

최 종
연구보고서

저독성 선택독성의 식물체 기원

버섯파리 방제제 개발

Development of Mushroom Fly Control

Agents derived Plants with Low and

Selective Toxicity

연구기관

서울대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “저독성 선택독성의 식물체 기원 버섯파리 방제제 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006 년 7 월 10 일

주관연구기관명 : 서울대학교
총괄연구책임자 : 안 용 준
연구 원 : 김 순 일
연구 원 : 정 인 홍
연구 원 : 김 도 형
연구 원 : 김 현 경
연구 원 : 김 준 란
연구 원 : 김 남 진
연구 원 : 이 지 환
연구 원 : 탁 준 형
연구 원 : 심 미 진
연구 원 : 최 은 정
연구 원 : 박 상 욱
연구 원 : 강 석 우
연구 원 : 정 우 철
연구 원 : 한 상 일

요 약 문

I. 제 목

저독성 선택독성의 식물체 기원 버섯파리 방제제 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

버섯에서 주로 발생하는 해충으로는 버섯파리과(Mycetophilidae), 흑파리과(Cecidomyiidae), 벼룩파리과(Phoridae)에 속하는 해충류 그리고 소수의 톡토기, *Linopodes*, *Tyroglyphus*, *Rhizoglyphus*, *Histiostoma*, *Pygmaeophorus* 속의 응애류 및 *Ditylenchus*와 *Rhabditis* 등의 선충 등을 들 수 있다. 느타리버섯 재배상에서 문제시 되는 주요 버섯파리류는 검정날개버섯파리과와 흑파리과, 벼룩파리과에 속하는 종들이며 이중 검정날개버섯파리과에 속하는 긴수염버섯파리(*Lycoriella mali*), *Lycoriella auripila*, *Bradysia* sp. 등의 피해가 심각하고, 우리나라의 경우는 긴수염버섯파리, *Bradysia* sp., *Megaselia nigra*, 털파리붙이(*Coboldia fuscipes*), *Mycetophila* sp., *Mycophila* sp. 등이 중요하다. 특히 긴수염버섯파리는 느타리버섯을 비롯한 양송이, 표고버섯에도 피해를 일으킨다. 이 종은 버섯갈반병을 일으키는 병원균들의 매개체가 되고 응애류와 선충류 등의 매개충으로 작용하여 간접적으로는 병 매개자로서 역할을 하며, 직접적으로는 느타리버섯 생산량의 17% 감소를 초래하는 해충이고 실제 느타리버섯 재배사에서 농민들이 가장 관리하는데 어려움을 겪고 있는 중요 해충이다.

이들 중요한 버섯파리를 방제하는 방법으로는 성충의 침입을 막기 위해 재배사의 출입구 및 환기창에 1 mm 눈금 크기의 방충망을 설치하는 물리적인 방법 그리고 종균재식시 chlorpyrifos가 원제인 2% 더스반 입제를 평당 15~18 kg 씩 종균에 혼합처리하여 초기에 균상 속으로 침입하는 성충밀도를 조절하는 방법, diflubenzuron 수화제 또는 diazinon 수화제 각 13 g을 종균과 혼합하여 사용

하거나 균사생장이 완료되어 하온할 때에 200~600배액으로 평당 6.5 g을 사용하고 버섯파리의 밀도가 높을 때는 평당 13 g을 1~2회로 나누어 균상에 처리하는 화학적인 방법을 들 수 있다. 그리고 균사 생장기 때 재배지 내에 1주 간격으로 DDVP 유제 1000배액을 살포하여 성충을 방제하는 효과를 기대할 수 있다. 하지만 이들 살충제들의 과 사용 시 균사생장이 억제되어 수량이 감소하거나 자실체 형성을 억제하여 기형 버섯이 발생할 수 있는 약해의 우려가 있어 그 사용이 매우 제한적일 수밖에 없다.

식물체는 곤충 방제에 이용 가능한 유용한 물질을 많이 포함하는 것으로 알려져 있다. 이러한 식물체는 선택적 독성을 가지고 있고, 비표적 생물에 영향을 주지 않으며, 환경에 해로운 영향을 주지 않는 장점을 가지고 있다. 그러므로 이들은 버섯파리 농가와 버섯 저장실, 버섯퇴비에 살충제로서 이용이 가능하다. 많은 식물체 추출물은 여러 곤충에 대해서 살란제, 기피제, 섭식저제, 그리고 살충력을 나타낸다. 또한 식물체 추출물과 식물 속에 함유된 화학물질들은 살충제에 저항성을 가지는 곤충에 대해서도 높은 효과를 가진다. 몇몇 식물체와 그들이 가지는 화합물은 유기합성 살충제의 대체체로 연방정부의 살충제, 살균제, 살서제의 요구 사항에도 적합하다. 이러한 이유로 식물체와 식물체 추출물은 살충제나 모핵화합물로 이용이 가능할 것이다.

많은 버섯의 생리활성이 밝혀졌고 그 중 이들의 항암효과에 관한 많은 연구들이 수행되었는데 특히 국내 연구진들에 의해 산느타리버섯(*Pleurotus pulmonarius*)의 항암효과가 밝혀졌다. 버섯의 가치에 대한 일반인들의 관심 증대는 버섯을 단순한 식품이 아닌 기능성 건강식품 또는 약용작물로서 인식함으로써 버섯이 농가의 고부가가치 주요 소득원으로서 역할을 하게 되었다. 따라서 버섯의 재배면적이 해마다 증가하고 있고 재배기술 또한 증진되고 있으며, 버섯 산업은 우리나라에서 10위의 규모를 차지하고 있을 정도로 중요한 산업작물이다.

기존에 개발된 버섯파리류 방제제들 대다수가 농업해충이나 위생해충을 방제하기 위해 개발된 약제들의 적용범위를 확대하여 사용하는 제제들이 대부분이기 때문에 신규 작용기작을 갖는 훈증형 타입의 물질이나 천연물 소재 개발이 절실히 요구된다. 이러한 연구를 통한 신규 살충원제들의 개발은 직간접적으로

화학합성 연구자들에게 모핵화합물(lead compound)로서 제공이 가능하여 관련된 산업기술의 발달에 기여할 수 있을 것이다. 또한 선택적인 저독성의 살충제를 개발함으로써 버섯 내 무잔류로 버섯관련 제품류들의 안전성을 확보할 수 있고, 이용하는 소비자들에게 믿음을 줄 수 있는 버섯을 생산할 수 있게 됨으로써 결국 생산자인 농민들에게 보다 손쉬운 판매경로를 확보할 수 있는 부차적인 이득을 줄 수 있다. 게다가 본 연구를 통해 다양한 제형기술에 관한 연구를 함께 진행함으로써 비슷한 류의 천연물 개발 연구에 있어서 그 모태가 될 수 있는 여건을 마련해 줄 수 있다.

다년간의 노력에 의해서 많은 새로운 농약이 탄생되었지만 저항성 충의 출현, 식품 중 잔류, 환경에 대한 우려, 안전성 문제 등 때문에 새로운 농약의 탄생을 여전히 요구하고 있다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 적은 양의 사용으로 고효성의 약효가 유지되고, 환경에 덜 피해를 주며, 안전성이 높은 새로운 농약이 기대되고 있는 것이 현재의 실정이다. 또한 저항성 충의 출현은 현재 사용되고 있는 화합물로부터의 약효를 기대하기에 한계가 있기 때문에 새로운 작용기작을 갖는 화합물의 출현이 기대되고 있다. 한 품목의 신물질의 개발은 그들 유도체의 합성으로부터 다른 유용한 생물활성의 화합물의 탄생을 유도되기 때문에 신물질의 분자설계, 합성, 활성시험, 안전성연구, 실용화 등의 기술이 축적될 수 있다.

최근 농업에 있어서 가장 문제시 되고 있고 인건비 상승은 그 생산단가를 줄임으로써 상쇄가 가능하다고 판단할 때, 본 연구를 통해 얻어질 식물성 혼증형 물질은 기존의 살충제에 비해 보다 손쉽게 적용하고 처리할 수 있어 살충제를 처리하는데 소요되는 노동력 절감 효과를 기대할 수 있다. 뿐만 아니라 농약이 속하는 정밀화학 산업에 있어서 농약에 대한 국민들의 불신과 환경오염에 대한 우려를 최소화할 수 있는 해충종합관리(Integrated Pest Management)의 한 수단으로서 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

지금까지 버섯 방제제로 사용되어 온 원제들에 대한 사용금지 조치는 보다 안전한 저독성의 살충제를 요구하는 사회적인 조류이다. 따라서 본 연구를 통한 저독성 선택독성의 살충제 개발은 바로 이러한 요구에 부합하는 가장 합리적인

연구라고 할 수 있다. 따라서 본 연구는 이러한 문제들을 해소하고 이 분야의 기초 연구 발전을 위해 수행하였다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 저독성 선택독성의 버섯파리(긴수염버섯파리(*Lycoriela mali*)와 털파리붙이(*Coboldia fuscipes*), 그리고 육묘장내에서 최근에 문제시되고 있는 작은뿌리파리(*Bradysia agrestis*)) 방제제 개발에 연구목표를 두고 수행되었다.

방향성 한방식물체 60여종과 100여종의 식물체 정유를 대상으로 버섯류에서 자주 발생하여 경제적인 피해를 가져오는 해충인 긴수염버섯파리와 털파리붙이, 그리고 육묘장내에서 최근에 문제시되고 있는 작은뿌리파리에 대한 살충 또는 훈증활성물질을 분리·동정하여 그 활성본체를 규명하고 저독성의 선택적인 훈증제 또는 살충제를 개발 하기위해 접촉훈증법(direct contact and fumigant bioassay)을 이용하여 스크리닝한 결과 털파리붙이 대해서는 15종, 긴수염버섯파리에 대해서는 11종에서 80% 이상의 높은 살충활성을 나타내었다.

이중에서 죽도리풀(세신: *Asarum sieboldii*) 전초 유래 살유충성분들이 국내 느타리버섯재배상의 주요해충인 긴수염버섯파리와 털파리붙이에 대한 살유충 활성을 보였다. 세신 메탄올 추출물은 0.07 mg/cm^2 긴수염버섯파리와 털파리붙이에 대해 각각 100%의 살유충활성을 보였다.

세신의 살유충활성 성분은 기체크로마토그래피-질량분석기(GC-MS)를 이용하여 phenylpropanoid인 (z)-asarone, methyl-eugenol, myristicin, safrole을 확인하였고, saturated unbranched hydrocarbon인 n-pentadecane, monoterpene인 eucarvone을 확인하였으며, 이를 기체크로마토그래피에 혼합투입함으로써 그 물질을 최종 확인하였다.

긴수염버섯파리에 대한 세신유래 성분의 살충활성을 접촉훈증법을 통해 검증한 결과 methyl-eugenol($\text{LD}_{50}, 1.46 \mu\text{g cm}^{-2}$)과 safrole($\text{LD}_{50}, 2.03 \text{ mg cm}^{-2}$) myristicin ($\text{LD}_{50}, 3.59 \mu\text{g cm}^{-2}$)로 높은 살유충활성을 나타내었다. 이는 현재 버섯 재배상에 사용 중인 합성살충제 중 유기염소계의 DDVP ($\text{LD}_{50}, 0.10 \mu\text{g cm}^{-2}$)

나 카바메이트계의 benfuracarb (LD_{50} , $0.75 \mu\text{g cm}^{-2}$) 에 비해 다소 약하나 그 효용성은 충분 할 것으로 판단된다.

마찬가지로 털과리붙이에 대한 살유충활성을 검증한 결과 methyl-eugenol (LD_{50} , $2.33 \mu\text{g cm}^{-2}$)과 safrole(LD_{50} , $4.96 \mu\text{g cm}^{-2}$) myristicin(LD_{50} , $2.59 \mu\text{g cm}^{-2}$)이 높은 살유충활성을 나타내었다. 이 역시 합성살충제인 DDVP(LD_{50} , $0.11 \mu\text{g cm}^{-2}$)나 benfuracarb(LD_{50} , $0.55 \mu\text{g cm}^{-2}$)에 비해 다소 차이가 나는 것을 알 수 있다.

또한 vapor phase toxicity test로부터 세신유래 물질들과 DDVP는 fumigant 로서의 역할을 수행할 수 있는 것으로 나타났으나, benfuracarb는 접촉 독으로서만 작용함을 알 수 있었다.

그리고 버섯파리에 대해 살충활성이 높게 나타난 정유(essential oil)인 coriander oil, myrtle oil, sage을 대상으로 하여 그 활성물질을 탐색하기 위해 GC-MS를 통해 분석을 시행하였다. Coriander는 linalool, camphor, terpinene이 주성분이고, myrtle은 pinene과 cineol, sage는 cineol, thujone, camphor가 주성분이었다.

활성물질의 물리화학적 특성탐색을 통한 산업화 가능성 검토하기 위하여, 버섯에 대한 약해를 판정하기 위해 배지를 이용하여 대조구 대비 생산량 증감 유무를 판정하였다. 세신의 메탄올 추출물은 2 mg까지는 버섯 종균의 생산에 영향을 미치지 않았으나, 10 mg 이상에서는 버섯 종균의 생산이 상당히 감소하는 결과를 보였다. 세신에서 분리한 물질인 safrole에 대해서도 MIC 검정을 실시한 결과 세신의 메탄올 추출물과 비슷한 결과를 보였으나, 세신의 메탄올 추출물 10 mg 보다는 영향을 덜 받는 것으로 조사 되었다. Safrol의 경우도 2 mg에서는 버섯 종균의 생산에 영향을 미치지 않지만, 10 mg에서는 버섯 종균의 colony 수에 영향을 미치지 않는 것으로 보이나, 버섯종균의 콜로니 크기가 감소하는 것을 알 수 있고, 25 mg 처리에서는 그 크기가 현저히 감소하였다.

마지막으로 분리한 물질들의 토양 내 유입 시 유익생물인 지렁이에 대한 급성독성 유무를 판정하였고, 이용이 가능한 시제품인 유제, 훈증제, 폴리머 소재를 제작하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

방향성 한방식물체 60여종과 식물체 정유 100여종을 대상으로 버섯류에서 자주 발생하여 경제적인 피해를 가져오는 해충인 긴수염버섯파리와 털파리붙이, 그리고 육묘장내에서 최근에 문제시되고 있는 작은뿌리파리에 대한 살충 또는 훈증활성물질을 분리·동정하여 그 활성본체를 규명하고 저독성의 선택적인 훈증제 또는 살충제를 개발 하기위해 접촉훈증법(direct contact and fumigant bioassay)을 이용하여 스크리닝한 결과 긴수염버섯파리에 대해서는 세신(*Asiasarum sieboldii*), 팔각향(*Cacalia roborowskii*), 대회향(*Foeniculum vulgare*), 사삼(*Codonopsis lanceolata*), 속새(*Equisetum hyemale*), 한라봉(*Citrus sp.*), 송화분(*Pinus densiflora*), 오갈피(*Canthoanax sessiliflorus*), 오미자(*Schizandra chinensis*)등에서 높은 활성을 나타내었다.

또한 작은뿌리파리에 대해서는 정유의 경우 0.07 mg/cm²로 처리하였을 때 긴수염버섯파리는 거의 모든 정유에 대해 100%의 살충활성을 나타내었다. 따라서 정유의 경우 처리농도를 더욱 낮추어 활성을 검증함으로써 실제 이용 가능한 식물체를 탐색할 수 있을 것으로 사료된다. 그러나 한방식물체 및 한약재의 경우 그 활성을 나타냄에 있어서 매우 다양한 양상을 나타내고 있다. 먼저 다른 곤충들에 대해 활성을 나타냈던 여러 식물체들을 가지고 실험한 결과 버섯파리 방제제로서 매우 효과가 뛰어남을 볼수 있었다. 특히 백지(*Angelica dahurica*), 방기(*Stephania tetrandra*), 백복령(*White Poria cocos*), 생지황(*Rehmannia glutinosa*) 등은 0.14 mg/cm² 처리수준에서 100%의 높은 활성을 보였고 갈근(*Pueraria thunbergiana* Benth), 계내금(*Galli stomachichum Corium*) 구맥(*Dianthus sinensis*), 구절초(*Chrysanthemum zawadskii*), 나복자(*Raphanus sativus*), 방풍(*Saposhnikovia divaricata*), 독활(*Radix Araliae continentalis*), 면화자(*Gossypium indicum*), 모맥(*Hordum sativum*), 백굴채(*Chelidonium majus*), 상지(*Morus alba*), 야고등(*Polygonum multiflorum*) 등 또한 80%이상의 높은 살충 혹은 훈증활성을 나타내었다. 활성의 정도는 식물체에 따라 매우 다양하게 나

타났다.

이중에서 족도리풀 전초 유래 살유충성분들이 국내 느타리버섯재배상의 주요해충인 긴수염버섯파리와 털파리붙이에 대한 살유충활성을 보였다. 세신 메탄올 추출물은 0.07 mg/cm^2 긴수염버섯파리와 털파리붙이에 대해 각각 100%의 살유충활성을 보였다.

세신의 살유충활성 성분은 기체크로마토그래피-질량분석기(GC-MS)를 이용하여 phenylpropanoid인 (z)-asarone, methyl-eugenol, myristicin, safrole을 확인하였고, saturated unbranched hydrocarbon인 n-pentadecane, monoterpene인 eucarvone을 확인하였으며, 이를 기체크로마토그래피에 혼합투입함으로서 그 물질을 최종 확인하였다.

활성물질의 물리화학적 특성탐색을 통한 산업화 가능성 검토하기 위하여, 버섯에 대한 약해를 판정하기 위해 배지를 이용하여 대조구 대비 생산량 증감 유무를 판정한 결과 세신의 메탄올 추출물은 2 mg까지는 버섯 종균의 생산에 영향을 미치지 않았으나, 10 mg 이상에서는 버섯 종균의 생산이 상당히 감소하는 결과를 보였다. 세신에서 분리한 물질인 safrole에 대해서도 MIC 검정을 실시한 결과 세신의 메탄올 추출물과 비슷한 결과를 보였으나, 세신의 메탄올 추출물 10 mg 보다는 영향을 덜 받는 것으로 조사 되었다. Safrol의 경우도 2 mg에서는 버섯 종균의 생산에 영향을 미치지 않지만, 10 mg에서는 버섯 종균의 콜로니 수에는 영향을 미치지 않는 것으로 보이나, 버섯종균의 콜로니 크기가 감소하는 것을 알 수 있고, 25 mg 처리에서는 그 크기가 현저히 감소하였다. 이와 같은 결과로 볼 때 세신에서 분리한 물질들은 앞으로 버섯파리 방제제로 이용하는데 있어서 저독성 살충제로 개발이 가능할 것으로 생각된다.

2. 활용에 대한 건의

가. 버섯 농가에서 사용하고 있는 유기합성 살충제의 문제점을 보완하는 대체제로서 식물체 자체, 식물체에 함유된 활성분체 또는 이 활성분체를 분리·정제하는 과정에서 수득되는 분획물 층 등 다양하게 이용함으로써 버섯파리 방제제로서 갖추어야 할 저독성이면서 선택독성이 강한 약제로서의 이용이 가능할

것으로 판단된다.

나. 한방 식물체 세신에서 버섯파리에 대해 높은 살충활성을 나타냈고 그들의 살충활성 본체가 동정되었으며, 이들 물질을 제형화하였다. 이것의 활용방법은 도출되는 물질의 특성을 통한 적절한 제형화 연구, 그리고 이를 근간으로 한 야외검정 등의 부수적인 연구가 수행되어야 한다.

다. 미환경청에 의한 버섯파리 방제제들의 규제 조치는 대체원제 개발이 시급함을 말하는 것이고, 이들 살충원제는 버섯파리 뿐만 아니라 가정 내 발생하는 위생해충 및 정원해충 등을 방제하기 위해 사용되고 있으므로 이들을 관리하는데 있어서 어려움을 겪게 될 것이다. 이는 곧 소비자나 농민 모두에게 불이익을 초래할 수 있는 상황이므로 대체원제 개발은 매우 중요하다고 여겨진다. 또한 중국산 버섯종균을 통해 유입될 수 있는 외래병해충의 검역이 국내에서도 강화되면서 이들의 유입을 원천적으로 예방할 수 있는 예방약제의 개발 또한 시급하고, 본 연구 성과물이 이러한 검역분야에도 충분히 활용될 수 있으리라 기대한다.

SUMMARY

I. Title

Development of Mushroom Fly Control Agents derived Plants with Low and Selective Toxicity

II. Purpose and background of research

Mushrooms have been consuming for health foods and herbs for a long time, and, nowadays, its consumption is rapidly increasing due to the large income and the improvement of dietary life. Therefore, the growing area of mushrooms is also expanding, and it became an important source of income. However, there are lot of pest problems causing serious damages on the mushroom as other crops. It is known that the pests in the mushroom culture are mainly caused by mites such as *Rhizoglyphis* spp., and *Histiostoma* spp., and mushroom flies such as *Lycoriella* sp., *Coboldia* sp., and *Mycophilla* sp. (Kim 1990, Kim and Hwang 1996, Kim *et al.* 1999). Among these pests, mushroom flies cause severe damage to mushroom. Larvae feed on the mycelium and fruit body of mushrooms, and adult flies may transport organisms such as nematodes, mites, and mold spores (Clancy 1981, Clift 1979, Wetzel 1981). Especially, *Lycoriella mali* Fitch (Diptera: Sciaridae) is the most abundant mushroom pest, occurring throughout the year in most regions of Korea. This species is distributed in North America, Europe, and Asia (Lee *et al.* 1999). *Coboldia fuscipes* Meigen (Diptera: Scatopsidae) is another major pest of oyster mushrooms in Korea (Kim *et al.* 1999). It has been reported that *L. mali* is responsible for approximately 20% mushroom loss annually

(Cantwell and Cantelo 1984).

For the control of mushroom flies, synthetic insecticides have been used for several decades. Methoprene and diflubenzuron are used for the control of *L. mali* larvae. Permethrin is the most widely used adulticide. Dichlorvos was used for control of larvae and adult flies. Although effective, synthetic pesticide for control of mushroom flies are limited by adversal effects such as disrupting natural biological control systems (DeBach and Rosen, 1991), development of resistance (Brewer and Keil, 1989; Bartlett and Clifford, 1997), residue and environmental and human health concerns (Brown, 1978; Hayes and Laws, 1991). These problems have highlighted the need for the development of new strategies for selective control of insect pests.

