

곤충병원성 곰팡이 *Metarhizium anisopliae* FT83의 파밤나방 생육단계별 살충활성

한지희* · 김정준 · 이상엽

농촌진흥청 국립농업과학원 농업미생물과

Insecticidal Activity of *Metarhizium anisopliae* FT83 against the Different Stages of Beet Armyworm, *Spodoptera exigua*

Ji Hee Han*, Jeong Jun Kim and SangYeob Lee

Agricultural Microbiology Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Jeonju, 565-851,
Republic of Korea.

(Received on November 12, 2014. Revised on November 16, 2014. Accepted on December 9, 2014)

Abstract The beet armyworm, *Spodoptera exigua* is pest which is difficult to control. For eco-friendly beet armyworm managements, we isolated entomopathogenic fungi from soil samples by insect-bait method using *Tenebrio molitor* and conducted bioassay to larvae of beet armyworm. The result of bioassay, a selected strain *Metarhizium anisopliae* FT83 caused 100% mortality against first~third instar larva of *S. exigua* at 1×10^8 conidia/ml and medial lethal time (LT_{50}) were 0.5 days, 2.6 days and 2.5 days respectively. Mortality against fourth and fifth larvae were $83.3 \pm 6.2\%$ and $86.0 \pm 5.7\%$ and medial lethal time (LT_{50}) were 4.2 days and 3.6 days respectively. Mortality against pupae and eggs of *S. exigua* were 100%. *M. anisopliae* FT83 showed high virulence at all developmental stages of *S. exigua*.

Key words Entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae*, beet armyworm, *Spodoptera exigua*

서 론

파밤나방(*Spodoptera exigua*)은 채소, 화훼, 과수, 전작물, 특작물, 잡초 등 200여종의 식물을 가해하는 광식성 해충으로 전 세계의 주요 경제 작물에 큰 피해를 주고 있다. 한국에서는 1926년 황해도 사리원 지역의 사탕무우를 가해하는 해충으로 최초로 기록되었으며 1986년 전남 진도에서 피해가 확인된 이후 1988년부터는 전국적으로 피해가 확산되었다(Park *et al.*, 1991). 고온성 해충인 파밤나방은 열대 및 아열대, 온대 지역에 주로 분포하며 우리나라에서는 1년에 4-5회 발생한다. 남부지방의 경우 6월 초에서 11월 말까지 발생하는데 최성기는 9월 중순으로 알려져 있고(Jin *et al.*, 2009) 시설재배지가 늘어난 2000년 이후에는 온실하우스에

서 지역과 시기를 불문하고 연중 발생하고 있다(Kang *et al.*, 2008).

파밤나방 방제를 위해 주로 유기인계, 카바메이트계, 피레스로이드계 등의 화학살충제가 사용되고 있지만 살충제에 감수성이 높은 어린 유충시기에 줄기 속으로 들어가 가해하는 습성 때문에 약제에 노출될 기회가 적어 효과적인 방제가 이루어지기 힘든 실정이다. 더욱이 파밤나방은 스피노신계인 스피노사드, 유기염소계, 카바메이트계, 피레스로이드계, 벤조일페닐우레아계 등의 화학 살충제에 저항성을 나타내는 것으로 보고되고 있다(Moulton, 1999).

현재까지 파밤나방의 친환경 방제 방법으로 곤충병원성 바이러스와 세균, 곰팡이를 이용한 미생물 살충제가 개발되어 활용되고 있지만 바이러스(*Spodoptera exigua* nucleopolyhedro virus : SeNPV)는 대량배양에 어려움이 있고 *Bacillus thuringiensis*에 대한 저항성 출현(Tabashnik and Carriere, 2004)이 보고되고 있어서 또 다른 방제수단인 곤충병원성 곰팡이에 대한 연구가 필요한 실정이다.

