

곤충병원선충을 이용한 채소해충의 생물적 방제

한상찬 · 김용균 · 이분조

(안동대학교 자연과학대학 생명자원과학부 농생물학전공)

Biological Control of Vegetable Insect Pests with Entomopathogenic Nematodes

Han, Sang-Chan · Yong-Gyun Kim and Bun-Jo Lee

(Major in Agricultural Biology, School of Life Resource Sciences,
College of Natural Sciences, Andong National University)

ABSTRACT

Entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae*, was able to invade and kill the several lepidopteran pests including the beet armyworm, *Spodoptera exigua* Hübner, which was the most effective target host. The beet armyworms treated with the effective nematode concentrations were died within 48 hrs. The lethal effect of the nematode was varied among the developmental stages of the host. The fifth instar larvae of the beet armyworm was more vulnerable to the nematode than the third instar larvae. Pupae was, however, refractory to the nematode. All three bioassays (topical application, filter paper test, and soil treatment) showed the positive correlation between the number of the treated nematodes and the mortality of the host. Topical application was the most effective and fast-acting method so that it gave the lethal effect 2 days earlier than did filter paper test at the same number of the treated nematodes. Soil treatment required higher number of the nematodes to get the effective lethality than did filter paper test. The fifth instar larvae of the beet armyworm expressed the specific hemolymph proteins of 5 to 10 kDa in response to nematode infection.

Key words : entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae*, *Spodoptera exigua*, lethal dose

서 론

곤충병원성 선충인 Steinernematidae와 Heterorhabditidae에 속하는 선충들은 토양 중에서 발견되며 곤충에 대한 높은 병원성과 치사효과가 있다고 알려져 왔다. 궁극적인 곤충에 대한 치사효과

는 이들 선충의 공생세균인 *Xenorhabdus* spp.와 *Photorhabdus* spp.가 각각 *Steinernema* spp.와 *Heterorhabditis* spp.와 더불어 기주 곤충에게 패혈증을 유발함에 기인되며 이 패혈증으로 말미암아 기주는 48시간 이내에 치사됨으로 이들 곤충병원성 선충이 생물적 방제를 위한 효과적 인자로 주목받았다 (Poinar 1979, Kaya 1985, Kaya & Gaugler

1993). 특히 이들 공생세균은 곤충혈액내로 항생물질의 분비로 선충과 더불어 그들의 성장에 타생물체 (다른 세균 과 진균류)와의 비경쟁적 환경을 조성하게 한다 (Maxwell et al. 1994). 기주범위도 다양하여 토양에 서식하는 나비목, 딱정벌레목, 파리목 및 벼룩목 유충에 효과적이다 (Klein 1990, Manweiler 1994, Tomalak 1994). 최근 미국에서는 일부 이들 선충 종은 토양해충을 구제할 목적으로 생물농약으로 등록되어 시판되고 있다.

유기합성 살충제에 의한 해충방제는 대상해충의 약제 저항성 발현으로 방제에 어려움이 있을 뿐만 아니라 인축에 유해한 영향을 주어 생태계 전반에 걸쳐 위협을 주고 있다. 특히 최근 들어 채소, 화훼등 원예작물의 재배면적이 확대되고 대형비닐하우스나 유리 온실 등의 시설을 이용한 생산체계가 이루어지면서 과거에는 잠재해충이었던 열대 또는 아열대 해충들이 겨울철에 월동이 용이하여 주요해충으로 등장하게 되어 피해면적이 점차 증가하고 있다. 이러한 해충중의 하나인 파밤나방 (*Spodoptera exigua* Hübner)은 1986년에 진도의 외대파에서 피해가 확인된 후 1988년에 파, 고추, 콩등에 발생하였고 1989년부터는 전국적으로 대 발생하여 극심한 피해를 주고 있다 (고 등 1991). 파밤나방은 잡식성으로 십자화과는 물론 달래과, 가지과, 박과등 많은 종류의 채소류와 화훼류 전특작물을 가해하는 해충이다. 노지에서는 8월이후 고온기에 발생량이 많으나 온실내에는 연중 발생한다. 파밤나방은 채소집단지배지의 증가, 유충 영기의 진행에 따른 약제 감수성이 크게 떨어지는 생리적 특성 (김용균, 미보고자료), 약제 저항성의 발달 (Poe et al. 1973, Huffman et al. 1982, Brewer et al. 1990) 등으로 인해 농작물에 경제적 피해를 가중시키게 되었다. 또 약제사용의 증가로 인한 천적감소와 함께 장거리 이동하는 생태적 특성도 이 해충의 효과적 방제책을 세우는데 어려움으로 알려져 있다 (Mikkola 1970, 고 등 1991).