Permethrin was introduced into mushroom agriculture to control *L. mali* 1981. Now, diflubenzuron and cyrimazine was registrated for control mushroom flies in Korea (Guideline of Pesticide, 2004). The other pesticides, benfuracarb, fenthion, and furathiocarb were suggested as adulticide and larvicide against *L. mali* (Kim *et al.*, 2001).

As biological control agents, *Bacillus thuringiensis*, isolated from a soil sample of dead mushroom fly in mushroom houses had been reported. Moon *et al.* (2002) was reported that *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* wettable powder made of beans and cabbage powder had 86.4% mortality against *L. mali*. And *B. thuringiensis* 656-3 showed a high level of toxicity against mushroom flies, *L. mali* and *C. fuscipes* (Choi *et al.*, 2004). The LC₅₀ values of *B. thuringiensis* 656-3 were 73.6 ng mL⁻¹ against *C. fuscipes* and 257.4 ng mL⁻¹ against *L. mali* after 24 h, respectively.

The other biological control agent was entomopathogenic Nematodes. In Korea, the Potential of two entomopathogenic nematodes, *Steinernem carpocapsae* Pocheon strain and *Heterorhabditis bacteriophora* Hamyang strain was evaluated against *L. mali* in laboratory and field (Kim *et al.*,

2001). Mortality of *L. mali* was significantly different according to nematode species, concentration, temperature, and developmental stage of *L. mali*. The Highest mortality was shown in adult female representing 74.0% at 20°C and 80.0% at 25°C. *L. mali* female adult was influenced by *S. carpocapsae* in oviposition. The number of eggs by *L. mali* female infected by nematodes was much lower than uninfected females. When *S. carpocapsae* was applied at the rate of 2.25×10^5 and 4.5×10^5 infective juveniles 1.5 m^{-2} in the mushroom house, mortalities were 42.2% and 81.6%, respectively.

III. Contents and bounds of research and development

Larvicidal activities of the methanol extracts from 60 oriental medicinal plant species and 100 essential oils were assessed against *L. mali* and *C. fuscipes*.

The larvicidal activities of materials identified from the whole plant of wild ginger, *Asarum sieboldii* Miquel (Family Aristolochiaceae), against two major dipteran pest insects *Lycoriella mali* Fitch (Diptera: Sciaridae) and *Coboldia fuscipes* Meigen (Diptera: Scatopsidae), were examined using direct contact and fumigant bioassay, respectively. At 0.07 mg cm^{-2} , the methanol extract exhibited 100 % larvicidal activity against 3rd instar larvae of *L. mali* and *C. fuscipes*.

Because of good larvicidal activity of methanol extract from the wild ginger against two dipteran pest insects, the extract was sequentially partitioned into hexane, chloroform, ethyl acetate, and water fractions. Among the solvent fractions, hexane and chloroform fractions exhibited good larvicidal activity against *L. mali* and *C. fuscipes*. Purification of the biologically active constituents from the hexane fraction was done using silica gel chromatography and high-performance liquid chromatography. The larvicidal

constituents of the wild ginger were characterized as 3 terpenoid methyl-eugenol, myristicin, and safrole by gaschromatography-mass spectrophotometal analysis. And then these compounds was double-checked by co-injection in GC system.

The toxicity of the *A. sieboldii* whole plant-derived constituents against 3rd instar larvae of *L. mali* and *C. fuscipes* was examined by direct contact and fumigant bioassay. Responses varied with compound and dipteran pests. At a dose of 0.5 mg cm^{-2} , the larvicidal activities of *A. sieboldii* whole plant-derived compounds caused 100% mortality against two dipteran pests. In a test with *L. mali* 3rd instar larvae, methyl eugenol (LD_{50} , 1.46 g cm^{-2}) and safrole (LD_{50} , 2.03 g cm^{-2}) were much more toxic than myristicin (LD_{50} , 3.59 g cm^{-2}). These toxicity was lower than synthetic insecticides, organophosphate DDVP (LD_{50} , 0.10 g cm^{-2}) and carbamate benfuracarb (LD_{50} , 0.75 g cm^{-2}). Also toxicity test against *C. fuscipes* 3rd instar larvae, LD_{50} of methyl eugenol, safrole, and myristicin were 2.33, 4.96 and 2.59 g cm^{-2} , respectively.

In vapor phase toxicity bioassay with *L. mali* larvae, methyl-eugenol, myristin, safrole and DDVP were more effective in closed container than in open ones, indicating that effect of the monoterpenoids were largely due to action in the vapor phase. But benfuracarb has same motality in uncontact conditions, so direct contact fumigant method was very useful to indicated both direct toxicity and fumigant toxicity.

In conclusion, *A. sieboldii* whole plant-derived materials merit further study as potential insect-control agents or as lead compounds against larvae of *L. mali* and *C. fuscipes*.

Finally, active constituent tested acute toxicity with earthworm in soil and we are made prototype medel.

IV. Results and suggestions of application of research and development

1. Results of study

When the lethal activity of 60 plant extracts and 100 essential oils were bioassayed by the direct contact bioassay, significant differences were observed in toxicity to *C. fuscipes* larvae. Responses were dependent on plant species tested. After 24 h of exposure, 100% mortality at 0.14 mg cm⁻² was produced from seven plant extracts: *Asarum sieboldii* (Aristolochiaceae), *Cacalia roborowskii* (Magnoliaceae), *Eugenia cariohillata* (Myrtaceae), *Illicium vernum* (Magnoliaceae), *Leonurus sibiricus* (Lamiaceae), *Poria cocos* (Poyporaceae), and *Rehmannia glutinosa* (Scrophulariaceae). Eleven plant extracts such as *Chelidonium majus* (Papaveraceae), *Chrysanthemum zawadskii* (Asteraceae), *Dianthus sinensis* (Caryophyllaceae), *Gallistomachichum* (Phasianidae), *Gossypium indicum* (Malvaceae), *Hordum sativum* (Poaceae), *Morus alba* (Moraceae), *Polygonum aviculare* (Polygonaceae), *Pueraria thunbergiana* (Fabaceae), *Raphanus sativus* (Brassicaceae), and *Schizandra chinensis* (Magnoliaceae) showed >80% mortality. Little or no lethal activity was observed with the other 24 plant extracts. Mortality in the untreated controls was below 6%.

Toxic effects in the direct contact bioassay of the test extracts against *L. mali* larvae are recorded. Responses varied according to plant species. After 24 hr of exposure, 100% mortality at 0.07 mg cm⁻² was observed with seven plant extracts: *A. sieboldii*, *Canthopanax roborowskii* (Araliaceae), *C. sessiliflorus*, *Carthamus tinctorius* (Asteraceae), *E. carrohillata*, *I. vernum*, and *L. sibiricus*. At same dose, >80% mortality was obtained from *Citrus* spp. (Rutaceae), *Equisetum hyemale* (Equisetaceae), *Pinus densiflora* (Pinaceae), *Polygalaceae tenuifolia* (Polygalaceae), *R. glutinosa*, and *S.*

chinernsis.

Fractions obtained from the methanol extract of *A. Sieboldii* whole plant were bioassayed by direct contact. Significant differences in toxicity in fractions of the extract were observed, and used to identify peak activity fractions for the meet step in the purification. The hexane and chloroform fractions showed potent lethal activity against *L. mali* larvae at 0.02 mg cm⁻². The larvicidal activity of the chloroform fraction was significantly low at 0.04 mg cm⁻².

Through our analysis protocols, differences in quantitative and qualitative composition were observed H11 fraction by comparison of mass spectral data and retention times of authentic compounds. The H11 fraction was mainly composed n-pentadecane (61.3 %). β -pinene, β -myrcene, cymene, DL-limonene, 1,8-cineole, camphor, α -terpenyl acetate, β -caryophyllene, and α -cedrol. The H12 fraction was mainly composed of safrole (60.2 %). The H13 fraction was composed of eucarvone (37.2 %), safrole (12.5 %), and myristicin (12.9 %). The H14 fraction was composed of eucarvone (45.0 %) and myristicin (25.9 %). The H2 fraction was composed of methyl-eugenol (67.7 %) and (Z)-asarone (20.8 %). The H3 fraction was composed of methyl-Eugenol (39.3 %) and (Z)-asarone (45.6 %).

The toxicity of methyl-eugenol, myristicin, and safrole to *C. fusciges* was compared with those of benfuracarb and dichlorvos. Potencies varied according to compound. On the basis of LD₅₀ values, methyl-eugenol and myristicin were more effective than safrole against larvae. The larvicidal activity of methyl-eugenol was compared to that of myristicin. All test compounds were less effective than either benfuracarb or dichlorvos.

Harmful effect of mushroom was tested using agar plate. as a result *A. sieboldii* methanol extract did not harmful effect until 2 mg/plate.

In conclusion, *A. sieboldii* whole plant-derived materials merit further

study as potential insect-control agents or as lead compounds against larvae of *L. mali* and *C. fuscipes*.

2. Suggestion of application

A. Synthetic pesticide for control of mushroom flies are limited by adversal effects such as disrupting natural biological control systems (DeBach and Rosen, 1991), development of resistance (Brewer and Keil, 1989; Bartlett and Clifford, 1997), residue and environmental and human health concerns (Brown, 1978; Hayes and Laws, 1991). These problems have highlighted the need for the development of new strategies for selective control of insect pests.

Plants may provide potential alternatives to currently used insect-control agents because they constitute a rich source of bioactive chemicals (Wink, 1993). Many of them are large free from harmful adverse effects (Hedin *et al.*, 1997), often biodegrade to nontoxic products, and have little or no harmful effects on non-target organisms or the environment (Dev and Koul, 1997). Much effort has, therefore, been focused on plant-derived materials as potential sources of commercial insect-control agents or as lead compounds (Jacobson and Crosby, 1971; 1977;*et al.*, 1989; Isman, 1995; Hedin *et al.*, 1997).

B. Certain plant extracts have potential as the *L. mali* and *C. fuscipes* control agents because they are widely available, relatively inexpensive, relatively nontoxic to mammals, and non-persistent in the environment possess, but toxic to mites through contact and/or fumigant actions. These properties of the plant extracts can lead to the development of appropriate types of formulations applying to a variety of the mushroom houses. Certain plant extracts are found as human toxicity. Novel safer and more effective

plant-based *L. mali* and *C. fuscipes* control agents can enhance the possibility of commercial success in the near future.

C. Plant extracts and essential oils have potential as mushroom house pest control agents because some are selective to certain pests, often biodegrade to nontoxic products, and have little or no harmful effects on non-target organisms or the environment (Isman, 2000, 2001). They have low toxicity to warm-blooded animals, high volatility, and toxicity to stored-grain insect pests (Regnault-Roger *et al.*, 1993; Shaaya *et al.*, 1991, 1997)

Natural products are the most consistently successful source of insecticide and insecticide lead compounds. therefore natural products can expect agents of protection of foreign pest and disease in quarantine.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction of the research	23
Section 1. Necessity of the research	23
Section 2. Goal and contents of the research	27
Chapter 2. Present status of technique development in domestic-international ...	29
Section 1. Present status of international technique development ...	29
Section 2. Present status of domestic technique development	30
Section 3. prospect of research	35
Section 4. Reasonable of technique invitation	36
Chapter 3. Contents and Results of the research	37
Section 1. Goal of the research	37
Section 2. Contents of the research	37
1. Oriental medicines and sample preparation	37
2. Tested insect	43
3. Contact bioassay	44
4. Mode of action	45
5. Isolation and identificaion of active principle	46
6. Toxicity against mushroom	47
7. Acute toxicity to earthworm	48
8. Statistical analysis	49
8. Manufacture of products	49
Section 3. Results of the research	50
1. Larvicidal activity of test plant extracts	50
2. Identification of active principles	55

3. GC-MS analysis of essential oils	72
4. Toxicity against mushroom	76
5. Acute toxicity to earthworm	78
6. Manufacture of products	80
Chapter 4. Achievement and devotion	86
Section 1. Achievement of the research	86
Section 2. Devotion for related areas	87
Chapter 5. Application plan of research results	89
Chapter 6. International information collected during study period	91
Chapter 7. Cited references	98

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	23
제 1 절 연구개발의 필요성	23
제 2 절 연구개발의 목표 및 내용	27
제 2 장 국내외 기술개발 현황	29
제 1 절 국외 관련 기술 현황 및 문제점	29
제 2 절 국내 관련 기술 현황 및 문제점	30
제 3 절 앞으로의 전망	35
제 4 절 기술 도입의 타당성	36
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	37
제 1 절 연구 목표	37
제 2 절 연구 내용	37
1. 식물체 확보	37
2. 공시층 확보 및 계대사육	43
3. 생물검정	44
4. 작용기작	45
5. 활성성물의 분리 및 정제	46
6. 버섯 독성 실험	47
7. 지렁이에 대한 급성 독성 평가	48
8. 통계처리	49
9. 시제품 제작	49
제 3 절 연구 결과	50
1. 버섯파리에 대한 살충·훈증활성 식물체 탐색	50
2. 살충 활성물질	55

3. 3중 정유의 GC-MS에 의한 화합물 동정	72
4. 세신 추출물의 버섯 독성 실험	76
5. 지렁이에 대한 급성 독성 평가	78
6. 시제품 제작	80
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	86
제 1 절 연구 목표달성도	86
제 2 절 관련 분야의 기여도	87
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	89
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	91
제 7 장 참고문헌	98

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절. 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

버섯류 생산량 확대와 더불어 버섯에 발생하는 병해충류가 크게 문제화되고 있는데, 느타리버섯 재배시 문제시 되는 병으로는 버섯을 재배하는 벗짚 등의 배지, 균상의 목재, 죽은 버섯 등에 푸른색의 포자를 형성하는 *Trichoderma* 속의 곰팡이가 일으키는 푸른곰팡이병, 자낭균류인 *Neurospora* 속 곰팡이에 의해 발생하는 붉은빵곰팡이병, 자실체에 *Pseudomonas* 균이 직접 기생하여 발생하는 세균성갈반병 등을 들 수 있다. 또한 버섯에서 주로 발생하는 해충으로는 버섯파리과(Mycetophilidae), 흑파리과(Cecidomyiidae), 벼룩파리과(Phoridae)에 속하는 해충류 그리고 소수의 톡토기, *Linopodes*, *Tyroglyphus*, *Rhizoglyphus*, *Histiostoma*, *Pygmaeophorus* 속의 응애류 및 *Ditylenchus*와 *Rhabditis* 등의 선충 등을 들 수 있다(Thomas, 1959; Kim and Hwang, 1996). 느타리버섯 재배상에서 문제시 되는 주요 버섯파리류는 검정날개버섯파리과와 흑파리과, 벼룩파리과에 속하는 종들이며 이중 검정날개버섯파리과에 속하는 긴수염버섯파리, *L. auripila*, *Bradysia* spp. 등의 피해가 심각하고(Clift and Toffolon, 1981; Al-Amidi, 1995; Scheepmaker 등, 1996), 우리나라의 경우는 긴수염버섯파리, *Bradysia* spp., *Megaselia nigra*, 털파리붙이, *Mycetophila* spp., *Mycophila* spp. 등이 중요하다(Lee, 1997, 1998, 1999). 특히 긴수염버섯파리는 느타리버섯을 비롯한 양송이, 표고버섯에도 피해를 일으킨다(Ishitani 등, 1993, 1997). 이 종은 버섯갈반병을 일으키는 병원균들의 매개체가 되고 응애류와 선충류 등의 매개충으로 작용하여 간접적으로는 병 매개자로서 역할을 하며(Rinker 등, 1989), 직접적으로는 느타리버섯 생산량의 17% 감소를 초래하는 해충이고 실제 느타리버섯 재배사에서 농민들이 가장 관리하는데 어려움을 겪고 있는 중요 해충이다(Cantelo, 1979).

이들 중요한 버섯파리를 방제하는 방법으로는 성충의 침입을 막기 위해 재배사의 출입구 및 환기창에 1 mm 눈금 크기의 방충망을 설치하는 물리적인 방법 그리고 종균재식시 chlorpyrifos가 원제인 2% 더스반 입제를 평당 15~18 kg 씩 종균에 혼합처리하여 초기에 균상 속으로 침입하는 성충밀도를 조절하는 방법, diflubenzuron 수화제 또는 diazinon 수화제 각 13 g을 종균과 혼합하여 사용하거나 균사생장이 완료되어 하온할 때에 200~600배액으로 평당 6.5 g을 사용하고 버섯파리의 밀도가 높을 때는 평당 13 g을 1~2회로 나누어 균상에 처리하는 화학적인 방법을 들 수 있다. 그리고 균사 생장기 때 재배사 내에 1주 간격으로 DDVP 유제 1000배액을 공중 살포하여 성충을 방제하는 효과를 기대할 수 있다. 하지만 이들 살충제들의 과 사용 시 균사생장이 억제되어 수량이 감소하거나 자실체 형성을 억제하여 기형 버섯이 발생할 수 있는 약해의 우려가 있어 그 사용이 매우 제한적일 수밖에 없다.

국내 연구진들에 의한 버섯파리류의 연구는 주로 버섯파리 분류 및 생태에 관한 연구(박 등, 1999; 김 등, 1999; 김 등, 2000; 최 등, 1999; 이 등, 1999) 등이 이루어졌고 최근에 김 등(2001)이 곤충병원성 선충을 이용하여 긴수염버섯파리를 생물적으로 방제하려는 연구를 수행하였다. 그러나 생물적 방제원이 3-4개월의 버섯 재배기간에 환경에 정착하여 실제적인 방제를 기대할 수 있을 무렵에는 이미 그 해충들의 발생이 일어난 이후가 되므로, 저독성의 선택적인 화학적 방제원에 의존하는 것이 가장 합리적인 선택이라고 볼 수 있다.

2. 경제·산업적 측면

국내 버섯 생산량은 2001년 농산물유통국 채소특작과 통계 기준 3백4십만 평 정도이고 그 생산량은 13만 톤 가량이며 느타리버섯(*Pleurotus ostreatus*) 재배면적은 2백 3십만 평이며 생산량은 7만 톤 이상이다. 따라서 버섯 중 단일상품으로는 재배면적으로 65%, 생산량으로 54%로 가장 중요한 위치를 차지하고 있다(<http://www.maf.go.kr/agriinfo2000/trade21.asp>). 한편 선진국들의 버섯 생산량 및 수출입 현황을 보면, 미국의 경우 2000년 현재 1억 5천만평 이상으로 8억 3천만 달러 가량이고, 주 수입국으로는 인도, 인도네시아, 네덜란드 순으로 나타났다

(http://www.maf.go.kr/html/pds01_06.htm). 그리고 일본의 버섯 총 생산량은 2001년 기준 6만 7천 톤, 수출량은 451톤, 중국의 경우는 버섯 생산량이 81만 톤, 수출량은 5만 톤 정도이다(<http://www.mushroom98.co.kr/>). 국내 버섯류 수출액은 2002년 6백만 달러, 2001년 7백만 달러, 2000년 5백6십만 달러로 해마다 6백만 달러 이상을 차지하고 있고, 수입액은 2002년 1천만 달러, 2001년 8백만 달러, 2000년 9백만 달러로 수출보다는 수입이 더 많은 비중을 차지하고 있다.

2001년 국내 농약생산량은 전년도 대비 5.7%가 감소하였는데 이는 하반기에 조기 생산한 이월재고분이 감안된 감축생산 때문이고, 살충제 중 수도용의 경우 2001년 현재 전년도에 비해 580톤이 감소한 3,250톤으로 1천 3백억원 정도의 규모이며 그 출하량으로 보면 3,360톤으로 1천3백4십억원, 원예용으로는 6,397톤으로 2천 5백억원 그리고 출하량으로는 6,520톤으로 약 2천 4백억원 규모의 시장을 형성하고 있다(한국농약공업협회, <http://www.koreacpa.org/>, 2003). 또한 2001년 농약원제 수입 총액은 2000년 3억5천8백만 달러에서 2.7% 감소한 3억5천만 달러이고 원제가 78.9%인 2억7천5백만 달러로 2000년 대비 2.6%감소하였고, 완제품은 24.5T가 증가하였으며 합성원료는 18%가 감소하였다. 수입국별로는 일본이 8천8백만 달러로 25.2%, 미국이 5천4백만 달러로 15.4%, 독일이 4천7백만 달러로 13.4%로 전체 수입액의 54%를 차지하였으며 나머지가 영국 등 20여개 국에서 수입되었다. 2001년도 농약 수출액은 약 4천만 달러로 전년도 대비 7.4% 감소하였고 원제 수출 역시 7.3% 감소, 완제품은 14.3% 감소 추세를 보였다. 그리고 수출 주 교역국으로는 프랑스, 영국, 미국, 베트남 순으로 나타났다.

미환경보호청 (US EPA)는 유기인계 살충제인 다이아지논을 잔디, 정원, 기타 외부의 거주지역에 사용목적으로 제형화 되는 것을 2003년 6월까지 모든 제조사들이 중지하도록 하였고 2004년 말까지 소매판매를 금지할 것을 발표했다(<http://www.geocities.com/fragranceallergy/SeattleTimes04022002.html>). 또한 클로로피리포스를 원제로 한 더스반은 가정용, 잔디해충, 농업해충 및 흰개미 방제용 살충제로서 미국 및 국내에서 가장 널리 사용되고 있는데, EPA는 이 살충제가 어린이들에게 노출 시 신경에 이상을 일으킬 수 있다고 하여 더스반 생산자들과 더불어 공공위생을 위하여 규칙적으로 가용하는 식품 및 가정용 살충제

로서 사용을 금지하거나 줄이는 방안에 2000년에 합의하여 관련법규를 2001년에 추진하였다(EPA Newsroom, [http://www.epa.gov/epahome/headline0608 .htm](http://www.epa.gov/epahome/headline0608.htm), 2000). 곤충생장조절제 계통의 키틴합성저해제인 diflubenzuron은 환경에 미치는 그 부작용이 상대적으로 낮은 안전한 살충제 그룹일지라도 계와 같은 절지동물에 정상적인 탈피과정 및 생식에 영향을 미칠 수 있다(Christiansen et al., 1977a, b; 1979). 훈증제로 널리 사용되는 DDVP(dichlorvos)의 사용을 미국의 각계 중요한 인사들 및 연구자들로 구성된 패널들이 가정용, 담배 온실, 장식용 잔디, 상업·교육·산업지역, 항공기를 비롯한 상업용 운송수단, 온실, 버섯 재배지에서의 수동 사용 등의 다양한 지역들에서 이 살충제를 사용하는 것을 금지할 것을 요구하는 DDVP Risk Assessment Issues paper를 EPA에 1998년 7월에 제안하였다(<http://www.epa.gov/oscpmont/sap/1998/july/final3.pdf>, FEDERAL INSECTICIDE, FUNGICIDE, AND RODENTICIDE ACT SCIENTIFIC ADVISORY PANEL MEETING, 1998).

