

## *Hyphantria cunea* Nuclear Polyhedrosis Virus의 특성 및 병원성

박일웅\*<sup>1</sup> · 이근광<sup>2</sup> · 김명곤<sup>3</sup>

<sup>1</sup>전북산업대학교 식품공학과, <sup>2</sup>금성환경대학 환경보호학과,

<sup>3</sup>전북대학교 식품공학과

**초록** : 바이러스 살충제의 개발을 위한 기초 자료로서 *Hyphantria cunea* nuclear polyhedrosis virus(HcNPV)의 일부 특성과 병원성을 조사하였다. HcNPV는 *Spodoptera frugiperda* (Sf)세포의 핵에서 복제 되었으며, 바이러스를 감염 시켰을 경우 감염 24시간 후에 prepolyhedra 형성이 관찰 되었고, 감염 48시간 후에는 성숙된 많은 polyhedra가 전체세포에서 관찰 되었으며, 감염 72시간 후에는 polyhedra가 세포밖으로 방출 되었다. 또한 세포는 부유 배양에서 잘 성장 하였으며, 바이러스에 감염되기 전의 세포 배양액은 pH가 6.35이었으나 이후 점차 증가하여 감염 120시간 후에는 pH가 6.77이었다. Polyhedra inclusion body(PIB)를 설탕 밀도구배 원심 분리한 결과 50~55% 부근에서 밴드가 형성 되었고, polyhedra는 도립 현미경과 전자 현미경하에서 관찰한 결과 대부분 4면형의 6면체(tetragonal hexahedron) 이었고, PIB의 크기는 평균 2.5  $\mu\text{m}$ 이었다. 또한 감염 48시간 후에 polyhedra 속에는 다발을 형성한 비리온이 봉입 되어 있었다. 흰불나방 유충에 대한 병원성 시험에서는 4령에서 보다는 2령과 3령의 유충에서 치사율이 높았고,  $1.5 \times 10^9 \sim 1.5 \times 10^7$  PIB/ml로 섭식시킨 구름에서는 2령과 3령 유충에서 90% 이상의 치사율을 나타 내었다(1995년 8월 11일 접수, 1995년 9월 14일 수리).

### 서 론

오늘날 인류문명과 산업이 고도로 발달함에 따라 야기되는 환경 오염과 생태계 파괴는 인류의 삶을 위협하는 심각한 문제점으로 대두되고있고, 이는 곧 세계 인구의 증가추세에 반하여 식량난을 가중 시키는 한 요인이 될 것으로 예상 되므로 식량자원의 확보 대책이 시급히 모색 되어야 할것으로 생각된다. 다행히도 우리 인류는 갖가지 유형으로 오염되어 가고있는 지구를 되 살리고자 부단히 노력을 기울여 왔지만 아직도 지구상에는 약 100만종 이상으로 추정되는 곤충들이 해충 또는 전염병 매체로서의 피해는 물론 식량 자원에도 엄청난 피해를 주고 있는 실정이다.<sup>1)</sup> 따라서 이같은 유해 곤충을 방제할수 있는 방법이 앞으로 적극 모색 되어야 할 것으로 생각된다.

해마다 우리나라에서는 솔나방(*D. spectabilis*), 솔잎혹파리(*T. japonensis*), 흰불나방(*H. cunea*), 밤나무혹벌(*D. kuriphilus*), 짚시나방(*L. dispar*) 등의 곤충에 의해 침식되는 식량 자원이나 산림의 손실은 막대하지만, 이들 해충의 방제 수단은 현재 화학 살충제에만 의존하고 있다.<sup>1)</sup> 또한 이들 화학 살충제의 남용은 환경오염은 물론 어류나 식물에 이들 성분의 누적으로 생태계를 파괴하여 돌이킬 수 없는 지국로 만들게 될 것이다.<sup>2)</sup> 이러한 살충제에 대한 저항성의 증가 등에 대한 문제점을 해결하기 위하여 안전한 해충방제법을 추구하게 되었으며,