*Corresponding author

Tel: +82-63-238-3052, Fax: +82-63-238-3834

E-mail: bijouhee@korea.kr

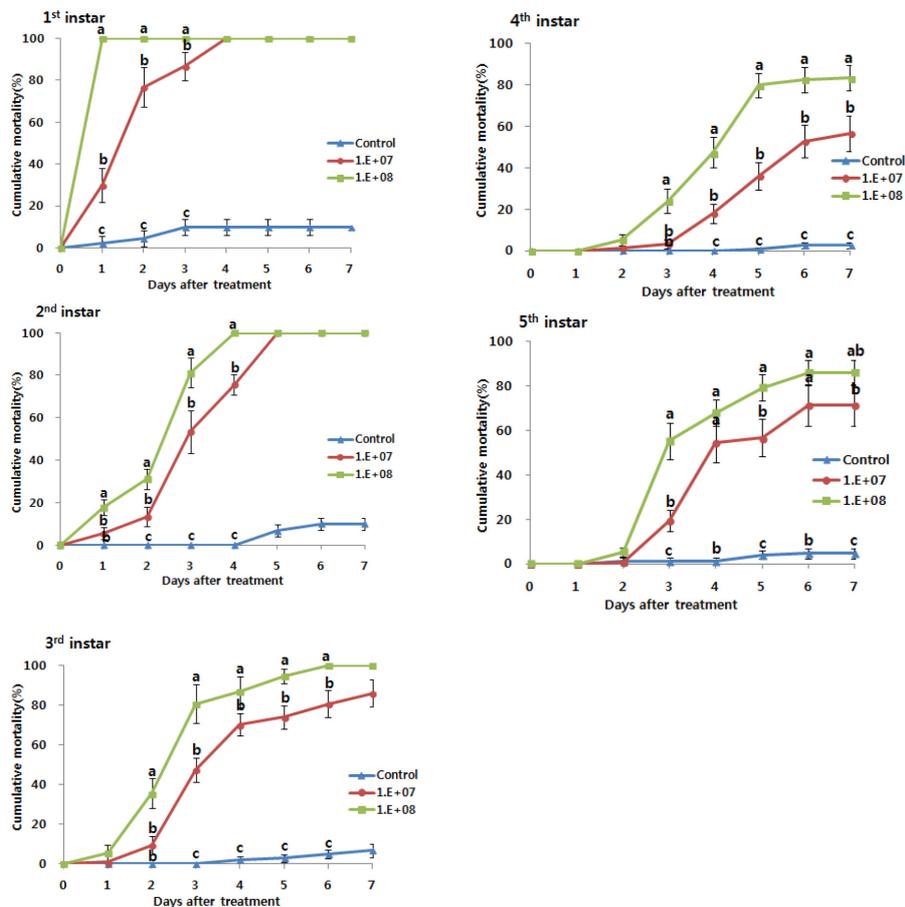


Fig 1. Cumulative mortality of *S. exigua* larvae by *M. anisopliae* FT83 after treatment with 1×10^7 and 10^8 /ml at different developmental stages. Means above the line followed by the same letter are not significantly different using Duncan's multiple range test ($P > 0.05$).

현재까지 750여 종의 곤충병원성 곰팡이가 알려져 있으며 이 중 12종의 곰팡이가 171개의 제품으로 개발되어 이용되고 있는데 *Beauveria bassiana*가 33.9%, *M. anisopliae*는 33.9%, *Isaria fumosorosea*가 5.8%, *B. brongniartii*가 4.1%를 차지하고 있다. 이 중 밤나방과 해충을 방제하기 위한 제품은 *B. bassiana* 7종, *M. anisopliae* 2종, 균주가 혼합된 제품 1종으로 모두 10종이 등록되어 있다(Marcos and Stephen, 2007).

본 연구에서는 파밤나방의 방제를 위한 새로운 방제제의 개발을 위해 선행 연구에서 분리한(Han *et al.*, 2013) 살충 활성이 우수한 곤충병원성 균주를 이용하여 파밤나방의 전 생육단계에 대한 살충효과를 검정하였다.