경제·산업적으로 중요한 이들 살충제들의 사용금지 조치 및 그 생산량 제한의 효과는 이들의 원제를 대체할 수 있을만한 신규 화합물의 개발을 필요로 한다. 이러한 측면에서 식물체 유래 저독성 선택적 살충제의 개발은 국내 농약 산업계의 국제 경쟁력 강화 및 관련업계의 경쟁력 향상에 도움을 줄 수 있고, 국내 학술계의 이 분야에 대한 보다 적극적인 연구기반 기술을 확립하는 데 도움이 될 수 있다. 무엇보다 중요한 것은 국내의 다양한 식물체 자원을 확보하여 이들의 버섯파리에 대한 중요한 살충활성을 검색하고 그 활성본체들의 특성을 파악함으로써 유기합성 화학자들에게 보다 빠른 합성물 또는 천연원제의 이용에 발 빠른 대응을 할 수 있는 여지를 줄 수 있을 것이다.

3. 사회·문화적 측면

많은 버섯의 생리활성이 밝혀졌고 그 중 이들의 항암효과에 관한 많은 연구들이 수행되었는데 특히 국내 연구진들에 의해 산느타리버섯(*Pleurotus pulmonarius*)의 항암효과가 밝혀졌다(Lee 등, 1985). 버섯의 가치에 대한 일반인들의 관심 증대는 버섯을 단순한 식품이 아닌 기능성 건강식품 또는 약용작물로

서 인식함으로써 버섯이 농가의 고부가가치 주요 소득원으로서 역할을 하게 되었다. 따라서 버섯의 재배면적이 해마다 증가하고 있고 재배기술 또한 증진되고 있으며, 버섯 산업은 우리나라에서 10위의 규모를 차지하고 있을 정도로 중요한 산업작물이다(Anonymous, 1999).

이와 더불어, 농림부 산하 국립식물검역소는 버섯종균에 대하여 2000년 9월 1일부터 식물검역을 실시하기로 하였는데, 최근 들어 톱밥 등에 집중된 중국산 버섯종균이 수입되면서 외래유해병해충이 유입될 위험성이 높아졌기 때문이며 이러한 보호조치는 곧 국내 버섯농가를 보호할 수 있는 효과를 기대할 수 있다. 하지만, 적절한 훈증제나 검육용 살충제의 개발을 통해 이들을 수입시 검역지 또는 수입국에서 검역을 실시토록 함으로써 외래 병해충의 국내 유입을 방지할 수 있는 효과를 기대할 수 있다(<http://www.maf.go.kr/html/mains/data/20000901.htm>, 9.1.부터 버섯 종균에 대한 식물검역 실시, Agro-Mail Club, 2000).

지금까지 버섯 방제제로 사용되어 온 원제들에 대한 사용금지 조치는 보다 안전한 저독성의 살충제를 요구하는 사회적인 조류이다. 따라서 본 연구를 통한 저독성 선택독성의 살충제 개발은 바로 이러한 요구에 부합하는 가장 합리적인 연구과제라고 할 수 있다.

제 2 절. 연구개발의 목표 및 내용

방향성 한방식물체 60여종 및 식물체 정유 100여종을 대상으로 버섯류에서 자주 발생하여 경제적인 피해를 가져오는 해충인 긴수염버섯파리와 털파리붙이, 그리고 육묘장내에서 최근에 문제시되고 있는 작은뿌리파리에 대한 살충 또는 훈증활성물질을 분리·동정하여 그 활성분체를 규명하여 저독성의 선택적인 훈증제 또는 살충제를 개발을 목표로 수행하였다.

1차년도에는 방향성 한방식물체 스크리닝을 통한 훈증·살충특성 식물체 탐색하고 연구수행을 위한 대상 식물체를 선정하였다. 방향성 한방식물체 60종 채집 및 추출하고, 식물체 정유 100종을 확보하였고, 공시충 3종 확보 및 실내사육 체계 확립하여 생물검정에 이용하였다. 사용한 생물검정법은 여지확산법, 배

지혼합법에 주로 의존하였다.

2차년도에는 버섯파리에 대한 1차년도 연구 결과를 바탕으로 하여 살충활성이 우수한 세신을 선별하여 살충활성 물질을 정제하여 동정하는데 주요 연구 목표를 두었다. 활성본체를 탐색하기 위해 활성 식물체의 유기용매를 이용한 순차분획하고, 크로마토그래피법을 이용한 물질 분리하였으며, GC-MS를 이용하여 활성 본체를 확인하였다. 분리 결과로 세신에서 활성이 좋은 6종의 활성본체를 확인하였고, 활성물질의 작용기작에 대한 현상학적 구명을 위해 접촉독성과 혼중독성의 유무를 판별하였다. 버섯파리는 실험실에서 계대 사육하면서 생물검정의 효율성을 높였다.

3차년도에는 버섯파리에 대해 살충활성이 높게 나타난 정유(essential oil)인 coriander oil, myrtle oil, sage을 대상으로 하여 그 활성물질을 탐색하기 위해 GC-MS를 통해 분석을 시행하였다. Coriander는 linalool, camphor, terpinene이 주성분이고, myrtle은 pinene과 cineol, sage는 cineol, thujone, camphor가 주성분이었다. 활성물질의 물리화학적 특성탐색을 통한 산업화 가능성 검토를 목적으로 독성 검사와 시제품을 제작하는데 목표를 두었다. 토양 내 유입 시 유익생물인 지렁이에 대한 급성독성 유무 판정하기 위하여 공시생물인 줄지렁이를 이용하여 토양 유입 시 토양생물에 미치는 효과를 간접적으로 판정하였고, 버섯에 대한 약해 유무 판정은 MIC법을 이용하였다. 또한 기업체의 참여로 버섯파리 방제용 시제품을 분리한 물질을 기본으로 제작하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절. 국외 관련 기술 현황 및 문제점

천연물을 이용하여 최근에 성공한 대표적인 사례로는 북미지역과 네팔을 들 수 있다. 미국과 캐나다의 벤처기업인 EcoSMART Technologies와 Mycotech Corporation은 식물체 정유에 근간한 살충제를 개발함으로써 급격히 성장한 기업이 되었는데, 이들은 cinnamon oil에 근간한 CinnamiteTM와 ValeroTM를 개발하였고 rosemary oil에 근간해서 제형화한 EcoPCOTM과 BiognicTM 그리고 HexacideTM을 개발하여 시판하고 있다. 또한 개발도상국에서의 성공사례로는 네팔의 경우를 들 수 있는데, 네팔은 자연 지리적으로 국토의 85%가 산림지역으로 우리나라와 유사한 특징을 갖고 있다. 따라서 산림의 이용을 위해 네팔정부의 적극적인 지원을 통해 설립된 벤처기업인 HPPCL은 네팔정부와 국제기구인 UNDP, UNIDO, FAO 등의 연구 성과를 바탕으로 산림자원 중 임산자원으로서 이용 가능한 한방식물체 29종과 허브식물 13종 그리고 상업화된 제충국 1종 등 43종을 선정한 후, 시장성 조사와 상업화 가능성·확보 기술 등 다양한 평가를 거쳐 최종적으로 자생 혹은 외국에서 들여온 허브 식물체들을 국유림 또는 사유림에 식재하여 관리한 후, 허브의 정유(대개는 화장품과 향료산업에 가장 많이 이용됨)를 추출하여 수출함으로써 네팔의 대표적인 수출기업으로 성공하게 되었다.

버섯류 일종인 *Tricholoma muscarium*과 *Amanita strobiliformis*의 살충성분으로서 각각 tciholomic acid와 ibotenic acid가 분리되었으며 이들은 모두 isoxazole환을 갖고있는 아미노산으로서 살충제 isoxathion과 살균제 hymexazol의 선도화합물로 이용되었다. 해조류 *Chondria armata*의 살충성분인 domoic acid는 kainic acid 유도체로서 바퀴벌레에 대한 살충활성이 있는 것으로 알려졌고 이들은 모두 흥분성 신경전달물질인 glutamic acid와 관련이 있으며, 이들 화합물을 선도화합물로 하여 일본에서 살충제로 개발 중에 있다. 살충성 화합물로 avermectin은 *Streptomyces avermitilis*가 생산하는 살충성 물질로서 적용범위가

넓을 뿐 아니라 저항성 해충에도 효과가 탁월하여 현재 널리 이용되고 있다. 식물체의 면역체계 등을 이용한 생태적으로 안전하면서 저독성을 지닌 신개념의 신규 살균제가 개발되었고, 생화학 및 생명과학분야의 눈부신 발전을 통하여 농약의 신규작용점 규명이 가능해짐에 따라, 새로운 스크리닝 기술이 급속도로 발전하고 신농약 개발의 잠재력 또한 증가하고 있다.

버섯류에서 발생하는 해충들을 방제하기 위한 연구는 영국의 Agricultural Genetics Company에서 Bt 균주를 이용 *Bacillus thuringiensis* isolate HD 541 (NCIMB 40373), HD 571 (NCIMB 40374), 또는 그 돌변변이균주, 이들의 재조합체나 유도체, 그리고 이들에서 유래한 살충성 물질들을 이용하여 *Lycoriella* 속의 과리목 해충들을 방제하는 것에 관한 PCT 출원(PCT/GB91/01957)(Jarretta 등, 1997). 그리고 긴수염버섯과리의 permethrine 살충제에 대해 산화효소들이 이들의 저항성 발달에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다(Gene 등, 1997). 국외 역시 특별히 버섯과리류의 방제제로서 식물체 유래물질을 이용하고자 하는 연구는 거의 이뤄지지 않은 것 같다. 앞선 언급한 바와 같이 생물적 인자인 선충이나 Bt 균주를 이용하여 방제를 하고자 하는 시도는 상당히 다양한 방법으로 접근이 이뤄진 것 같다. 따라서 버섯류 발생 해충들에 대한 방제제에 관한 연구는 그 연구의 의미가 크다고 볼 수 있다.

제 2 절. 국내 관련 기술 현황 및 문제점

버섯류 생산량 확대와 더불어 버섯에 발생하는 병해충류가 크게 문제시되고 있는데, 국내에서는 과거 20여 년간의 연구를 통해 살충제 2개, 제초제 1개, 살균제 1개 등의 합성 신농약을 개발하는데 성공하였으며 현재 (주)동부한농화학 과 LGLS 등을 주축으로 한 6개의 신규농약이 제품개발단계 및 진전단계 연구를 진행 중이다. 이러한 제품들의 개발 성공은 전통적인 합성기술과 농약 스크리닝 초기단계 그리고 진전단계 기술이 선진국 수준에 어느 정도 근접하였음을 말해 준다. 국내 농약산업계는 (주)동부한농화학, (주)LGLS, (주)경농 그리고 다국적 기업들에 의해 연구가 주도되고 있고 각 대학의 농업관련 학교들의 일부 연구자들을 중심으로 이뤄지고 있다. 또한 최근에 설립된 벤처업계로 서울대학교 실험

실 기업인 (주)내츄로바이오텍 등의 일부 벤처 기업계에서 진행하고 있다. 그러나 그 연구수준은 농약활성을 밝히거나 이에 준하는 기능성을 구명하는 정도의 수준으로 보다 많은 연구자들의 관심과 연구비의 지원이 필요하다고 여겨진다.

특히 버섯에서 발생하는 해충류 방제에 관한 연구는 김 등(2001)이 곤충병원성 선충을 이용하여 긴수염버섯파리를 생물적으로 방제하고자 하는 연구가 진행되었다. 그 밖에 버섯류에 발생하는 해충의 발생소장 및 피해양상과 같은 생태학적 연구 그리고 발생하는 해충들의 분류학적인 종 동정과 같은 연구가 진행되었다. 하지만, 이들을 효과적으로 방제할 수 있는 화학적 방제제의 개발에 관한 연구는 전무한 실정이다. 실제 농약으로 사용되는 유기인계 살충제들의 잔류 및 저항성 문제로 인해 그 사용이 금지되거나 제한되고 있는 상황이고 또한 식품으로 빈번히 사용되는 버섯에 이러한 고독성의 살충제를 살포하는 것은 그 잔류성을 확실히 검사할 수 없는 국내 여건상, 보다 저독성의 선택적인 살충원제 및 천연물 소재 개발은 절실하다고 볼 수 있다.

최근에 한국화학연구원을 중심으로 화합물은행이 설립되어 많은 화합물들을 확보하고 있고, 고효율 대량 스크리닝 체제(High Throughput Screening System)를 운영할 수 있는 기반 시설은 갖추었으나, 선진국의 많은 다국적 기업들이 확보하고 있는 조합합성기술은 선진국에 비해 미흡한 실정이므로 이들의 기술수준이 상대적으로 취약한 천연물 관련 연구 분야에 보다 더 적극적인 연구 활성화가 이뤄져야 할 것으로 보인다. 일본 등은 최근 들어 해양자원을 대상으로 한 천연물 탐색을 박차를 가하고 있다. 아직까지 국내의 경우 육상생물에 대한 자원 확보가 미흡함으로 이들에 대한 보다 더 많은 정보를 얻고 이에 기반을 둔 기술 축적 및 know-how로 이들에 대한 정보를 검색하는 연구가 앞으로 진행되어야 할 것으로 생각한다.

신농약 개발과 관련한 국내 기업들의 특허출원을 분석해 보면, 1998년 현재 한국화학연구원을 비롯한 LG화학이 전체 출원 건수의 53%를 차지하고 있어 이들 연구기관이 농약 관련 분야에 대한 연구개발이 가장 활발하게 이루어지고 있음을 알 수 있고, 극히 최근 들어 농업계 벤처인 (주)내츄로바이오텍에서 1-2년의 짧은 연구에도 불구하고 그동안 축적된 기술적 경험을 바탕으로 20여건 이상

의 국내외 특허를 출원한 것으로 나타났다. 따라서 이러한 천연물 분야와 농약분야의 접목이 가능한 연구에 정책적으로 지속적인 연구비의 지원이 필요하다고 사료된다. 그렇지만 이들 특정기업에서 출원한 특허에 대부분 대학 연구진들이 함께 참여하여 이뤄진 것이기 때문에 산술적으로 대학 연구진의 연구능력이나 자질이 이들 연구소의 연구진들에 비해 뒤처진다고 보기는 어렵다.

본 연구 과제를 신청한 서울대학교 농생명공학부 생리활성천연물연구실은 다양한 국내산 식물체들의 조추출물을 확보하고 있고, 본 과제를 신청하기 전에 실제 버섯농가를 방문하여 버섯파리를 채집하여 버섯파리의 대량사육방법의 가능성을 타진하였으며, 일부 식물체들을 대상으로 이들을 방제할 수 있는 가능성을 스크리닝하였다. 따라서 본 과제 수행 시 별다른 어려움이 없다고 판단한다. 또한 본 연구를 통해 버섯파리의 방제제 개발 시 가장 중요시 될 수 있는 다양한 스크리닝 기법들을 개발할 수 있는 여건이 마련될 수 있을 것으로 기대한다.

작물보호 및 농업 생산성 증대를 위해 사용되어 온 유기 합성 살충제들의 사용 감소에 대한 각국 정책 및 소비자들의 압력 증대가 대체 가능한 해충 방제제개발을 위한 노력을 불러왔다. 이러한 대체제들 중에는 식물성 살충제, 미생물 살충제 그리고 곤충 생육 억제제 등을 들 수 있다. 유기염소계와 유기인계 살충제들이 등장한 1930년대 말부터 1940년대 초 이전에는 선진국의 경우, 해충들을 관리하는 주요 수단으로서 식물성 살충제들에 크게 의존하여 왔었다. 비록 식물성 살충제들이 작물보호 측면에서 한때는 중요한 위치를 점유했을지라도 1950-1960년대에 출현한 합성 살충제들에 의해 거의 대다수 식물성 살충제들은 후진국에서조차도 그 점유력을 상실한 것이 사실이다. 그러나 합성 살충제들의 환경 및 건강에 대한 악영향 그리고 이로 인한 각국의 법적인 규제 강화로 식물성 해충 방제제 개발 및 활용에 대한 보다 새로운 관심이 집중되었다(Arnason 등, 1989; Hedin 등, 1997; Isman, 1995; 2001). 이와 같은 식물성 살충제 개발에 대한 관심 증대 이면에는 식물성 살충제가 갖는 장점들이 존재하기 때문이다. 즉, 식물성 살충제는 환경 내 유입 시 작물에 거의 잔류되지 않고 빠르게 생분해되며, 포유동물 및 유용곤충 그리고 처리되는 작물에 대한 독성이 낮으며 목적해충만을 선택적으로 치사시킬 수 있는 특징이 있다. 또한 식물성 살충제의 자원은

1993년까지 알려진 식물체 2차 대사산물들의 화합물 수(대략 30,000개 정도로 식물계 전체를 감안할 때 10% 미만)에 근간해 추정하면 약100,000개 정도가 자연계에 존재할 것으로 추정되므로 매우 풍부하다고 볼 수 있다(Wink, 1993).

그러나 식물성 살충제가 갖는 이와 같은 많은 장점에도 불구하고, 아직도 식물성 살충제를 포함한 생물농약(biopesticides)이 전체 농약 시장에서 차지하는 비율은 2% 미만으로 극히 미약하다. 하지만, 전 세계 살충제 시장에서는 약 4-5% 정도를 점유하고 있으며, 향후 이러한 증가세는 가속화되어 10년 내에 화학 농약 시장의 점진적인 잠식과 더불어 매년 10-15%의 증가세를 이어 나갈 것으로 전망한다(Menn, 1996). 이러한 잠식결과가 바로 식물성 농약의 밝은 미래를 약속한다고 판단하기에는 시기상조이다. 이는 식물 농약의 원제 생산 단가가 화학 살충제의 원제 생산 단가에 비해 약 10배 이상비용소모가 많이 되기 때문에 현재의 살충제 시장 형태를 바꾸기에는 극복할 많은 문제점들이 내재되어 있기 때문이다. 그럼에도 불구하고 식물성 살충제의 사용 증가 또는 시장 잠식이 가장 활발히 이뤄질 수 있는 분야는 가정 내에서 출현하는 위생해충 및 온실 그리고 정원 등에 발생하는 해충 등 인간과 직간접적인 접촉이 많이 이뤄지는 분야로 생각된다. 이러한 증가 역시 앞으로 5년 내에 관련 시장에서 25% 이상의 시장 점유력을 확보할 수 있을 것으로 예측한다.

현재 극소수의 식물성 살충제들만이 산업화되는데 성공하였고, 대다수는 산업화에 이르지 못했다. 식물성 살충제들의 산업화에 있어서 장벽요인들로는 하기와 같다.

첫째, 산업화를 위해서는 대량생산을 위한 자원 확보가 용이하여야 하나 대다수 식물체는 쉽게 자연계에서 채집하여 대량으로 활용하는데 있어서 한계가 있다. 하나의 대안으로는 산업폐기물로서 버려지거나 가공 과정에서 필수적으로 수득되는 산업 부산물들(예, 톱밥)을 적극적으로 활용하는 것을 들 수 있다(Ahn 등, 1997; 1998). 또 다른 대안은 식물체 추출물 또는 그 활성물질들의 적절한 혼합을 통한 상승작용(synergism)을 피함으로써 원료물질의 부족을 보완할 수 있다고 본다.

둘째, 유효성분에 근간한 식물 추출물의 품질관리(quality control)를 위한 어

편 표준화가 필요하지만, 식물체의 성분 분포 또는 함량은 계절적 또는 환경적으로 영향을 받는 것이 사실이다. 따라서 채집 시기나 채집 지역 및 채집 부위에 따라 유효성분 함량에 차이가 있을 수 있다(Marr and Tang, 1992). 하나의 대안으로는 계절적인 변화가 적은 아열대 또는 열대지역에서 관련 식물체를 대량으로 재배함으로써 유효성분의 함량 변화를 최소화함과 아울러 수요에 따른 공급을 용이하게 할 수 있다고 본다. 우리나라의 경우는 제주도 또는 남부 도서지역의 무인도를 재배지역으로 활용하거나 간척지 등을 활용함으로써 수도재배에서 생산되는 잉여 농산물의 과잉현상을 억제할 수 있고 또한 농업 경관을 보다 다양화함으로써 관광수입의 부수적인 효과를 기대할 수 있다고 생각한다. 게다가 식물체 재배는 향후 2008년 발효될 기후변화협약을 통해 탄소배출권과 관련된 국가적인 권리 확보 차원에서 매우 중요하다고 여겨진다.

