

파밤나방 (*Spodoptera exigua* (Hübner))과
담배거세미나방 (*Spodoptera litura* (Fabricius))에 대한
곤충병원선충 (*Steinernema carpocapsae* Weiser)의
감염력 및 증식력

Pathogenicity and Multiplication of Entomopathogenic
Nematode, *Steinernema carpocapsae* Weiser,
on Beet Armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner) and
Tobacco Cutworm, *Spodoptera litura* (Fabricius)

한상찬 · 이성섭 · 김용균

Sangchan Han, Sungseob Lee and Yonggyun Kim

Abstract - Pathogenicity and multiplication of entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae* Weiser, were analyzed in two insect hosts, *Spodoptera exigua* (Hübner) and *Sp. litura* (Fabricius). The estimated LC_{50s} (lethal concentration of the infective juveniles to kill 50% of the host insect population) were not different between two insect species or among their developmental stages on the filter paper assay, though the actual numbers of the infected nematodes were varied among them. The significant variation, however, occurred in nematode multiplication between two insect hosts. Temperature also gave so significant effect on nematode multiplication rate that it took 6 days after infection at 25°C, but did 12 days at 20°C to show the maximal nematode population peak (≈500,000 infective juveniles (IJ) in a 5th instar larva of *Sp. litura* and ≈100,000 IJ in a 5th instar larva of *Sp. exigua*).

Key Words - *Steinernema carpocapsae*, *Spodoptera exigua*, *Spodoptera litura*, Mass rearing, Pathogenicity

초 록 - 곤충병원선충 (*Steinernema carpocapsae* Weiser) 기주 증식을 위해 실내 대량사육이 용이한 파밤나방 (*Spodoptera exigua* (Hübner))과 담배거세미나방 (*Sp. litura* (Fabricius)) 유충에서 병원성과 증식선충수를 조사하였다. 반수치사 병원선충수는 두 기주간 또는 발육시기에 따라 차이가 없었으나 기주내에 증식된 선충수는 기주의 크기에 비례하였다. 온도에 따른 선충의 증식은 온도가 증가함에 따라 기주내 최대 감염태 선충수 (담배거세미나방 5령충에서 약 500,000마리, 파밤나방 5령충에서 약 100,000마리)를 보이는 소요기간이 25°C에서는 접종 후 6일이나 20°C에서는 12일로 길어졌다.

검색어 - 곤충병원선충, 파밤나방, 담배거세미나방, 대량증식, 병원력

곤충병원선충은 토양에서 발견되며 곤충에 대한 높은 병원성과 치사효과가 있다고 알려져 왔다 (Kaya

and Gaugler, 1993). 이러한 곤충병원선충은 Steinernematidae와 Heterorhabditidae의 두 과에서 주로 발견되

며 이들은 각 병원선충종에 특이적으로 공생하는 세균의 도움을 받아 곤충 기주내에서 그들의 병원력을 발휘한다(Akhurst and Dunphy, 1993; Maxwell *et al.*, 1994). 감염된 곤충은 패혈증이 유발되며 24~48시간 내에 치사하게 된다. 병원선충은 곤충에 대해 특이적으로 살충력을 보이고 척추동물이나 식물에 안전함으로 생물적 방제 인자로서 주목을 받아왔다(Poinar, 1989; Akhurst, 1990; Han *et al.*, 1996).

곤충병원선충 중에서 기주 곤충의 적용범위가 넓어 생물적 방제 인자로서 가장 연구가 많이 된 종이 *Steinernema carpocapsae* Weiser이다(Gaugler and Kaya, 1990). 이 선충을 이용한 야외 해충방제를 위해서는 무엇보다도 이 선충의 대량증식이 선행되어야 한다. 이러한 대량증식을 위해 액체배지(Friedman, 1990; Han, 1996)와 고체배지(Bedding, 1981; Wouts, 1981) 상태의 기내배양법이 개발되었다.