재료 및 방법

실험곤충

본 실험에 사용된 파밤나방은 국립농업과학원 작물보호과 실험실에서 분양 받아 온도 25°C , 광조건 16L:8D, 상대 습도 $70 \pm 5\%$ 조건에서 인공사료(bioserve, mixing direction

#F9219B)를 공급하여 누대 사육하였다. 생물검정에 사용된 파밤나방의 알은 성충 20마리가 이틀간 산란한 난괴를 받아 사용하였으며 번데기는 용화된 후 3일 되어 표피가 완전히 갈색으로 변한 후 생물검정에 사용하였다.

곤충병원성 분리

곤충병원성 곰팡이를 분리하기 위해 경기도 양평의 파재 배지에서 토양을 채취하였다. 각 토양샘플은 20 m^2 내 4지점을 무작위로 설정하여 지름 7 cm 오거(auger)를 이용하여 5 cm 깊이로 0.5 L의 토양을 채취하여 일주일 내에 insect-bait법을 이용하여 곤충병원성 곰팡이를 분리하였다(Meyling, 2007). 채집한 토양은 2 mm체에 내려 50 ml을 플라스틱 통에 담고 부화 후 60일 가량 된 갈색거저리(*Tenebrio molitor*) 10마리를 넣어 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 에서 2주간 보관하면서 하루에 한번씩 7일 동안 뒤집어주었다. 2주간 배양 후 이병곤충의 숫자를 기록하고 이병곤충의 표면을 3% 차아염소산나트륨용액으로 3분, 멸균수로 3분간 2회 살균한 후 멸균수로 적신 필터페이퍼가 깔린 90 mm 패트리디쉬에 넣어 25°C , 7-14일간 배양하며 곰팡이의 포자성장을 유도하였다. 사충의 표피로

부터 포자를 취하여 PDA에 옮겨 하나의 콜로니를 분리하였다. 분리한 곤충병원성 곰팡이는 PDA에 접종하여 25 ± 1°C, 광주기 16:8의 조건에서 2주간 배양한 후 포자를 생물검정에 이용하였다. 선행 연구에서 분리한 곰팡이 중 파밤나방 유충에 살충율이 높은 균주를 선발하여 본 시험에 사용하였다. 생물검정을 위하여 포자가 형성된 배지에 5 ml의 멸균된 0.01% Tween 80 용액을 넣고 유리막대로 표면을 긁어 포자를 회수한 후 거즈로 걸러 hemocytometer를 이용하여 계수하고 생물검정에 필요한 농도의 포자현탁액(1 × 10⁷, 10⁸ conidia/ml)을 제조하였다.

생물검정

생물검정은 알, 1, 2, 3, 4, 5령 유충, 번데기를 각각 이용하였으며, 유충에 대한 검정은 각 령기별로 10마리씩 이용하였으며, 파밤나방 유충 10마리가 접종된 직경 9 cm배추 잎에 포자 현탁액 700 µl를 Plexyglass 스프레이 타워(100 kPa, 직경 1.5 mm의 polyvinyl acetal cone nozzle)을 이용하여 배추 앞, 뒷면에 살포하였다. 알과 번데기에 대한 검정은 산란한 후 1일된 난괴와 용화한 지 3일된 번데기 10마리씩을 이용하였으며 유충과 같은 방법으로 포자현탁액을 살포하였다. 살포한 잎은 상온에서 한 시간 동안 건조한 후 멸균수로 적신 필터페이퍼가 깔린 페트리디쉬에 넣고, 25°C, 광조건 16L:8D, 습도 90% 이상으로 6일간 유지하며 매일 사충 수를 관찰하였으며 살포한 난괴와 번데기는 필터페이퍼가 깔린 페트리디쉬에 넣고, 25°C, 광조건 16L:8D, 습도 90% 이상으로 7일간 유지하며 부화 또는 우화하는 충의 수를 관찰하였다. 사충은 습식 처리한 페트리디쉬에 옮겨 표피에서 곰팡이가 발생하면 죽은 것으로 산정하였다. 대조구는 0.01% Tween 80 용액만을 처리하였다. 생물검정은 3회 수행되었으며 매 실험마다 3반복으로 수행하였다.

