

**Bacillus thuringiensis와 Neem 오일에 대한 배추좀나방의 살충활성**조민수<sup>1</sup> · 최수연 · 김태환 · 박 찬 · 김담아<sup>1</sup> · 김영림<sup>1</sup> · 오세문<sup>1</sup> · 김성우<sup>1</sup> · 윤영남 · 유용만\*충남대학교 농업생명과학대학 응용생물과, <sup>1</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 농약평가과

(2009년 11월 2일 접수, 2009년 11월 15일 수리)

**Insecticidal activity of Diamondback Moth, *Plutella xylostella* against *Bacillus thuringiensis* and Neem oil**Min-Su Cho<sup>1</sup>, Su-Yeon Choi, Tae-Whan Kim, Chan Park, Dam-A Kim<sup>1</sup>, Young-Rim Kim<sup>1</sup>, Se-Mun Oh<sup>1</sup>, Sung-Woo Kim<sup>1</sup>, Young-Nam Youn and Yong-Man Yu\*Dept. Applied Biology, College of Agriculture and Life Science, Chungnam National University, Daejeon, 305-764, Korea, <sup>1</sup>Pesticide Safety Evaluation Division, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon, 441-707, Korea**Abstract**

For the environmental friendly management of diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.), *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* ( $30 \times 10^8$  cfu/mg) and neem oil (0.5% azadirachtin) were used as green control agencies with mixed and alternative treatments on the chinese cabbage. When *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* was applied to 1st and 2nd larva of *P. xylostella* with recommended concentration, their mortalities were reached to 100% by 2 days after treatment. In case of azadirachtin, its effect of mortality was continued for 7 days, and reached to 100% mortality.  $LC_{50}$  values of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and azadirachtin against 1st, 2nd, 3rd and 4th larva of *P. xylostella* were  $2.8 \times 10^4$ ,  $3.1 \times 10^4$ ,  $3.4 \times 10^4$  and  $1.5 \times 10^5$  cfu/ml, and 2.7, 3.9, 4.7 and 7.1 ppm, respectively. The number of laid eggs of *P. xylostella* was reduced to 57.5 at 25 ppm of azadirachtin compared with control treatment. The hatch ratio was not significantly different with *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* treatment in comparison with control treatment. However, when azadirachtin was applied, their hatch ratio were reduced to 25.8 and 45.4% at 25 and 50 ppm, respectively. On the other hand, emergence rate of eggs was not different with *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* treatment, but 45.4% was shown in azadirachtin treatment with 50 ppm in comparison with control. When the mixture with *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and azadirachtin was applied to adults of *P. xylostella*, their mortality was higher than *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* treatment only. These results are supposed that the mixture of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and azadirachtin might be used as green control agents for reducing the damage of diamondback moth in the Chinese cabbage.

**Key words** Neem oil, Azadirachtin, *Bacillus thuringiensis*, *Plutella xylostella*, mortality**서 론**

우리나라의 대표적 김치 재료인 배추를 포함하는 십자화과

작물(Cruciferae)에 주요 해충인 배추좀나방(*Plutella xylostella* L.)은 나비목(Lepidoptera) 집나방과(Yponomeutoidea)에 속하는 농업해충으로 전 세계적인 난방제 해충의 하나이다. 이러한 배추좀나방의 방제를 위해서 전 세계적으로 10억불 이상의 방제 비용이 사용되는 것을 보고하고 있다(Talekar

\*연락처 : Tel. +82-42-821-5763, Fax. +82-42-823-8679

E-mail: ymyu@cnu.ac.kr

and Shelton, 1993). 이 해충의 생활환은 약 16일경으로 연간 발생 세대수가 많고, 발육기간이 짧아 살충제에 의한 노출 기회가 많으며 세대가 혼재하여서 저항성 발달이 빠르게 나타날 수 있는 난방제 해충이다(Kim *et al.*, 1990). 우리나라에서도 제주도에서 강원도의 고랭지까지 전국적으로 발생하고 있고, 배추 등의 주요작물에 많은 피해를 주는 것으로 보고하고 있다(Kim *et al.*, 2006).

따라서 오랜 기간 동안 이 해충을 방제하기 위한 다양한 살충제의 연용과 오남용으로 약제저항성을 나타내 방제에 큰 어려움을 겪고 있다(Charleston *et al.*, 2005). 배추좀나방에 1953년 최초로 저항성이 발견된 살충제는 DDT로 그 이후 유기인계, 카바메이트계, 합성피레스로이드계 등과 IGR계통인 Teflubenzuron과 Chlorfluazuron에도 저항성이 보고되었다(Cho and Lee, 1994). 그러므로 배추좀나방의 생리 생화학적 변화로 인해 더 많은 양의 화학 살충제가 사용되면서 저항성 뿐 만 아니라 생태계 파괴 등의 문제를 야기 시키고 있다. 따라서 생태계 보호 및 농작물 생산 증대를 위하여 종합적 해충방제 방법 도입이 필요하고, 최근 소비자들의 인식이 친환경 농산물 등의 안전성에 관심이 높아짐에 따라 생물적 방제의 가치는 높아져 가고 있다.

미생물살충제로서 국내외적으로 가장 많이 사용되는 *Bacillus thuringiensis*의 주요 작용기작인 살충성 단백질은 비 선택 유기체에 대하여 안전하기 때문에 환경친화적인 재배방법에 필요한 자재이다. 곤충병원성세균인 *B. thuringiensis*는 그람 양성 호기성 간균으로, 내생포자를 형성하면서 내독소( $\delta$ -endotoxin)로 이루어진 살충성 결정 단백질을 생성한다. 현재까지 나비목, 파리목, 딱정벌레목에 활성을 나타내며, 최근에는 벌목, 매미목, 메뚜기목 새털이목등과, 선충, 응애, 원생동물에도 효과가 있는 *B. thuringiensis*가 분리되었다(Schnepf *et al.*, 1998). 살충성 결정 단백질의 작용기작은 내독소 단백질이 중장 소화효소에 분해가 되어 독소활성을 갖게 되고, 중장세포 수용체와 결합하여 구멍을 만들어 폐혈증을 유발하고 섭식이 중단되어 곤충이 죽게 된다(Gill *et al.*, 1992). 이러한 *B. thuringiensis*제의 사용은 세계적으로 50여 년간 사용되어 왔으며 국내시장에서도 20여년 넘게 사용되어오고 있다. 특히 최근에는 친환경 농산물의 생산을 위하여 다양한 채소작물에 사용이 서서히 증가하고 있는 실정이다. 또한 국내외의 해충방제를 위한 농약살포 습관에서 하나의 동일한 약제를 수회 살포하므로 *B. thuringiensis*제가 배추좀나방의 포장에서 저항성이 있는 것으로 밝혀졌다(Frutos *et al.*, 1999). 또한 *B. thuringiensis*제는 독성이 활성을 갖기 위해서 해충이 반드시 섭식해야 하기 때문에(Schnepf *et al.*, 1998) 유충만을 죽이고 해충의 알,

번데기, 성충에는 영향을 줄 수 없는 단점이 있다.