야외 살포를 위한 대량사육 방식외에도 소규모 포장 또는 실내실험용으로 기주곤충을 이용하여 빠르고 간편하게 곤충병원선충을 확보하려는 사육방식이 요구된다(Lindergren *et al.*, 1993). 이러한 기주곤충을 이용한 병원선충의 증식법은 야외에서 서식하고 있는 지역별 곤충병원선충의 생태형 확보에도 이용되게 된다. 특히 야외형의 확보는 Roush(1990)가 지적했듯이 다양한 지역에서 유래되는 상이한 곤충병원선충의 집단간에 교잡을 통해 실내 누대사육에 따른 임의 유전적 부동(random genetic drift) 및 동계교배에 기인한 유전적 변이의 감소를 막아 줄 수 있는 효과도 얻게 된다. 이러한 목적을 달성하기 위해 병원선충을 채집 및 증식시키는 데 현재까지 사육이 비교적 용이하고 대부분의 병원선충에 대해 감수성인 꿀벌부채명나방(*Galleria mellonella*)이 이용되었다(Choo *et al.*, 1995). 본 연구는 *St. carpocapsae*를 빠른 시간내에 대량 확보하기 위해 빠른 증식력과 대량사육이 용이한 기주인 파밤나방(*Spodoptera exigua* (Hübner))과 담배거세미나방(*Sp. litura* (Fabricius))에 대한 이 병원선충의 병원력과 증식력을 분석하여 새로운 증식용 기주곤충을 선발하려는 데 목적을 두었다.

재료 및 방법

1. 실험곤충

경북 안동시 송천동 파밭에서 채집되어 실내에서 4년 동안 사육된 파밤나방과 농업과학기술원 농업해충과 곤충사육실에서 2년간 실내사육된 담배거세미나방을 이용하여 인공사료(Gho *et al.*, 1990)로 온도 25±1°C, 광주기 16:8h(L:D)의 배양기에서 사육하였다. 성충의 먹이로 10% 설탕물이 산란상자(20×20×15 cm: 가로×세로×높이)에 공급되었다.

2. 곤충병원선충

경상대학교 농생물학과에 증식 및 보관 중이던 곤충병원선충인 *St. carpocapsae*을 분양 받아 파밤나방과 담배거세미나방을 기주로 대량 증식시켜 실험에 사용하였다. 증식된 선충은 최적의 보관온도인 15°C에서(Park *et al.*, 1998) 사용될 때까지 보관하였다.

3. 병원선충의 생물검정법

사육용기(직경 90 mm, 높이 15 mm) 바닥에 여과지(#2, 90 mm, Advantec, Toyo, Japan)를 깔고 0, 100, 200, 400, 800, 1,600 마리의 서로 다른 감염태 선충(infective juvenile: IJ) 밀도가 포함된 0.5 ml 증류수를 뿌린 후 먹이와 함께 대상 곤충을 처리하였다. 각 밀도에 30마리의 대상 곤충이 반복 처리되었다. 이후 처리된 사육용기들은 배양기(온도 25±1°C, 광주기 16:8h(L:D))에서 48시간 경과한 후 사망률을 조사하였고 Raymond(1985)의 probit 분석법에 의해 반수치사농도(50% lethal concentration: LC₅₀)를 산출하였다.

4. 집중 밀도별 증식

감염태 선충 밀도별(100, 200, 400, 800, 1,600 IJ/200 µl 증류수)로 기주의 기문주위의 측면에 자동피펫(P200, Gilson, France)으로 국부처리한 후 배양기(온도 25±1°C, 광주기 16:8h(L:D))에서 배양시켰다. 배양일 각각에 9마리 기주를 처리했으며 이들은 해부된 후 Baermann 깔대기법(Choi and Na, 1994)에 의해 살아있는 선충을 분리되어 이들 중 감염태 선충의 밀도를 해부현미경하에서 조사하였다.