요즘 우리 농업이 당면한 현실은 대량의 유기합성농약 살포로 인하여 환경오염이 발생하고 농산물의 가격 경쟁력 문제가 대두되고 있다 (김과 추 1994, 김과 장 1996). 이러한 현실을 극복하기 위해 곤충병원선충과 같은 천적을 이용한 생물적

방제법 개발이 최근에 여러 해충에 시도되고 있다 (Choo et al. 1996). 본 연구는 곤충에 기생하여 큰 사망요인을 주는 *S. carpocapsae*가 파밤나방과 같이 방제에 어려움을 주는 해충에게 미치는 살충효과를 분석하여 효과 있는 생물적 방제 기술 개발에 정보를 제공하고자 수행하였다.

재료 및 방법

파밤나방 사육

공시충은 1994년 9월말에서 10월초에 경상북도 안동시 일직면 고추밭에서 채집한 파밤나방을 고 (1990)의 방법을 이용하여 인공사료로 실내에서 8-9세대 누대 사육되었다. 사육상자의 조건은 온도 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 광주기 16:8h (L : D) 이었다. 성충의 먹이로 10% sucrose가 산란상자에 공급되었다.

곤충병원선충

경상대학교 농생물학대에 증식 보관중이던 곤충병원선충인 *Steinernema carpocapsae*을 분양 받아 파밤나방을 기주로 대량 증식시켜 실험에 사용하였다. 증식된 선충은 10°C 에서 사용될 때까지 보관하였다.

곤충병원선충에 의한 해충별 살충효과

사육용기 (직경 90mm, 높이 15mm)에 여과지를 깔고 공시선충 현탁액 (120마리/1ml)을 기주체에 국부 접종하였다. 시험대상 기주로 배추흰나비, 담배거세미나방, 파밤나방 각각의 5령 유충을 사용하여 살충효과를 접종 6일 후 해부현미경하에서 조사하였다.

곤충병원선충의 밀도별 파밤나방의 살충효과

여과지처리법과 토양처리법으로 나누어 시행되었다. 여과지검정법에서는 지름 9cm 사육용기 바닥에 여과지를 깔고 0, 50, 100, 200, 400마리의 0.5ml 선충현탁액을 뿌려준 후 3마리의 5령충 파밤나방을 인공사료 (약 1cm 정육면체)와 함께 넣었다. 토양처리법은 약 10ml의 멸균된 토양을 직경 5.5cm 사육용기에 담고 0, 50, 100, 200, 400마리의 3ml 선충현탁액을 뿌려준 후 3마리의 5령충 파밤

나방을 인공사료 (약 1cm 정육면체)와 함께 넣었다. 접종 후 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 인큐베이터에 보관하였다. 살충효과는 Finney (1971)의 probit분석법을 이용하여 산출하였다.

혈림프 추출

혈림프의 추출은 5령충에서만 이루어졌다. 복부 첫째마디 다리를 자른 후 나오는 혈림프를 약간의 phenylthiourea가 들어있는 0.5ml Eppendorf tube에 수거했다. 추출된 혈림프는 4°C , 14000rpm에서 원심 분리한 후 상등액이 전기영동을 통한 혈림프 단백질 분석에 이용되었다.

전기영동

혈림프시료는 같은 양으로 2X denaturing buffer (4% SDS, 20% glycerol, 10% β -mercaptoethanol in 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8)로 혼합 후 100°C 에서 90초동안 열처리후 15,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 상등액을 얻었다. 시료 단백질은 수직전기영동장치로 변성조건하에서 7.5-15% gradient gel로 분리되었다 (Laemmli 1970). 전기영동은 35mA/gel의 일전 전류에서 tracking dye가 바닥까지 도달할 때까지 이루어졌다. 단백질 염색은 0.125% Coomassie Blue R-250 (50% methanol, 10% acetic acid), 1차탈색은 50% methanol, 10% acetic acid에서 2시간, 2차탈색은 5% methanol, 7% acetic acid에서 약 48시간동안 이루어졌다.