결과 및 고찰

M. anisopliae FT83 균주를 1 × 10⁷ conidia/ml의 농도로 파밤나방 1령~3령 유충에 처리하였을 때 살충율은 100.0%, 100.0%, 86.0 ± 6.8%, 반수치사시간은 2.0, 3.2, 3.7일이었으며 4, 5령의 유충에 처리하였을 때도 56.7 ± 8.5%, 71.3 ± 9.4%살충율과 6.4일, 4.9일의 반수치사시간을 나타냈다. 이보다 높은 농도인 1 × 10⁸ conidia/ml의 농도로 1령~3령 유충에 처리하였을 때의 살충율은 100%였으며 반수치사시간은 0.5일, 2.6일, 2.5일이었다. 4, 5령의 유충에 처리하였을 때도 83.3 ± 6.2%, 86.0 ± 5.7%의 높은 살충율을 나타냈으며 반수치사시간은 각각 4.2일, 3.6일이었다. 또한 *M. anisopliae* FT83균주를 1 × 10⁶~10⁸ conidia/ml 농도로 번데기에 처리하였을 때 살충율은 96.7 ± 1.7%, 97.8 ± 1.5%, 100.0%였으며 파밤나방의 알에 처리하였을 때의 살충율도 65.4 ± 6.2%,

Table 1. Corrected mortality and LT₅₀ of different instar larvae of *S. exigua* by *M. anisopliae* FT83 after treatment with suspension of 10⁷ and 10⁸ conidia/ml

Developmental stages	Treatment	Mortality (%)	LT ₅₀ (days)
1st instar	Control	10.0 ± 3.7 d	80.28
	FT83 10 ⁷	100.0 ± 0.0 a	2.00
	FT83 10 ⁸	100.0 ± 0.0 a	0.5
2nd instar	Control	10.0 ± 2.9 d	13.66
	FT83 10 ⁷	100.0 ± 0.0 a	3.19
	FT83 10 ⁸	100.0 ± 0.0 a	2.60
3rd instar	Control	6.7 ± 3.5 d	15.15
	FT83 10 ⁷	86.0 ± 6.8 ab	3.73
	FT83 10 ⁸	100.0 ± 0.0 a	2.52
4th instar	Control	2.7 ± 1.5 d	17.49
	FT83 10 ⁷	56.7 ± 8.5 c	6.37
	FT83 10 ⁸	83.3 ± 6.2 ab	4.24
5th instar	Control	4.7 ± 2.2 d	47.75
	FT83 10 ⁷	71.3 ± 9.4 b	4.91
	FT83 10 ⁸	86.0 ± 5.7ab	3.59
Pupa	Control	14.4 ± 4.1 d	
	FT83 10 ⁷	97.8 ± 1.5 a	
	FT83 10 ⁸	100.0 ± 0.0 a	
Egg	Control	0.0	
	FT83 10 ⁷	90.9 ± 3.5 a	
	FT83 10 ⁸	100.0 ± 0.0 a	

90.9 ± 3.5%, 100.0%로 파밤나방의 전 생육단계에서 우수한 살충효과를 나타내었다(Table 1).

Asi 등(2013)의 결과에서 곤충병원성 곰팡이 *M. anisopliae*, *Isaria fumosorosea*, *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium lecanii*를 담배겨세미나방에 처리하였을 때 네 균주의 농도별(1 × 10⁵~10⁸conidia/ml) 살충율은 8.9 ± 1.3%~71.6 ± 3.1%였으며, 2~4령 유충(1 × 10⁷conidia/ml)에 대한 살충율은 2령 25.3 ± 3.2%~59.1 ± 5.1%, 3령 13.3 ± 2.6%~53.2 ± 6.1%, 4령 7.8 ± 1.6%~36.3 ± 3.5%였다. 태국에서 분리된 *B. bassiana*의 담배겨세미나방 유충에 대한 살충활성은 80.0% (Petlamul and Prasertsan, 2012)였으며 인도에서 분리된 *M. anisopliae* (2.4 × 10⁸ conidia/ml)의 담배겨세미나방 번데기에 대한 살충활성은 85.8% (Anand et al., 2009)였다. 한국에서 분리된 *M. anisopliae* FT83 균주는 다른 국가에서 분리된 균주들과 비교하여 다양한 발육단계의 파밤나방을 방제할 수 있는 특징을 가지고 있다. 그러나 *M. anisopliae* FT83 균주의 파밤나방 발육단계별 살충율은 어린 유충일수록 뛰어나고 노령 유충일수록 살충활성이 낮아지는 경향을 나타낸다. 곤충병원성 곰팡이에 대한 해충의 방어 기작은 곤충의 큐티클 층과 체액성, 세포성 방어기작에 의해 일어난다. 그 중 가장 중요한 방어막인 해충의 큐티클 층은 항진균 지방산과