5. 온도별 기주내 증식 현황

선충의 증식과 온도의 관계를 분석하고자 감염태 병원선충 400마리를 파밤나방과 담배거세미나방 각각에 국부처리한 후 이들 곤충 기주들의 발육에 양호한 두 온도(20°C와 25°C) 조건에서 시기별 선충의 증식밀도변화를 조사하였다. 각 시기에서 각 종마다 9마리의 기주곤충이 분석되었다.

6. 선충의 기주침입속도

두 종의 기주곤충에 대한 병원선충의 침입속도를 비교하기 위하여 400마리의 감염태 선충을 기주 곤충에 상기에서 기술된 방법으로 국부처리 또는 여과지 처리하였다. 일정시간후 기주를 증류수에 1분간 담고 다시 새로운 증류수로 2회 이동시키면서 기주곤충의 몸표면에 남아있을 미침입선충을 제거했다. 이렇게 세척된 기주는 배양기(온도 25±1°C, 광주기 16:8h(L:D))로 옮긴 후 48시간 경과되었을 때(대부분 침입선충이 관찰이 용이한 4령 또는 성충으로 성장한 시기)

해부현미경하에서 침입 선충밀도를 조사하였다. 각 조사에서 9마리의 기주곤충이 이용되었다.

결 과

1. 곤충병원선충의 침입력

두 기주곤충에 대한 병원선충의 침입속도가 비교되었다(Fig. 1). 여과지처리에 비해 국부처리가 초기침입 밀도가 높았으며 기주 치사속도가 빨랐다. 두 처리방법 모두에서 파밤나방이 담배거세미나방에 비해 치사율이 높았다. 그러나 침입숫자를 비교하면 담배거세미나방이 파밤나방에 비해 높았다. 본 연구에서 이용된 병원선충의 처리밀도(400마리)에서는 병원선충이 처리방법과 기주에 관계없이 100%의 살충력을 발휘하려면 12시간 이상 침입기회를 가져야 함을 나타냈다.

병원선충을 기주 곤충에 처리후 2시간까지 시간별로 조사되었을 때 두 기주 모두에서 침입선충의 수는 불과 2마리 이하로 매우 느리게 기주에 침입했으나 충분한 침입시간을 허용했을 때(24시간) 두 기주 모두에서 처리 병원선충 밀도가 증가함에 따라 곤충 체

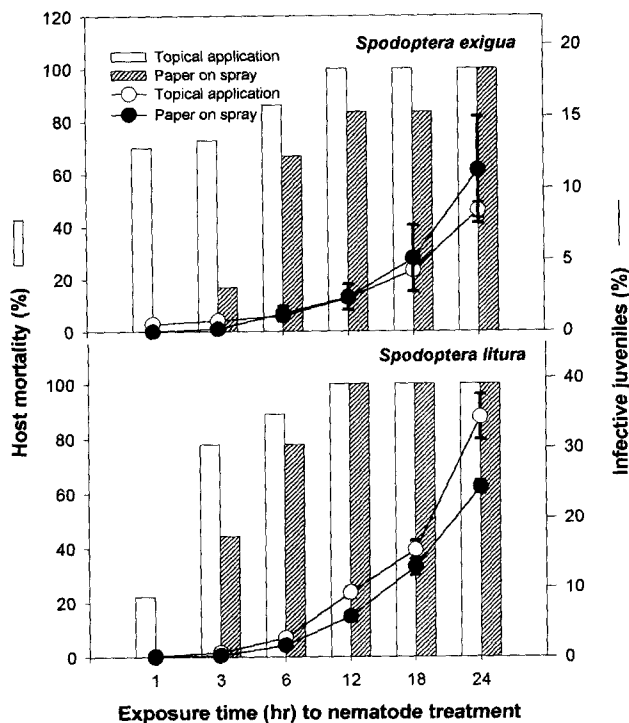


Fig. 1. Infecitivity of *Steinernema carpocapsae* (400 infective juveniles/insect) to the fifth instar larvae of *Spodoptera exigua* and *Sp. litura* at 25°C. White (□) and black (—) bars represent the filter paper and topical applications, respectively. Vertical error bars represent standard deviations of the mean.