결과 및 고찰

곤충병원선충인 *Steinernema carpocapsae*는 여러 나비목 해충에 침입하여 치사에 이르게 하며 특히 파밤나방에서는 증식이 탁월하였다. 배추흰나비, 담배거세미나방, 파밤나방에 대한 *S. carpocapsae*의 살충효과를 검토하고자 선충 현탁액(120마리/1ml)을 충체에 직접 접종한 결과 파밤나방은 살충효과도 높았고 증식도 잘 되었으나 배추흰나비와 담배거세미나방은 살충효과만 있을 뿐 증식은 되지 않았다 (Table 1 & Fig. 1). *Steinernema* spp.가 여러 해충들에게 살충효과가

Table 1. Host specificity of *S. carpocapsae* (observed 6 days after application)

Host	Host	Infection	Multiplication
<i>Artogeia rapae</i> (L.)	5th instar larvae	Yes	No
<i>Spodoptera litura</i> (Fabricius)	5th instar larvae	Yes	No
<i>Spodoptera exigua</i> Hübner	5th instar larvae	Yes	Yes

(A)



(B)

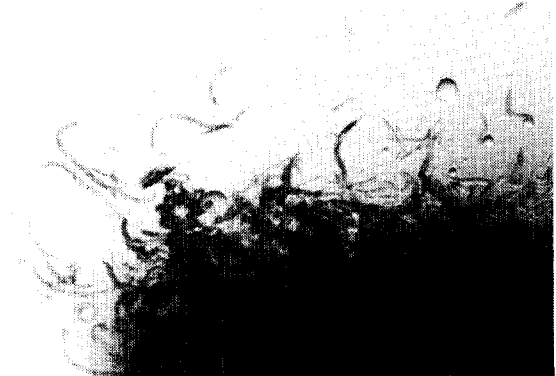


Fig. 1. Infective juveniles(A, 100x) of *Steinernema* spp. after development within the beet armyworm, *S. exigua*(B, 40x)

있음은 실내 실험에 의해 알려져 있다 (Poinar 1979). 그러나 실제로 야외조건에서는 생태적 및 행동적 영향에 의해 기주범위가 매우 제한적이다 (Gaugler 1988). Grewal et al. (1993)은 자연계에서 이들 선충이 기주를 탐색하는데 기주의 배설물 또는 체표 및 장내용물을 지표로 삼을 수 있다고

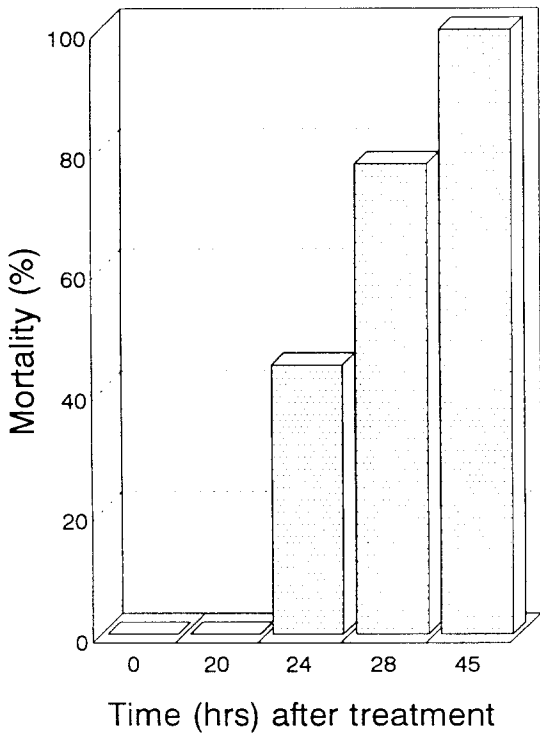


Fig. 2. Temporal mortality changes of the fifth instar larvae of *S. exigua* by topical application of *S. carpocapsae*(ϕ 5/5cm)

보고하였다. 본 결과는 꿀벌부채명나방에서 *Steinernema* spp.를 증식시키는 방법 (추 등 1988) 외에 파밤나방에서도 증식시킬 수 있음을 나타냈다.