또한 친환경 농자재로서 사용되는 Neem oil은 님나무(*Azadirachta indica* A. juss, Meliaceae)의 추출물에서 나온 Azadirachtin을 주성분으로 하는 살충제로서, Butterworth와 Morgan(1968)에 의해 분리되었다. 세계적으로 주요 작물의 해충을 포함한 400종 이상의 해충에 사용되고, IPM을 위한 가장 주목받는 식물성 성분 중에 하나이다(Schmutterer, 1990; Isman, 1999). Azadirachtin은 곤충에 섭식을 저해하고, 산란억제, 성장 저지, 탈피방지와 우화방해 등의 다양한 작용을 한다(Schmutterer, 1990; Mordue and Blackwell, 1993). 곤충생장조절제인 Azadirachtin은 천적에 안전하며 환경에 적은 영향을 주고, 인간이나 다른 절지동물에 독성이 없는 것이 가장 큰 장점중의 하나이다. 또한 저항성 발달의 가능성이 적기 때문에 해충 방제에 유용한 성분으로 알려져 있다(Isman, 1999; Walter, 1999).

이 연구에서 채소류의 환경 친화적으로 해충을 방제하기 위한 *B. thuringiensis*와 Neem oil의 처리는 방제 효과를 증가시키는데 유용할 것이고, 기주에 대한 저항성 발달의 가능성이 감소시킬 수 있을 것으로 사료되어 연구를 검토하였다. 이 두 종류에서 *B. thuringiensis*제만 사용했을 때 죽일 수 없는 알, 번데기, 성충에도 영향을 줄 수 있는 Neem oil때문에 배추좀나방의 모든 세대의 방제효과를 시도하였다.

## 재료 및 방법

### 공시곤충

본 실험은 농촌진흥청 국립농업과학원 농약평가과에서 10년 이상 누대 사육한 배추좀나방(*P. xylostella*) 개체를 사용하였다. 배추좀나방 유충은 플라스틱 통(38 cm×28 cm×17 cm)에서 직접 재배한 배추를 먹이로 하였다. 번데기는 다른 상자로 옮겨서 성충으로 우화하도록 하였고, 우화한 성충은 10% 설탕물을 먹이로 주었다. 성충은 통배추를 넣어서 산란을 유도하고, 통배추를 플라스틱 통(20 cm×14 cm×10 cm)으로 옮겨 알이 부화하도록 하였다. 곤충의 사육 조건은 23±2℃, 광조건 16L:8D, 상대습도 50~60%로 유지하였다.

### 유충의 생물검정

생물검정에 사용된 생물농약과 친환경유기농자재 제품은 슈리사이드{수화제, (주)바이엘크롭사이언스; *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* 30×10<sup>8</sup> cfu/mg}와 Pestal Neem oil {(주)누보, ai; Azadirachtin; 0.5%}을 사용하였다.

배추좀나방에 대한 생물검정은 1~4령 유충을 잎 침지법

(Tabashnik *et al.*, 1991)을 이용하였다. 직접 재배한 배추잎을 원의 지름을 7 cm로 잘라 *B. thuringiensis*( $1.0 \times 10^3$ - $1.0 \times 10^6$  cfu/ml)와 Neem oil(Azadirachtin; 0.5-100 ppm)의 각각의 희석액에 30초간 담갔다가 1시간 음건한다. 잎디스크를 지름 10 cm 높이 4 cm의 플라스틱 사육통에 넣고 여과지를 깔아 습도를 유지하였다. 사육통에 배추좀나방 유충을 10마리 씩 넣고, 모두 5반복으로 시험하였다. 플라스틱 사육통은  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , 상대습도 50~60%의 사육실에 보관하면서 사충을 확인한다. *B. thuringiensis*와 Neem oil의 혼합처리는 잎디스크를 *B. thuringiensis* 희석액에 담갔다가 1시간 음건한 후 Neem oil에 침지하여 사용하였다.

배추좀나방 용화율은 유충에 *B. thuringiensis*와 Neem oil의 희석액을 처리한 잎디스크를 먹이로 하여 번데기가 되는 정도를 측정하였다. 사육통에 유충 10마리 씩 5반복으로 하였고, 번데기가 되는 시간과 번데기의 무게도 측정하였다. 배추좀나방 우화율은 번데기에 *B. thuringiensis*와 Neem oil의 희석액을 처리한 뒤 알에서 우화되는 수를 측정하였다.

### 산란 및 부화에 대한 영향

배추좀나방 성충의 산란을 유도하기 위해 알루미늄 호일을 사용하였다. 알루미늄 호일에 촘촘한 공간이 생기도록 구긴 뒤  $12 \times 14$  cm로 잘라서 알루미늄호일을 배추즙액에 담근다. 배추즙액은 65 g의 배추에 500 g의 증류수를 넣고 오토클레이브로  $125^\circ\text{C}$ 에서 20분간 멸균하여 만든다. 멸균 후 식힌 배추즙액에서 배추를 걸러내고 배추즙액에 알루미늄 호일을 30초 담갔다가 말린다. 산란을 위해 배추좀나방 성충은 암, 수 30마리씩 케이지( $40 \times 40 \times 50$  cm)에 넣는다. 배추좀나방 성충은 산란을 위해 부화한지 2~3일 되는 성충을 사용했고 10%설탕물을 먹이로 주었다. 배추물이 물은 알루미늄 호일을 *B. thuringiensis*( $3.0 \times 10^6$  cfu/ml)와 Neem oil(Azadirachtin; 5, 25 ppm)을 처리하여 케이지에 시험하였다. 무처리구로 배추즙액 알루미늄 호일을 대조구로 사용하였다. 처리 24시간 뒤에 알루미늄 호일에 있는 배추좀나방 알의 수를 해부현미경으로 확인하였다.

부화실험을 위해 배추즙액 알루미늄 호일을 이용해 배추좀나방 알의 산란을 유도한 뒤 해부현미경으로 알의 수를 확인하였다. 알이 있는 알루미늄 호일을 *B. thuringiensis*( $1.5 \times 10^5$  cfu/ml)와 Neem oil(Azadirachtin; 1, 5, 10 ppm)의 희석액에 30초간 담갔다가 건조시킨다. 무처리는 배추즙액 알루미늄 호일을 이용하였다. 건조 후에 알이 부화할 수 있도록 플라스틱 사육통에 여과지를 깔고 알루미늄 호일을 넣은 뒤  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , 상대습도 50~60%에 두고, 부화한 배추좀나방 유

충을 확인하였다.