내의 침입되는 선충의 수가 증가했으나 침입된 병원선충수는 기주간 상이했다(Figs. 1, 2). 파밤나방 5령충의 경우 처리된 선충중 약 10%가 침입하였고 담배거세미나방은 3령충에서 약 10%, 5령충의 경우 약 30%까지 보여 선충의 침입은 파밤나방보다는 담배거세미나방에서 용이하였으며 동일 기주 종에서도 영기가 진행함에 따라 증가하는 경향을 보였다.

2. 병원선충의 병원력

곤충병원선충의 두 종의 기주곤충에 대한 살충력을 여과지검정법으로 비교하였다(Table 1). 기주와 발육시기에 상관없이 약 20마리의 농도에서 반수치사농도(LC₅₀)를 나타냈다.

3. 병원선충의 증식력

병원선충의 처리농도에 따른 기주내 병원선충의 증식율을 두 종의 기주와 발육시기에 따라 조사했다

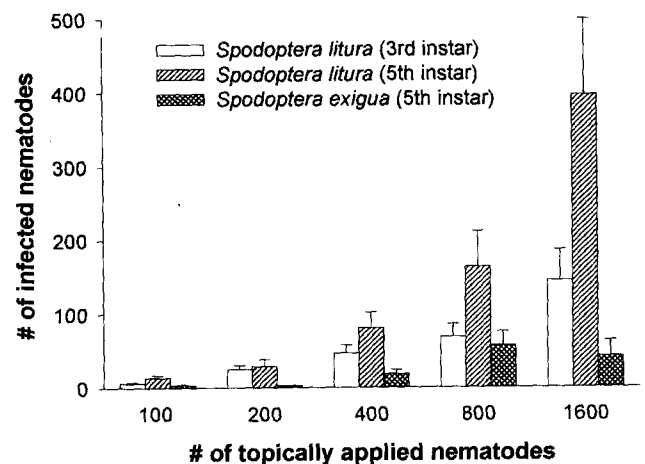


Fig. 2. Penetration of *Steinernema carpocapsae* to different insect hosts after 24h treatment at 25°C. Vertical error bars represent standard deviations of the mean.

Table 1. Pathogenicity of *Steinernema carpocapsae* on different insect hosts and developmental stages

Hosts	Instars	N	LC ₅₀ ¹ (95% C.I.)	Slope ± SD
<i>Spodoptera exigua</i>	5th	30	24.67 (14.88~32.62)	1.64 ± 0.30
<i>Spodoptera litura</i>	3rd	30	16.88 (9.04~25.71)	1.62 ± 0.34
<i>Spodoptera litura</i>	5th	29	15.99 (7.23~24.49)	1.30 ± 0.29

¹ LC₅₀ represents the lethal concentration of the infective nematodes applied to the filter paper method to kill 50% of the host insect population.

(Fig. 3). 조사된 모든 기주에서 증식된 병원선충 밀도는 접종농도에 관계없이 각 기주의 발육시기에 따라

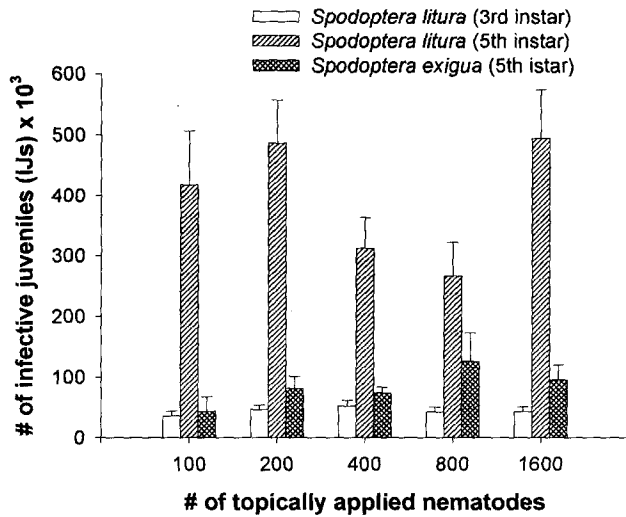


Fig. 3. Number of *Steinernema carpocapsae* produced in different insect hosts at 25°C. Vertical error bars represent standard deviations of the mean.