곤충병원선충을 접종한 후 파밤나방이 치사에 이르게 되는 시간이 조사되었다. 충체에 직접 처리한 경우 24시간이후 부터 치사효과가 나타나기 시작하여 48시간이내에 100%의 치사효과를 나타내었다 (Fig. 2). 일반적으로 이 선충에 의한 곤충의 치사는 매우 빨라 48시간 이내 이루어진다 (Poinar 1979, Kaya 1985, Kaya & Gaugler 1993). 파밤나방의 혈림프내에서 처리 1일후 부터 특이한 단백질이 5-10 kDa영역에서 나타났다 (Fig. 3). 이 단백질의 생리학적 기능에 대해 우선 일반적으로 선충이 곤충 기주내 침입 후에 공생기생균을 혈림프내로 방출시키고 이 세균에 의해 곤충 혈림프의 패혈증을 일으켜 치사에 이르게 함으로 (Kaya & Gaugler 1993) 이 단백질을 패혈증을 유발시키는 인자로 의심해 볼 수 있다. 다른 가능

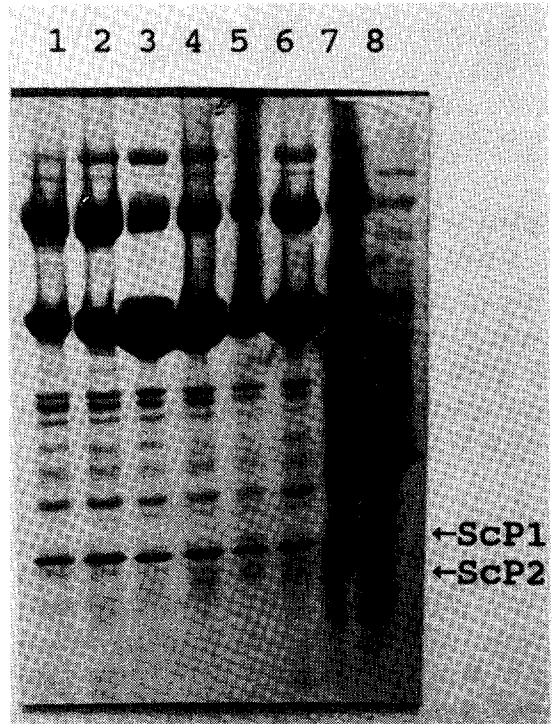


Fig. 3. Hemolymph protein changes of the fifth instar larvae of *S. exigua* after topical application of *S. carpocapsae* :

- 1 & 2 : no treatment
 - 3 & 4 : 1 day after nematode treatment
 - 5 & 6 : 2 day after nematode treatment
 - 7 & 8 : 3 day after nematode treatment
- where 'ScP1' and 'ScP2' represent the nematode-induced proteins.

성으로 이러한 공생세균이 기주를 죽이고 기주내 영양물을 독점하려는 의도로 분비하는 타세균과 진균류에 대한 항생물질일 가능성 (Maxwell et al. 1994)도 있다. 또 이상의 가능성외에 단순히 파밤나방 기주가 외래침입 물질에 대해 발현하는 일종의 stress 단백질일 가능성도 배제할 수 없다. 현재로서는 이 작은 분자량의 단백질의 본체를 입증할 자료는 가지지 못하고 계속 연구해야 될 분야이다.

반면에 국부처리와 같은 농도로 선충을 여과지에 처리한 경우 100%의 치사효과를 얻기 위해서는 72-96시간의 시간을 요구하였고 또 처리농도에 따라 치사가 일어나기 시작하는 시간이 비례함을 알 수 있었다 (Fig. 4). 이러한 처리방법에 따른 치사 시간의 차이는 같은 선충농도로 처리하였지