### 성충의 생물검정

성충은 실로된 망( $20 \times 15 \times 30$  cm)을 지상에서 1.5 m 높이로 매달아 놓고, 배추좀나방 성충 20마리를 망에 넣었다. 망으로부터 1~1.5 m 떨어진 거리에서 압축식 분무기를 이용하여 *B. thuringiensis*( $1.5 \times 10^5$  cfu/ml)와 Neem oil(Azadirachtin; 1, 25, 50 ppm)을 희석하여 배추좀나방 성충이 약제에 충분히 묻도록 분무하였다. 무처리는 물을 분무하였고, 10%설탕물을 넣어주었다.

### 포트실험

배추좀나방의 알, 유충(1~4령), 번데기, 성충이 동시에 존재하는 실제 포장에서 방제 효과를 보기 위한 방법으로 포트실험을 하였다. 포트에 배추를 재배한 뒤, 배추좀나방의 알, 유충, 번데기, 성충을 동시에 투입하였다. 알과 번데기를 배추 포트가 들어있는 케이지( $40 \times 40 \times 50$  cm)에 각각 20마리 씩 넣고, 성충은 암, 수 20마리를 넣었다. *B. thuringiensis*( $1 \times 10^6$  cfu/ml)와 Neem oil(Azadirachtin; 50 ppm)을 희석하여 적정량을 살포하였고, 간접효과를 위하여 유충은 배추 잎의 살포된 후 약제가 건조된 뒤 1, 2, 3, 4령 별로 20마리 씩 넣었다. 직접접촉의 효과를 위하여 *B. thuringiensis*와 Neem oil이 같이 처리된 배추잎은 *B. thuringiensis*와 Neem oil을 혼합하여 살포하였다. 대조구는 물을 살포하였고, 2일에 한 번 씩 배추에 물을 주었다.

## 결 과

### 유충의 령기별 사충률

*B. thuringiensis*와 Azadirachtin에 표기되어 있는 추천농도로 배추좀나방 유충에 대한 생물검정을 실시하였다(Fig. 1). *B. thuringiensis*는 배추좀나방 유충의 1령에서 4령까지 령기에 차이가 없이 48시간 안에 100%의 사충률을 보였다. 반면에 Azadirachtin은 *B. thuringiensis*보다 낮고 늦은 사충률을 나타냈다. 배추좀나방의 어린 유충인 1, 2령에서도 72시간이 지나서야 40%의 사충률을 보였으며, *B. thuringiensis*와는 다르게 7일이 되어서 100%의 사충률을 보여 지효적인 효과를 나타냈다.

배추좀나방에 대한 *B. thuringiensis*와 Azadirachtin의 LC<sub>50</sub>의 값은 배추좀나방 1, 2, 3, 4령 유충에 대해 *B. thuringiensis* 균수는 각각  $2.8 \times 10^4$ ,  $3.1 \times 10^4$ ,  $3.4 \times 10^4$ ,  $1.5 \times 10^5$  cfu/ml의 값으로 나타났고 Azadirachtin은 각각 2.7, 3.9, 4.7, 7.1 ppm

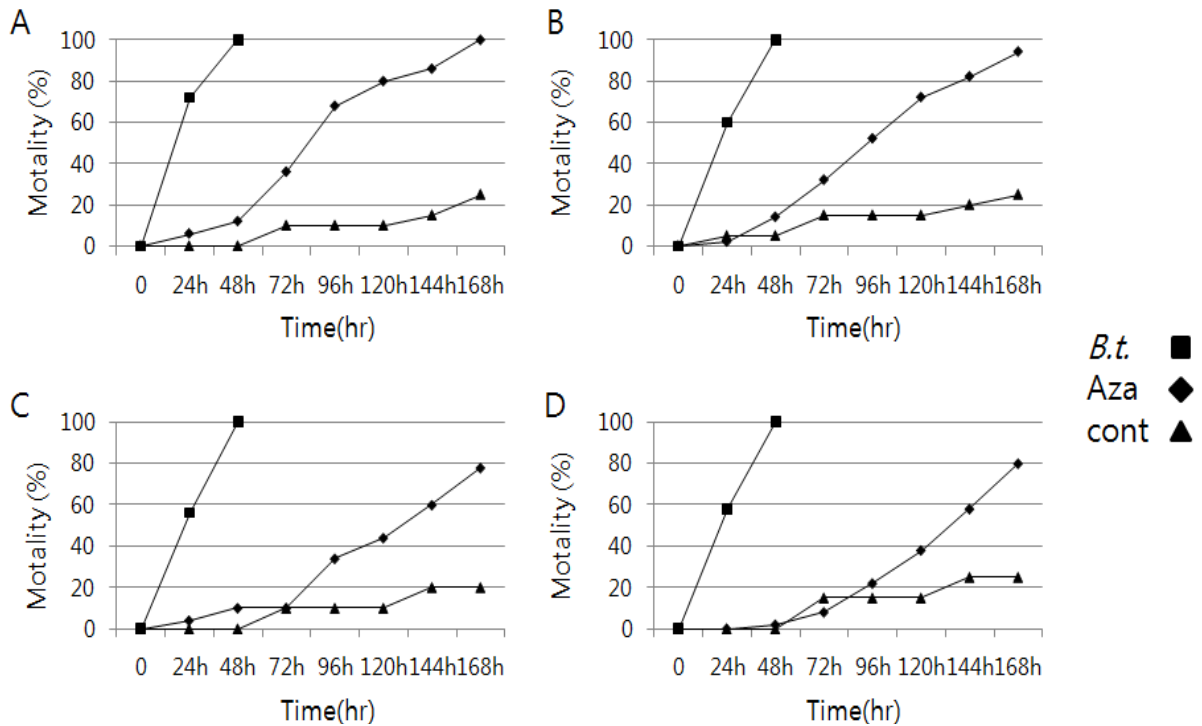


Fig. 1. Insecticidal activities at the recommended concentration of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and azadirachtin against *P. xylostella* according to different larval stages. (A) 1st instar (B) 2nd instar (C) 3rd instar (D) 4th instar.