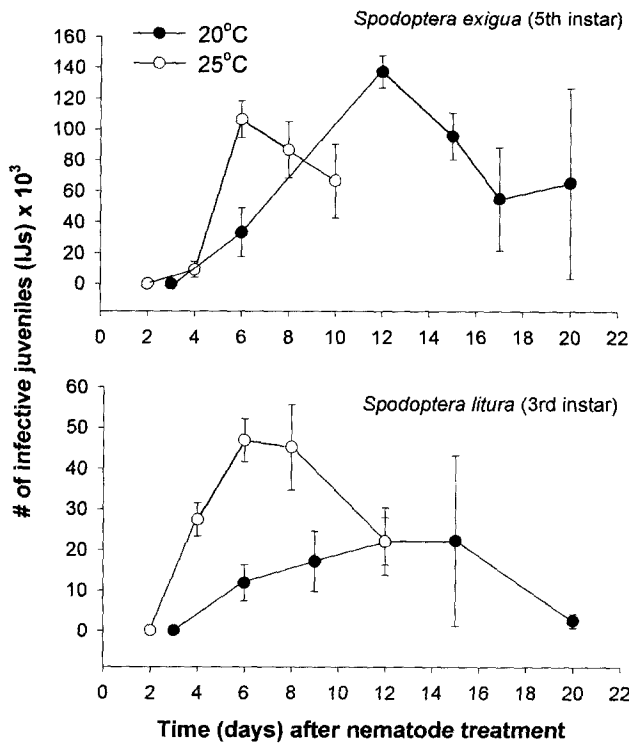


Fig. 4. Yield of infective juveniles, *Steinernema carpocapsae*, in different insect hosts with rearing temperatures. Vertical error bars represent standard deviations of the mean.

달랐다. 파밤나방 5령충 개체에서 증식된 병원선충수는 약 100,000마리, 담배거세미나방 3령충에서 약 50,000마리, 담배거세미나방 5령충에서 처리밀도에 따라 변동은 있지만 통계적으로 차이가 없었으며(F=2.13, df=4, 46, P=0.0919) 최대 약 500,000마리를 나타냈다.

조사된 두 가지 발육온도가 병원선충 증식에 미치는 영향을 분석하였다(Fig. 4). 두 온도중 병원선충의 증식은 높은 온도에서 빨랐다. 두 종의 기주 모두가 최대증식에 도달하는 기간이 20°C에서는 접종 후 12일이 소요된 반면 25°C에서는 불과 6일만으로 단축되었다.

고 찰

본 연구에서는 생물적 방제자로서 주목을 받고 있는 곤충병원선충(*St. carpocapsae*)에 대한 새로운 곤충 증식기주로서 기존에 인공사료가 개발되어 있어 비교적 실내에서 사육이 용이하고 발육속도가 빠른 파밤나방과 담배거세미나방이 이 병원선충에 대한 병원력과 증식력면에서 비교하였다.

곤충병원선충이 파밤나방에 비해 담배거세미나방에서 침입속도는 느리지만 침입밀도는 높았다. 또 담배거세미나방의 경우 5령충이 3령충에 비해 침입밀도가 높게 나왔다. 이러한 침입밀도의 차이는 병원선충이 기주에 들어갈 수 있는 경로(입, 항문, 기문 및 표피)상의 크기 및 기주 곤충의 행동성의 차이에 기인될 수 있다(Kaya, 1985; Han et al., 1996). 유사한 결과로서 갓 부화한 1령 파밤나방의 경우 25°C에서 3일 또는 8일 성장된 유충에 비해 *St. carpocapsae*에 대해 현격하게 낮은 감수성을 보였고 이는 어린 유충일수록 분주한 행동성으로 말미암아 병원선충의 충분한 침입 기회를 얻지 못했다고 설명되었다(Kaya, 1985).