셋째, 신규 살충원제를 등록하는데 소요되는 비용은 미국의 경우 250,000달러를 쉽게 초과할 수 있으며 심지어 2백만 달러를 초과하기도 한다. 그러나 최근 들어 이러한 비용에 대한 기업 부담을 줄여주기 위해 미국을 비롯한 캐나다에서는 neem과 같은 식물체 추출물의 복합물(mixture)에 대한 허가를 보다 간소화하기 시작하였다(Isman, 1997). 식물성 살충제를 기존 화학 합성제들과 동일한 품목으로 다루고 있는 현실에서 관련 연구자들의 보다 적극적인 연구를 통한 식물성 살충제의 안전성 및 유효성에 대한 과학적인 입증으로 위정자들의 정책적인 변화를 자연적으로 유도해야 할 것으로 본다. 또한 보다 현실적인 측면에서 보면, 식물체의 활성을 확인하기 위한 스크리닝 시 곤충을 이용한 생물검정에 의존하게 되는데, 이때 식물체 시료에 대한 스크리닝 목적이 급성독성을 보는데 초점이 맞춰져 있다는 점이다. 그러나 식물체와 곤충의 오랜 진화적인 시간에서 볼 때 이러한 접근법에는 한계가 있을 수 있다. 즉, 식물은 자신을 공격하는 식식성 곤충들(herbivores)의 섭식을 저해하거나 기피시킬 수 있는 물질들 역시 독성물질과 더불어 생산할 수 있기 때문이다. 따라서 어떤 연구자나 개발자가 생물검정 목적을 살충물질 개발에만 몰두하고 현재 사용되고 있는 유기 합성 살충제와 비슷한 결과를 예상한다고 한다면, 거의 어떤 식물체 시료도 이러한 생각을 부합시키지 못함을 깨닫게 될 것이다. 그러므로 다양한 곤충들을 이용한 체계적인 생물

검정법에 근간하여 식물성 살충제를 탐색하는 것이 올바른 접근이라 할 수 있다.

따라서 현재의 이러한 식물성 살충제 개발의 문제점들을 인식하고, 버섯파리의 생리학적 생태적 특성을 고려한 실용 가능한 식물체 후보군을 도출하는 것이 시급하다고 여겨진다. 식물체 정유는 이러한 식물성 살충제 산업화의 문제점을 극복할 수 있는 대안이며, 본 연구를 통해 도출된 1차년도 결과물들 중에 산업화 가능 후보군들이 확보되었다고 사료되어 향후 계속될 연구를 통해 약해 및 독성 등의 제반여건을 고려하여 산업화 할 수 있도록 참여기업과 적극적인 연구성과의 공유를 이뤄나갈 것이다.

제 3 절. 앞으로의 전망

기존에 개발된 버섯파리류 방제제들 대다수가 농업해충이나 위생해충을 방제하기 위해 개발된 약제들의 적용범위를 확대하여 사용하는 제제들이 대부분이기 때문에 신규 작용기작을 갖는 훈증형 타입의 물질이나 천연물 소재 개발이 절실히 요구된다. 이러한 연구를 통한 신규 살충원제들의 개발은 직간접적으로 화학합성 연구자들에게 모핵화합물로서 제공이 가능하여 관련된 산업기술의 발달에 기여할 수 있을 것이다. 또한 선택적인 저독성의 살충제를 개발함으로써 버섯내 무잔류로 버섯관련 제품류들의 안전성을 확보할 수 있고, 이용하는 소비자들에게 믿음을 줄 수 있는 버섯을 생산할 수 있게 됨으로써 결국 생산자인 농민들에게 보다 손쉬운 판매경로를 확보할 수 있는 부차적인 이득을 줄 수 있다. 게다가 본 연구를 통해 다양한 제형기술에 관한 연구를 함께 진행함으로써 비슷한 류의 천연물 개발 연구에 있어서 그 모태가 될 수 있는 여건을 마련해 줄 수 있다.

다년간의 노력에 의해서 많은 새로운 농약이 탄생되었지만 저항성 층의 출현, 환경에 대한 우려, 안전성 문제 등 때문에 새로운 농약의 탄생을 여전히 요구하고 있다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 적은 양의사용으로 고효성의 약효가 유지되고, 환경에 덜 피해를 주며, 안전성이 높은 새로운 농약이 기대되고 있는 것이 현재의 실정이다. 또한 저항성 층의 출현은 현재 사용되고 있는 화합물

로부터의 약효를 기대하기에 한계가 있기 때문에 새로운 작용기작을 갖는 화합물의 출현이 기대되고 있다. 한 품목의 신물질의 개발은 그들 유도체의 합성으로부터 다른 유용한 생물활성의 화합물의 탄생이 유도되기 때문에 신물질의 분자설계, 합성, 활성시험, 안전성연구, 실용화 등의 기술이 축적될 수 있다.

최근 농업에 있어서 가장 문제시 되고 있고 인건비 상승은 그 생산단가를 줄임으로써 상쇄가 가능하다고 판단할 때, 본 연구를 통해 얻어질 훈증형 물질은 기존의 살충제에 비해 보다 손쉽게 적용하고 처리할 수 있어 살충제를 처리하는데 소요되는 노동력 절감 효과를 기대할 수 있다. 뿐만 아니라 농약이 속하는 정밀화학 산업에 있어서 농약에 대한 국민들의 불신과 환경오염에 대한 우려를 최소화할 수 있는 종합적방제원(Integrated Pest Management)으로 활용될 수 있다.

제 4 절. 기술 도입의 타당성

미국과 캐나다의 벤처기업인 EcoSMART Technologies와 Mycotech Corporation은 식물체 정유에 근간한 살충제를 개발함으로써 급격히 성장한 기업이 되었는데, 이들은 cinnamon oil에 근간한 CinnamiteTM와 ValeroTM를 개발하였고 rosemary oil에 근간해서 제형화한 EcoPCOTM과 BiognicTM 그리고 HexacideTM을 개발하여 시판하고 있다. 그러나 선진국으로부터의 기술 도입보다는 우리나라의 천연물을 이용한 틈새시장을 공략하는 것이 타당하다. 또한 (주)내츄로바이오텍과 같이 제형화 기술을 가진 국내 기술도입이 필요하겠다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절. 연구 목표

방향성 한방식물체 60여종과 식물체 정유 100여종을 대상으로 버섯류에서 자주 발생하여 경제적인 피해를 가져오는 해충인 긴수염버섯파리와 털파리붙이 그리고 육묘장내에서 최근에 문제시되고 있는 작은뿌리파리에 대한 살충 또는 혼증활성물질을 분리·동정하여 그 활성본체를 규명하고 저독성의 선택적인 혼증제 또는 살충제를 개발 하였다.

제 2 절. 연구 내용

1. 식물체 확보

세신등을 포함하는 한방식물체 및 한약재 60여종은 서울 청량리 경동시장 한약방에서 구입하였고, thyme white oil을 포함한 100여종의 정유는 참여기업인 (주)내추로바이오텍을 통하여 구입하였다. 이들 식물체 및 한약재들을 건조시킨 후 마쇄하여 분말로 만들고 나서, 각각의 분말시료 50 g씩을 취하여 500 ml Erlenmeyer flask에 넣고, 메탄올 300 ml를 부어 잘 흔들어 준 후에 실온 암실하에 방치하였다. 2일 후 감압여과하고 회전진공농축기로 40℃에서 감압농축하여 메탄올 조추출물을 얻어 이것을 생물검정에 이용하였다. 연구에 이용한 한방식물체 및 한약재의 목록 및 수율 그리고 정유에 관한 정보를 표 1과 2에 제시하였다.

Table 1. Oriental medicines tested

Sample	Scientific name	Family name	Part	Yield
갈근	<i>Pueraria thunbergiana</i> Benth	콩과	Leguminosae	Ro 8.1
감국	<i>Chrysanthemum indicum</i> L.	국화과	Compositae	Fb 31.6
황백나무	<i>Phellodendron amurense</i> Ruprecht	운향과	Rutaceae	Fb -
계내근	<i>Galli stomachichum</i> Corium	평과	Phasianidae	- 1.5
초롱담	<i>Gentiana scabra</i> var. <i>buergeri</i> (Miq.) Max.	용담과	Gentianaceae	Ro -
백지	<i>Angelica dahurica</i> (Fisch.) Benth. et Hooker F.	산형과	Umbelliferae	Ro -
구맥	<i>Dianthus sinensis</i> L.	석죽과	Caryophyllaceae	Wp 7.6
율무	<i>Coix lachryma-jobi</i> var. <i>mayun</i>	벼과	Gramineae	Fr -
구절초	<i>Chrysanthemum zawadskii</i> var. <i>latilobum</i> kitamura	국화과	Compositae	Fb 12.6
귤피	<i>Citrus unshiu</i> Markovich	운향과	Rutaceae	B 33.4
나복자	<i>Raphanus sativus</i>	십자화과	Cruciferae	Se 7.5
진범	<i>Acomitum pseudo-laeve</i> var. <i>erectum</i>	미나리아재비과	Ranunculaceae	B -
대추	<i>Zizyphus jujuba</i> var. <i>inermis</i> Rehder	갈매나무과	Rhamnaceae	F 46.1
방풍	<i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turcz.) Schischk.	산형과	Umbelliferae	Ro -
독활	<i>Radix Araliae continentalis</i>	두릅나무	Araliaceae	Ro -
면화자	<i>Gossypium indicum</i> Lam.	아욱과	Malvaceae	Se 1.7
모맥	<i>Hordum sativum</i> Jess. var. <i>hexaastichon</i> Hack	벼과	Gramineae	Se 4.3
방기	<i>Stephania tetrandra</i> S. Moore	방기과	Menispermaceae	Ro
백굴채	<i>Chelidonium majus</i> L.	양귀비과	Papaveraceae	Wp 8.8
백모근	<i>Imperata cylindrica</i> (L.) P. Beauv. var. <i>major</i> (Nees) C. E. Hubb	벼과	Gramineae	Rh 29.0
백복령	<i>White Poria cocos</i>	구멍장이버섯과	Ployporaceae	Fg 3.5
황벽나무	<i>Phellodendron amurense</i> Rupr.	운향과	Rutaceae	En
대추씨	<i>Zizyphus jujuba</i> var. <i>inermis</i> Rehder	갈매나무과	Rhamnaceae	Se 17.4
상지	<i>Morus alba</i> L.	뽕나무과	Moraceae	Wp 5.9
사삼	<i>Codonopsis lanceolata</i>	초롱꽃과	Campanulaceae	Ro -
새삼씨	<i>Cuscuta japonica</i> Chois.	메꽃과	Convolvulaceae	Se 2.9
생지황	<i>Rehmannia glutinosa</i>	현삼과	Scrophulariaceae	Ro 16.7
서목태	<i>Rhynchosia Nolubilis</i>	콩과	Leguminosae	Se -
송화분	<i>pinus densiflora</i>	소나무과	Pinacea	Po 12.19
시호	<i>Bupleurum falcatum</i>	산형과	Umbelliferae	Wp 21.6
속새	<i>Equisetum hyemale</i> L.	속새과	Equisetaceae	Wp 1.4
한라봉	(<i>Citrus unshiu</i> - <i>Citrus sinensi</i>) - <i>Citrus reticulat</i> 3종 교잡	운향과	Rutacea	Fr 56.6
화피	<i>Prunus serotina</i>	장미과	Rosaceae	B -

(Continued)

Sample	Scientific name	Family name	Part	Yield
만삼	<i>Codonopsis pilosula</i> (Fr.) Nannf	초롱꽃과 Campanulaceae	Wp	-
야고등	<i>Polygonum multiflorum</i>	마디풀과 Polygonaceae	St	3.3
영지	<i>Ganoderma lucidum</i>	불노초과 Ganodermataceae	Wb	-
오갈피	<i>Canthopanax sessiliflorus</i> (Rupr. et Max.) Seem.	두릅나무과 Araliaceae	B	5.3
오미자	<i>Schizandra chinensis</i> (Turcz.) Baill.	목련과 Magnoliaceae	Fr	38.1
홍화	<i>Carthamus tinctorius</i> L.	국화과 Compositae	Fb	19.8
현자초	<i>Phaenosperma globosa</i> Munro.	벼과 Gramineae	Wp	10.4
원지	<i>Polygala tenuifolia</i> Willd.	원지과 Polygalaceae	Ro	21.3
위령선	<i>Clematis mandshurica</i>	미나리아재비과 Ranunculaceae	Ro	12.1
으름덩굴	<i>Akebia quinata</i>	으름덩굴과 Lardizabalaceae	Rh	5.9
하련초	<i>Eclipta prostrata</i> L.	국화과 Compositae	Wp	4.4
익모초	<i>Leonurus sibiricus</i> L.	꿀풀과 Labiatae	Wp	6.9
저두강	<i>Oryza sativa</i> L.	벼과 Gramineae	Se	21.4
전호	<i>Peucedanum praeruptorum</i> Dunn, <i>Peucedanum decursivum</i> (Miq.) Maxim	미나리아재비과 Ranunculaceae	Ro	7.4
죽여	<i>Phyllostachys nigra</i> (Lodd.) Munro var. <i>henonis</i> (Mitf.) Stapf ex Rendle	벼과 Gramineae	Rh	4.3
포도근	<i>Vitis vinifera</i> L.	포도과 Vitaceae	Ro	-
편축	<i>Polygonum aviculare</i> L.	마디풀과 Polygonaceae	Wp	4.0
토복령	<i>Smilax glabra</i> Roxb.	백합과 Liliaceae	Rh	8.7
석창포	<i>Acorus gramineus</i> Soland.	천남성과 Araceae	Rh	9.5
정향	<i>Eugenia carrophiolata</i> Thunb.	도금양과 Myrtaceae	Fb	37.8
대회향	<i>Illicium verum</i> Hook. Fil	목련과 Magnoliaceae	Fr	26.1
팔각향	<i>Cacalia roborowskii</i>	목련과 Magnoliaceae	R	27.5
마늘	<i>Allium scorodoprasm</i> L.	백합과 Liliaceae	F	10.1
고추	<i>Capsicum annuum</i> L.	가지과 Solanaceae	F	4.8
세신	<i>Asiasarum sieboldii</i>	취방울덩굴과 Aristolochiaceae	Wp	5.0

B, branch; Fg, fungi; , Fb, flower bud; Fr, fruit; L, leaf; Li, lignin; Rb, root bark; Rh, rhizome; Ro, root; Se seed; St, stem; Wp, whole plant; and Wb, Whole body

Table 2. Plant Essential Oils tested

Oil	Scientific name	Family	Part
Thyme White	<i>Thymus vulgaris</i>	Labiatae	L
Cade	<i>Juniperus oxycedrus</i>	Cupressaceae	W
Cardamone ceylon	<i>Elettaria cardamomum</i>	Zingiberaceae	F
Juniperberry	<i>Juniperus communis</i>	Cupressaceae	B
Caraway Seed	<i>Carum carvi</i>	Umbelliferae	Se
Tagetes	<i>Tagettes glandulifera</i>	Compositae	L
Chamomile Roman	<i>Anthemis nobilis</i>	Compositae	Fl
Sage	<i>Salvia officinalis</i>	Labiatae	L
Patchouly	<i>Pogostemon patchouli</i>	Labiatae	L
Bergamot	<i>Citrus bergamia</i>	Rutaceae	P
Geranium	<i>Pelargonium graveolens</i>	Geraniaceae	Fl
Lime Dis 5 Fold	<i>Citrus aurantifolia</i>	Rutaceae	P
Grapefruits	<i>Citrus paradisi</i>	Rutaceae	P
Clary Sage	<i>Salvia sclerea</i>	Labiatae	F
Bay	<i>Pimento racemosa</i>	Myrtaceae	L
Peppermint	<i>Mentha piperita</i>	Labiatae	F
Oregano	<i>Origanum vulgare</i>	Labiatae	L
Myrtle	<i>Myrtus communis</i>	Myrtaceae	L
Clove Leaf	<i>Eugenia caryophyllata</i>	Oleaceae	L
Eucalyptus	<i>Eucalyptus globulus</i>	Myrtaceae	L
Ylang Ylang	<i>Canaa odorata</i>	Annonaceae	Fl
Rosewood	<i>Aniba rosaeodora</i>	Lauraceae	W
Tangerine	<i>Citrus reticulata</i>	Rutaceae	Fl
Tea Tree	<i>Melaleuca tenifolia</i>	Myrtaceae	L
Cedarwood	<i>Cedus atlantica</i>	Cupressaceae	W
Lemon Eualyptus	<i>Eucalyptus citriodora</i>	Myrtaceae	L
Wormwood	<i>Artemesia absinthium</i>	Compositae	W
Frankincense	<i>Boswellia carterii</i>	Burseraceae	Re
Rosemary	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Labiatae	Fl
Black Pepper	<i>Piper nigrum</i>	Piperaceae	F
Palmarosa	<i>Cymbopogon martini</i>	Gramineae	G
Petitgrain	<i>Citrus aurantium</i>	Rutaceae	L
Tyme Red	<i>Thymus vulgaris</i>	Labiatae	L
Mandarin	<i>Citrus reticulata</i>	Rutaceae	P

(Continued)

Oil	Scientific name	Family	Part
Fir Needle	<i>Abies alba</i>	Pinaceae	C
Marjoram	<i>Thymus masticina</i>	Labiatae	L
Lemon Grass	<i>Cymbopogon citratus</i>	Gramineae	L
Pennyroyal	<i>Mentha pulegium</i>	Labiatae	L
Vetiver Haiti	<i>Vetivera zizanooides</i>	Gramineae	G
Lemon 10 Fold	<i>Citrus limonum</i>	Rutaceae	P
Spearmint	<i>Mentha spicata</i>	Labiatae	F
Clove Bud	<i>Eugenia caryophyllata</i>	Oleaceae	B
Pimento Berry	<i>Capsicum annuum</i> var. <i>angulosum</i>	Solanaceae	F
Ginger	<i>Zinger officinalis</i>	Zingiberaceae	R
Nutmeg	<i>Myristica fragrans</i>	Myristicaceae	F
Lanvender	<i>Lavendula hybrida</i>	Labiatae	Fl
Bitter Orange	<i>Citrus aurantium</i>	Rutaceae	P
Orange	<i>Citrus sinensis</i>	Rutaceae	P
Chypress	<i>Cupressus sempervirens</i>	Cupressaceae	T
Sandalwood	<i>Santalum album</i>	Santalaceae	W
Basil	<i>Ocimum basilicum</i>	Labiatae	Fl
Almond Oil Sweet	<i>Prunus amygdalus</i> / <i>Prunus</i> <i>communis</i>	Rosaceae	K
Angelica Root	<i>Angelica archangelica</i> L.	Umbelliferae	R
Armoise	<i>Artemesia vulgaris</i>	Compositae	
Amyris	<i>Amyris balsamifera</i> L.	Rutaceae	W
Aniseed	<i>Pimpinella anisum</i> L. <i>Barosma betulina</i> Bartl. et	Umbelliferae	Se
Buchu Leaf	Wendl., <i>B. crenulata</i> (L.) Hook. or <i>B. serratifolia</i> Willd.	Rutaceae	L
Dillweed	<i>Anethum graveolens</i>	Umbelliferae	We
Calamus	<i>Acorus calamus</i>	Araceae	Rh
Cananga	<i>Cananga odorata</i> Hook. f. and Thoms.	Annonaceae	Fl
Carrot Seed	<i>Daucus carota</i> L.	Umbelliferae	Se
Cascarilla Bark	<i>Croton eluteria</i> Benn.	Euphorbiaceae	P
Cedarleaf	<i>Thuja plicata</i>	Cupressaceae	L
Cedarwood	<i>Thuja orientalis</i>	Cupressaceae	W
Cedarwood	<i>Juniperus Mexicana</i>	Cupressaceae	W

(Continued)

Oil	Scientific name	Family	Part
Cedarwood	<i>Juniperus virginiana</i>	Cupressaceae	W
Celery Seed	<i>Apium graveolens</i>	Umbelliferae	Se
Cinnamon Bark	<i>Cinnamomum zeylancium</i>	Lauraceae	P
Coriander Herb	<i>Coriandrum sativum</i>	Umbelliferae	Se
Davana	<i>Artemisia pallens</i> wall.	Compositae	Fl
Galbanum	<i>Ferula galbaniflua</i>	Apiaceae	Re
Guaiacwood	<i>Bulnesia samienti</i>	Zygophyllaceae	W
Helichrysum	<i>Helichrysum italicum</i>	Compositae	Fl
Howood	<i>Cinnamomum camphora</i>	Lauraceae	
Hyssop	<i>Hyssopus officinalis</i>	Lamiaceae	L,B
Lavandin Grosso	<i>Lavandula angustifolia</i>	Labiatae	L
Litsea Cubeba	<i>Litsea cubeba</i>	Lauraceae	F
Lovage Root	<i>Levisticum officinale</i>	Apiaceae	R
Melissa	<i>Melissa officinalis</i>	Lamiaceae	B
Myrrh	<i>Commiphora myrrha</i>	Burseraceae	R
Neroli	<i>Citrus aurantium</i>	Rutaceae	Fl
Niaouli	<i>Melaleuca quinquenervia</i>	Myrtaceae	L
Origanum	<i>Origanum syriacum</i>	Labiatae	L
Parsley Herb	<i>Petroselinum sativum</i>	Umbelliferae	L
Parsley Seed	<i>Petroselinum sativum</i>	Umbelliferae	Se
Mace	<i>Myrsica fragrans</i>	Annonaceae	H
Pine Needle	<i>Pinus sylvestris</i>	Pinaceae	L
Rose	<i>Rosa damascena</i>	Rosaceae	Fl
Sassafras	<i>Sassafras officinale</i>	Lauraceae	R
Savory	<i>Satureja montana</i>	Lamiaceae	L
Tarragon	<i>Artemisia dracunculus</i>	Compositae	L
Valerian	<i>Valeriana officinalis</i>	Valerianaceae	Rh
Wintergreen	<i>Gaultheria procumbens</i>	Ericaceae	L
Coriander	<i>Coriandrum sativum</i>	Umbelliferae	F
Citronella Java	<i>Cymbopogon nardus</i>	Gramineae	L
Yarrow	<i>Achillea Millefolium</i>	Compositae	L

B, branch; Fg, fungi; , Fb, flower bud; Fr, fruit; L, leaf; Li, lignin; Rb, root bark; Rh, rhizome; Ro, root; Se seed; St, stem; Wp, whole plant; and Wb, Whole body

2. 공시충 확보 및 계대사육

경기도 가평에 있는 (주)이우에서 봉지재배를 하는 농가를 방문하여 실제 버섯재배상에 날아다니는 수종의 버섯파리를 채집하였다. 또한 강원도 홍천에 병재배를 하는 청량버섯농원에서 병재배시 발생하는 지꺼기와 재배하고 버린 버섯 배지에 발생하고 있던 버섯파리 수종을 채집하였다. 가평에서 채집한 결과 *Mycophila* sp. 1종 및 긴수염버섯파리를 채집할 수 있었다. 홍천에서는 털파리붙이가 발견되어 계대사육을 시작하였다. 이들 3종을 계대사육한 결과 털파리붙이의 생활환이 가장 짧고, 개체군도 가장 빨리 증가하는 것을 알 수 있었다. 털파리붙이는 약제에 노출되지 않은 3세대 이상을 계대사육한 후 실제 검정에 이용하였다. 긴수염버섯파리의 경우도 마찬가지로 털파리붙이에 비해 그 개체군의 증가가 뚜렷하지 않았으나 시일이 지남에 따라 생물검정에 필요한 개체군을 유지할 수 있었다. 그러나 *Mycophila* sp. 의 경우 그 계대사육에 실패했으며, 또한 개체군의 크기를 증가시키는데도 많은 어려움이 있었다. 따라서 이들은 봉지재배시 실제 버섯상에 채집하여 바로 사용하는 방법을 사용해야 할 것으로 여겨진다.

