

## 파밤나방 핵다각체병 바이러스의 병원성 및 증식

Pathogenicity and Production of *Spodoptera exigua*  
Nuclear Polyhedrosis Virus최재영<sup>1</sup> · 김혜성<sup>1</sup> · 진병래<sup>1</sup> · 설광열<sup>2</sup> · 박호용<sup>3</sup> · 강석권<sup>1</sup>Jae Young CHOI<sup>1</sup>, Hye Sung KIM<sup>1</sup>, Byung Rae JIN<sup>1</sup>, Kwang Youl SEOL<sup>2</sup>,  
Ho Yong PARK<sup>3</sup>, and Seok Kwon KANG<sup>1</sup>

**ABSTRACT** To produce *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus (SeNPV) using *S. exigua* larvae, the efficiency of the *in vivo* production was analysed by larval instar, inoculum and mortality. The results revealed that the mortality of 4th instar larvae inoculated with  $1.0 \times 10^6$  PIBs per ml was 86.7% and the yields of SeNPV was maximal, demonstrating that 4th instar larvae inoculated with  $1.0 \times 10^6$  PIBs per ml were effective to mass production of SeNPV.

**KEY WORDS** *Spodoptera exigua*, nuclear polyhedrosis virus, production

**초 록** 파밤나방 유충을 이용한 효율적인 SeNPV의 생산을 위하여, 파밤나방유충의 렙기와 접종농도에 따른 병원성과 관련하여 바이러스 생체 증식 효율을 조사하였다. 그 결과, 파밤나방 유충을 이용한 SeNPV의 대량생산은 4령 유충에  $1.0 \times 10^6$  다각체/ml 농도로 접종하였을 시 약 86.7%의 사충율과 함께 최대 바이러스 생산성을 보여 가장 효율적임을 알 수 있었다.

**검색어** 파밤나방, 핵다각체병 바이러스, 증식

파밤나방은 채소, 화훼 및 과수 등 기주 범위가 넓으며 파, 배추, 수박 등 시설재배지에 대발생하여 전국적으로 극심한 피해를 주고 있다 (안 등 1990, 고 등 1991). 특히 3령 유충 이후에는 살충제에 대한 저항성을 강하게 나타내어 방제가 어려운 해충으로 구분되고 있다 (박 1995). 또한 생물농약으로 주목되고 있는 *Bacillus thuringiensis*에도 다른 해충에 비해 감수성이 매우 낮은 것으로 알려져 있다 (MacIntosh 등 1990). 이와 같이 유기합성 살충제에 저항성을 나타내며, *B. thuringiensis*에도 감수성이 약한 파밤나방에는 바이러스를 이용한 방제법이 가장 효과적인 것으로 알려져 있다 (Smits & Vlcek 1988).

파밤나방 바이러스중 바이러스 입자가 다각체 단백질에 매립되어 있는 핵다각체병 바이러스(*Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus; SeNPV)는 이미 국내에서도 분리되어 병원성 및 교차감염(임 등 1991)뿐

만 아니라 생화학적 특성(진 등 1991) 등이 보고되었다. 이러한 SeNPV를 이용하여 최근 약제저항성 등으로 문제가 되고 있는 파밤나방의 미생물적 방제에 응용하기 위해서는 우선 SeNPV의 대량증식이 선행되어야 하며, 이를 위해서는 숙주곤충을 이용한 생체 증식이 가장 경제적인 것으로 알려져 있다 (Kurstak 1982). 그러나 파밤나방은 사육 온도에 따라 유충 및 번데기 기간이 현저히 달라지며 (박 1995), 또한 각 렙기에 따른 바이러스의 병원성 차이 역시 크다 (임 등 1991).

따라서 본 연구에서는 파밤나방 핵다각체병 바이러스를 이용한 미생물 살충제 개발에 있어서 가장 중요한 단계인 바이러스 대량생산의 기초 연구로서 파밤나방 렙기에 따른 파밤나방 핵다각체병 바이러스의 병원성과 관련하여 바이러스의 생체 증식 효율을 조사하였다.