본 연구에서 실시된 여과지검정법(400마리의 감염태 선충밀도)에서 100%의 살충효과를 보이기 위해서 기주 곤충이 12시간 이상 병원선충에 노출되어야 함을 보였다. Shannag et al.(1994)이 실시한 5종의 병원선충의 비교 살충력 연구에서 명나방 일종인 *Diaphania nitidalis*에 가장 빠르고 효과적인 선충이 *St. carpocapsae*이고 동일한 여과지검정법(100마리 감염태 선충밀도)에서 1시간 노출에 50%의 살충력을 보였고 24시간 노출시킬 경우 100%의 살충력을 나타냈다. 그러나 본 연구에서는 이 농도의 병원선충을 국부처리법을 이용할 경우 12시간 노출에 100% 치사율을 기록한 점으로 미루어 병원선충이 기주 곤충의 표면에 정착하는데 상당한 시간이 소요됨을 보여 주었다.

두 종의 기주곤충간에 이러한 침입밀도의 차이에도 불구하고 여과지 검정법에서 얻어진 반수치사 선충농

도(LC₅₀)는 기주나 발육시기에 따라 차이가 없었다. 이 치사농도는 Han *et al.* (1996)에서 얻은 결과(약 17 마리)와 매우 유사했다.

여과지 검정법에서 얻어진 반수치사농도를 실제로 증체내에 침입했던 병원선충수를 환산하기 위해 본 연구에서 얻어진 병원선충의 기주 침입율(Fig. 2)로 환산하면 파밤나방 5령충의 경우 2마리(20마리×10%=반수치사농도×침입율), 담배거세미나방 3령충의 경우 2마리(20마리×10%), 담배거세미나방 5령충의 경우 4마리(20마리×20%)에 해당하게 된다. 그러나 증체에 직접 처리하여 얻은 침입율과 여과지검정법으로 얻은 반수치사선충수를 직접 환산시킬 수 없으므로 실제로 여과지검정법에서 증체에 들어간 침입수는 이상의 산출숫자보다 낮아질 수 있다. 담배거세미나방의 높은 침입율에도 불구하고 유사한 반수치사농도를 보였다는 점은 이 곤충이 파밤나방에 비해 병원선충에 대한 저항 기작이 높았다는 점이다. 실제로 기주곤충을 치사하게 하는 인자는 병원선충의 장내에 공생하는 *Xenorhabdus nematophilus*의 독소물질에 기인됨으로(Forst *et al.*, 1997) 담배거세미나방은 이 물질에 대해 파밤나방에 보다 높은 면역 기작을 가졌음을 의미하게 된다. 이러한 면역기작은 3령충에 비해 5령충에서 높았음을 간접적으로 제시하게 된다.

기주내 병원선충의 최대증식숫자는 기주의 몸의 크기와 비례했다. 체중면에서 담배거세미나방 3령충은 약 100 mg, 파밤나방 5령충은 약 150 mg 그리고 담배거세미나방 5령충은 약 1,000 mg으로 각각 1:1.5:10의 체중비율을 보였다. 최대증식밀도면에서 볼 때 담배거세미나방 3령충은 약 50,000마리, 파밤나방 5령충은 약 100,000마리 그리고 담배거세미나방 5령충은 약 500,000마리로서 1:2:10의 증식 숫자비율을 보였다. 이러한 몸의 크기와 병원선충의 증식과의 관계는 약 기주곤충 체중이 1 mg당 500마리의 병원선충이 증식될 수 있다는 관계식이 성립될 수 있다. 또 이러한 최대증식밀도가 두 종의 기주 모두에서 25°C로 증식하였을 경우 불과 6일만에 얻어졌다. 이 기간이후 감소되는 기주체내 선충밀도는 일부 감염태 선충의 체외 탈출과 불완전한 기주체 조건하에서 잔류했던 이들의 일부 사멸에 기인된다고 사려된다.