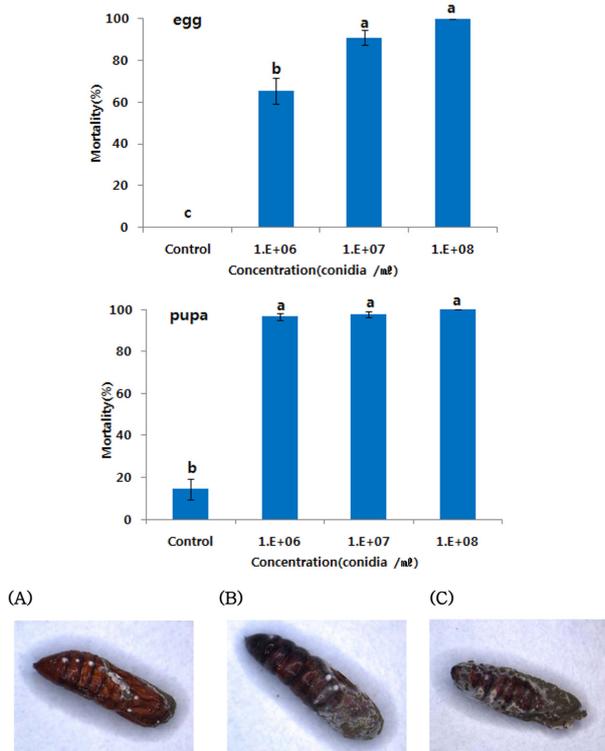


Fig. 2. Mortality of egg and pupa of *S. exigua* treated with suspension of 10^6 (A), 10^7 (B) and 10^8 (C) conidia/ml. The *S. exigua* pupae were covered with mycelium by *M. anisopliae* FT83 10 days after treatment. Means within the same column followed by the same letter are not significantly different using Duncan's multiple range test ($P > 0.05$).

phenoloxidase, melanin 등의 물질을 분비하여 곰팡이의 침투를 막아주며(Wraight *et. al.*, 1990), 곰팡이가 큐티클 층을 침투하였다 하더라도 혈림프에 존재하는 혈구세포에 의한 식균 작용, 소낭 형성과 같은 세포성 방어기작과 phenoloxylase cascade와 lysozyme, lectin등의 면역 단백질에 의한 체액성 방어기작으로 병원체에 의한 기주의 감염을 억제시키는 것으로 알려져 있다(Hajek and Leger, 1994). 곤충은 생육단계별로 exoskeleton의 형상이 변화하고 체액성, 세포성 방어물질의 활성이 달라지는데 이러한 결과로 유충의 령기에 따라 곤충병원성 곰팡이의 살충활성이 변화하는 것으로 추정된다. 난방제 해충인 과밤나방은 일반 포장에서 유충의 령기가 혼재되어 있으며, 3령 이후의 노령유충은 화학 살충제로도 방제가 어렵다는 점을 고려하였을 때 노령유충에도 살충효과가 우수한 *M. anisopliae* FT83균주가 과밤나방의 친환경 방제에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 국립농업과학원의 기관고유사업 (PJ00865202)의 지원에 의해 수행되었습니다.