근래에 와서는 유해 농림 곤충의 억제 및 환경오염의 방지를 위한 일환으로 미생물 제제를 사용하는 경향이 있으며,<sup>3)</sup> 미생물 살충제로서는 *Bacillus* sp.와 baculovirus 및 곰팡이(*Aschersonica aleyrodis*)가 널리 이용 되고 있고, 이들은 환경보호는 물론 유해 곤충을 선택적으로 제어 하는데 효과가 큰 것으로 알려져 있다.<sup>4,5)</sup>

또한 이들 중 병원성 곤충 바이러스는 곤충 집단에서 Epizotic disease을 일으켜 곤충의 번식을 억제한다.<sup>6)</sup>

Baculovirus는 baculoviride의 유일한 속으로 나비목, 쌍시목, 벌목, 메뚜기목의 곤충에서 분리되었으며,<sup>7)</sup> 또한 수중의 무척추동물(새우)에서 분리 보고 되었고,<sup>8)</sup> 형태에 따라서 nuclear polyhedrosis virus(NPV), granulosis virus(GV), 그리고 oryctes-like virus(OV)로 분류된다.<sup>7)</sup> 이 중 핵다면체 바이러스는 DNA 바이러스로 무척추동물의 핵에서 분열 복제하며, 뉴클레오 캡시드의 크기는 30~40 $\times$ 400 nm이고, 핵다면체는 3~15  $\mu\text{m}$ 의 크기로 다양하다.<sup>9-11)</sup>

또한 비리온은 세포에서 세포로의 감염에 관여하며, 핵다면체는 숙주에서 숙주로의 감염에 관여하는 것으로 알려져 있는데,<sup>12,13)</sup> 본 연구에서는 무공해 살충제 개발을 위한 기초 전략의 하나로 살충 미생물인 baculovirus에 의한 식량자원 및 환경 보호를 목적으로 흰불나방을 선택적으로 치사시키는 흰불나방 핵다면체 바이러스(*H. cunea* nuclear polyhedrosis virus, HcNPV)에 대한 일부 특성과 병원성을 조사하였다.

찾는말 : HcNPV, *S. frugiperda* cell line, Polyhedra, *Hyphantria cunea* larvae, pathogenicity

\*연락처

## 재료 및 방법

### 세포배양 및 바이러스

바이러스의 증식을 위한 숙주 세포로 *Spodoptera frugiperda*(IPLB-SF-21)세포주를 사용하였으며, 세포 배양을 위해서는 TNM-FH배지(Hazleton research products Inc.)에 10% fetal bovine serum(Flow Lab.), 0.26% tryptose broth(Difco Lab.), penicillin(1,000 unit/ml)-streptomycin(1000 µg/ml, Flow Lab.)을 첨가하였고, 바이러스는 바이러스질병에 의해 치사된 흰불나방 유충으로부터 Choe 등<sup>14)</sup>이 분리한 핵다면체 바이러스(HcNPV)를 사용하였다.

### 바이러스 접종

세포배양용 플라스크(25 cm<sup>2</sup>, Falcon)에 세포를 2×10<sup>6</sup> 개 이식한 다음 바이러스를 2 M. O. I. 되게 1시간 감염시킨 후, 배양액 1 ml을 넣어 세척하고, 다시 배양액 5 ml을 넣어 CO<sub>2</sub>항온기에서 28°C로 배양하면서 감염과정을 도립현미경(Olympus, IMT-2)으로 관찰하였다.

### 바이러스감염에 따른 배지내 pH 변화

세포배양용 플라스크(75 cm<sup>2</sup>)에 5×10<sup>6</sup> cell를 이식한 다음, 여기에 바이러스를 2 M. O. I. 되게 1시간 감염시킨 후, CO<sub>2</sub>항온기에서 28°C로 배양하면서 배양액내 pH 변화를 조사하였다.