이상의 결과를 통해 추후 자연계내의 *St. carpocapsae* 채집 및 증식 또는 소형 포장실험용 선충배양에 담배거세미나방이나 파밤나방도 기존의 꿀벌부채명나방과 더불어 곤충병원선충의 효율적 기주곤충임을 제시한다.

사 사

본 연구의 수행에 이용된 곤충병원선충을 제공하여

주신 경상대학교 농생물학과 추호렬교수님과 대학원생들에게 감사드립니다. 이 연구는 농림부에서 시행한 농림수산특정연구사업의 연구결과입니다.

인 용 문 헌

- 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. Laird, L.A. Lacey and E.W. Davidson. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Akhurst, R.J. and G.B. Dunphy. 1993. Tripartite interactions between symbiotically associated entomopathogenic bacteria, nematodes, and their insect hosts. pp. 1-23. in Parasites and pathogens of insects. Vol. 2. eds. N.E. Beckage, S.N. Thompson and B.A. Federici. Academic press, NY.
- Bedding, R.A. 1981. Low cost *in vitro* mass production of *Neoaplectana* and *Heterorhabditis* species (Nematoda) for field control of insect pests. *Nematologica* 27: 109-114.
- Choi, Y.Y. and Y.J. Na. 1994. Plant nematology. Hyangmoonsa, Seoul. 226 pp.
- Choo, H.Y., S.M. Lee, B.K. Chung, Y.D. Park and H.H. Kim. 1995. Pathogenicity of Korean entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) against local agricultural and forest insect pests. *Korean J. Appl. Entomol.* 34: 314-320.
- Forst, S., B. Dowds, N. Boemare and E. Stackebrandt. 1997. *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: Bugs that kill bugs. *Annu. Rev. Microbiol.* 51: 47-72.
- Friedman, M.J. 1990. Commercial production and development. pp. 153-172. in Entomopathogenic nematodes in biological control. eds. R. Gaugler and H.K. Kaya. CRC press, Boca Raton, FL.
- Gaugler, R. and H.K. Kaya. 1990. Entomopathogenic nematodes in biological control. 365pp. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Goh, 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, R.C. 1996. The effects of inoculum size on yield of *Steinernema carpocapsae* and *Heterorhabditis bacteriophora* in liquid culture. *Nematologica* 42: 546-553.
- Han, S., Y. Kim and B. Lee. 1996. Biological control of vegetable insects pests with entomopathogenic nematodes. *Korean J. Soil Zoology* 1: 81-88.
- Kaya, H.K. and R. Gaugler. 1993. Entomopathogenic nematodes. *Annu. Rev. Entomol.* 38: 181-206.
- 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.

- Lindergren, J.E., K.A. Valero and B.E. Mackey. 1993. Simple *in vivo* production and storage methods for *Steinernema carpocapsae* infective juveniles. *J. Nematol.* 25: 193~197.
- 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.
- 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.
- Poinar, G.O.Jr. 1989. Non-insect hosts for the entomogenous rhabditoid nematodes *Neoalectana* (Steinernematidae) and *Heterorhabditis* (Heterorhabditidae). *Rev. Nematol.* 12: 423~428.
- Raymond, M. 1985. Presentation d'un programme d'analyse log-probit pour micro-ordinateur. *Cah. ORS-TOM. Ser. Ent. Med. et Parasitol.* 22: 117~121.
- Roush, R.T. 1990. Genetic variation in natural enemies: critical issues for colonization in biological control. pp. 263~288. in *Critical issues in biological control*. eds. M. MacKauer, L.E. Ehler and J. Roland. Hants: Intercept, Andover.
- Shannag, H.K., S.E. Webb and J.L. Capinera. 1994. Entomopathogenic nematode effect on pickleworm (Lepidoptera: Pyralidae) under laboratory and field conditions. *J. Econ. Entomol.* 87: 1205~1212.
- Wouts, W.M. 1981. Mass production of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis heliothidis* (Nematoda: Heterorhabditidae) on artificial media. *J. Nematol.* 13: 467~469.

(1999년 1월 12일 접수, 1999년 10월 13일 수리)