버섯파리를 실내조건에서 사육하기 위해 먼저 강원도 홍천의 청량버섯농원에서 액체종균(춘추2호)과 느타리 병 재배 시 발생하는 지꺼기를 수거하여 버섯파리 배지로서 활용하였다. 그리고 실제 판매되고 있는 느타리버섯으로부터 PDA(potato extract agar)상에 종균을 분리 농촌진흥청에서 보고된 느타리버섯 액체종균 배양조건으로 배양하여 다시 PDA 배지에 접종한 후 버섯파리사육 및 생물검정에 이용하였다. 그러나 버섯 재배 시 발생하는 부산물을 이용한 경우 버섯파리 접종 시 산란유무, 유충의 출현 등을 확인하기가 어렵고, 개체군을 관리하기가 어려운 관계로 PDA 배지를 활용하는 방안으로 실내사육을 실시하였다. 먼저 PDA 배지에 액체종균을 접종하여, 3~5일 정도 22 °C, 60% 이상의 습도를 유지하면서 암실환경에서 배양한 후, 16h:8h (L:D) 조건으로 버섯파리 성충을 접종하여 산란과 섭식을 유도했다. 페트리디쉬 상에 성충이 발생하면 다시 흡충관으로 잡아 새로운 배지로 옮겨주어 개체군을 유지하였다. 이러한 방법은 개체군의 관리가 쉽고 유충을 발견하기도 용이하였다.

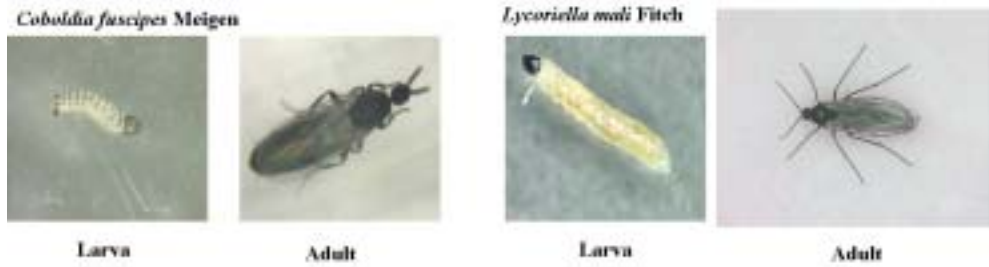


Figure 1. Insects tested.

3. 생물검정

본 연구에서 긴수염버섯파리 유충, 털파리붙이 유충 등 2종의 한국 느타리버섯 재배지에 발생하는 주요 파리류 해충을 공시충으로 이용하였다(그림 1). 긴수염버섯파리의 경우 부화된 지 9~12일정도 된 유충을 생물검정에 이용하였으며, 털파리붙이의 경우 부화한지 5~8일정도 된 개체를 생물검정에 이용하였다. 긴수염버섯파리에 대한 살충 및 훈증활성 검정은 여지확산법 및 배지혼합법을 이용하였는데, 그 효율성과 정확성을 고려했을 때 배지혼합법보다는 여지확산법을 실내검정에 사용하였다. 먼저 페트리디쉬에, 직경 1 cm의 코르크보러로 떼어낸, 버섯종균을 키운 PDA 배지를 넣고 공시충 10개체를 접종한 후 시료를 에탄올 50 ml에 녹여 여지(직경 42.5 mm)에 흡지 시킨 후 약 1분 30초 간 용매를 휘발 시킨 후 페트리디쉬에 넣고 뚜껑을 덮었다. 결과조사는 처리 24시간 후 혹은 48시간 후에 확인하였으며, 보정 살충율은 Abbott(1925)의 방법에 따라 산출하였다. 털파리붙이의 경우 그 개체수를 정확히 옮기는 것이 어려운 관계로 각 실험구당 10개체 이상의 충을 접종하는 방식을 이용하였으며 실험방법과 살충률 조사는 긴수염버섯파리와 동일하게 수행하였다. 그러나 털파리붙이의 경우 그 활성성이 매우 떨어져 48시간 후 증류수를 부어 그 생존을 검사하였다. 모든 실험은 4반복을 수행하였다(그림 2).

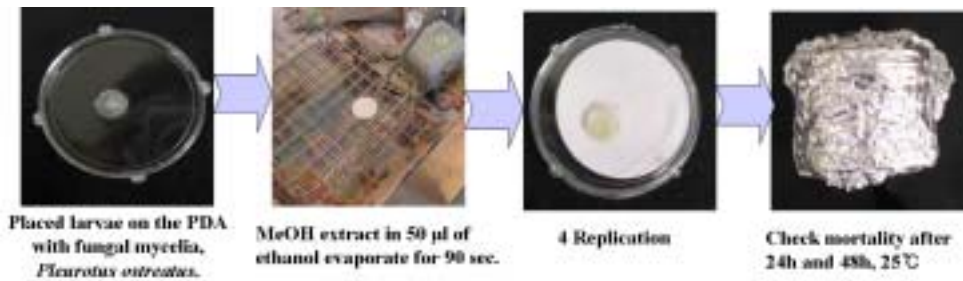
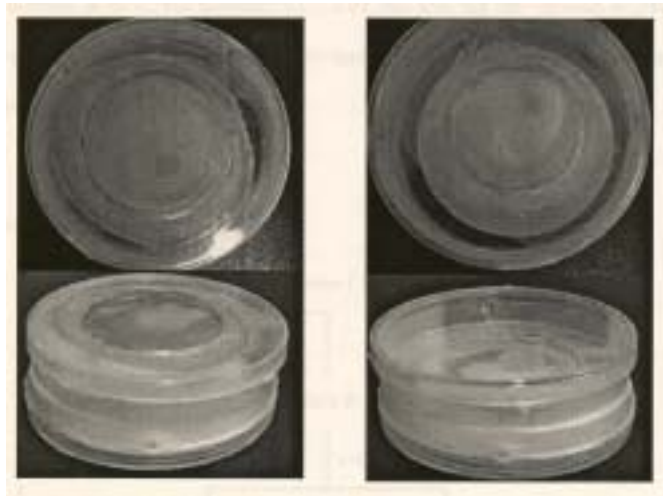


Figure 2. Direct contact and fumigation bioassays.

4. 작용기작

활성분체의 작용기작을 알아보기 위해서는 그림 3의 방법을 이용하였다.

긴수염버섯파리 유충을 이용하여 실험 식물체에 대한 훈증독성을 실험하였다. 2개의 페트리디쉬를 붙이고 지름 2.5cm 크기로 구멍을 만든 후 곤충은 지나가지 못하고 공기는 순환이 되도록 망을 씌워놓았다. 10마리의 긴수염버섯파리 유충은 먹이와 함께 위쪽에 놓는다. 지름 4.25 cm의 여과지에 각각 100%의 살충률을 보인 농도의 4배에 해당하는 약량을 50 ul 의 에탄올에 녹여 처리하여 망 아래쪽에 놓는다. 이것은 유충에 직접적으로 접촉되는 것을 막기 위함이다. 각각의 페트리디쉬는 뚜껑을 닫지 않아 구멍을 열어놓은 것(A)와 닫아서 훈증독성의 가능성을 실험한 것(B)으로 나누었다. 대조구는 50 ul 의 에탄올만을 처리하였다. 살충률은 처리한지 8시간 후에 20× 현미경을 이용하여 확인하였다. 이 실험은 가는 핀으로 부속지를 건드려 움직이지 않으면 죽은 것으로 간주하였다. 모든 처리구는 4반복을 하였고, 데이터는 Abbott's (1925) formula를 이용하여 처리하였다.



A

B

Figure 3. Vapor phase toxicity bioassay at open(A) and closed(B) container.

5. 활성성분의 분리 및 정제

가. 용매분획(Solvent fractionation)

스크리닝 대상 식물체들 중 살충활성이 우수한 식물체의 메탄올 조추출물 20 g을 증류수 800 ml에 녹여 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 그리고 물 등 용매의 극성에 따른 분리 원리를 이용해 검정용 분획층을 확보하였다. 특히 물층은 동결건조기(Vertis, USA)를 이용하여 진공감압하여 물을 제거하였으며, 헥산층, 클로로포름층, 에틸아세테이트층은 회전진공농축기(EYELA autojack NAJ-160, Japan)로 농축하였다.

나. 칼럼크로마토그래피(Column chromatography)

살충활성이 검증된 분획분 12 g을 칼럼크로마토그래피에 이용할 용매시스템에 맞춰 녹이거나 아세톤 30 ml에 녹여 30 g의 silica gel(70~230 mesh, Merck)과 함께 섞은 후 아세톤을 완전히 휘발시켜 시료를 실리카겔에 흡착하거나하여 크로마토그래피를 수행하였다. 충전제로는 본 연구실에서 확립한 유리제

column(φ 5.5×70 cm, PTEE end plate 부착)에 실리카겔(70~230 mesh, Merck) 500 g을 클로로포름으로 습식 충전 시킨 뒤, 상층부에 클로로포름으로 녹인 흡착시료를 10 ml 피펫으로 충전 하였다. 용출용매는 클로로포름/메탄올 혹은 헥산/에틸아세테이트 = 99/1, 97.5/2.5, 95/5, 90/10, 80/20 을 각 1,000 ml씩 순차적으로 흘렸고 마지막은 메탄올로써 용출시켰으며, 용출속도는 분당 10 ml, 분취량은 50 ml로 하였다. 각 분취시료는 박층크로마토그래피(TLC: Thin layer chromatography)에 의해 TLC plate(SIL G/UV₂₅₄, 0.25 mm, MACHEREY-NAGEL, Germany)상에 전개된 spot pattern을 UV hand lamp(UVGL-58, UV-254/366 nm, UVP Inc., USA)로 확인하였으며, 동일 spot으로 확인되면 서로 합쳐 감압농축한 후 상기의 방법에 따라 생물검정을 행하였다. 분리된 활성층은 HPLC 또는 GC를 이용하여 더욱 분리·정제하였고, 활성물질은 GC-MS를 통해 분석하였으며, 분석된 물질은 GC를 통해 co-injection을 하여 확인하였다.

6. 세신 추출물의 버섯 독성 실험

활성물질의 물리화학적 특성탐색을 통한 산업화 가능성 검토하기 위하여, 버섯에 대한 약해를 판정하기 위해 배지를 이용하여 대조구 대비 생산량 증감 유무를 판정하였다. 약해의 유무는 대조구 대비 생산량 증감을 보고 판정할 수 있다. 실험방법은 MIC(minimum inhibition concentration)법을 이용하였다. 25 ml의 PDA 배지에 1 ml의 Ethanol에 시료를 녹인 후 버섯 균균이 접종된 배지에 도달하고 인큐베이터에서 배양 후 버섯의 평균 생산량을 확인하였다. 실험 방법은 그림 4와 같다.

MIC (minimum inhibition concentration) :

25ml PDA media + 1ml Ethanol + X mg material

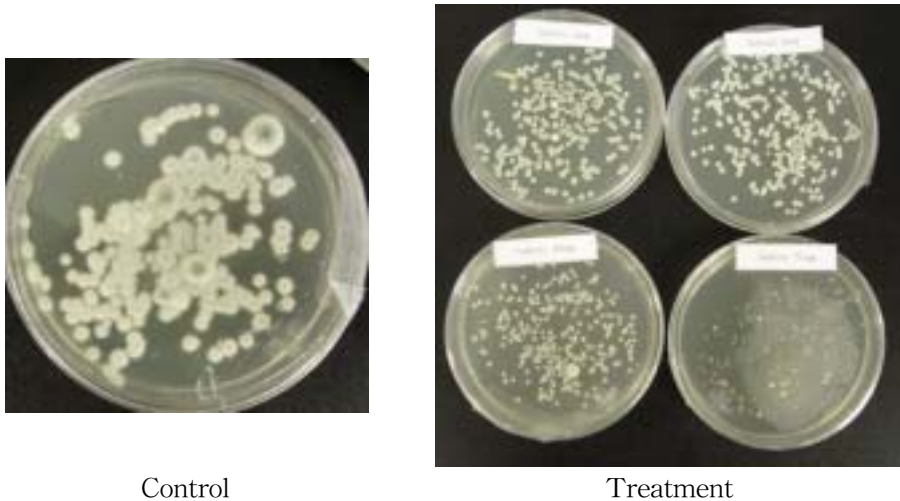


Figure 4. Method of MIC (minimum inhibition concentration).

그림과 같이 배양후의 대조구의 버섯 종균 생산량을 확인하고, 대조구과 비교하여 각 약제와 농도에 따른 종균의 생산을 비교하였다.

7. 지렁이에 대한 급성 독성 평가

지렁이에 대한 급성 독성 평가 시험 대상은 무게가 0.6~1.0 g 인 줄지렁이 *Eisenia fetida*를 선별하여 증류수로 체표면을 씻은 후 실험에 이용하였다. 처리 물질은 유효성분이 많이 들어있는 2종의 정유(coriander oil, basil oil), 3종의 화합물(methyl-eugenol, pentadecane, safrole)을 용매(에탄올)로 희석하여 3가지 농도(1.2 mg, 0.6 mg, 0.3 mg ml⁻¹)로 준비하였다. Petri dish(지름 50 mm × 높이 12 mm)에 직경 50 mm의 여지를 깔고, 이 여지 위에 농도별로 준비해 둔 물질을 각 100 ul씩 처리하였다. 이 때 여지 전체에 처리 물질이 골고루 스며들도록 하였다. 25분 동안 용매(에탄올)를 휘발시킨 후, 100 ul의 증류수를 여지에 처리하여 수분을 공급하고, 수분 공급 후, 준비해 놓은 실지렁이를 1마리 씩 넣고 뚜껑을 덮었다. 20-22 °C 항온기에 처리한 petri dish를 보관하였고, 48시간 후에 지렁이의 치사율을 조사하였다. 각 농도별로 10반복을 실시하였고, 무처리구는 용매로 이용된 에탄올을 100 ul 처리한 것과, 에탄올 없이 수분만 공급해 준 것

2가지로 처리구의 치사율과 비교하여 독성 평가에 이용하였다.

8. 통계처리

평균과 표준편차는 ANOVA 분석을 통해서 구했고, 각 평균 간의 유의성 검정은 Scheffe 검정을 하였다(SAS Institute, 2000).

9. 시제품 제작

버섯파리 유충에 대해 우수한 활성을 나타낸 basil oil과 coriander oil을 유효성분으로 하여 실제로 버섯 농가에서 활용할 수 있는 제형을 개발하기 위한 연구를 실시했다. 제형개발의 목적은 1)버섯 재배상에 직접 살포할 수 있는 유제와 2)오염된 균상과 버섯 재배 단지 전체를 훈증 소독을 할 수 있는 열원을 활용할 수 있는 훈증제 그리고 3)배지를 담은 버섯 배양 용기 등으로 활용할 수 있도록 이들 유효성분을 함유한 폴리머 소재 등의 제형을 개발하였다.

제 3 절. 연구 결과

1. 버섯파리에 대한 살충·훈증활성 식물체 탐색

가. 긴수염버섯파리 유충에 대한 살충활성

접촉독 생물검정을 이용하여 정유 0.07 mg cm⁻²을 긴수염버섯파리 유충에 처리하였을 때 100%의 살유충활성을 나타내는 정유를 표3에 나타내었다.

Table 3. Insecticidal activities of plant extracts against *L. mali* larvae, using the direct contact bioassay, exposed to 0.14 and 0.07 mg cm⁻²

Oil	Mortality (%) Mean±SE			
	0.14 mg cm ⁻²		0.07 mg cm ⁻²	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Thyme white	100	-	100	-
Cade oil	100	-	100	-
Cardamone ceylon	100	-	100	-
Juniperberry	100	-	100	-
Caraway seed	100	-	100	-
Tagettes oil	100	-	100	-
Chamomille roman	100	-	100	-
Coriander	100	-	100	-
Citronella java	100	-	100	-
Sage	100	-	100	-
Patchouli	100	-	100	-
Bergamot	100	-	100	-
Geranium	100	-	100	-
Lime dis 5F	100	-	100	-
Grapefruits	100	-	100	-
Clary sage	100	-	100	-
Bay	100	-	100	-
Peppermint	100	-	100	-
Oregano	100	-	100	-
Myrtle	100	-	100	-
Control	0	0	0	0

한방식물체의 긴수염버섯파리 유충에 대한 살충활성을 표 4와 5에 나타내었다. 특히 세신(*Asiasarum sieboldii*), 팔각향(*Cacalia roborowskii*), 대회향(*Foeniculum vulgare*), 사삼(*Codonopsis lanceolata*), 속새(*Equisetum hyemale*), 한라봉(*Citrus* sp.), 송화분(*Pinus densiflora*), 오갈피(*Canthopanax sessiliflorus*), 오미자(*Schizandra chinensis*)등에서 80% 이상의 높은 살충활성을 나타내었다.

Table 4. Larvicidal activities of plant extracts against *L. mali*, using the direct contact bioassay, exposed to 0.18 and 0.35 mg cm⁻²

Material	Mortality (%) Mean±SE	
	0.35 mg cm ⁻²	0.18 mg cm ⁻²
	24 h	24 h
<i>E. hyemale</i>	93±2.5	95±2.5
<i>E. carrophiolata</i>	100	-
<i>A. gramineus</i>	10	15±2.9
<i>A. quinata</i>	28±2.5	30±0.0
<i>A. scorodoprasm</i>	23±2.5	30±0.0
<i>A. sieboldii</i>	100	-
<i>B. falcatum</i>	0	10±0.0
<i>C. roborowskii</i>	100	-
<i>C. sessiliflorus</i>	100	-
<i>C. tinctorius</i>	100	-
<i>C. majus</i>	0	0
<i>C. zavadskii</i>	0	18±2.5
<i>C. indicum</i>	0	0
<i>Citrus spp.</i>	85±2.9	93±2.5
<i>C. mandshurica</i>	10±0.0	15±2.9
<i>C. unshiu</i>	0	10±0.0
<i>C. japonica</i>	0	0
<i>D. sinensis</i>	10±0.0	20±0.0
<i>E. prostrata</i>	0	0
<i>G. stomachichum</i>	10±0.0	18±2.5

Table 5. Larvicidal activities of orient medical plant extracts against *L. mali*, using the direct contact bioassay, exposed to 0.07 mg cm⁻²

Material	Mortality (%) Mean±SE	
	24 h	48 h
<i>G. indicum</i>	18±2.5	23±2.5
<i>H. sativum</i>	48±4.8	65±2.9
<i>I. vernum</i>	100	-
<i>I. cylindrica</i>	0	0
<i>L. sibiricus</i>	100	-
<i>M. alba</i>	15±2.9	23±2.5
<i>O. sativa</i>	25±2.9	30±0.0
<i>P. praeruptorum</i>	30±0.0	30±0.0
<i>P. globosa</i>	0	10 ± 0.0
<i>P. nigra</i>	5±2.9	13 ± 2.5
<i>P. densiflora</i>	88±2.5	93 ± 2.5
<i>P. tenuifolia</i>	93±2.5	100
<i>P. aviculare</i>	20±0.0	30 ± 0.0
<i>P. multiflorum</i>	0	18 ± 2.5
<i>P. cocos</i>	50±4.1	73 ± 2.5
<i>P. thunbergiana</i>	0	8 ± 2.5
<i>R. sativus</i>	23±2.5	23 ± 2.5
<i>R. glutinosa</i>	98±2.5	100
<i>S. chinensis</i>	88±2.5	95 ± 2.9
<i>S. glabra</i>	53±2.5	53 ± 2.5
<i>Z. jujuba</i>	70±0.0	73 ± 2.5
<i>Z. jujuba Seed</i>	70±0.0	73 ± 2.5

나. 털파리붙이 유충에 대한 살충활성

접촉독 생물검정법을 이용하여 한방식물체의 털파리붙이에 대한 살충활성을 표 6에 나타내었다. 백지(*Angelica dahurica*), 방기(*Stephania tetrandra*), 백복령(*White Poria cocos*), 생지황(*Rehmannia glutinosa*) 등은 0.14 mg cm⁻² 처리수준에서 100%의 높은 활성을 보였고 갈근(*Pueraria thunbergiana* Benth), 계내금(*Galli stomachichum Corium*) 구맥(*Dianthus sinensis*), 구절초(*Chrysanthemum zawadskii*), 나복자(*Raphanus sativus*), 방풍(*Saposhnikovia divaricata*), 독활(*Radix Araliae continentalis*), 면화자(*Gossypium indicum*), 모맥(*Hordum sativum*), 백굴채(*Chelidonium majus*), 상지(*Morus alba*), 야교등(*Polygonum multiflorum*) 등 또한 80%이상의 높은 살충 활성을 나타내었다. 활성의 정도는 식물체에 따라 매우 다양하게 나타났다.