<sup>1</sup>서울대학교 농업생명과학대학 농생명학과(Department of Agricultural Biology, College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Suwon, Korea)

<sup>2</sup>농촌진흥청 잠사곤충연구소(National Sericulture and Entomology Research Institute, RDA, Suwon, Korea)

<sup>3</sup>KIST 생명공학연구소(Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST, Taejeon, Korea)

## 재료 및 방법

### 공시 바이러스와 파밤나방

파밤나방 핵다각체병 바이러스는 진 등(1991)의 보고에서와 같이 작물시험장 임대준 박사로부터 분양받았다. 바이러스 분리는 임 등(1991)의 방법에 따라 이병충을 0.01% SDS가 함유된 TE완충액(pH 7.0)에서 마쇄한 후 거저로 여과한 다음 1,000 rpm에서 1~2분 원심분리하여 유충의 찌꺼기를 제거한 후 2~3회의 저속 원심분리(3,000 rpm, 25분)와 40~65% 설탕 밀도구배 원심(25,000 rpm, 60분)으로 다각체를 순화시켜 바이러스 농도를  $2 \times 10^{10}$  다각체/ml로 조제하였다. 조제한 바이러스 용액은 -20°C 냉동고에 보관하면서 실험에 사용하였다. 파밤나방은 고 등(1990)의 인공사료를 약간 보완하여 25°C에서 계대사육하면서 바이러스의 병원성 및 증식 실험에 사용하였다.

### 병원성 검정

인공사료(2.5×2.5×0.2 cm) 표면에 바이러스를  $1.0 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^8$  Polyhedral Inclusion Bodies(PIBs)/ml 농도별로 10 µl씩 처리한 후, 탈피 직후의 3령, 4령 및 5령 유충 마리당 완전히 섭식시켰으며, 각 농도별로 20마리, 3반복으로 실험하였다.

사충수는 바이러스 접종후 3령과 4령의 경우 25°C에서, 5령의 경우는 25°C와 20°C에서 사육하면서 매일 일정한 시간에 조사하였고, LD<sub>50</sub>과 LT<sub>50</sub>은 Finney (1971)의 계산법에 따라 산출하였다.

### 바이러스 증식율

바이러스 증식율은 병원성 검정에서 얻어진 사충을 이용하여 사충 마리당 다각체수로 조사하였는데, 사충 마리당 일정량의 증류수를 가하고, -70°C에서 얼리고 37°C에서 녹이는 과정과 심하게 vortexing하는 과정을 3회 이상 반복한 후 hemacytometer로 다각체수를 계수

하여 산출하였다.

파밤나방의 병원성과 관련한 증식 효율 조사는 령별 각 접종농도구의 사충 마리당 다각체수에 총 공시충수(60두)와 사충률을 곱하여 산정하였다.

## 결과 및 고찰

### 파밤나방 유충에 대한 SeNPV의 병원성

파밤나방의 유충을 이용한 SeNPV의 효율적인 증식을 위하여, 파밤나방 령기에 따른 병원성을 LD<sub>50</sub> 및 LT<sub>50</sub> 값으로 조사하였다 (Table 1, 2).

Table 1에 나타나 있는 것처럼 LD<sub>50</sub>값은 3령이  $1.64 \times 10^4$  다각체/ml이었으며, 4령은 3령에 비해 약 2.5배 높은  $4.28 \times 10^4$  다각체/ml이었다. 그러나 5령의 경우 LD<sub>50</sub>값은 3령에 비해 약 390배 높은  $6.40 \times 10^6$  다각체/ml로 현저한 감수성 차이를 보였다. 이는 임 등(1991)이 보고한 SeNPV에 대한 파밤나방 병원성 결과에서 볼 때, 3령의 경우는 유사하나 5령의 경우는 본 실험의 결과와 상당한 차이를 나타내었다. 그러나 Smits와 Vlask(1988)의 경우, LD<sub>50</sub>값이 3령에서 보다 5령에서 상당히 증가했다는 보고와는 비슷한 경향이었다.