### Polyhedra 정제

세포배양용 플라스크(75 cm<sup>2</sup>)에 세포를 5×10<sup>6</sup> 되게 이식한 후, 바이러스를 5 M.O.I. 되게 감염 시키고, CO<sub>2</sub> 항온기에서 28°C로 5일간 배양한 다음 3,000×g에서 세포를 10분간 원심 분리하였다. 여기에 SDS를 최종농도 1% 되게 30분 반응 시킨 다음, 세포액을 25~65%(wt/wt)의 설탕 밀도구배 원심 분리 튜브에 조심스럽게 올리고, 100,000×g(Beckman LK-2, SW41 Roter)에서 2시간 원심분리한 후, 형성된 핵다면체(polyhedra inclusion body, PIB) 층만을 모아 사용하였다.

### 전자현미경 관찰

감염된 세포를 원심분리하여 침전시키고 3% glutaraldehyde 용액에서 1시간, 2% osmium tetroxide에서 1시간 고정 시킨 다음, 각 시료는 60, 70, 80, 95와 100%의 ethanol로 각각 10분간 탈수하였다. 이어 epon과 propylene oxide의 비가 1:2, 1:1, 2:1인 용액에 각각 1시간씩 정치시킨 후, epon에 포매하여 24시간 정치하고 65°C에서 3일간 건조 시켰다. 박편제작은 ultramicrotome(Sorval MT-2)으로 절단하여 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색한 후, 투과 전자현미경(Hitach H-500)으로 75 kV에서 관찰하고 사진 촬영 하였다.

### 공시충

흰불나방 卵塊는 야외에서 채집하여 1% NaOCl로

소독한 후, 난부화한 유충을 사육하면서 공시하였고, 사육실(25+2°C, RH 65%)은 3% formalin으로 소독하였다.

### 병원성 시험

병원성 시험에 사용한 polyhedra는 Sf세포를 대량 배양한 후, 바이러스를 접종하여 형성된 polyhedra를 분리하였고, polyhedra 숫자를 10<sup>5</sup>~10<sup>9</sup> PIB/ml로 조정 한 후, *Platanus orientalis* 잎(10×10 cm)에 고르게 바른 다음, 음지에서 건조시킨 후, 유충이 섭식 하도록 하였다. 이때 사용한 사레(직경 9 cm)는 멸균된 1회용 제품을 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### 바이러스의 sf세포에 감염

*S. frugiperda* 계대 세포에 HcNPV를 감염시킨 후, CO<sub>2</sub> 항온기에서 28°C로 배양하면서 감염 과정을 조사하였다. 감염 24시간 후, 세포의 핵에서 형성 초기에 있는 PIB를 관찰 할 수 있었고, PIB는 시간이 지나면서 점점 성숙하여 감염 36시간에는 확실히 구별할 수 있었다(Fig. 1, A). 감염 72시간 이후에는 PIB의 성숙이 완성되어 세포가 용해되고, 감염 100시간 후에는 PIB가 세포밖으로 방출 되었음을 관찰 할 수 있었다(Fig. 1, B). 그러나 Choe 등<sup>14)</sup>은 HcNPV를 *Trichoplusia ni*(TN-368) 세포주에 감염시키면 세포가 등글게 됨으로써 바이러스 감염을 확인할 수 있고, 접종후 72시간 후에는 성숙된 PIB의 일부가 세포배양액 속으로 방출 된다고 보고하여 Sf세포에서와 TN-368세포주에서는 PIB성숙 시간상에 약간의 차이를 보였으나 Faulkner<sup>15)</sup>가 보고한 AcNPV가 *T. ni*세포에 감염되었을 때의 결과와 Raghov와 Grace<sup>16)</sup>가 보고한 *B. mori* NPV가 *B. mori* 세포주에 감염되었을 때의 결과와 유사할 뿐만 아니라 이외의 다른 NPV와도