Table 6. Insecticidal activities of plant extracts against *C. fuscipes* larvae, using the direct contact bioassay, exposed to 0.14 mg cm⁻²

Test material	n	Mortality (%) Mean±SE	
		24 h	48 h
<i>P. thunbergiana</i>	70	98±2.5	98±2.5
<i>C. indicum</i>	86	16±5.9	16±5.9
<i>P. amurense</i>	50	42±8.1	46±9.2
<i>G. stomachichum</i>	56	94±4.7	95±5.0
<i>G. scabra</i>	72	4±2.3	29±10.5
<i>A. dahurica</i>	83	100	-
<i>D. sinensis</i>	41	88±7.5	95±2.9
<i>C. lachryma-jobi</i>	62	11±7.0	18±8.4
<i>C. zawadskii</i>	47	96±2.7	100
<i>C. unshiu</i>	50	45±1.4	65±13.8
<i>R. sativus</i>	73	96±1.4	97±1.6
<i>A. pseudo-laeve</i>	82	98±1.5	98±1.5
<i>Z. jujuba</i>	62	29±7.4	41±4.5
<i>S. divaricata</i>	54	91±3.9	94±4.3
<i>R. a continentalis</i>	66	90±5.1	96±2.9
<i>G. indicum</i>	66	92±5.9	95±4.8
<i>H. sativum</i>	82	88±4.9	88±3.3
<i>P. nigra</i>	80	6±0.3	15±1.5
<i>E. carrohillata</i>	71	100	-
<i>I. vernum</i>	82	100	-

(Continued)

Test material	n	Mortality (%) Mean±SE	
		24 h	48 h
<i>S. tetrandra</i>	64	100	-
<i>C. majus</i>	61	84±5.9	87±7.6
<i>I. cylindrica</i>	64	49±16.8	64±13.6
<i>W. Poria</i>	68	100	-
<i>P. amurensis</i>	58	35±20.5	35±20.5
<i>Z. jujuba</i>	87	2±1.5	4±2.6
<i>M. alba</i>	59	87±7.0	87±8.0
<i>C. lanceolata</i>	74	68±16.4	68±16.4
<i>C. japonica</i>	71	0	0
<i>R. glutinosa</i>	68	100	-
<i>R. Nolubilis</i>	68	22±3.7	22±3.7
<i>E. hyemale</i>	55	13±10.5	36±22.8
<i>Citrus</i> spp.	61	19±4.9	39±6.5
<i>P. densiflora</i>	74	34±3.5	61±7.4
<i>B. falcatum</i>	64	16±1.6	13±2.5
<i>P. serotina</i>	75	2±1.8	6±3.0
<i>C. pilosula</i>	61	9±3.5	80±7.7
<i>P. multiflorum</i>	62	89±6.5	83±10.5
<i>G. lucidum</i>	73	73±4.8	79±8.1
<i>C. sessiliflorus</i>	74	99±1.5	-
<i>S. chinensis</i>	77	10±4.6	12±3.2
<i>C. tinctorius</i>	57	12±11.8	12±11.6
<i>P. globosa</i>	78	94±3.4	95±2.3
<i>P. tenuifolia</i>	65	10±6.4	29±5.6
<i>C. mandshurica</i>	66	18±3.3	21±2.8
<i>A. quinata</i>	75	0	16±5.6
<i>E. prostrata</i>	73	100	-
<i>L. sibiricus</i>	87	5±3.3	24±7.2
<i>L. oryzae</i>	71	0±0.0	40±13.3
<i>P. praeruptorum</i>	71	4±1.4	15±5.6
<i>P. nigra</i>	78	4±4.3	12±5.6
<i>V. vinifera</i>	69	3±1.4	18±1.4
<i>P. aviculare</i>	65	42±3.7	70±4.3
<i>S. glabra</i>	65	42±1.2	70±1.5
<i>A. scorodoprasm</i>	61	18±1.1	23±1.7
<i>A. sieboldii</i>	74	100	-
Control	80	1±1.0	3±1.5

2. 살충 활성물질

버섯파리에 대해 살충활성이 높게 나타난 식물체를 대상으로 하여 그 활성물질을 탐색하기 위한 연구를 수행하였다. 특히 세신의 경우 활성을 가지고 있던 한방식물체중 높은 활성을 나타내어 활성본체 탐색을 수행하였다.

가. 세신(*Asiasarum sieboldii*)

세신의 메탄올 조 추출물은 긴수염버섯파리 유충에 대해 0.07 mg cm^{-2} 에서 100%의 살충활성을 나타내었다. 따라서 이에 대해 조추출물의 분리와 정제를 통해서 그 활성본체를 탐색하기 위한 연구를 수행하였으며, 먼저 추출물을 용매의 극성을 이용하는 순차분획을 하였다(그림 5).

세신 메탄올 조추출물 20 g을 증류수 800 ml에 녹여 분획여두에 넣고, 헥산을 800 ml 첨가하여 2시간 방치 후에 헥산분획을 얻었다. 이 과정을 두 번 반복하여 헥산분획 1600 ml을 얻었다. 남은 물 800 ml에 클로로포름 800 ml을 넣어 클로로포름분획을 얻었고, 헥산분획과 같이 두 번 반복하였다. 마지막으로 에틸아세테이트를 이용하여 에틸아세테이트분획 1600 ml을 얻었다. 얻어진 모든 용매층은 감압농축기를 이용하여 농축하였다. 이 분획과정을 여러 번 반복하여 세신 메탄올 추출물 65 g에서 헥산분획 20 g, 클로로포름분획 6 g, 에틸아세테이트 3 g, 그리고 물 36 g을 얻었고, 이 분획물들을 생물검정에 이용하였다.

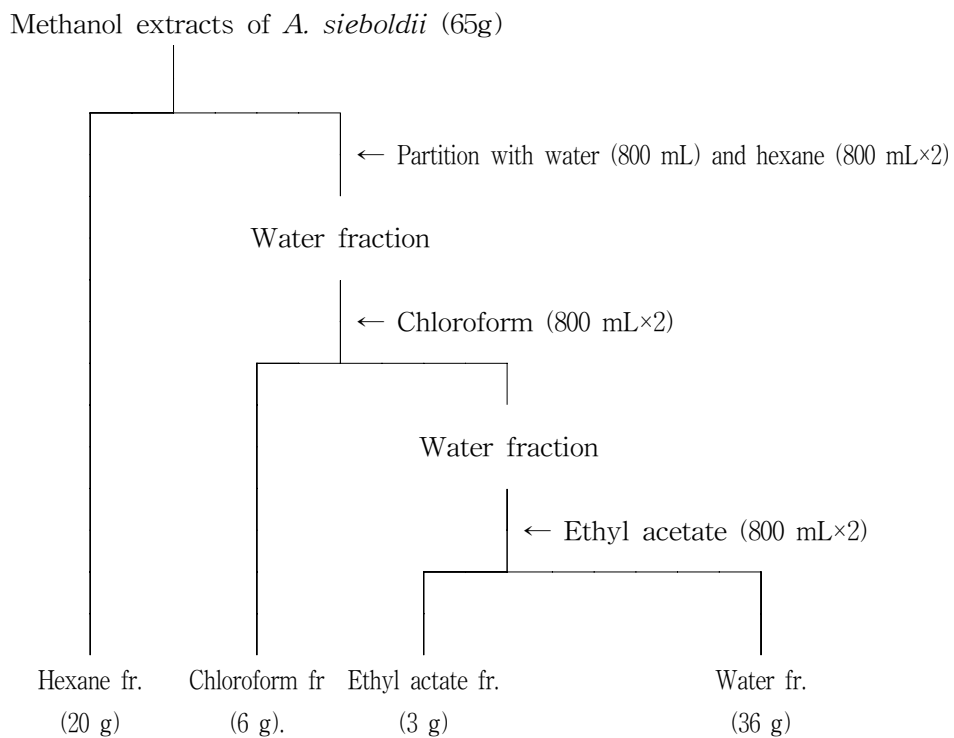


Figure 5. Procedures of solvent partitions for methanol extract of *A. sieboldii* whole plants.

4종 용매 분획물에 대한 살충활성을 표 7에 나타내었다. 헥산 분획은 0.02 mg cm⁻²에서 100% 살충활성을 나타내었다. 클로로포름분획은 0.07 mg cm⁻²과 0.04 mg cm⁻²에서 각각 93%과 40% 살충활성을 나타내었다. 에틸아세테이트분획은 0.07 mg cm⁻²에서 40%의 살충활성을 보였고, 물 분획물은 같은 농도에서 살충활성을 보이지 않았다.

Table 7. Larvicidal activities of each solvent fractions form methanol extract of *A. sieboldii* against *L. mali* using the direct contact bioassay

Fraction	Dose(mg cm ⁻²)	Mortality (%) (\pm SE) ^a
Methanol	0.07	100a
Hexane	0.07	100a
	0.04	100a
	0.02	100a
Chloroform	0.07	93 \pm 4.8b
	0.04	48 \pm 4.8b
Ethyl Acetate	0.07	40 \pm 9.1b
Water	0.07	0c
Control		0c

^a Means within a column followed by the same letter are not significantly different (P = 0.05, Scheffe's test) (SAS, 1989). Mortalities were transformed to arcsine square root before ANOVA. Means (\pm SE) of untransformed data are reported.

Hexane fraction에서 가장 높은 활성을 보였기에 이를 open column chromatography와 TLC를 통해 더욱 분리 정제하였다. 분리하는 방법은 그림 6에 나타내었다. Hexane fraction은 H1, H2, H3, H4층으로 구분하였다.

H4를 제외한 3층에서 0.04 mg cm^{-2} 의 농도에서 100%의 살충률을 나타내었다. 이중 H1을 다시 5개의 층으로 구분하였다. H1을 분리한 결과 H5를 제외하고 0.02 mg cm^{-2} 의 농도에서 H11, H12, H13는 100%의 살충률을 H14는 95%의 살충률을 나타내었다(표 8).

Hexane (12 g)

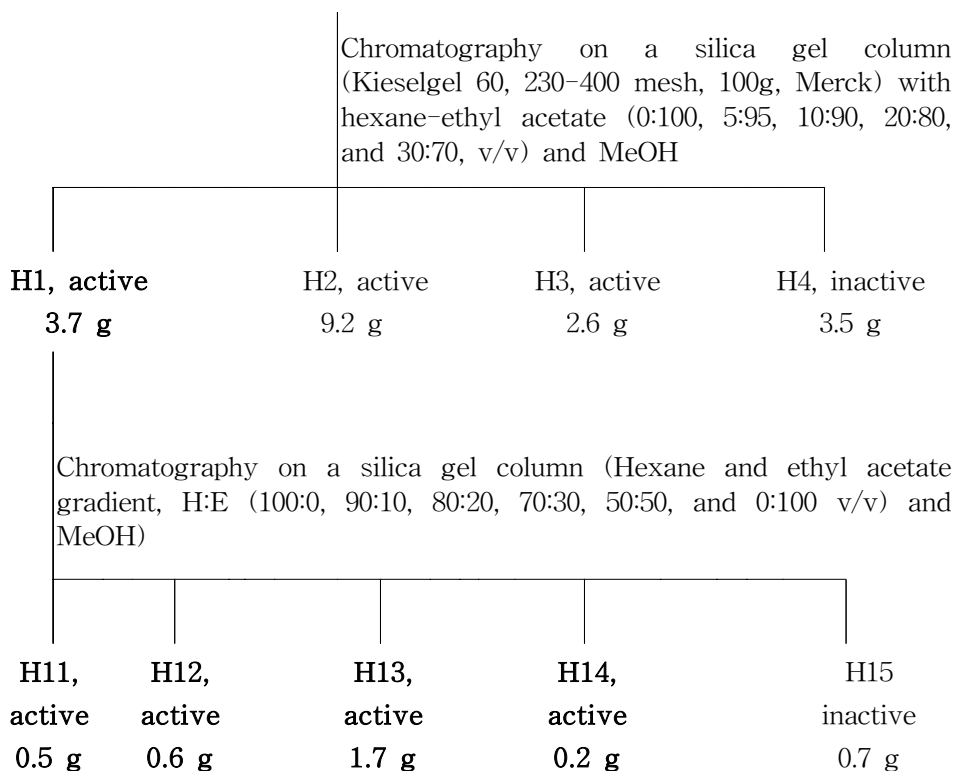


Figure 6. Isolation procedure of *A. sieboldii* hexane fraction.

Table 8. Larvicidal activities of each solvent fractions form methanol extract of *A. sieboldii* and active compounds against *L. mali* using direct contact and fumigation bioassays

Fraction	Dose(mg cm ⁻²)	Mortality (%) (±SE)
H1	0.07	100a
	0.04	100a
	0.02	100a
	0.01	100a
H2	0.07	100a
	0.04	100a
	0.02	100a
	0.01	100a
H3	0.07	100a
	0.04	100a
	0.02	98±2.5a
	0.01	18±4.8c
H4	0.07	53±4.8b
H11	0.04	100a
	0.02	100a
H12	0.04	100a
	0.02	100a
H13	0.04	100a
	0.02	100a
H14	0.04	100a
	0.02	95±2.9a
Control		0d

세신의 경우 그림 6에서 보는 바와 같이 H11~H14의 4개의 분획이 긴수염 버섯파리에 대해 높은 살충활성을 나타내었으나, 이들 분획의 높은 휘발성으로 인하여 GC-MS를 통해 활성물질을 동정하였다. 각각의 활성분획에 대한 GC-MS 데이터는 그림 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 그리고 16에 나타내었으며 각각에 대한 데이터는 표 9, 10, 11, 12, 13, 14, 그리고 15에 나타내었다.

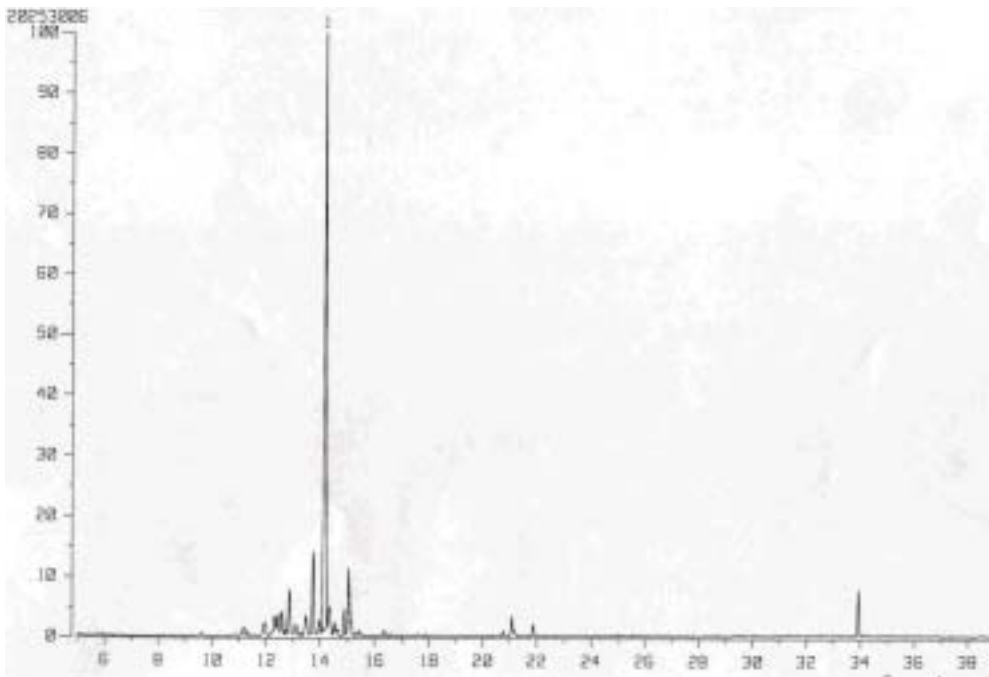


Figure 7. GC spectra of the H11.

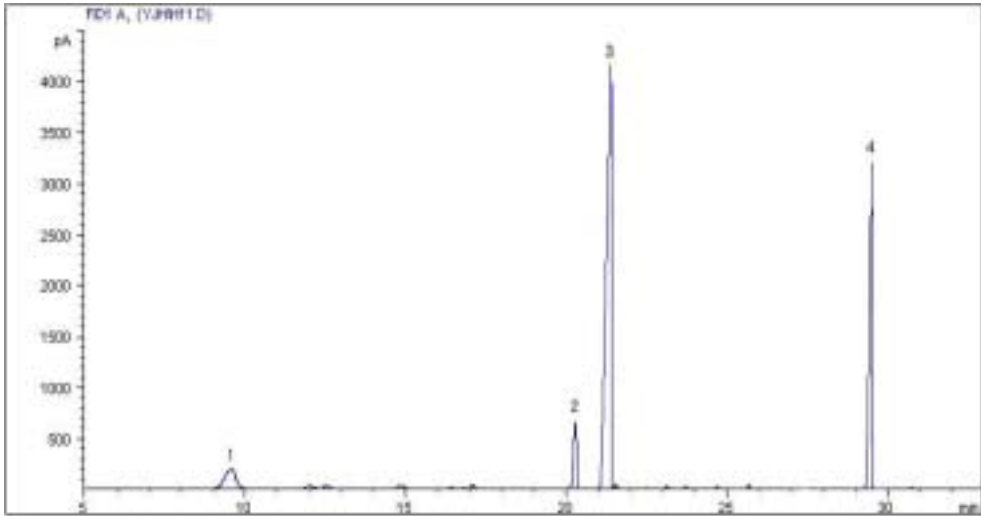


Figure 8. Gas-chromatography diagram of H11 fraction.

표9 에서 보는 바와 같이 H11에서는 주요 화합물은 n-pentadecane으로서 61.3% 였다.

Table 9. Chemical constituents of H11 fraction by GC-MS analysis

Peak#	Compound2	RT(min)	Area %
1	-	9.573	6.3
2	-	20.291	5.5
3	n-Pentadecane	21.401	61.3
4	-	29.517	26.9

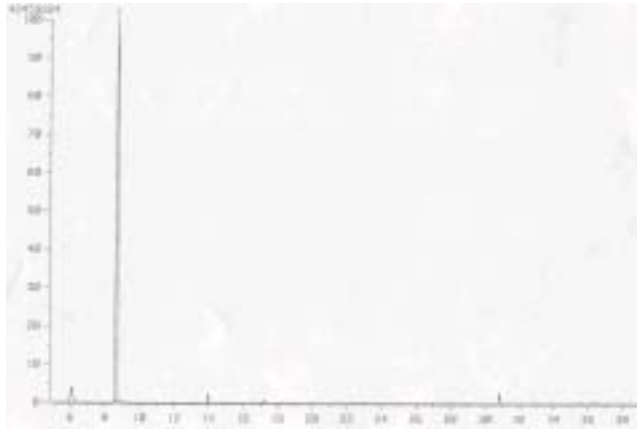


Figure 9. GC spectra of the H12.

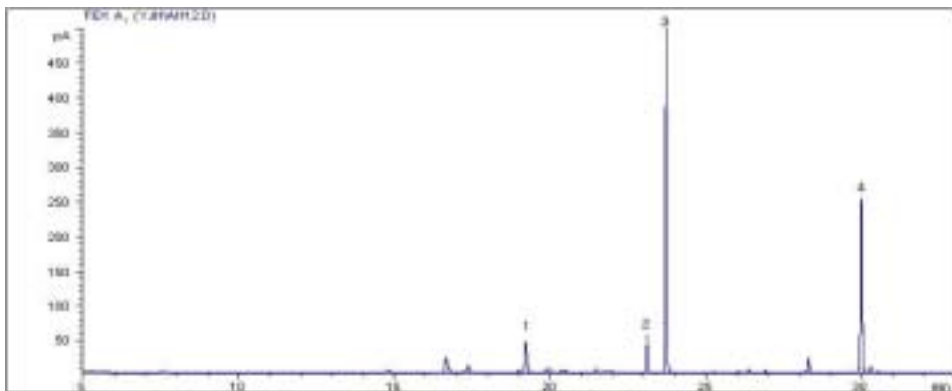


Figure 10. Gas-chromatography diagram of H12 fraction.

표10 에서 보는 바와 같이 H12에서는 주요 화합물은 Safrole로서 60.2% 였다.

Table 10. Chemical constituents of H12 fraction by GC-MS analysis

Peak#	Compound	RT(min)	Area %
1	-	19.206	6.3
2	-	23.115	5.7
3	Safrole	23.733	60.2
4	-	29.99	27.8

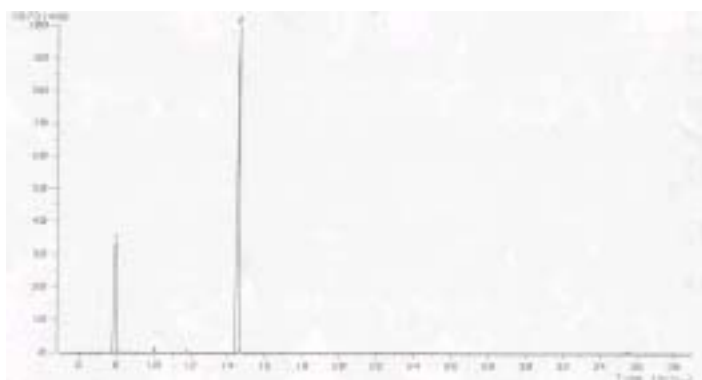


Figure 11. GC spectra of the H13.

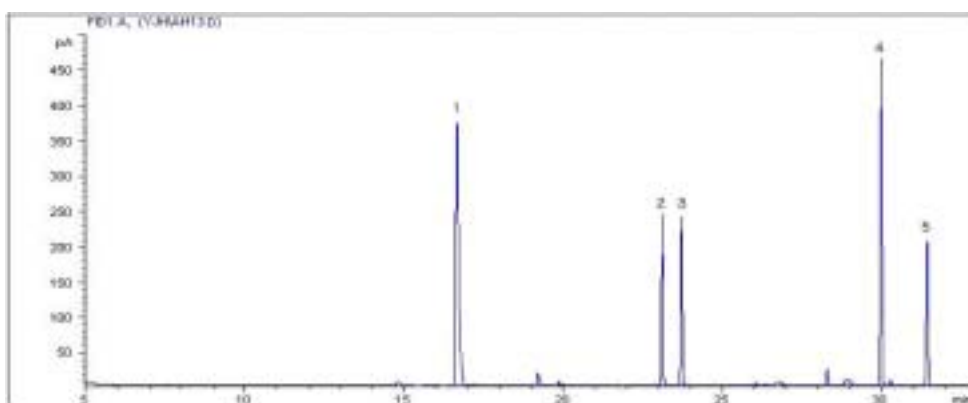


Figure 12. Gas-chromatography diagram of H13 fraction.

H13은 표 11에서 보는바와 같이 Eucarvone, Safrole, Myrisiticin이 각각 37.2%, 12.5%, 12.9% 였다.