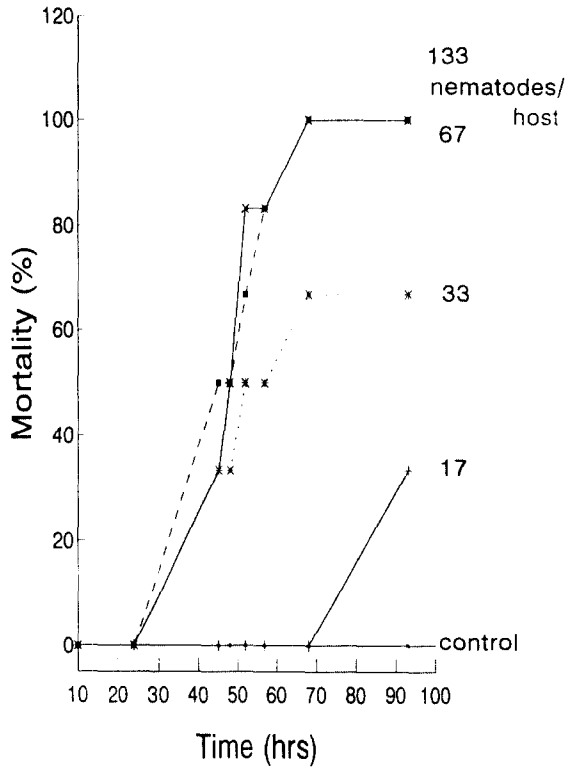


Fig. 4. Temporal mortality changes of the fifth instar larvae of *S. exigua* by *S. carpocapsae* to filter paper(ϕ 5.5cm)

만 실제로 곤충체내로의 선충 침입시간과 침입한 선충수에 차이가 있음을 나타내고 있다. 그러나

Table 2. Development of *S. carpocapsae* in the fifth instar larvae of *S. exigua* after topical application of the nematodes(150 infective juveniles) at 25°C

Days after treatment	Stages of nematodes*			
	2nd	3rd	4th	abult
4	-	+	+	-
5	-	-	-	++
6	++++	+	+	-
7	+	++	++	++

* Number of nematodes :
 '-' represents no nematodes,
 '+' represents 0 - 50 nematodes,
 '++' represents 50 - 100 nematodes,
 '+++' represents 100 - 1000 nematodes, and
 '++++' reepresents more than 1000 nematodes.

Table 3. Development of *S. carpocapsae* in the fifth instar larvae of *S. exigua* after nematode application(150 infective juveniles) to filter paper (ϕ 5.5cm) at 25°C

Days after treatment	Stages of nematodes*			
	2nd	3rd	4th	abult
6	-	+	+	-
7	-	-	-	++
8	+++	+	+	-
9	+	++	++	++

* Number of nematodes :
 '-' represents no nematodes,
 '+' represents 0 - 50 nematodes,
 '++' represents 50 - 100 nematodes,
 '+++' represents 100 - 1000 nematodes, and

Fig. 2.의 결과에서 보듯 처리농도에 따른 치사시간의 차이는 파밤나방이 치사에 이르게 하는데 필요한 선충의 기주내 유효농도를 의미한다. 파밤나방의 치사시간이 선충의 기주내 유효농도에 따라

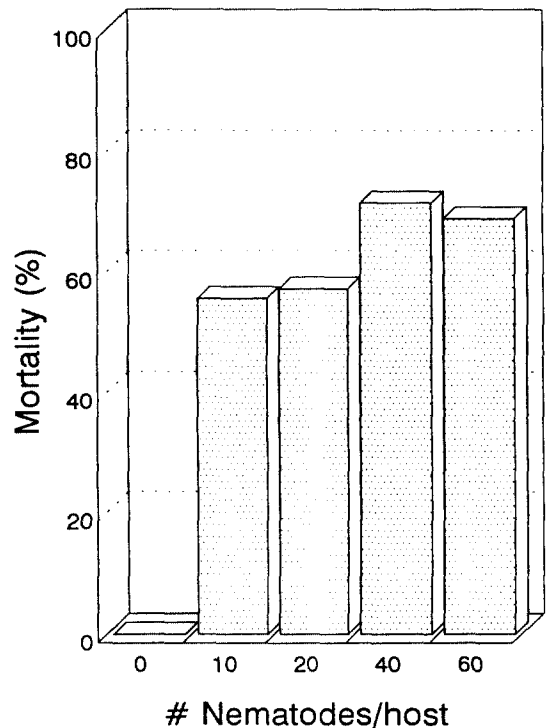


Fig. 5. Control effect of *S. carpocapsae* on the third instar larvae of *S. exigua* after applying the nematodes to filter paper (ϕ 5.5cm)