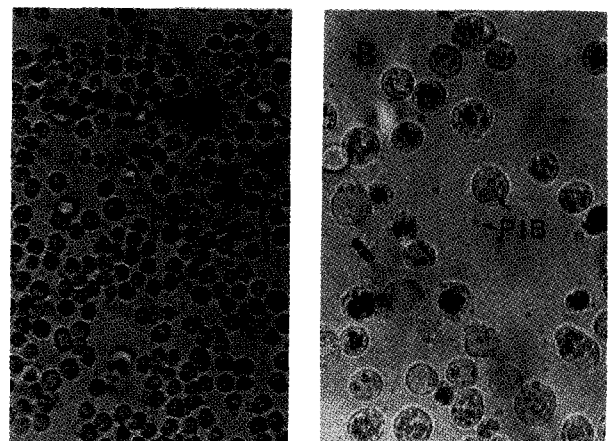


Fig. 1. Micrographs of the *S. frugiperda* cells infected with HcNPVs at 36hrs post-infection(A), and at 100hrs post-infection(B). PIB; polyhedra inclusion body. Cells were observed under a Inverted Microscope wide 100x(A) and 200x(B) magnification.

Table 1. Changes of pH in *S. frugiperda* cell culture medium after virus infection

Hours after infection	pH
Control(medium)	6.35
12	6.50
24	6.57
36	6.62
48	6.70
60	6.71
72	6.73
84	6.73
96	6.76
108	6.76
120	6.77

유사한 결과로 나타났다.<sup>16,17)</sup>

### 바이러스 감염에 따른 배지내 pH 변화

바이러스를 *S. frugiperda* 세포에 감염시켜 감염 시간에 따른 배지내 pH 변화를 조사한 결과는 Table 1과 같다. 세포를 배양하기 전, 배지내 pH는 6.35이었으나 바이러스를 감염시켜 배양 12시간 후의 pH는 6.50이었고, 24시간 후는, 6.57, 48시간 후는, 6.70으로 약간씩 증가하다가 60시간 후, 6.71, 72시간 후, 6.73, 96시간 후, 6.76, 108시간 후, 6.76, 120시간 후 6.77로 거의 일정 하였다. 이와같이 배양액내 pH가 감염 48시간까지는 약간씩 증가하다가 감염 60시간 이후에는 거의 비슷한 값으로 나타난것은 지금까지 각종 바이러스 감염세포의 pH 변화에 관련한 자료가 흔치않아 정확한 비교 검토는 어려운 실정이지만 TN-368 정상 세포의 경우, 배양시간이 길어질수록 pH가 비례해서 증가(배지내 pH 6.3, 96시간 배양후 pH 7.0)되었다는 Hink와 Strauss<sup>18)</sup>의 보고를 감안 하면 HcNPV에 감염된 본 Sf세포의 pH가 초기에 완만한 상승을 나타낸점과는 대체로 유사한 경향으로 이는 바이러스가 세포에 처음 감염 되었을때는 세포가 활성을 완전히 잃지 않고, 대사가 어느정도 진행되기 때문에 대사 산물인 노폐물로 인하여 나타난 결과로 추정된다. 그러나 감염 60시간 이후의 pH값이 거의 일정한 것은 세포가 바이러스 감염에 의해 활성을 완전히 잃어 대사가 중지된 때문으로 생각 되며, 따라서 Sf세포는 HcNPV 감염후 약 60시간 정도면 세포의 활성을 잃게 될것으로 추정된다.

### Polyhedra 정제 및 형태

PIB가 성숙된 세포에 SDS를 반응시켜 세포막을 용해한 후, 설탕 밀도구배 원심 분리한 결과 PIB는 50~55% sucrose 층에서 밴드를 형성하였으며, Sf세포내에서 성숙된 PIB를 위상차 현미경과 전자현미경 하에서 관찰한 결과 PIB중 극히 일부는 구형에 가까운 형태도 있으나 대부분은 4변형의 6면체(tetragonal hexahedron)이었고, PIB의 크기는 대략 0.7~3  $\mu\text{m}$  정도로 다양하나