바이러스 대량증식을 고려할 때 총체가 큰 종령유충을 이용하는 것이 가장 효율적인데, 특히 파밤나방의 경우는 사육 온도에 따라 유충 및 번데기 기간이 상당한 차이를 나타낸다 (박 1995). 따라서 탈피 직후의 파밤나방 5령 유충에 바이러스를 접종한 뒤 사육 온도를 20°C로 낮추었을 때, 바이러스의 병원성은 Table 1의 LD<sub>50</sub>값에서 처럼 25°C에서 계속 사육했을 때 보다 약 63배 정도 낮은  $1.02 \times 10^5$  다각체/ml로 나타났다. 이는 25°C에서 계속 사육한 3령 유충의 LD<sub>50</sub>값 보다는 약 6.2배 높으며 4령 유충의 LD<sub>50</sub>값에 비해서는 약 2.4배 높은 값으로, 바이러스 접종후 사육 온도를 낮추었을 때 5령 유충 기간이 약 2~3일 정도 길어짐으로서 바이러스에 의한 병원성이 높아진 것으로

Table 1. Median lethal dose (LD<sub>50</sub>) value of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus tested against 3rd, 4th and 5th instar *S. exigua* larvae

Larval <sup>a)</sup> instar	Inoculum (PIBs/ml)	LD <sub>50</sub> (PIBs/ml)	Slope (B)	Intercept	χ <sup>2</sup>	df
3rd	$1.0 \times 10^{4-8}$	$1.64 \times 10^4$	0.717	1.978	13.613	3
4th	$1.0 \times 10^{4-8}$	$4.28 \times 10^4$	0.732	1.610	2.709	4
5th	$1.0 \times 10^{4-8}$	$6.40 \times 10^6$	0.661	0.499	3.392	3
5th <sup>b)</sup>	$1.0 \times 10^{4-8}$	$1.02 \times 10^5$	0.366	3.168	13.918	4

a) Sixty larvae were tested and 10 µl of inoculum was inoculated to each larva.

b) The larvae were reared at 20°C after inoculation.

**Table 2. Median lethal time ( $LT_{50}$ ) value of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus tested against 3rd, 4th and 5th instar *S. exigua* larvae**

Larval <sup>a)</sup> instar	Inoculum (PIBs/ml)	$LT_{50}$ (day)	Slope (B)	Intercept	$\chi^2$	df
3rd	$1.0 \times 10^4$	14.92	2.265	2.342	0.352	5
	$1.0 \times 10^5$	9.68	2.964	2.078	0.908	5
	$1.0 \times 10^6$	6.46	8.110	-1.570	10.704	4
	$1.0 \times 10^7$	5.46	8.010	-0.906	4.170	5
	$1.0 \times 10^8$	5.39	10.367	-2.584	5.201	3
4th	$1.0 \times 10^4$	13.28	3.741	0.798	1.655	5
	$1.0 \times 10^5$	9.12	3.725	1.423	0.613	6
	$1.0 \times 10^6$	5.79	3.602	2.254	1.967	6
	$1.0 \times 10^7$	4.51	5.368	1.486	9.842	5
	$1.0 \times 10^8$	4.18	8.534	-0.302	3.535	4
5th	$1.0 \times 10^6$	9.69	7.167	-2.068	0.462	1
	$1.0 \times 10^7$	7.18	9.142	-2.825	1.248	2
	$1.0 \times 10^8$	6.40	6.582	-0.308	1.457	4
5th <sup>b)</sup>	$1.0 \times 10^4$	14.53	3.175	1.310	0.334	5
	$1.0 \times 10^5$	10.87	6.214	-1.440	0.120	5
	$1.0 \times 10^6$	9.75	6.963	-1.885	1.794	5
	$1.0 \times 10^7$	8.85	7.409	-2.016	7.725	7
	$1.0 \times 10^8$	7.58	9.642	-3.479	11.349	6

<sup>a)</sup> Sixty larvae were tested and 10  $\mu$ l of inoculum was inoculated to each larva.

<sup>b)</sup> The larvae were reared at 20°C after inoculation.

로 생각된다.

한편  $LT_{50}$ 값은 Table 2에서 처럼 바이러스 접종 농도가 높아짐에 따라 짧아지는 경향이었으며, 고농도구와 저농도구간에 상당한 차이를 나타냈다. 이는 이미 보고된 임 등(1991)과 Smits와 Vlask(1988)의 결과와 같은 경향이였다. 그러나 본 실험에서 5령 유충의 경우 바이러스 접종 후 사육 온도를 25°C에서 20°C로 낮출 경우, 25°C에서 계속 사육하였을 때 보다  $LT_{50}$ 값이 고농도인  $1.0 \times 10^7 \sim 10^8$  다각체/ml에서 1일 정도 길게 나타났는데, 이는  $LD_{50}$ 값이 낮아지는 것을 고려할 때 5령 유충 기간의 연장과 관련이 있는 것으로 생각된다.