Table 1. LC<sub>50</sub> value of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and azadirachtin against different larval stages of *P. xylostella*

Larval stages	n	<i>B. thuringiensis</i>		Azadirachtin	
		LC <sub>50</sub> (95% CL., cfu/ml)	slope±SE	LC <sub>50</sub> (95% CL., ppm)	slope±SE
1st instar	150	2.8×10 <sup>4</sup> (1.6×10 <sup>4</sup> -4.6×10 <sup>4</sup> )	1.13±0.12	2.7 (2.1-3.3)	1.36±0.10
2nd instar	150	3.1×10 <sup>4</sup> (2.1×10 <sup>4</sup> -4.6×10 <sup>4</sup> )	1.22±0.14	3.9 (3.1-4.7)	1.53±0.11
3rd instar	150	3.4×10 <sup>4</sup> (1.9×10 <sup>4</sup> -6.2×10 <sup>4</sup> )	0.73±0.13	4.7 (3.7-5.9)	1.32±0.10
4th instar	150	1.5×10 <sup>5</sup> (4.7×10 <sup>4</sup> -1.0×10 <sup>6</sup> )	0.41±0.16	7.1 (5.7-8.6)	1.50±0.11

의 값을 보였다(Table 1). 배추좀나방의 노령 유충일수록 *B. thuringiensis*와 Azadirachtin에 대한 감수성이 낮아지는 것으로 나타났다.

### 산란에 미치는 영향

배추좀나방의 산란에 미치는 영향을 조사하기 위하여 배추즙액을 처리한 알루미늄 호일에 배추좀나방 성충에 의하여 산란된 알의 수를 조사하였다. 대조구로서 배추즙액만 처리한 알루미늄 호일에는 산란수가 하루 평균 77.5개의 산란을 하였다. 반면에 *B. thuringiensis*(3.0×10<sup>6</sup> cfu/ml)를 처리한 알루미늄 호일에는 하루 평균 56.5개의 산란을 하였다. 또한 Azadirachtin 주성분 함량을 5 ppm, 25 ppm을 처리한 알루미늄 호일은 각각 37.5개와 20개의 산란하였다. *B. thuringiensis*

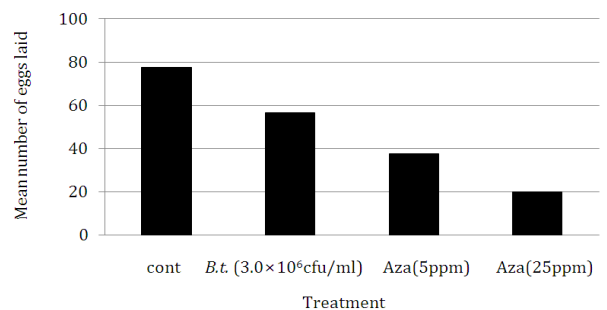


Fig. 2. Mean number of eggs laid at the treated concentrations of *B. thuringiensis* and Neem oil against *P. xylostella*.

를 처리했을 때 무처리보다 27.8%의 산란저해를 보였고, Azadirachtin을 처리했을 때 무처리보다 51.7, 74.2%의 산란 저해를 보이는 것으로 나타났다(Fig. 2).

**알의 부화율에 미치는 영향**

Fig. 3에서와 같이 시험에 사용된 2종의 약제가 유충의 부화에 미치는 영향을 조사한 결과 배추좀나방 알의 부화율은 무처리에서 94.4%로 나타났으나, *B. thuringiensis*  $1.5 \times 10^5$  cfu/ml 처리시에는 86%의 부화율을 보여 약간의 산란저해 효과를 나타내는 것으로 나타났다. Azadirachtin 5 ppm에서는 88%, 25 ppm은 68.6% 50 ppm은 49%의 부화율로 농도가 높아짐에 따라 확실하게 영향이 미치는 것으로 보였다. Azadirachtin을 처리했을 때 25 ppm에서는 무처리보다 25.8%, 50 ppm에서는 45.4%로 부화율에 높은 저해를 보였다.

**용화율과 우화율에 미치는 영향**

배추좀나방의 유충에 *B. thuringiensis*와 Azadirachtin의 시험약제의 농도를 LC<sub>50</sub>으로 처리하여 시간의 경과함에 따라 번데기가 되는 용화율과 번데기에서 성충이 되는 우화율을 검토하였다(Table 2). 배추좀나방 3, 4령 유충에 *B. thuringiensis*와 Azadirachtin을 처리하였을 때의 번데기가 되는 용화율을 보면 3령에 처리하였을 때 무처리는 75.3%이고, *B. thuringiensis* ( $3.0 \times 10^4$  cfu/ml)는 47.3%로 무처리 보다 28% 낮았고, Aza-

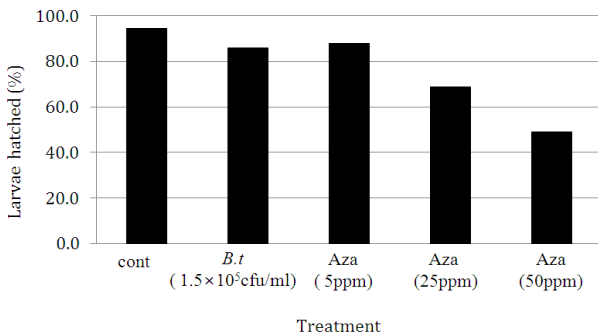


Fig. 3. Hatch ratio of *P. xylostella* at the treated concentrations of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and azadirachtin.

dirachtin 4 ppm은 32.1%로 43.2%가 낮게 나타났다. 노령인 4령 유충에서는 무처리의 85%보다 *B. thuringiensis* ( $1.5 \times 10^5$  cfu/ml)는 41.5%로 무처리 보다 43.5%가 낮았고, Azadirachtin 7 ppm은 40.5%로 44.5%가 낮게 나타났다. 또한 용화되는 시간을 보면 배추좀나방 3, 4령 유충의 경우 50%의 번데기가 되는 시간은 3령에서 무처리는 4.11일, *B. thuringiensis*는 4.65일, Azadirachtin은 7.53일로 Azadirachtin처리 시 무처리 보다 3.42일 오래 걸렸다. 4령 유충은 무처리가 2.27일, *B. thuringiensis*는 3.34일, Azadirachtin은 3.67일로 3령의 유충보다 짧게 나타났다.

한편, 배추좀나방 3, 4령 유충에 대한 *B. thuringiensis*와 Azadirachtin의 우화율을 보면 3령에서 무처리는 81.4%고, *B. thuringiensis*는 83.0%, Azadirachtin은 51.1%로 무처리 보다 30.3%낮은 우화율을 보였다. 4령 유충에서는 무처리는 70.0%, *B. thuringiensis*는 65.0%, Azadirachtin은 14.8%로 무처리에 비해 55.2%가 낮은 우화율을 보였다(Table 2).