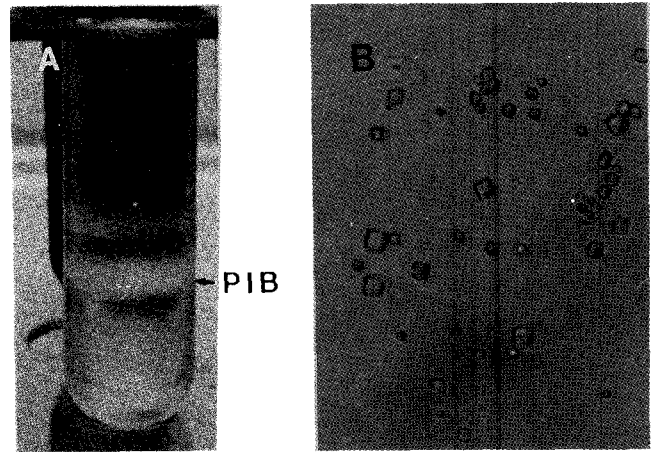


Fig. 2. Purified polyhedra band(arrow) layered on 50~55% sucrose linear density gradient(A), and polyhedra shapes were observed under a Inverted Microscope with 600 $\times$ (B) magnification.

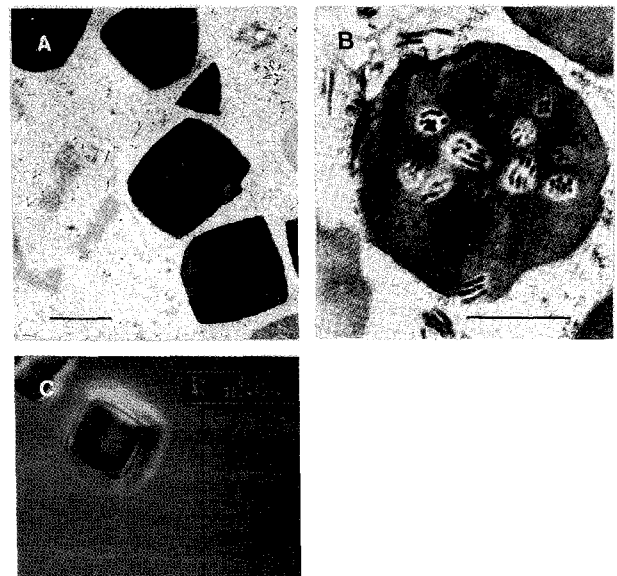


Fig. 3. Electron(A, B) and phase contrast micrographs(C) of polyhedra inclusion bodies. PIB; polyhedra inclusion body. V; virion. The black bars in the figures represent 2  $\mu\text{m}$ .

평균 2.5  $\mu\text{m}$ 였다(Fig2, 3). 이는 Hukuhara와 Namura<sup>19)</sup>가 토양에서 분리한 HcNPV PIB의 형태와 HcNPV를 TN-368세포주에 감염시켜 형성된 PIB는 다각체였다는 Choe 등<sup>14)</sup>의 보고 및, Im 등<sup>20)</sup>이 보고한 바이러스병에 의해 치사된 흰불나방 유충에서 얻은 PIB의 형태 대부분은 tetragonal과 hexagonal형태 였다는 결과와 대체로 유사한 결과로서 HcNPV가 숙주가 아닌 Sf세포내에서도 숙주세포 에서와 같은 형태의 PIB가 생산됨을 시사한다. 또한 Adams와 Wilcox<sup>21)</sup>는 여러 종류의 baculovirus의 PIB의 형태를 주사전자 현미경으로 관찰해 본 결과 AcNPV와 *T. ni* NPV의 PIB는 주사위 모양이라고 보고한 것과도 유사한 결과로서 이점에 비추어 볼때 대부분의 핵 다면체 바이러스의 PIB는 그형태가 비슷할 것으로

Table 2. Comparative mortality(%) of three instars of *H. cuneata* larvae by the nuclear polyhedrosis virus

No. of PIB/ml	Second instar	Third instar	Fourth instar
$1.5 \times 10^9$	98.5	99.7	93.1
$1.5 \times 10^8$	97.2	98.5	89.1
$1.5 \times 10^7$	92.5	92.7	70.1
$1.5 \times 10^6$	70.1	74.3	43.3
$1.5 \times 10^5$	40.3	41.2	31.7

Mortality was monitored until pupation and was based on 3 replications

생각된다. 한편 polyhedra 내부에는 virion이 bundle 형태로 봉입되었는데(Fig. 2, B; Fig. 3) 이러한 결과는 Oh 등<sup>17)</sup>이 보고한 AcNPV와 매우 유사하였다.