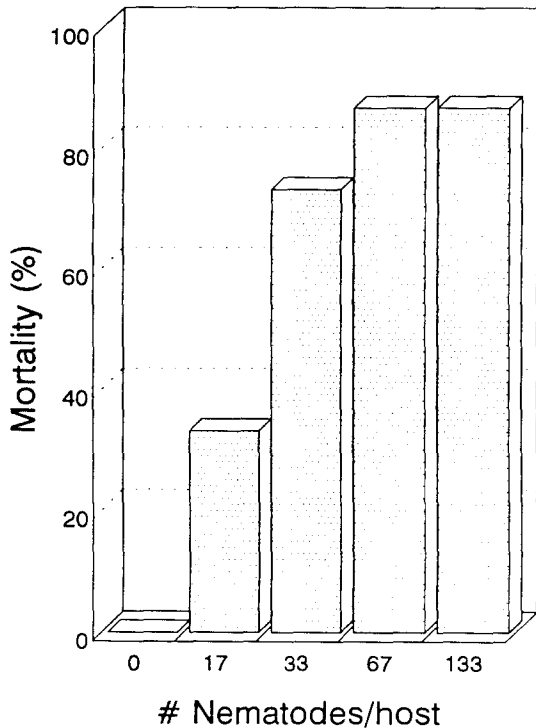


Fig. 6. Control effect of *S. carpocapsae* in the fifth instar larvae of *S. exigua* after applying the nematodes to filter paper (ϕ 5.5cm)

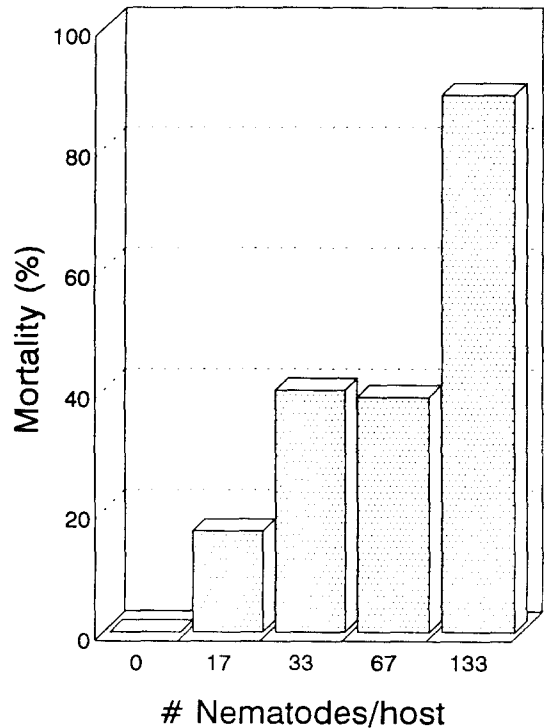


Fig. 7. Control effect of *S. carpocapsae* on the fifth instar larvae of *S. exigua* after applying the nematodes to 10 ml soil

달라지는 가설은 두 가지 처리방법으로 파밤나방에 처리한 후 시간별로 충체내에서 발육하고 있는 선충의 발육양상을 조사함으로써 뒷받침할 수 있다. 충체에 직접 처리하였을 경우 처리 후 4일째되는 날부터 기주내에서 선충이 발견되어 대략 2일을 주기로 생활사를 반복하고 있음을 관찰하였다 (Table 2). 같은 형태의 생활 주기가 여과지에 처리하였을 때도 보였다 (Table 3). 그러나 여과지 처리에서는 시간적으로 2일의 차이를 나타내었다. 즉 선충이 파밤나방을 치사시키는데 두 처리방법간의 소요되는 시간적 차이는 해충을 치사시킬 수 있는 유효밀도로 증식하는데 소요되는 시간의 차이로 하겠다. 즉 이러한 유효선충농도 조건하에서는 파밤나방이 선충을 처리한 후 48시간 내에 치사된다.