배추좀나방 1령 유충에 2종의 약제를 처리하고 생존율, 용화율, 번데기의 길이 그리고 우화율을 조사하였다. *B. thuringiensis* LC<sub>20</sub>, LC<sub>50</sub>, LC<sub>90</sub>을 처리했을 때 각각 76.6%, 72.3%, 81.0%의 용화율을 보였고, 71.4%, 73.5%, 76.5%의 우화율을 보였다. 번데기의 길이는 5.86 cm, 5.56 cm, 5.20 cm로 나타났다. Azadirachtin의 경우 LC<sub>20</sub>, LC<sub>50</sub>, LC<sub>90</sub>을 처리했을 때 80.3%, 65.5%, 28.6%로 무처리에 비해 LC<sub>50</sub>에서 20.4%, LC<sub>90</sub>에서 57.3%가 낮은 용화율을 보였다. 우화율도 61.2%, 38.9%, 25.0%로 무처리와 LC<sub>50</sub>에서 32%, LC<sub>90</sub>에서 45.9% 낮게 나타났다. 번데기의 길이는 5.39 cm, 5.37 cm, 5.03 cm로 무처리에 비해 LC<sub>90</sub>에서 0.9 cm의 차이를 보였다(Table 3).

***B. thuringiensis*와 Neem oil의 혼합처리**

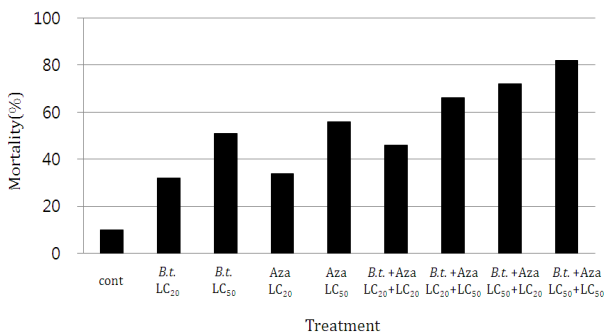
배추좀나방 2령 유충에 *B. thuringiensis*와 neem oil을 동

Table 2. Pupation and emergence rates of 3rd and 4th larva of *P. xylostella* treated with *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and azadirachtin (LC<sub>50</sub>)

Larval stages	Concentration	n	Pupation rate (%)	Time of 50% pupation (days)	Emergence rate (%)
Third	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> ( $3.0 \times 10^4$ cfu/ml)	150	47.3±5.1	4.65±0.3	83.0±7.1
	Azadirachtin (4 ppm)	150	32.1±5.7	7.53±1.7	51.1±4.8
	Control	150	75.3±3.1	4.11±0.6	81.4±7.0
Fourth	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> ( $1.5 \times 10^5$ cfu/ml)	200	41.5±2.8	3.34±0.4	65.0±12.4
	Azadirachtin (7 ppm)	200	40.5±6.4	3.67±0.2	14.8±8.6
	Control	200	85.0±3.5	2.27±0.5	70.0±5.2

**Table 3.** Survival, pupation and emergence rates and pupal length of *P. xylostella* after *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and azadirachtin treatment against 1st larva

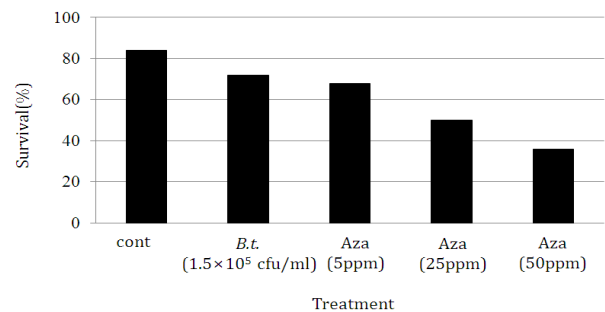
Concentration		n	Survival rate (%)	Pupation rate (%)	Pupa length (cm)	Emergence rate (%)
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	LC <sub>20</sub> ( $3.0 \times 10^3$ )	150	71	76.6±3.7	5.86±0.4	71.4±1.7
	LC <sub>50</sub> ( $3.0 \times 10^4$ )	150	47	72.3±3.5	5.56±0.5	73.5±1.1
	LC <sub>90</sub> ( $1.0 \times 10^5$ )	150	21	81.0±0.7	5.20±10.4	76.5±4.0
Azadirachtin	LC <sub>20</sub> (0.5 ppm)	150	76	80.3±3.5	5.39±0.5	61.2±8.1
	LC <sub>50</sub> (2.7 ppm)	150	55	65.5±6.3	5.37±0.5	38.9±2.8
	LC <sub>90</sub> (15 ppm)	150	14	28.6±4.9	5.03±0.5	25.0±0.5
Control	-	150	80	85.9±4.7	5.93±0.3	70.9±4.3

**Fig. 4.** Comparative toxicities by single and mixture of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and azadirachtin against *P. xylostella* larva.

시처리 했을 때 약제특성과 해충의 생활환에 따른 효과를 보기 위해 *B. thuringiensis* LC<sub>20</sub>( $8.0 \times 10^3$  cfu/ml), LC<sub>50</sub>( $3.0 \times 10^4$  cfu/ml)과 Azadirachtin LC<sub>20</sub>(1.1 ppm), LC<sub>50</sub>(4 ppm)을 혼합처리하였다. 2종의 약제를 각각 단독처리 하였을 때 사충률을 보면 *B. thuringiensis* LC<sub>20</sub>은 32%, LC<sub>50</sub>은 51%로 나타나고, Azadirachtin LC<sub>20</sub>에서 34%, LC<sub>50</sub>은 56%을 보였다. 혼합처리시 사충률은 *B. thuringiensis* LC<sub>20</sub> + Azadirachtin LC<sub>20</sub>에서 46%로 단독처리 보다 *B. thuringiensis*는 14%이고 Azadirachtin은 12%가 증가하였다. 한편 *B. thuringiensis* LC<sub>50</sub> + Azadirachtin LC<sub>50</sub>은 82%로 *B. thuringiensis* LC<sub>50</sub>보다 31%가 증가하였으며 Azadirachtin LC<sub>50</sub>도 증가하는 것을 볼 수 있다(Fig. 4).

### 성충의 생물검정

배추좀나방의 성충을 환경친화적인 방법으로 죽이기 위한 생물활성검정이 시도되었다. 배추좀나방 성충에 *B. thuringiensis* ( $1.5 \times 10^5$  cfu/ml)와 Azadirachtin(5, 25, 50 ppm)을 각각 처리하였다. 대조구에서는 80%이상의 생존율을 나타내는 것에 비하여 Azadirachtin 5ppm은 68%, 25 ppm은 50%, 50 ppm

**Fig. 5.** Survival rates of *P. xylostella* adults at the different concentrations of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and azadirachtin.

에서 36%의 생존을 보였다(Fig. 5).