Literature cited

Han, J. H., H. Y. Kim, H.T. Leem, J. J. Kim and S. Y. Lee (2013) Characteristics and virulence assay of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* for the microbial control of *Spodoptera exigua*. Korean J. Pestic. Sci. 17: 454-459.

Jin, N. Y., S. Y. Jung, C. Park, S. K. Paek, M. J. Seo and Y. Y. Man (2009) The synergy effects of mixed treatment with tannic acid and *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* KB100 against *Spodoptera exigua*. Korean J. Appl. Entomol. 48(4):519-526.

Kang, E. J., M. G. Kang, M. J. Seo, S. N. Park, C. U. Kim and Y. M. Yu (2008) Toxicological effects of some insecticides against welsh onion beet armyworm (*Spodoptera exigua*). Korean J. Appl. Entomol. 47:155-162

Marcos, R. F. and P. W. Stephen (2007) Mycoinsecticides and mycoacaricides : A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. Biol. Control. 43:237-256.

Meyling, N. V. (2007) Methods for isolation of entomopathogenic fungi from the soil environment. Manual for isolation of soil borne entomopathogenic fungi. pp2-18

Moulton, J. K. (1999) Studies of resistance of beet armyworm (*Spodoptera exigua*) to spinosad in field populations from the southern USA and southeast Asia. University of Arizona College of Agriculture 1999 Vegetable Report.

Park, J. D., H. G. Goh, J. H. Lee, W. J. Kee and K. J. Kim (1991) Flight activity characteristics of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Lepidoptera : Noctuidae) in southern region of Korea. Korean. J. Appl. Entomol. 30:124-129

Tabashnik, B. E. and Y. Carriere (2004) Bt transgenic crops do not have favorable effects on resistant insects. J. Insect Sci. 4:1-4.

Asi, M. R., M. H. Bashir, M. Afzal, K. Zia and M. Akram (2013) Potential of entomopathogenic fungi for biocontrol of *Spodoptera litura* fabricius (lepidoptera : noctuidae). J. Anim. Plant Sci. 23:913-918.

Petlamul, W. and P. Prasertsan (2012) Evaluation of strains of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against *Spodoptera litura* on the basis of their virulence, germination rate, conidia production, radial growth and enzyme activity. Kor. J. Mycobiol. 40:111-116.

Anand, R., B. Prasad and B. N. Tiwary (2009) Relative susceptibility of *Spodoptera litura* pupae to selected entomopathogenic fungi. BioControl 54:85-92.

Wraight, S. P., T. M. Butt, S. Galaini-Wraight, L. L. Allee and R. S. Soper (1990) Germination and infection processes of the entomophthoralean fungus *Erynia radicans* on the potato leafhopper, *Empoasca fabae*. J. Invert. Pathol. 56: 157-174.

Hajek, A. E. and R. J. St. Leger (1994) Interaction between fungal pathogens and insect hosts. Ann. Rev. Entomol. 39: 293-322.

곤충병원성 곰팡이 *Metarhizium anisopliae* FT83의 파밤나방 생육단계별 살충활성

한지희* · 김정준 · 이상엽

농촌진흥청 국립농업과학원 농업미생물과

요 약 난방제 해충인 파밤나방의 친환경적 방제를 위하여 토양에서 곤충병원성 곰팡이를 수집한 다음, 파밤나방 유충에 대해 우수한 방제효과가 있는 곰팡이 *Metarhizium anisopliae* FT83을 분리하여 파밤나방의 생육단계별 살충율을 검정하였다. *M. anisopliae* FT83의 파밤나방 1령~3령 유충에 대한 살충율은 1×10^8 conidia/ml 수준에서 100% 이었고 반수치사시간은 0.5일, 2.6일, 2.5일이었으며 4령과 5령에 대한 살충율은 각각 $83.3 \pm 6.2\%$, $86.0 \pm 5.7\%$ 였으며 반수치사시간은 4.2일, 3.6일이었다. 번데기와 알에 대한 살충율도 100%로 파밤나방의 전 생육단계에 대해 높은 살충활성을 나타내었다.

색인어 파밤나방, 곤충병원성 곰팡이