### 병원성

바이러스에 감염된 흰불나방 유충은 감염 7일째부터 표피색이 흑갈색으로 변하기 시작하면서 활동이 둔해지고, 식욕이 부진하여 감염 9일째부터 폐사체가 발견되기 시작하였고, 시간이 경과할 수록 많은 폐사체가 나타났다. 또한 감염된 유충은 증장 부위가 괴사되어 유충의 중간 부분이 V자 형태로 폐사되었다. 한편 핵다면체 바이러스의 영기별 병원성을 검정하기 위하여 각 농도별로 섭식(Per Os)시켜 실내에서 사육하면서 치사율을 조사한 결과는 Table 2와 같다.  $1.5 \times 10^9$  PIB/ml의 구름에서는 2, 3, 4령 모두가 90% 이상의 치사율을 나타내었고,  $1.5 \times 10^8$ 과  $1.5 \times 10^7$  PIB/ml 구름에서는 2, 3령에서만 각각 90% 이상의 치사율을 나타내었으며,  $1.5 \times 10^6$  PIB/ml 이하 구름에서는 바이러스에 대한 저항성이 다소 강할 것으로 추정되었다. 또한 실험결과를 통해서 볼 때 각 령기별 LD<sub>50</sub>은 2령과 3령은 대략  $1.5 \times 10^{5-6}$  PIB/ml로, 4령은  $1.5 \times 10^{6-7}$  PIB/ml 부근으로 추정된다. 이러한 결과는 TN-368세포주에서 배양한 PIB를 흰불나방유충에게 감염시킨 결과  $10^6$  PIB/ml을 감염시켰을 때 2령유충은 83%가, 3령유충은 67%가 치사되고 일반적으로 유충의 령이 낮을수록 그리고 집중량이 많을수록 치사율이 높게 나타났다는 Choe 등<sup>14)</sup>의 보고와 유사한 결과였다. 또한 Choe 등<sup>14)</sup>은 바이러스병에 의해 치사된 흰불나방유충으로부터 분리 정제된 바이러스를 TN-368세포주에 감염하여 얻은 바이러스도 흰불나방 유충에서 직접분리한 바이러스와 동일한 특성 및 병원성을 나타낸다고 보고한 바 있으며, Im 등<sup>20)</sup> 역시 바이러스 질병에 걸린 흰불나방 유충에서 얻은 PIB를 각령기별 유충에게 먹여 병원성을 검토한바 이와 유사한 결과를 보고한 바 있는데 이같은 결과를 종합하면, 흰불나방으로부터 분리된 HcNPV를 Sf세포에 감염 시킨뒤 배양하여 얻어진 바이러스는 병사한 흰불나방 유충에서 얻은 바이러스와 동일한 병원성 특성을 지니고 있음을 알 수 있으며, 이로서 세포 핵 속에서 형성된 PIB에 봉입된 비리온은 미생물 살충제로서의 효과가 기대된다. 그러나 본 연구에서 앞서 언급한 바와 같이 90% 이상 치사율을 나타낸