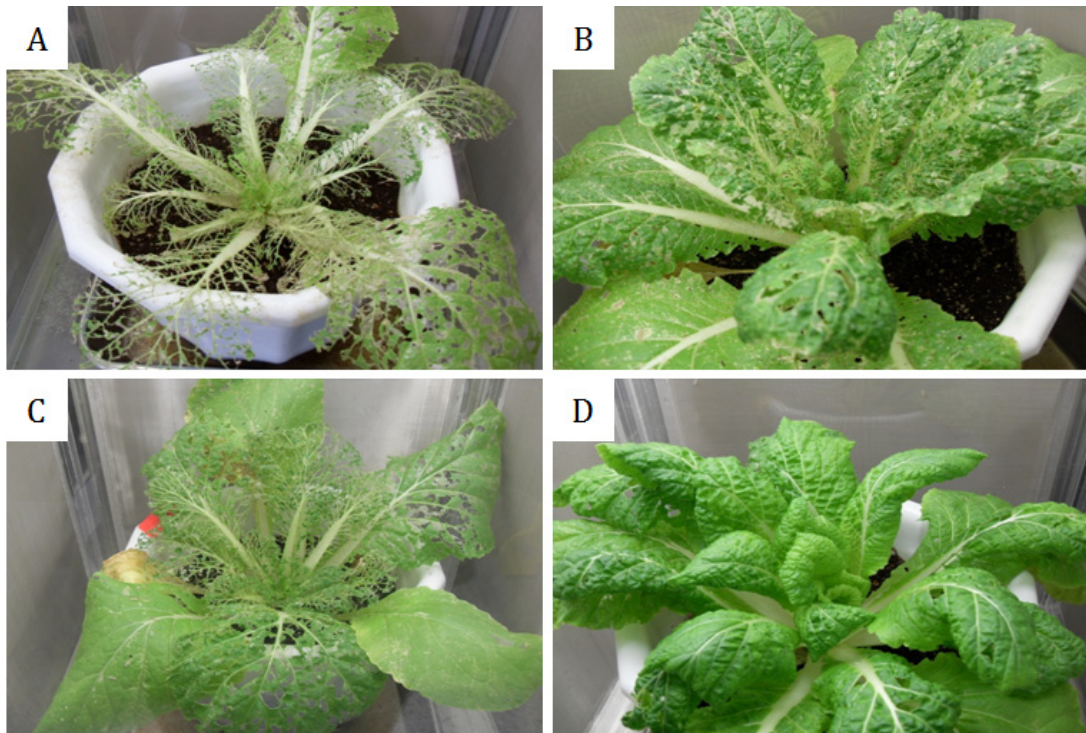
### 포트에서의 혼합처리 시험

농가의 배추밭에서의 실용성을 시험하기 위하여 배추좀나방의 알, 유충(1~4령), 번데기, 성충이 혼합에 혼재해 있는 경우를 가정하여 *B. thuringiensis*와 Neem oil를 사용 포트 실험을 하였다. 생물활성 검정에서 Fig. 6A는 무처리 처리구로서 배추잎 대부분이 해충에 의하여 손실된 것을 볼 수 있다. 반면에 *B. thuringiensis*만을 처리한 경우나(Fig. 6B) Neem oil만을 처리한 경우(Fig. 6C)에는 무처리 보다는 적은 양이지만 많은 부분의 잎이 섭취된 흔적이 남아있다. 그러나 *B. thuringiensis*와 Neem oil을 동시처리에 의한 경우에는 거의 모든 배추잎이 그대로 남아있었다(Fig. 6D).

### 고 찰

지구상에 서식하는 대부분의 식물은 공격자인 해충의 섭식에 대하여 저해물질을 생산하므로 자기를 방어하는 기작이 존재한다(Koul, 2005). 운향목(Rutales)의 Limonoids는 가





**Fig. 6.** Comparison of damage level caused by *P. xylostella* larvae after treatment of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and azadirachtin. (A) control (B) *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (C) Azadirachtin (D) *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and azadirachtin.

장 뛰어난 2차 대사산물로 많은 생물적 활성을 보임이 밝혀졌다(Champagne *et al.*, 1992). Limonois드의 활성인자중 하나인 Azadirachtin은 많은 나비목에 섭식저해, 곤충생장조절, 불임유발의 효과가 있다. 또한 이런 Azadirachtin은 해충의 독소에 대한 감수성을 증가시키는 스트레스의 요인으로 작용한다(Murray *et al.*, 1993). 그러나 Azadirachtin의 해충에 대한 완벽한 방어기작이 부족하여 단독으로 농업해충의 방제 약제로서는 시장에서 현실적으로 많은 어려움이 나고 있다. 따라서 Azadirachtin을 또 다른 해충 방제인자와 조합하거나 종합적인 방법을 개발함으로써 효과적으로 사용할 수 있을 것이다. 그러한 생물적 방제 인자의 하나로 *B. thuringiensis*는 인축에 안전하고, 비 표적 유기체에 안전하기 때문에 배추좀나방 방제를 위해 우리나라에서도 많이 사용되고 있다. 그러나 이 약제는 대상해충의 섭식에 의해서만 살생작용을 하기 때문에 해충의 유충이 아닌 알, 번데기, 성충 단계에서는 효과를 나타낼 수가 없다. 그러므로 섭식작용뿐 아니라 접촉에 의해서도 활성을 보여 곤충생장조절의 작용을 하는 Azadirachtin을 *B. thuringiensis*와 조합하여 배추좀나방 방제에 사용하면 더 큰 효과를 볼 수 있을 것이다.

시중에 판매되는 *B. thuringiensis*와 Azadirachtin은 2종류 모두 배추좀나방에 사용할 수 있지만 추천농도로 각각 단독 처

리 했을 때 배추좀나방 유충에 대한 효과에서 *B. thuringiensis*는 모든 령기의 유충에서는 빠르고 우수한 효과를 보였지만, Azadirachtin은 상당히 늦은 효과를 나타냈다(Fig. 1). 따라서 이런 유충이 발생한 포장에서 Azadirachtin을 단독으로 처리했을 때 작물에 섭식 피해를 줄 수 있어 상품의 가치를 떨어뜨리게 될 것이다. 이러한 이유에서 사용자인 농민은 이 약제의 이용을 기피할 수밖에 없을 것이다.

