsy moth: Research towards integrated pest management], C.C. Doane (Ed.). USDA Tech. Bull., Chap. 6, 5.
- Boucias, D.G. & G.L. Nordin. 1980. Methoprene-nuclear polyhedrosis virus infections in *Hyphantria cunea* (Drury). J. Kans. Entomol. Soc. 53 : 56~60.
- Cunningham, J.C., G.M. Howse, J.R. Mc Phee, P. de Groot & M.B.E. White. 1979. Aerial application of spruce budworm baculovirus: Replicated tests with an aqueous formulation and a trial using an oil formulation in 1978. Rep. FPM-X-21, Forest Pest Management Institute, Sault Ste. Marie, Ontario.
- Hedlund, R.C. & W.G. Yendol. 1974. Gypsy moth nuclear polyhedrosis virus production as related to inoculating time, dosage, and larval weight. J. Econ. Entomol. 6 : 6~6.
- Ignoffo, C.M. 1966. Effects of age on mortality of *Heliothis zea* and *Heliothis virescens* larvae exposed to a nuclear polyhedrosis virus. J. Invertebr. Pathol. 8 : 279~282.
- Ignoffo, C.M. & R.F. Anderson. 1979. In [Microbial technology], 2nd ed., Vol. I. Academic Press. New York. pp.1~28.
- Ignoffo, C.M. & M. Shapiro. 1978. Characteristics of baculovirus preparations processes from living and dead larvae. J. Econ. Entomol. 71 : 186~188.
- 任大準, 朴範錫, 陳炳來, 崔續文, 姜錫權. 1988. 담배거세미나방核角體病 바이러스의 病原性. 韓應昆誌. 27 : 219~224.
- Kurstak, E. 1982. In [Microbial and Viral pesticides] pp.335~507. Dekker. New York.
- Mackinnon, E.A., J.F. Henderson, D.B. Stoltz & P. Paulkner. 1974. Morphogenesis of nuclear polyhedrosis virus under conditions of prolonged passage *in vitro*. J. Ultrastruct. Res. 49 : 419~435.
- Martignoni, M.E. 1979. Mass propagation of insect viruses with especial reference to forest insects, In [The Douglas-Fir Tussock Moth: A synthesis]

- ed. by Brooker, M.H., R.W. Stark, & R.W. Campbell(Eds.) USDA For. Serv. Tech. Bull. 1585. Chap. 7.2, pp.140~147.
- 岡田齊夫. 1977. 核多角體病ウイルスよるハスモンヨトウの防除に関する研究. 中國農試報. E12:1~66.
- Shapiro, M. 1980. In[The Gypsy Moth: Research towards integrated pest management] ed by Doane. C.C. USDA Tech. Bull. Chap. 6.6.
- Shapiro, M., R.A. Bell & C.D. Owens. 1980. In [The Gypsy Moth: Research towards integrated pest management] ed by Doane. C.C. USDA Tech. Bull. 1584. Chap. 6.5.
- Smith, R.P., S.P. Wraight, M.F. Tardif, M.J. Hasenstab & J.B. Simoone. 1976. Mass rearing of *Porthethia dispar* (L)(Lepidoptera: Lymantriidae) for in host production of nuclear polyhedrosis virus. N.Y. Entomol. Soc. 84:212~213.
- Vail, P.V., S.J. Anderson & D.L. Jay. 1973. New procedures for rearing cabbage loopers and other lepidopterous larvae for propagation of nuclear polyhedrosis virus. Environ. Entomol. 2:339~344.
- Vail, P.V., D.L. Jay & D.K. Hunter. 1973. Infectivity of a nuclear polyhedrosis virus from the alfalfa looper, *Autographa californica*, after passage through alternate hosts. J. Invertebr. Pathol. 21:16~20.

(1989년 2월 23일 접수)