구름을 제외하고는  $1.5 \times 10^6$ ,  $1.5 \times 10^5$  PIB/ml로 감염된 4령 유충에서 치사율이 비교적 낮았고, 병징이 서서히 유발되어 일부는 번데기 상태로 변한 점을 감안 하면, 일단 유충이 바이러스에 감염되어 치사되지 않고 번데기 상태로 되었다 할 지라도 바이러스 감염에 의해 초래되는 우화 불량이나, 산란 불능등의 결과가 나타날 수 있기 때문에 핵다면체 바이러스를 이용한 해충 개체군의 억제효과는 비교적 저 농도 살포로도 충분할 것으로 생각되나, 이점에 대해서는 안전성 문제와 더불어 앞으로 더욱 연구 검토 되어야할 과제이다. 다만 지금까지는 NPV를 사람,<sup>22)</sup> 토끼,<sup>23)</sup> Guinea pig,<sup>24)</sup> 흰쥐,<sup>25)</sup> 닭,<sup>26)</sup> 개구리등에 감염시켰을 때 전혀 피해가 없었다는 보고를<sup>25)</sup> 미루어 볼 때 이들 바이러스는 척추동물에게 전혀 피해가 없을 것으로 판단되며, 특히 baculovirus는 숙주 특이적으로 숙주에 감염 되기 때문에 baculovirus를 이용한 살충제 개발은 해충의 선택된 구충제로써<sup>27)</sup> 식량 자원의 보호 및 환경 보호측면에서 매우 유용할 것으로 전망된다.

### 참 고 문 헌

1. 산림 병충해의 발생상황 (1975) 한국 식물보호학회 4, p.51.
2. FAO/WHO, Reports (1972) Pesticide Residues in food.
3. Stairs, G. R. (1971) Use of viruses for microbial control of insects, In "microbial control of insects and mites". (Burgess, H. D. and Hussey, N. W. eds). Academic press. N. Y. p 97-124.
4. Anderson, J. F. (1970) An iridescent virus infecting the mosquito, *Ades stimulans*. *J. Invert. Pathol.* 15, 219-224.
5. Falcon, L. A. (1973) Biological factors that effect the success of microbial insecticides; Development of integrated control. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 217, 173-186.
6. Summers, M. D. (1977) In the Atlas of insect and plant viruses. Academic Press. 8, 3.
7. Fenner, F. (1976) Classification and nomenclature of viruses. *Intervirology* 7, 100.
8. Lightner, D. V., R. P. Hedrick, J. L. Fryer, S. N. Chen, I. C. Liao, and G. H. Kou (1987) A survey of cultured penaeid shrimp in Taiwan for viral and other important diseases. *Fish Pathol.* 22(3), 127-140.
9. Kelly, D. C. (1977) The DNA contained by NPVs isolated from four *Spodoptera* sp. (Lepidoptera, Noctuidae): genome size and homology and molecular weights determined by reassociation kinetics. *J. Virol.* 76, 468-471.
10. Miller, L. K. and K. P. Dawes (1979) Physical map of the DNA genome of *A. Californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.* 29, 1044-1055.
11. Harrap, K. A. and J. S. Rovertson (1968) A possible infection pathway in the development of a nuclear polyhedrosis virus. *J. Gen. Virol.* 3, 221-225.
12. VolKman, L. E., M. D. Summers and C. H. Hsieh (1976) Occluded and nonoccluded nuclear polyhedrosis virus grown in *T. ni* comparative neutralization, comparative infectivity and *in vitro* growth studies. *J. Virol.* 19, 820-832.