한편, 배추좀나방 성충의 산란율을 보면 Azadirachtin을 5 ppm으로 처리했을 때 무처리 보다 40%, 25 ppm으로 처리했을 때 57.5%의 산란 저해를 나타냈으며 Azadirachtin의 농도가 높을수록 산란 저해가 커졌다(Fig. 2). 부화율에서도 Azadirachtin을 50 ppm처리했을 때 45%이상의 높은 저해 효과를 보였다(Fig. 3). Azadirachtin은 Ecdysteroids와 juvenile hormone의 변화로 깰 수 있는 알의 수와 살 수 있는 유충의 수를 감소시킨다는 보고서와 일치함을 알 수 있다(Mordue and Nisbet, 2000). 이러한 효과는 유충의 섭식효과만을 나타내는 *B. thuringiensis*에서는 얻을 수 없는 결과이다. 또한 알루미늄호일에 묻어 있는 Azadirachtin의 휘발성 물질과 냄새가 배추좀나방 성충의 산란을 방해했다(Liang *et al.*, 2003). 때문에 Azadirachtin을 처리한 알루미늄 호일의 산란수가 낮았으며 포장에서 산란 저해작용이 나타날 것으로

보인다. *B. thuringiensis*를 처리한 알루미늄호일의 산란수가 무처리 보다 적은 것은 *B. thuringiensis*의 배양액에서 나는 냄새로 판단되나 이번 실험에서 확인할 수가 없었다.

배추좀나방 3, 4령 유충에 처리한 2종의 약제가 용화율에서 미치는 영향을 보면 *B. thuringiensis*와 Azadirachtin을 처리했을 때 모두 50%이하로 무처리 보다 낮게 나타났다. 이것은 *B. thuringiensis*와 Azadirachtin에 의해 유충의 50%가 번데기가 되기 전에 죽었고, 나머지 유충이 번데기가 된 수치이다. Azadirachtin이 처리된 3령 유충은 32.1%의 용화율을 보이면서 LC<sub>50</sub> 처리보다 더 높은 용화저지를 나타냈다. 4령은 번데기까지의 기간이 짧아서 Azadirachtin의 영향을 덜 받은 것으로 보인다(Table 2). 이 번데기들의 우화율을 보면 *B. thuringiensis*를 처리했을 때는 무처리와 유사하지만, Azadirachtin처리에서는 3, 4령에서 30.3%, 55.2%의 우화저지를 나타냈다. Azadirachtin의 작용기작에서 탈피억제 물질의 효과로 인해 우화율의 감소를 나타내는 것으로 사료된다(Mordue and Nisbet, 2000).

배추좀나방이 포장에서 해충의 각 단계가 혼재하여 존재하는 생활환에 의하여 작물보호제를 처리하여도 정확한 작용기작에 의하여 살생되기는 매우 어려운 문제이다. 따라서 작용기작이 다른 2종류의 친환경 자제를 선택하여 적절한 처리시기를 조절하므로 살충효과를 높일 것으로 판단되었다. 먼저 배추좀나방 2령 유충에 *B. thuringiensis* LC<sub>20</sub> 단독처리에서 32%의 사충률을 보였으나 *B. thuringiensis* LC<sub>20</sub>과 Azadirachtin LC<sub>20</sub>의 혼합처리에서는 46%로 *B. thuringiensis* 단독처리 보다 높은 사충률을 보였다. 또한 *B. thuringiensis* LC<sub>50</sub>의 사충률은 56%였는데 Azadirachtin LC<sub>20</sub>과 LC<sub>50</sub>과의 혼합처리에서는 72%, 82%로 각각 16%, 26%의 사충률이 증가한 것을 볼 수 있다. 이로서 배추좀나방 유충에 대해 *B. thuringiensis*와 Azadirachtin의 혼합처리에 대한 효과를 확인할 수 있었다(Fig. 4). Azadirachtin은 곤충의 중장 상피세포 돌기를 손상시키고, 부풀어 오르게 하여 입방형의 모양으로 만들고 세포의 부풀어 오름과 공포형성(vacuolization)으로 미세용모의 밀도가 낮아지게 된다. 중장에서 세포 재생의 역할을 하는 Nidi(Yu, 2004)는 Azadirachtin에 의해 천천히 괴사되고, Nidi에 의한 세포 재생이 감소하게 되고 위식막에 영향을 줘 중장을 약하게 만들고, 다른 독소에 의해 상처받기 쉽게 한다(Singh *et al.*, 2007). 또한 trypsin과 elastin과 같은 장내 효소 활성화에 영향을 주고, 손상을 야기한다(Koul *et al.*, 1996). 이런 Azadirachtin의 작용은 곤충 중장에서 이온 불균형을 야기하는 *B. thuringiensis*와 효과적인 상호작용을 나타낼 수 있는데 이는 Azadirachtin이 *B. thuringiensis*

독소가 중장 수용체의 접근과 결합을 쉽게 해줄 수 있기 때문인 것으로 판단된다. 그렇기 때문에 이런 *B. thuringiensis*와 Azadirachtin의 혼합처리로 사충률의 증가를 볼 수 있었고, 또한 Azadirachtin의 탈피방지 호르몬의 작용으로 인해 그 효과가 더해질 수 있었을 것이다.

이런 배추좀나방 유충의 섭식에 대한 *B. thuringiensis*의 살충효과와 배추좀나방의 알, 번데기, 성충에 영향을 주는 Azadirachtin의 역할의 효과를 보기위한 포트시험으로 보여 주었다. 포트에 배추를 재배하고 각각 약제의 살포에서 단독 처리 한 *B. thuringiensis*가 Azadirachtin을 처리했을 때보다 배추손실이 적은 것으로 보였다. 이러한 결과는 유충만을 죽이는 *B. thuringiensis*가 배추좀나방의 성충과, 번데기, 알에 영향을 주지 못했고 시간이 흐르면서 알에서 깨어난 새로운 유충에 의한 손실로 사료된다. 한편, Azadirachtin의 처리구에서는 *B. thuringiensis*보다 손실이 더 컸는데 이는 Azadirachtin이 유충에 대한 지효적인 효과로 Azadirachtin처리 초기에 유충에 의한 피해가 많았던 것으로 사료된다. 이런 *B. thuringiensis*와 Azadirachtin의 단점을 보완할 수 있도록 두 약제의 혼합 처리는 유충에 대한 빠른 효과와 지효적이지만 알, 번데기, 성충에 효과를 동시에 줄 수 있기 때문에 배추의 해충방제를 효과적으로 할 수 있어 손실을 줄일 수 있는 것으로 판단되었다(Fig. 6).

실제 농가 포장에서의 해충 혼재되어있으며 배추의 형태가 약제 침투가 어려워 방제는 더욱 어렵고 복잡하다. 그러나 이와 같은 친환경적인 *B. thuringiensis*제와 Neem oil제의 혼합사용은 배추좀나방의 서식 밀도를 줄여주며 경제적 가치를 부여해주며 농업 생태계와 사람에게도 안전하기 때문에 주목할 만한 해충 방제의 도구가 될 수 있을 것으로 판단된다.

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립 농업과학원의 “해충방제용 미생물 살충제의 현장 활용 평가 기술 개발”과제에 의해 지원되었으며 이에 감사드립니다.