파밤나방에 있어서 선충의 치사효과는 파밤나방의 발육시기에 따라 달랐다. 파밤나방 3령충보다는 5령충이 더 감수성이 컸으나 (Figs. 5 & 6)

용은 거의 효과가 없었다 (30마리 용처리시 0% 살충률). 낮은 선충 밀도에서 3령충이 5령충보다 치사 효과가 크게 나타났으나 처리 선충수의 증가에 따라 치사효과는 5령충에서 높게 나타났다. 이와 유사한 결과가 *S. feltiae*로 처리한 *Pseudaletia unipuncta*와 파밤나방에서도 어린 유충이 노숙유충에 비해 낮은 감수성을 나타냈다 (Kaya 1985). 이는 기주의 작은 체형에 따른 물리적 및 행동학적 제약을 기생선충이 받기 때문이라 생각된다. 파밤나방에 있어 용은 유충에 비해 이 선충에 대해 내성을 보인 점은 Kaya & Grieve (1982)의 파밤나방에 대한 *S. feltiae*의 처리에서도 유사한 결과를 보였다.

파밤나방에 대한 *S. carpocapsae*의 밀도별 살충효과는 여과지검정법과 토양처리법으로 나뉘어 시행되었다. 파밤나방의 반수치사를 이르게 하기 위해 여과지처리 (Fig. 6)에서는 기주당 22.6 마리 (10.2 - 32.3 : 95% 신뢰구간)이었고 토양처리법

(Fig. 7)에서는 기주당 60.5 마리 (33.5 - 81.9: 95% 신뢰구간)로 더 많은 수의 선충을 요구했다. 유효치사선충밀도와 관련지어 여과지처리에서 김 등 (1989)은 파밤나방을 포함한 몇몇 나비목 해충 및 굽벙이류 방제를 위한 실험에서 기주당 180-200 마리의 기생선충수가 필요하다 하였고 추 등 (1988)의 기주당 50마리 처리에서 50% 이하의 살충력을 보였는데 본 실험 결과 *S. carpocapsae*는 파밤나방에 비교적 높은 살충력을 보였다.

적 요

곤충병원선충인 *Steinernema carpocapsae*는 여러 나비목 해충에 침입하여 치사에 이르게 하였으며 특히 파밤나방에 효과적이었다. 유효치사선충 밀도로 처리된 파밤나방은 48시간 이내에 치사되었다. 파밤나방에 있어서 이 선충의 치사효과는 파밤나방의 발육시기에 따라 달랐다. 파밤나방 3령충보다는 5령충이 더 효과적이었으나 용은 거의 효과가 없었다. 세 가지 선충처리방법 (충체국부처리, 여과지처리, 토양처리)에서 선충농도와 파밤나방의 치사는 비례했다. 같은 농도에서 충체접종이 여과지처리보다 25°C에서 2일 빠르게 치사효과를 주었다. 파밤나방의 반수치사를 이르게 하기 위해 토양처리는 여과지처리보다 더 많은 수의 선충을 요구했다. 충체국부접종후 1-2일에 선충이 처리된 기주혈액내에서만 5-10 kDa의 특이한 단백질이 발현되었다.

검색어 : 곤충병원선충, *Steinernema carpocapsae*, 파밤나방, 치사농도

사 사

이 연구를 수행하는 과정에서 공시선충을 필요할 때마다 공급하여준 경상대학교 농생물학과 추호렬교수께 먼저 감사드린다. 또 파밤나방 채집과 선충 증식에 도움을 준 안동대학교 생명자원과학부 농생물전공 강성영군과 김영선양에게도 감사드린다. 본 연구는 안동대학교 학술연구비지원 (#95-9)으로 수행되었다.