Table 11. Chemical constituents of H13 fraction by GC-MS analysis

Peak#	Compound	RT(min)	Area %
1	Eucarvone	16.768	37.2
2	-	23.176	12.2
3	Safrole	23.779	12.5
4	-	30.110	25.2
5	Myrisiticin	31.543	12.9

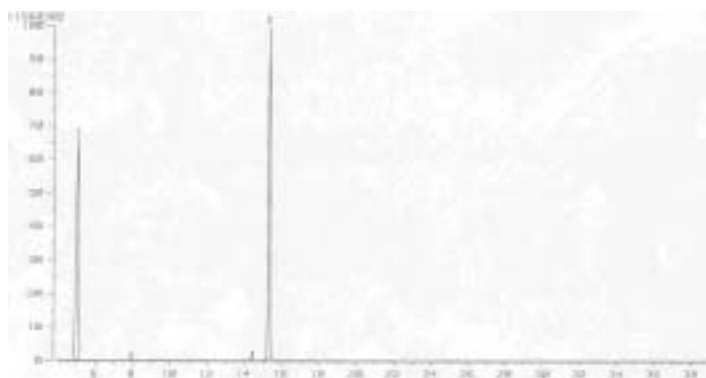


Figure 13. GC spectra of the H14.

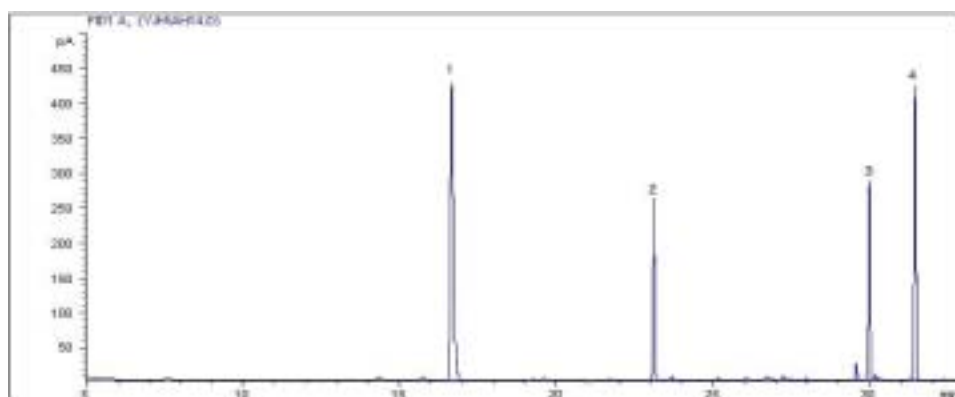


Figure 14. Gas-chromatography diagram of H14 fraction.

H14는 표 12에서 볼 수 있듯이 Eucarvone, Myrisiticin이 각각 45.0%, 25.9% 였다.

Table 12. Chemical constituents of H14 fraction by GC-MS analysis

Peak#	Compound	RT(min)	Area %
1	Eucarvone	16.652	45.0
2	-	23.119	13.2
3	-	29.990	15.9
4	Myrisiticin	31.462	25.9

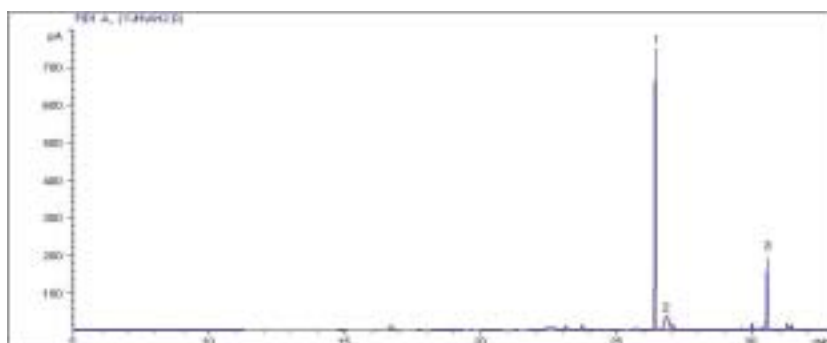


Figure 15. Gas-chromatography diagram of H2 fraction.

H2은 표 13에서 볼 수 있듯이 methyl-Eugenol, (Z)-Asarone이 각각 67.7%, 20.8% 였다.

Table 13. Chemical constituents of H2 fraction by GC-MS analysis

Peak#	Compound	RT(min)	Area %
1	methyl-eugenol	26.423	67.7
2	-	26.834	11.5
3	(Z)-Asarone	30.538	20.8

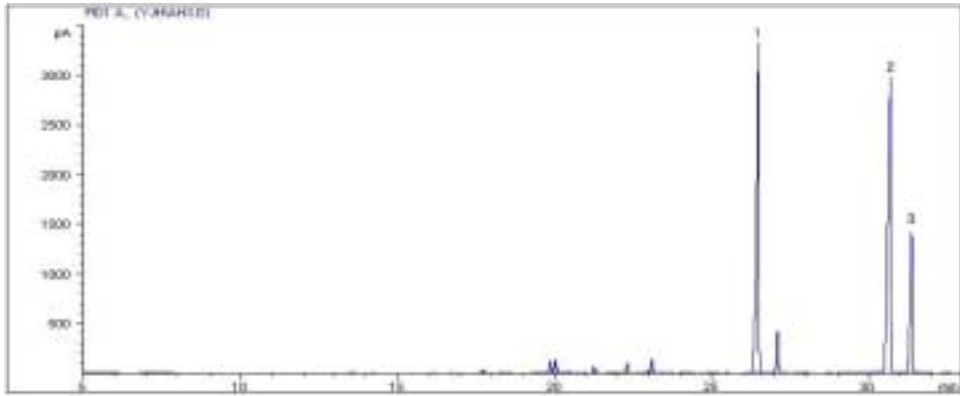


Fig 16. Gas-chromatography diagram of H3 fraction.

H3은 methyl-eugenol, (*Z*)-asarone이 각각 39.3%, 11.5% 였다.

Table 14. Chemical constituents of H3 fraction by GC-MS analysis.

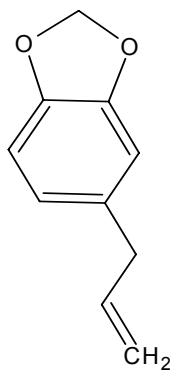
Peak#	Compound	RT(min)	Area %
1	methyl-Eugenol	26.507	39.3
2	(<i>Z</i>)-Asarone	30.699	11.5
3	-	31.37	15.1

표15는 H11와 H12는 거의 모두 *n*-pentadecane와 safrole이었다. H13와 H14의 경우 2가지의 주성분이 존재했는데 이들을 비교해보면 H13와 H14의 살충력의 차이를 유추할 수 있을 것으로 여겨진다. 즉 myristicin의 함량의 차이에 의해서 살충력의 차이가 발생한 것으로 유추할 수 있을 것이다. 또한, H2와 H3에서 보듯, 대부분이 methyl-eugenol, (Z)-asarone이었고, 이 두 물질이 살충과 관련되어 살충력이 발생되어진 것으로 여겨져, 이후 실험을 통해 증명하였다.

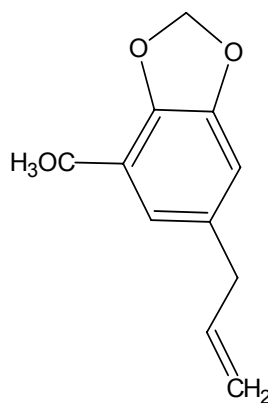
Table 15. Chemical constituents of each fractions derived from *A. sieboldii* identified by GC-MS

Sample	Peak #	Compound	RT	Area	Area %	Remark
H11	1	<i>n</i> -Pentadecane	14.18	8374.34	100	
H12	1	Safrole	8.69	26512.44	100	
H13	1	unknown	7.95	14455.61	23.86	1:2 = 1:3.19
	2	myristicin	14.61	46121.49	76.14	
H14	1	eucarvenol	5.09	5808.13	50.91	1:2 = 1:0.96
	2	myristicin	15.35	5599.95	49.09	

각각의 화학구조식은 그림 17에서 나타내었다.



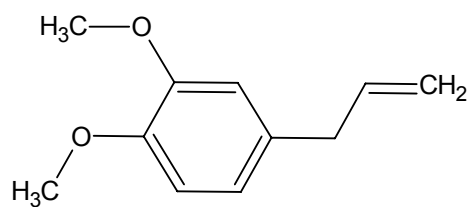
Safrole



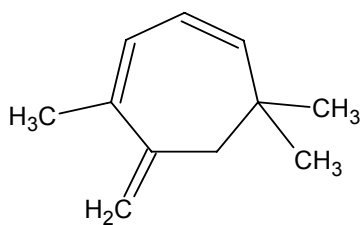
Myristicin



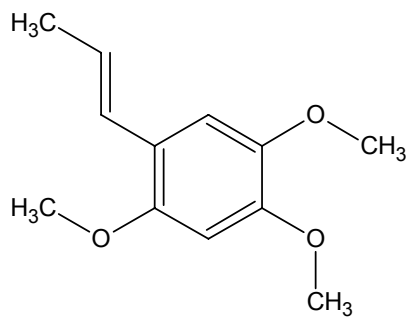
n-Pentadecane



methyl-Eugenol



Eucarvone



(Z)-Asarone

Figure 17. Structure of active compounds derived from *A. sieboldii* whole plant.

나. 화성성분의 살충효과

세신의 살충활성성분인 methyl-eugenol, myristicin 및 safrol의 긴수염버섯파리 유충에 대한 살충활성을 현재 긴수염버섯파리 유충 방제제로 널리 사용되고 있는 살충제 Benfuracarb와 Dichlorvos와 비교하였다(표 16). LD₅₀ 측정결과, methyl-eugenol의 경우 두 standard 물질보다는 조금 낮지만, 거의 유사한 LD₅₀ 값을 볼 수 있었고, myristicin과 safrole 역시 좋은 효과를 보여주었다.

Methyl-eugenol은 LD₅₀ 값이 1.46 ug cm⁻² 이었고, myristicine은 3.59 ug cm⁻², safrole은 2.03 ug cm⁻² 이었다. 이에 대조 살충제로 사용한 benfuracarb와 Dichlorvos는 각각 0.75, 0.10 ug cm⁻² 으로 나타났다.

Table 16. Toxicity of *A. sieboldii* derived compounds and synthetic insecticides against *L. mali* using the direct contact bioassay, exposed for 8 hr

Chemical ^a	n	Slope(±SE)	LD ₅₀ (µg cm ⁻²)	95%CL ^b
Methyl-eugenol	160	4.3 ± 0.75	1.46	1.22 - 1.70
Myristicin	200	3.9 ± 0.57	3.59	3.01 - 4.19
Safrole	160	4.2 ± 0.57	2.03	1.72 - 2.35
Benfuracarb	243	1.7 ± 0.25	0.75	0.47 - 1.02
Dichlorvos	242	1.6 ± 0.23	0.10	0.06 - 0.14

^a *A. sieboldii* whole plant derived compounds and synthetic pesticides which had larvicidal activity against *L. mali*.

^b CL, confidence limit.

세신의 살충활성성분인 methyl-eugenol, myristicin 및 safrol의 털파리 붙이 유충에 대한 살충활성을 현재 털파리붙이 유충 방제제로 널리 사용되고 있는 살충제 Benfuracarb와 Dichlorvos와 비교하였다(표 17). LD₅₀ 측정결과, methyl-eugenol의 경우 두 standard 물질보다는 조금 낮지만, 거의 유사한 LD₅₀ 값을 볼 수 있었고, myristicin과 safrole 역시 좋은 효과를 보여주었다.

Methyl-eugenol은 LD₅₀ 값이 2.33 ug cm⁻² 이었고, myristicine은 2.59 ug cm⁻², safrole은 4.96 ug cm⁻² 이었다. 이에 대조 살충제로 사용한 benfuracarb와 Dichlorvos는 각각 0.55, 0.11 ug cm⁻² 으로 나타났다.

Table 17. Toxicity of *A. sieboldii* derived compounds and synthetic insecticides against *C. fusciceps* using the direct contact bioassay, exposed for 8 hr

Material ^a	n	Slope(±SE)	LD ₅₀ (µg cm ⁻²)	95%CL ^b
methyl-Eugenol	161	2.9 ± 0.42	2.33	1.90 - 2.79
Myristicin	208	2.7 ± 0.35	2.59	2.10 - 3.11
Safrole	143	3.0 ± 0.46	4.96	4.08 - 6.11
Benfuracarb	176	1.6 ± 0.34	0.55	0.26 - 0.78
Dichlorvos	231	1.3 ± 0.23	0.11	0.07 - 0.16

^a *A. sieboldii* whole plant derived compounds and synthetic pesticides which had larvicidal activity against *L. mali*.

^b CL, confidence limit.

다. 작용기작

활성물질의 작용기작에 대한 현상학적 구명을 위해 methyl-eugenol, myristicin, safrole를 vapor phase toxicity bioassay를 시행하였고, 각각 open container와 close container에서 노출 시켜 시행한 결과, 표 18과 같은 결과를 얻을 수 있었다. 이상의 결과로부터, methyl-eugenol, myristicin, safrole은 모두 fumigant 작용에 의해 독성을 나타냄을 알 수 있었다.

Table 18. Fumigant activity of *A. sieboldii* whole plant-derived compounds and insecticides against *L. mali* using vapor phase toxicity bioassays, exposed 8 hr

Compounds	Dose (mg cm ⁻²)	Mortality(mean±SE,%)			
		n	A	n	B
Methyl-eugenol	0.017	40	100 ± 0.0a	40	0 ± 0.0b ^{***b}
Myristicin	0.07	40	97 ± 3.3a	40	0 ± 0.0b ^{***}
Safrole	0.035	40	100 ± 0.0a	40	0 ± 0.0b ^{***}
DDVP	0.009	40	100 ± 0.0a	40	0 ± 0.0b ^{***}
Benfuracarb	0.035	40	0 ± 0.0b	40	0 ± 0.0b

^aMethod A, vapor in closed containers; method B, vapor in open containers

^b ^{***}, Significant at $P = 0.001$, according to a paired t -test.

3. 3종 정유의 GC-MS에 의한 화합물 동정

버섯파리에 대해 살충화로성이 높게 나타난 essential oil을 대상으로 하여 그 활성물질을 탐색하기 위해 GC-MS를 통해 분석을 시행하였다.

가. Coriander(*Coriandrum sativum*)

Coriander의 GC-MS 분석 크로마토그램과 주요 성분들에 대한 결과를 하기 그림 18과 표 19에 제시하였다. Coriander는 linalool(79.1%)과 camphor(6.9%), terpinene(6.8%)이 주성분이었다.

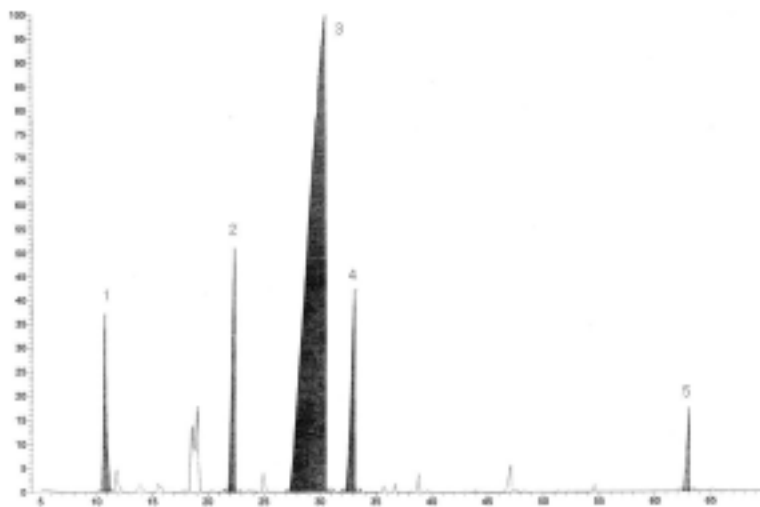


Figure 18. Gas-chromatography diagram of coriander oil.

Table 19. Chemical constituent of coriander oil by GC-MS analysis

Peak#	Compound	RT(min)	Area(%)
1	α -Pinene	10.79	4.9
2	ψ -Terpinene	22.35	6.8
3	Linalool	30.50	79.1
4	Camphor	33.06	6.9
5	Geranyl acetate	63.05	2.3

나. Myrtle(*Myrtus communis*)

Myrtle의 GC-MS 분석 크로마토그램과 주요 성분들에 대한 결과를 하기 그림 19과 표 20에 제시하였다. 미어틀은 pinene(53.2%)과 cineol(46.8%)이 주성분이었다.

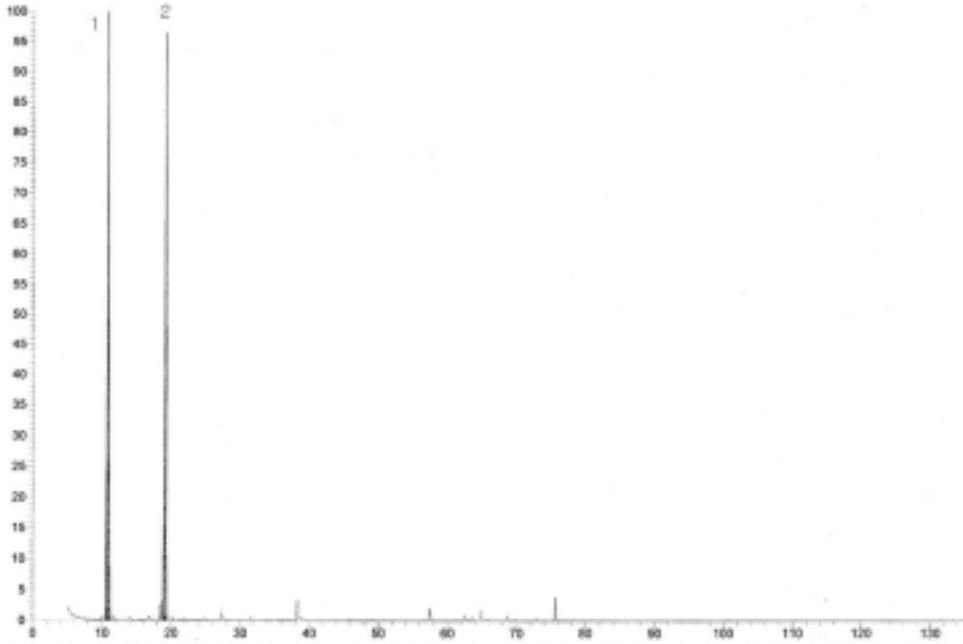


Figure 19. Gas-chromatography diagram of myrtle oil.

Table 20. Chemical constituent of myrtle oil by GC-MS analysis

Peak#	Compound	RT(min)	Area(%)
1	α -Pinene	10.74	53.2
2	Cineol	19.14	46.8

다. Sage(*Salvia officinalis*)

Sage의 GC-MS 분석 크로마토그램과 주요 성분들에 대한 결과를 하기 그림 20와 표 21에 제시하였다. 세이지는 cineol(13.7%), thujone(25.1%), camphor(25.3%)가 주성분이었다.

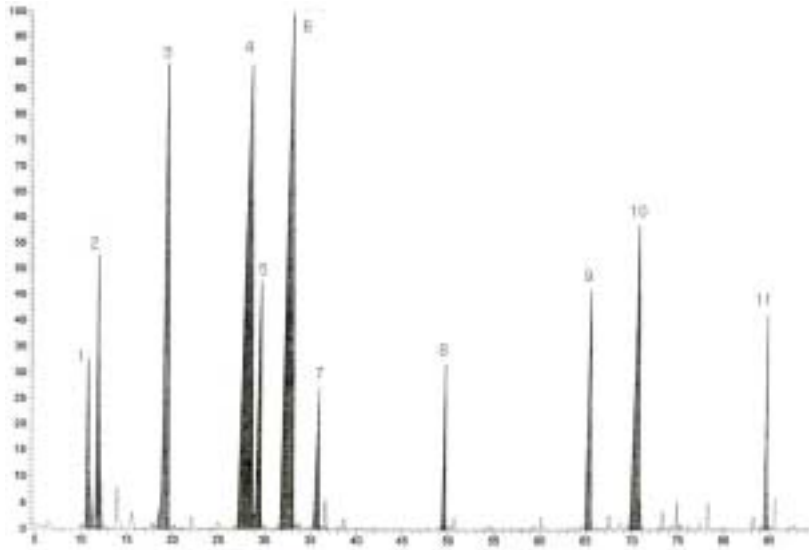


Figure 20. Gas-chromatography diagram of sage oil.

Table 21. Chemical constituent of coriander oil by GC-MS analysis

Peak#	Compound	RT(min)	Area(%)
1	β-3-Carene	10.79	3.3
2	Camphene	11.92	5.1
3	1,8-Cineol	19.57	13.7
4	α-Thujone	28.65	25.1
5	α-Thujone	29.60	5.3
6	Camphor	33.08	25.3
7	Borneol(endo-borneol)	35.92	2.9
8	Bornyl acetate	49.70	2.2
9	Isocaryophyllene	65.53	5.1
10	4,7,10-Cycloundecatriene,	70.73	9.4
11	Veridiflorol	84.74	2.7

3종(coriander, myrtus communis, sage)의 분석된 essential oil은 두 종의 버섯파리(*L. mali* and *C. fuscipes*)유충에 실험을 수행하였다.

4. 세신 추출물의 버섯 약해 실험

활성물질의 물리화학적 특성탐색을 통한 산업화 가능성 검토하기 위하여, 버섯에 대한 약해를 판정하기 위해 배지를 이용하여 대조구 대비 생산량 증감 유무를 판정하였다. 약해의 유무는 대조구 대비 생산량 증감을 보고 판정할 수 있다. 실험방법은 MIC(minimum inhibition concentration)법을 이용하였으며, 세신의 메탄올 추출물은 2 mg까지는 버섯 종균의 생산에 영향을 미치지 않았으나, 10 mg 이상에서는 버섯 종균의 생산이 상당히 감소하는 결과를 보였다. 결과는 아래의 그림 21과 같다.