## >> 인 / 용 / 문 / 헌

Butterworth, J. H., Morgan E. D. (1968) Isolation of a substance that suppresses feeding in locusts. Chem. Commun. 23~24.  
Champagne, D. E., O. Koul, M. B. Isman, G. G. E. Scudder and



- G. H. N. Towers (1992) Biological activity of limonoids from the Rutales. *Phytochemistry*. 31(2):377~394.
- Charleston, D. S., R. Kfir, M. Dicke and L. E. M. Vet (2005) Impact of botanical pesticides derived from *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* on the biology of two parasitoid species of the diamondback moth. *Biol. Contemp.* 33(2):131~142.
- Cho Y. S. and S. C. Lee (1994) Resistance Development and Cross-Resistance of Diamondback Moth (Lepidoptera: Plutellidae) by Single Selection of Several Insecticides. *Korea J. Pest. Sci.* 33(4):242~249.
- Frutos R., C. Rang, and M. Royer (1999) Managing insect resistance to plants producing *Bacillus thuringiensis* toxins. *Crit. Rev. Biotechnol.* 19:227~276.
- Gill S. S., E. A. Cowles and P. V. Pietranonio (1992) The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu. Rev. Entomol.* 37:615~636.
- Isman M. B. (1999) Neem and related natural products. In: Hall, F.R., Menn, J.J. (Eds.), *Method in Biotechnology*, Vol. 5. *Biopesticides: Use and Delivery*. Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 139~153.
- Kim H. H., S. R. Cho, D. W. Lee, H. Y. Jeon, C. G. Park and H. Y. Choo (2006) Biological Control of Diamondback Moth, *Plutella xylostella* with Korean Isolates of Entomopathogenic Nematodes (Steinernematid and Heterorhabditid) in Greenhouse. *Korean J. Appl. Entomol.* 45(2):201~209.
- Kim H. H., Y. S. Seo, J. H. Lee and K. Y. Cho (1990) Development of Fenvalerate Resistance in the Diamondback Moth, *Plutella xylostella* Linne (Lepidoptera : Yponomeutidae) and its Cross Resistance. *Korean J. Appl. Entomol.* 29(3): 194~200.
- Koul, O. 2005. *insect antifeedants*. Boca Raton, Florida, CRC Press 1005.
- Liang G. M., W. Chen and T. X. Liu (2003) Effects of three neem-based insecticides on diamondback moth (lepidoptera: plutellidae). *Crop prot.* 22(2):333~340.
- Koul, O., J. S. Shankar and R. S. Kapil (1996) The effect of neem allelochemicals on nutritional physiology of larval *Spodoptera litura*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 79:43~50.
- Mordue, A. J. and A. Blackwell (1993) Azadirachtin: an update. *J. Insect Physiol.* 39:903~924.
- Mordue, A. J. and A. J. Nisbet (2000) Azadirachtin from the Neem Tree *Azadirachta indica*: its Action Against Insects. *An. Soc. Entomol. Brasil.* 29(4):615~63.
- Murray, K. D., A. R. Alford, E. Groden, F. A. Drummond, R. H. Storch, M. D. Bentley and P. M. Sugathapala (1993) Interactive effects of an antifeedant used with *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* delta endotoxin on Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.* 86:1793~1801.
- Schmutterer, H. (1990) Properties and potential of natural pesticides from the neem tree. *Annu. Rev. Entomol.* 35:271~298.
- Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler and D. H. Dean (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *S, J Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(3):775~806.
- Singh G., P. J. Rup and K. Opende (2007) Acute, sublethal and combination effects of azadirachtin and *Bacillus thuringiensis* toxins on *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Bull. Entomol. Res.* 97:351~357.
- Tabashnik, B. E., N. Finson and M. W. Johnson (1991) Managing Resistance to *Bacillus thuringiensis*: Lessons from the Diamondback Moth (Lepidoptera: Plutellidae) *J. Econ. Entomol.* 84(1):49~55.
- Talekar, N. S. and A. M. Shelton (1993) Biology, ecology, and management of the diamondback moth. *Annu. Rev. Entomol.* 38:275~301.
- Walter, J. F. (1999) Commercial experience with neem products. In: Hall, F.R., Menn, J.J. (Eds.), *Method in Biotechnology*, 5: *Biopesticides*. Humana Press, Totowa, NJ. pp. 155~170.
- Yu C. H. (2004) Ultrastructure of the Midgut Epithelial Cells in the Mosquito Larvae, *Anopheles sinensis* Wiedemann. *Korean J. Electron Microscopy* 34(3):199~209.

## ***Bacillus thuringiensis*와 Neem oil에 대한 배추좀나방의 살충활성**

조민수<sup>1</sup> · 최수연 · 김태환 · 박 찬 · 김담아<sup>1</sup> · 김영림<sup>1</sup> · 오세문<sup>1</sup> · 김성우<sup>1</sup> · 윤영남 · 유용만\*

충남대학교 농업생명과학대학 응용생물과, <sup>1</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 농약평가과

**요 약** 배추좀나방(*Plutella xylostella* L.)의 효과적인 방제를 위해서 현재 상용화되고 있는 친환경 농자재인 *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*( $30 \times 10^8$  cfu/mg)와 Neem oil(0.5% azadirachtin)을 사용하였다. 두 약제를 추천농도로 처리했을 때 배추좀나방 1, 2령 유충에서 *B. thuringiensis*는 2일만에 100%의 사충률을 보였으며, Azadirachtin은 7일까지 지효적 효과를 보였다. 배추좀나방 1, 2, 3, 4령 유충에 대한 *B. thuringiensis*의 LC<sub>50</sub> 값은 각각  $2.8 \times 10^4$ ,  $3.1 \times 10^4$ ,  $3.4 \times 10^4$ ,  $1.5 \times 10^5$  cfu/ml이었으며, Azadirachtin은 2.7, 3.9, 4.7, 7.1 ppm이었다. *B. thuringiensis*와 Azadirachtin를 배추좀나방 성충에 처리하였을 경우에 산란수는 무처리와 비교하여 Azadirachtin 25 ppm에서 57.5개의 감소를 보였다. 또한 알의 부화율은 무처리와 비교하여 *B. thuringiensis*는 큰 차이가 없었고, Azadirachtin 50 ppm에서 45.4%의 부화율 감소를 나타냈다. 배추좀나방은 *B. thuringiensis*와 Azadirachtin을 혼합처리할 경우, 각각의 처리구에서 각각을 단독으로 처리하였을 때보다 높은 방제효과를 나타내었다. 포트시험의 경우에서도 *B. thuringiensis*와 Neem oil의 혼합처리 사용은 배추좀나방 알, 유충, 번데기, 성충의 친환경적인 방제에 효과를 나타냈다.

**색인어** Neem oil, Azadirachtin, *Bacillus thuringiensis*, 배추좀나방, 사충률