인 용 문 헌

- 추호렬, H. K. Kaya and D. K. Reed. 1988. 곤충기생성 선충, *Steinernema feltiae*와 *Heterorhabditis heliothidis*를 이용한 고자리 파리 및 담배거세미나방의 생물적 방제. 한용곤지. 27 : 185-189.
- 김용균, 추일. 1994. 안동지역의 농업현황과 U.R. 대책. 안동대학교 농업과학연구소논문집. 1 : 23-31.
- 김용균, 장동걸. 1996. 배추좀나방 (*Plutella xylostella* L.)의 deltamethrin 저항성 기작에 관한 에스테라제의 역할. 한용곤지. 35 : 74-79.
- 김지인, 이해인, 한상찬. 1989. 곤충기생성선충을 이용한 해충방제법 연구. 농기연(연구보고서), pp. 551-554.
- 고현관. 1990. 인공사료에 의한 파밤나방의 대량사육법. 한용곤지. 29 : 180-183.
- 고현관, 박종대, 최용문, 최귀문, 박인선. 1991. 파밤나방의 기주 및 피해조사. 한용곤지. 30 : 111-116.
- Brewer, M. J., J. T. Tumble, B. Alvarado-Rodriguez and W. E. Chaney. 1990. Beet armyworm (Lepidoptera : Noctuidae) adult and larval susceptibility to three insecticides in managed habitats and relationship to laboratory selection for resistance. J. Econ. Entomol. 83 : 2136-2146.
- Choo, H., J. B. Kim and D. W. Lee. 1996. Entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from Korea with a key to *Steinernema*. Korean J. Soil Zoology. 28-36.
- Finney, D. J. 1971. Probit analysis, estimation of the median effective dose. Cambridge Univ. Press, Cambridge Enblande, pp. 19-47.
- Gaugler, R. 1988. Ecological considerations on the biological control of soil-inhabiting insects with entomopathogenic nematodes. Agric. Ecosys. Environ. 24 : 351-360.
- Grewal, P. S., R. Gaugler and S. Selvan. 1993. Host recognition by entomopathogenic nematodes : Behavioral response to contact with

- host feces. J. Chem. Ecol. 19 : 1219-1231.
- Huffman, F. R., A. J. Mueller and J. A. Harding. 1982. Dosage-mortality studies on Arkansas and Texas beet armyworm strains. J. Ga. Entomol. Soc. 17 : 283-285.
- Kaya, H. K. 1985. Susceptibility of early larval stages of *Pseudaletia unipuncta* and *Spodoptera exigua* (Lepidoptera : Noctuidae) to the entomogenous nematode *Steinernema feltiae* (Rhabditidae : Steinernematidae). J. Invertebr. Pathol. 46 : 58-62.
- Kaya, H. K. and R. Gaugler. 1993. Entomopathogenic nematodes. Annu. Rev. Entomol. 38 : 181-206.
- Kaya, H. K. and B. J. Grieve. 1982. The nematode *Neoplectana carpocapsae* and the beet armyworm *Spodoptera exigua* : infectivity of prepupae and pupae in soil and of adults during emergence from soil. J. Invertebr. Pathol. 39 : 192-197.
- Klein, M. 1990. Efficacy against soil-inhabiting insect pests. pp. 195-214. In R. Gaugler and H. K. Kaya [eds.], Entomopathogenic nematodes in biological control. CRC, Boca Raton, FL.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227 : 680-685.
- Manweiler, S. A. 1994. Development of the first cat flea biological control product employing the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. Proc. Brighton Crop Pest Control Conf. Pests and Dis. 3 : 1005-1012.
- Maxwell, P. W., G. Chen, J. M. Webster and G. B. Dunphy. 1994. Stability and activity of antibiotics produced during infection of insect *Galleria mellonella* by two isolates of *Xenorhabdus nematophilus*. Appl. Environ. Microbiol. 60 : 715-721.
- Mikkola, K. 1970. The interpretation of long-range migrations of *Spodoptera exigua* Hb. (Lepidoptera : Noctuidae). 39 : 593-598.
- Poe, S. L., G. L. Crane and D. Cooper. 1973. Bionomics of *Spodoptera exigua* (Hübner), the beet armyworm, in relation to floral crops. Proc. Trop. Reg. Am. Soc. Hortic. Sci. 17 : 389-396.
- Poinar, G. O. Jr. 1979. Nematodes for biological control of insects. CRC, Boca Raton, FL.
- Tomalak, M. 1994. Selective breeding of *Steinernema feltiae* (Filipjev) (nematoda : Steinernematidae) for improved efficacy in control of a mushroom fly, *Lycoriella solani* Winnertz (Diptera : Sciaridae). Biocontrol Sci. Technol. 4 : 187-198.

(1996년 9월 13일 접수)