#### 파밤나방 유충에 있어서 SeNPV의 증식 효율

파밤나방 유충을 이용한 SeNPV의 효율적인 생산조건을 구명하기 위하여, 파밤나방 유충의 령기와 접종 농도 및 병원성과 관련하여 바이러스 증식 효율을 조사하였다 (Table 3).

파밤나방 유충의 령기에 따른 사충당 바이러스 증식 효율은 령이 진전될수록 높게 나타났다. 또, 저농도구에 비해 고농도의 바이러스 접종구에서는 사충율은 높았으나 바이러스 생산성은 낮게 나타났다.

한편, 파밤나방 5령 유충을 바이러스 접종 후 온도

**Table 3. Yields of nuclear polyhedrosis virus in relation to inocula and mortality in *Spodoptera exigua* larvae**

Larval <sup>a)</sup> instar	Inoculum (PIBs/ml)	Mortality (%)	PIB/dead larva ( $\times 10^{10}$ )	Total Yields <sup>b)</sup> ( $\times 10^{11}$ )
3rd	$1.0 \times 10^4$	38.6	2.03	4.7
	$1.0 \times 10^5$	61.1	1.55	5.7
	$1.0 \times 10^6$	93.5	1.51	8.5
	$1.0 \times 10^7$	100	1.37	8.2
	$1.0 \times 10^8$	100	1.13	6.8
4th	$1.0 \times 10^4$	33.3	3.15	6.3
	$1.0 \times 10^5$	59.3	2.89	10.3
	$1.0 \times 10^6$	86.7	2.57	13.4
	$1.0 \times 10^7$	93.5	1.91	10.7
	$1.0 \times 10^8$	100	1.22	7.3
5th <sup>c)</sup>	$1.0 \times 10^4$	38.9	3.75	8.8
	$1.0 \times 10^5$	57.9	3.48	12.1
	$1.0 \times 10^6$	69.0	3.14	13.0
	$1.0 \times 10^7$	85.2	2.69	13.8
	$1.0 \times 10^8$	100	2.06	12.4

<sup>a)</sup> Sixty larvae were tested and 10  $\mu$ l of inoculum was inoculated to each larva.

<sup>b)</sup> Total yields were calculated by total tested larvae, mortality and PIB per dead larva.

<sup>c)</sup> The larvae were reared at 20°C after inoculation.

를 25°C에서 20°C로 낮추어 사육한 결과, 4령 유충에 비해 5령 유충에 바이러스를 접종한 후 사육 온도

를 20°C로 낮추었을 때 바이러스 생산성이 전반적으로 높게 나타났으며 고농도구의 경우 약 2배 정도 높았다.

그러나 파밤나방 유충의 령기와 접종 농도에 따른 사충율 및 사충 마리당 바이러스 생산량을 전체 접종 유충수로 산정하였을 때, 3령의 경우 93.5%의 사충율을 보인  $1.0 \times 10^6$  다각체/ml 접종 농도구에서  $8.5 \times 10^{11}$  다각체로 가장 높게 나타난 반면, 4령의 경우는 86.7%의 사충율을 보인  $1.0 \times 10^6$  다각체/ml 접종 농도구에서  $13.4 \times 10^{11}$  다각체로 가장 높게 나타났고, 바이러스 접종 후 사육 온도를 20°C로 낮춘 5령 유충에서의 경우  $1.0 \times 10^7$  다각체/ml 접종 농도구에서 85.2%의 사충율과 함께  $13.8 \times 10^{11}$  다각체로 가장 높게 나타났다. 이러한 결과는 4령 유충에  $1.0 \times 10^6$  다각체/ml 농도로 접종했을 때 바이러스 생산성에 있어서 더 효율적임을 보여주고 있다.