13. Faulkner, P. and J. F. Henderson (1972) Serial passage of a nuclear polyhedrosis disease virus of the cabbage looper (*T. ni*) in a continuous tissue culture cell line. *Viol.* **50**, 920-924.
14. Choe, Y. K., J. H. Kim, S. K. Hong, S. M. Byun, and H. H. Lee (1985) A potential virial insecticide of fall webworm, *Hyphantria cunea*, nuclear polyhedrosis virus. Biotech. 85 Asia, Singapore.
15. Raghov, R. and T. D. C. Grace (1974) Studies on a nuclear polyhedrosis virus in *B. mori* cells *in vitro*. *J. Ultra. Res.* **47**, 384-399.
16. Granados, R. R. (1978) Early events in the infection of *Heliothis zea* midgut cells by a baculovirus. *Viol.* **50**, 114-123.
17. Oh, C. K., H. H. Lee and K. K. Lee (1989) Electron microscope studies of infection and multiplication of AcNPV clone L-1 and ts-B1074. *J. Genetics.* **11**(4), 211-222.
18. Hink, W. F. and Strauss (1976) Growth of the *T. ni*(TN-368) cell line in suspension culture. Invertebrate tissue culture. *Academic Press. Inc.* 297-300.
19. Hukuhara, T. and H. Namura (1972) Distribution of NPV of the Fall webworm, *H. cunea* in soil. *J. Invert. Pathol.* **19**, 308-316.
20. Im, D. J., H. J. Sun, P. H. Hah, and L. J. Sung (1979) Studies on the nature and pathogenicity of NPV fall webworm, *Hyphantria cunea* (Dury). *Kor. J. Pl. Prot.* **18**(1), 1-10.
21. Adams, J. R. and T. A. Wilcox (1982) Scanning electron microscopical comparisons of insect virus occlusion bodies prepared by several techniques. *J. Invert. Pathol.* **40**, 12-20.
22. Aizawa, K. A. (1954) Neutralization of silkworm jaundice virus by human serum. *Nature* **174**, 748.
23. Krywienczyk, J. and G. H. Bergold (1960) Serological relationship between inclusion body proteins of some lepidoptera and hymenoptera. *J. Immunol.* **4**, 404-480.
24. Smirnoff, W. A. and C. F. MacLeod (1964) Apparent lack of effect of orally-introduced polyhedrosis virus on mice and of pathogenicity of rodent-passed virus for insects. *J. Insect. Pathol.* **6**, 537-538.
25. Aizawa, K. A. (1961) Changes in the chick embryo. *Entomophaga.* **3**, 197-201.
26. Ignoff, C. M. and A. M. Hemipel (1965) The nuclear polyhedrosis virus of *H. zea* and *H. virescens*. V. Toxicity pathogenicity of virus to white mice and guinea pigs. *J. Invert. Pathol.* **7**, 329-340.
27. Hall, I. M. (1963) Microbial control. In "Insect Pathology, An Advanced treatise" (E. A. Steinhaus, ed), vol. 2, 477-518. Academic Press, New York.

#### Characteristics and Pathogenicity of *Hyphantria cunea* Nuclear Polyhedrosis Virus

Park Il-Woong<sup>\*1</sup>, Keun-Kwang Lee<sup>2</sup>, Myung-Kon Kim<sup>3</sup> (<sup>1</sup>Department of Food Science and Technology, Chonbuk Sanup University, Kunsan 573-400, Korea; <sup>2</sup>Department of Environment Preservation, Kumsung Environment College, Naju 523-930, Korea; <sup>3</sup>Department of Food Science and Technology, Chonbuk National University, Chonju 560-756, Korea)

**Abstract** : Some characteristics and pathogenicity of *Hyphantria cunea* nuclear polyhedrosis virus (HcNPV), a potential microbial pesticide was studied. *H. cunea* NPV replicated in the nucleus of *S. frugiperda* cells cultured in the TNM-FH medium. In case of virus infected cell, prepolyhedra formation was observed at 24hrs post-infection. At 48 hrs post-infection, Most of the infected cell contained many mature polyhedra, which were released into culture media 72 hrs post-infection, with the cells grown in suspension culture, pH of the culture medium increased during the virus replication: the pH of fresh medium was 6.35 and rose to 6.77 within 120 hrs. Polyhedra formed a band in linear density gradient of sucrose by centrifugation, which co-sedimented with 50~55% sucrose. The shape of the purified polyhedra was mostly tetragonal hexahedron and its size was about 2.5  $\mu$ m. Electron microscopy and phase contrast microscopy showed that many bundled nucleocapsids were occluded in mature polyhedra at 48 hrs post infection. *H. cunea* larvae infected with NPV showed a higher mortality in the second and third instar than in the fourth instar. Death rate of *H. cunea* larvae in the second and third instar fed with leaves coated with  $1.5 \times 10^9 \sim 1.5 \times 10^7$  PIBs/ml reached more than 90%.

\*Corresponding author