숙주 곤충을 이용한 바이러스 대량생산 조건에 있어서 숙주 곤충의 최대 성장과 동시에 바이러스의 최대 생산을 얻을 수 있다(임 등 1989, Smith 등 1976, Shapiro 1980)고 하며, 본 실험의 결과에서도 숙주 곤충의 령기와 적정 바이러스 접종 농도구에 따른 사충율이 바이러스의 효율적인 대량생산에 밀접한 관계가 있음을 보여주고 있다.

또한, 임 등(1989)은 담배거세미나방 종령 유충을 바이러스 대량생산에 이용하기 위하여 합성유약호르몬을 처리함으로써 용화 지연과 충체중 증가로 유충 마리당 바이러스 생산량에 있어서 약 15% 정도 효과적이었다고 보고했다. 그러나 본 실험에서는 파밤나방 종령 유충에서의 사육 온도를 조절함으로써 용화 지연과 충체중 증가를 유도하여 바이러스 생산성을 증가시켰지만, 사료 섭취량, 온도 처리 및 사육 기간 등 경제성면을 고려할 때 4령 유충에 비교적 낮은 농도인  $1.0 \times 10^6$  다각체/ml 농도로 접종하여 종령 유충에서 사충을 얻음으로 오히려 바이러스 대량생산 효율면에서 유리하였다.

이상의 결과를 종합할 때, 파밤나방 유충을 이용한 SeNPV의 대량생산은 4령 유충에  $1.0 \times 10^6$  다각체/ml 농도로 접종하였을 시 86.7%의 사충율과 함께 최대 바이러스 생산량을 보여 가장 효율적임을 알 수 있었다. 따라서 차후 본 실험에서의 파밤나방 유충 령기와 접종 농도 및 사충율을 고려한 바이러스 생산성 결과를 토대로 수거 시기 및 수거 방법 등 효율적인 최적 대량생산 조건을 구명하고자 한다.

## 사 사

본 연구는 1995년도 농특과제 연구비 지원에 의하여 수행되었음.

## 인용문헌

- 안성복, 김인수, 조왕수, 이문홍, 최귀문. 1990. 1988년 해충 발생 상황(민원중심). 한웅곤지. **28**: 246-263.
- Finney, D.J. 1971. Probit analysis. Cambridge Univ. Press. Cambridge. pp. 333.
- 고현관, 이상계, 이비파, 최귀문, 김정화. 1990. 인공사료에 의한 파밤나방의 대량사육법. 한웅곤지. **29**: 180-183.
- 고현관, 박종대, 최용문, 최귀문, 박인선. 1991. 파밤나방의 기주 및 피해조사. 한웅곤지. **30**: 111-116.
- 임대준, 최귀문, 이문홍, 진병래, 강석권. 1989. 숙주곤충을 이용한 담배거세미나방 핵다각체병바이러스의 대량생산. 한웅곤지. **28**: 82-87.
- 임대준, 최귀문, 강석권. 1991. 파밤나방 핵다각체병바이러스의 병원성과 곤충 간상바이러스의 파밤나방에 대한 교차감염에 관한 연구. 한웅곤지. **30**: 212-218.
- 진병래, 박범석, 제연호, 강석권. 1991. 파밤나방 핵다각체병 바이러스의 생화학적 특성. 한웅곤지. **30**: 144-149.
- Kurstak, E. 1982. In[Microbial and Viral pesticides]pp. 335-507. Dekker. New York.
- MacIntosh, S. C., T. B. Stone, S. R. Sims, P. L. Hunst, J. T. Greenplate, P. G. Marrone, F. J. Periak, D. A. Fischhoff & R. L. Fuchs. 1990. Specificity and efficacy of purified *Bacillus thuringiensis* proteins against agronomically important insects. J. Invertebr. Pathol. **56**: 258-266.
- 박종대. 1995. 피해심한 파밤나방 이렇게 방제하자. 농약정보. **5-6**: 17-21.
- Shapiro, M. 1980. In[The Gypsy Moth: Research towards integrated pest management]ed by Doane. C. C. USDA Tech. Bull. Chap. 6.6.
- 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.
- Smits, P. H. & J. M. Vlak. 1988. Biological activity of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus against *S. exigua* larvae. J. Invertebr. Pathol. **51**: 107-114.

(1996년 7월 3일 접수)