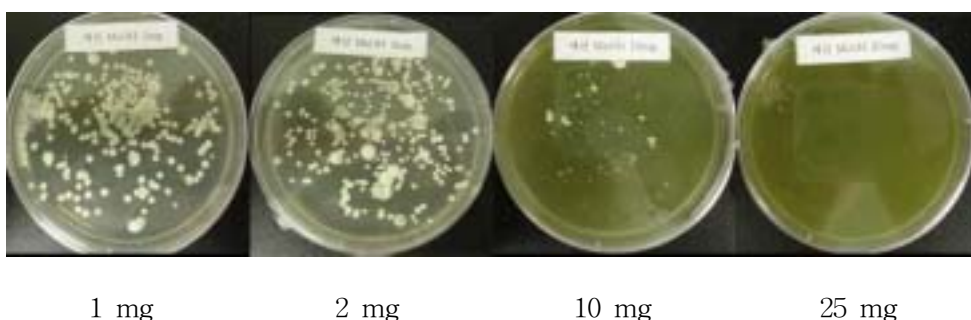
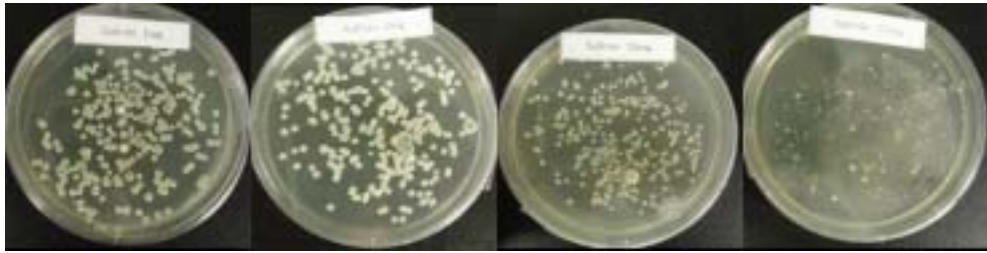


Figure 21. Results MIC test of *A. sieboldii* MeOH extract.

이와 같은 방법으로 세신에서 분리한 물질인 Safrole에 대해서도 MIC 검정을 실시한 결과 세신의 메탄올 추출물과 비슷한 결과를 보였으나, 세신의 메탄올 추출물 10 mg 보다는 영향을 덜 받는 것으로 조사 되었다. Safrol의 경우도 2 mg에서는 버섯 종균의 생산에 영향을 미치지 않지만, 10 mg에서는 버섯 종균의 콜로니 수에는 영향을 미치지 않는 것으로 보이나, 버섯종균의 콜로니 크기가 감소하는 것을 알 수 있고, 25 mg 처리에서는 그 크기가 현저히 감소하는 것을 아래의 그림 22에서 확인 할 수 있다.



1 mg

2 mg

10 mg

25 mg

Figure 22. Results MIC test of safrole.

Table 22. Result of MIC test

Material	Concentration (mg ml ⁻¹)			
	625	250	50	25
Benfracarb	++ ^a	++	++	++
DDVP	-	+	++	++
<i>A. sieboldii</i> MeOH extract	-	+	++	++
Safrol	+	++	++	++
Methyl-eugenol	-	-	++	++

^a++; too much to count, +; able to count, -; none.

처리 물질의 버섯에 대한 약해 시험결과 benfracarb는 625 mg ml⁻¹에서도 아무런 영향을 나타내지 않아 버섯 종균의 콜로니를 세기 어려웠고, safrol도 많은 버섯 종균이 생성되었다. DDVP와 세신 메탄올 추출물의 경우는 250 mg ml⁻¹에서 버섯 종균의 수가 감소하였고, methyl-eugenol이 여러 물질들 가운데 버섯 종균의 생성에 가장 큰 영향을 주는 것으로 조사되었다. 실험에서 처리한 25 mg ml⁻¹을 단위면적당으로 환산을 하면 18 mg cm⁻²이다.

5. 지렁이에 대한 급성 독성

토양 내 유입 시 유익생물인 지렁이에 대한 급성독성 유무의 판정 결과는 아래 표 23과 그림 23과 같다. 치사한 지렁이의 경우 부분적으로 반점 형태의 변색된 부분이 나타났고, 분비물과 진액으로 filter paper 위가 지지분해된 것을 관찰 할 수 있었다. 겉 표면을 눌러 보면 무척리구는 탄력이 있는 반면 치사한 지렁이의 경우 흐물흐물해져 가볍게 눌러도 쉽게 몸체가 부스러짐을 알 수 있었다.

Table 23. Toxicity of some materials to *E. fedita* using a contact filter method. (6.27 days)

Materials	Mortality (%)		
	120 ug	60 ug	30 ug
Basil oil	0	0	10
Coriander oil	10	0	30
Methyl-eugenol	20	0	20
Pentadecane	0	10	10
Safrole	10	0	10
Control (with Ethanol)	0	0	0
Control (without Ethanol)	0	0	0



Control (Ethanol)



Basil oil 30 ug



Coriander oil 30 ug



Safrole 120 ug



Safrole 30 ug



Methyl-eugenol 120 ug



Methyl-eugenol 30 ug



Pentadecane 60 ug



Pentadecane 30 ug

Figure 23. Acute toxicity to earthworm of active principles.

6. 시제품 제작

버섯파리 유충에 대해 우수한 활성을 나타낸 basil oil과 coriander oil을 유효성분으로 하여 실제로 버섯 농가에서 활용할 수 있는 제형을 개발하기 위한 연구를 실시했다. 제형개발의 목적은 1)버섯 재배상에 직접 살포할 수 있는 유제와 2)오염된 균상과 버섯 재배 단지 전체를 훈증 소독을 할 수 있는 열원을 활용할 수 있는 훈증제 그리고 3)배지를 담은 버섯 배양 용기 등으로 활용할 수 있도록 이들 유효성분을 함유한 폴리머 소재 등의 제형을 개발했다(그림 24). 이들 각 제형에 관한 상세한 제원을 하기 표 24에 제시했다.

Table 24. Composition of mushroom fly larva control products

Products	Composition	Apply	Volumn
Emulsifiable concentrate	Compound 5%	Fungus and mushroom	300 ml
	NBT 40E 5%		
	Fragrance 0.5%		
	Ethanol 10%		
	Water 79.5%		
Fumigant	Compound 31 g	Mushroom farm	150 ml
	Foaming agebt 63 g		
	N-methylpyrrolidon 61 g		
Polymer (PE)	polyethylene 90%	Production of mushroom culture container and sterilization of media	
	Carrier; Silica 10%		

유제의 경우는 버섯파리가 발생했을 때 직접 균상에 처리하거나 버섯 균주에 살포해서 유충들을 구제할 목적으로 활용 가능하다. 또한 훈증력을 극대화시켜 효과적으로 유충들을 방제하기 위해서는 오염된 버섯에 처리하고 봉지를 약 30-1시간 정도 씌워 밀봉하면 된다. 처리가 쉽고 단순하지만 투요되는 노동력이 다소 많다는 단점이 있다. 훈증제의 경우는 오염된 버섯 재배지를 완전히 소독할

목적으로 활용 가능하다. 원료가 함유된 알루미늄 용기를 열관(그림 26)에 올려 두고 뚜껑을 열어 가열하면 발포제가 발포되면서 자연스럽게 유효성분을 공기 중에 확산시켜 준다. 훈증력을 충분히 발휘할 수 있도록 훈증 소독을 실시할 때 오염된 버섯 재배지를 밀폐하는 것이 좋다. 이 제형은 적용이 매우 간단하고 편리하나 유효량이 넓은 공간에 확산되기 때문에 많은 양의 약제가 소요되는 단점이 있다. 유효성분을 담고 있는 폴리머 소재는 버섯 재배용 용기로 활용하거나 그 자체를 배지와 혼합 처리해서 배지에 자연스럽게 물질이 휘발될 수 있도록 적용 가능하다. 또한 폴리머 소재이기 때문에 용기 뿐 만 아니라 비닐로도 제작이 가능하므로 적용 범위가 매우 넓은 특성이 있다. 하지만 물질이 균일하게 분포되기 어렵고 그 유효력을 발휘함에 있어 다양한 편차를 보일 수 있는 단점이 있다. 이와 같이 각 제형물들이 갖고 있는 특성을 충분히 활용해서 적용 환경에 맞게 합리적으로 선택해서 사용하게 되면, 버섯파리로 인한 문제를 경감시키는 데 도움을 줄 수 있을 것으로 기대한다.



Figure 24. Mushroom fly larva control products.



Figure 25. Emulsifiable concentrate for control mushroom fly larva.



Figure 26. Fumigant for control mushroom fly larva.



Figure 27. Polymer(PE) for control mushroom fly larva.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절. 연구 목표달성도

1. 1차년도

1차년도 연구개발 목표는 방향성 한방식물체 스크리닝을 통한 훈증·살충 특성 식물체 탐색으로 차년도 연구수행을 위한 대상 식물체 선정에 그 주요 목표를 두었다. 우선 식물체 탐색을 위해 방향성 한방식물체 60여종을 채집하고 추출하였다. 한방식물체의 추출은 메탄올추출을 하였다. 실험에 사용하기 위한 공시층은 긴수염버섯파리를 비롯한 2종의 버섯류 발생해충을 버섯 농가에서 채집하여 실내에서 사육을 하며 감수성을 유지시키고 실내사육 체계를 확립하였다. 곤충활성 물질의 탐색의 가장 중요한 요소인 활성식물체를 탐색하기 위해 살충 및 훈증 활성은 여지확산법과 배지혼합법을 사용하였다. 버섯파리류의 방제제 개발을 위한 생물검정법 미확립된 상황이므로 본 연구에서 지속적으로 신속정확하게 활성물질을 탐색할 수 있는 생물검정법 확립하였다. 60여종의 한방식물체에서 활성 물질은 스크리닝 한 결과 세신(*Asarum sieboldii*) 전초 유래 살유충성분들이 국내 느타리버섯재배상의 주요해충인 긴수염버섯파리와 털파리붙이에 대해 높은 살충활성을 보임을 확인하였다. 또한 100여 종의 식물체 정유에서도 살충활성이 높은 정유도 선별하였다. 따라서 1차년도의 연구목표로 설정한 식물체 시료 확보 및 생물검정법 확립 그리고 버섯파리에 대한 훈증·살충특성 식물체의 탐색에 대한 목표 등 모든 세부적인 연구목표까지 100% 달성하였다.

2. 2차년도

당해연도(2차년도) 연구개발 목표는 긴수염버섯파리와 털파리붙이에 대해 1차년도 연구수행 결과 살충활성이 우수한 식물체로 밝혀진 세신 전초 유래 물질을 분리정제 하여 동정하는데 주요 연구목표를 두었다. 1차년도 연구성과를 통해 기확보된 세신의 메탄올 추출물로부터 유기용매를 이용한 순차분획을 실시하고

크로마토그래피법을 이용하여 물질을 분리하였다. 마지막 분리 방법으로는 GC-MS를 이용하여 6종의 활성 물질을 동정하였다. 또한 활성 본체의 작용기작에 관한 연구를 계획하여 혼중독 작용에 의한 살충활성을 나타냄을 확인 하였다. 따라서 2차년도의 연구목표로 설정한 활성본체의 동정 및 작용기작 연구에 대한 목표 등 세부적인 연구목표를 100% 달성하였다.

3. 3차년도

3차년도의 연구개발 목표는 세신의 살충활성 본체의 물리화학적 특성탐색을 통한 산업화 가능성 검토에 목표를 두었다, 동정된 세신의 살충본체들의 효과를 판정하는데 있어서 버섯 재배상을 미니어처한 배상 내에서 기준농도 설정 및 병 재배시 적정한 기준농도 설정은 하지 못하였지만, 토양 내 유입 시 유익생물인 지렁이에 대한 급성독성 유무 판정을 수행하였다. 또한 버섯에 대한 약해 유무 판정을 하여 대조구 대비 생산량 증감유무를 판정하였고, 시제품을 스프레이형과 혼중형으로 만들었다. 앞으로 산업화를 위해서는 본 물질의 독성평가가 체계적으로 수행되어야 할 것으로 판단된다.

제 2 절. 관련 분야에의 기여도

1. 식물체 유래 생물활성을 밝히는 정밀화학 산업의 발전에 기여할 수 있다. 식물체에는 다양한 물질들이 분포해 있으나, 생물활성을 나타내는 2차 대사산물은 그 양이 극히 미량이므로 분리, 정제하는 기술이 용이하지 않다. 본 연구 성과는 식물체로부터 활성물질을 분리한 연구라 볼 수 있어 관련 연구자들에게 물질분리에 관한 기본적인 정보를 제공 할 수 있다.

2. 식물체에서 밝혀진 생물활성 물질 특히, 살충활성물질의 경우 화학합성을 실행하는 합성화학자들에게 모핵화합물로 제공 될 수 있다. 특히 버섯파리 방제제의 경우 식물체 유래 물질을 모핵화합물로 하여 살충제가 합성이 된다면, 화학합성자나 실제 버섯을 재배하는 농민들에게도 큰 도움이 될 것이다. 이는 살충활성 물질이 있는 화합물을 모핵화합물로 합성하기 때문에 살충원제를 개발 할 수 있는 기회가 높다는 장점이 있다.

3. 식물체를 이용하여 물질을 탐색하는 연구자들에게 도움이 될 수 있다. 본 연구에서 버섯파리 살충활성 물질 탐색을 위하여 이용한 60여종의 한방 식물체와 100여종의 식물체 정유는 식물체 시료내에 함유된 물질을 탐색하는 연구자에게 동기를 부여 할 수 있을 것이다.

4. 연구 결과로 얻어진 살충 물질 및 방향성 식물체, 식물체 정유는 버섯파리 방제제의 산업화가 가능하다. 분리한 물질 6종은 혼중독성을 보이기 때문에 본 연구에서 제형화한 형태의 제제로 실제 적용시험을 할 수 있을 것이다. 그러나 실제 제형화를 위해서는 물질의 독성유무, 특히 포유류에 대한 독성평가가 이루어져야 할 것으로 사료되며 관련 분야 연구자들의 참여가 필요하겠다.

5. 버섯 산업은 우리나라에서 10위의 규모를 차지하고 있을 정도로 중요한 산업작물이나, 버섯파리에 대한 국내 연구진들의 관심은 많지 않다. 하지만 본 연구를 통해 버섯파리의 중요성이 인식 될 수 있는 계기가 마련되었고, 버섯파리를 대상으로 한 연구의 중요성이 대두되어 관련 연구자들의 연구욕을 북돋을 수 있는 동기가 부여되었다고 본다.

6. 본연구의 연구 결과 학술대회에서 Larvicidal Activity of *Asiasarum sieboldii* Whole Plant-Derived Compounds against *Lycoriella mali* (Diptera: Sciaridae), Activity of *Asarum sieboldii* Whole Plant-Derived Compounds against *Lycoriella mali* (Diptera: Sciaridae) and *Coboldia fuscipes* (Diptera: Scatopsidae). 의 제목으로 발표되었고, SCI 저널에 연구성과를 투고 중이다.

7. 마지막으로 방향성 식물체 및 식물 정유로부터 버섯파리에 대해 살충활성을 보인 물질을 확보하였으므로 이들을 이용한 저독성이며 안전한 방제제 개발에 도움을 줄 것으로 기대된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

전 세계적인 농약시장을 고려할 때 국내 농약시장은 세계 10위권에 속할 정도로 그 수요가 크나, 국내 농약산업계의 경우 아직도 원제수입이나 제형화 기술만으로 생존하고 있다. 그러나 선진국의 농약업체들이 국내 산업체를 인수합병하여 그들의 유통망을 확보하여 농약시장을 잠식하고 있으므로 이제는 신물질 개발을 통한 독자적인 기술 확립이 요구된다. 따라서 본 연구 성과를 국내 업체에 기술 이전함으로써 관련 산업체의 국제 경쟁력을 향상시킬 수 있을 것이다.

북미지역 및 유럽 그리고 중국을 비롯한 아시아 개발도상국들의 농약시장 성장률 및 그 잠재력이 점차 증가되는 추세이고 미국 등 여러 버섯 생산국들에서 버섯파리와 이들이 매개하는 질병에 대한 연구가 진행되고 있고 또한 그 성과물도 차츰 특허화 하고 있기 때문에 버섯의 해외 수출과 국내 소비자들을 위한 신개념의 저독성 버섯파리 방제제 개발이 시급하다.

처음 버섯을 재배하기 시작한 농가는 상대적으로 버섯파리에 오염되기 쉬운 조건에서 버섯을 생산하게 된다. 따라서 이러한 버섯 사육상에 천연물을 이용한 방제가 가능해짐으로서 시설에 투자되어지는 높은 투자비를 대체할 수 있는 사육상 내 무공해 버섯의 재배가 가능할 것으로 사료된다.

실제 유통상에 있어서 버섯파리의 오염도 심각한 것으로 알려져 있다. 버섯은 그 신선도와 다른 미생물에 대한 오염 및 버섯파리에 의한 오염이 저장 운송 중에 많은 피해를 가져오게 되는데 이를 극복할 수 있는 보관용 천연물 방제제의 개발도 기대할 수 있을 것이다.

또한 버섯파리는 버섯사육 상의 폐상 후 버려진 곳에서 많은 버섯파리의 온상이 존재하는 것을 알 수 있었다. 따라서 이들 버섯파리의 방제를 위해서는 이러한 버섯파리가 자랄 수 있는 환경을 제어해 주는 제어제로서의 개발이 가능할 것으로 사료된다.

활성이 우수한 세신과 다른 많은 식물체의 정유 혹은 그 활성성분들은 국내 농약회사를 통한 적절한 제형화를 거쳐 야외에서의 실제적인 효과만 검증된

다면, 버섯파리 방제제로서 개발이 유망시 된다고 판단한다. 버섯파리에 대한 우수한 활성본체 혹은 메탄올 추출물 자체를 이용한 합리적인 제형화를 통해 실제 야외에서 적용할 수 있도록 하는 준야외실험을 추가적으로 실시함으로써, 국내 농약산업계의 국제경쟁력 강화 및 버섯파리방제제 시장에 있어서 국제적인 우위를 점할 수 있을 것이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 2차 세계대전 이후 유기합성 살충제의 출현은 농업해충의 방제에 의한 농작물의 증산과 질적 향상, 인축의 질병을 매개하는 위생해충의 구제에 의한 인류의 보건향상이라는 측면에 크게 기여하였다. 그러나 이러한 살충제의 연용과 남용으로 점차 심각한 사회문제로 등장하게 되었다. 이에 따라 여러 가지 무공해적인 천연물유래의 생리활성물질 즉, 곤충의 호르몬이나 페로몬 등의 생리활성물질, 동·식물이나 토양미생물로부터의 살충성분, 해충에 대하여 강력한 살충효과가 있는 병원미생물 등을 이용하여 해충을 효과적으로 방제하는 연구에 관심이 집중되어왔다(Cutlur, 1988). 특히 곤충과 오랫동안 관계를 맺으며 공진화(供進化)해 온 식물체가 함유하고 있는 2차 대사산물(secondary metabolites)을 살충제로 개발, 이용하고자 하는 연구가 지난 60년대 이후 꾸준히 진행되어왔다(Jacobson, 1989).

Jacobson(1989) 은 Meliaceae, Rutaceae, Asteraceae, Annonaceae, Labiatae, Canellaceae과의 식물체가 가장 유망하다고 제안하였다. 식물체의 2차대사산물은 3개의 합성경로를 통하여 합성되어진다. Terpenoids, phenolics, 그리고 질소를 기본으로한 2차대사산물들은 mevalonate, shikimic acid, 또는 amino acid와 같은 전구체로부터 각각 합성되어진다. 식물체의 2차대사산물들은 식물체의 종에 따라 다양하게 존재하는데 30,000개 이상의 천연물질 또는 2차대사산물들이 보고되었다(Wink, 1993; Rowe, 1989; Harborne, 1993). 300,000종이상의 고등식물체중 단지 5-10%에서 식물 유래 화합물이 알려져 있을 뿐이고 이중 2차대사산물은 100,000의 물질이 밝혀져 있다. 이것들은 초식자들로부터 방어하기위해 물리적 화학적인 요소를 근간을 둔다. 물리적 방어기작으로는 the potato leafhopper, *Empoasca fabae* (Harris)의 섭식을 방해하기위하여 몇몇의 콩이나 알팔파의 잎의 털을 자라게 함으로써 방어를 한다(Taylor, 1956; Lee, 1983). 몇몇 작물에서

는 식물체 조직을 두께를 조절함으로써 저항정도를 높여준다. rice, sugarcane, 그리고 wheat는 표피세포층을 증가시켜 줄기를 두껍게 만들어 곤충으로 줄기의 피해를 줄이게 만들어준다(Patanakamjorn and Pathak, 1967; Wallace et al., 1974; Martin et al., 1975; Fiori and Dolan, 1981). 물리적인 방어와 마찬가지로 화학적 방어도 역시 매우 중요하다. 많은 식물의 2차대사산물들은 초식곤충에 대하여 독이나 섭식저해, 기피, 곤충성장조절제로 이용된다(Matsuda and Senbo, 1986; Sinden et al., 1986; Harborne, 1993).

살충제로 사용될 수 있는 2차대사산물들은 크게 3그룹으로 나눌 수 있는데 terpenoids, nitrogen compounds, 그리고 phenolics 화학물들이다(Berenbaum, 1989; Kang, 1991; Harborne, 1993). 반면에 이들 그룹들은 곤충성체 조절제와 곤충 행동제어제로서 곤충을 제어하는 물질로 주목받고 있다. Williams(1967)은 이들 화합물들을 "the Third Generation Pesticides"이라고 불렀다.

Terpenoids는 종종 isoprenoids이라 부르기도 하고 5개의 탄소 isoprene으로부터 수천가지의 방법들을 통하여 유래되는 terpenes과 유사한 화합물들이다. 23,000이상의 물질들이 terpenoids 또는 terpenes계열의 화합물들이다. 이들 그룹들은 다양한 물질들이 많이 알려져 있다.

대부분 다양한 구조들을 가지는데 기본 탄소 골격 뿐만아니라 functional groups이 다른 경우이다. 그러므로 terpenoid 물질들은 limonoids, clerodane diterpenoids, triterpenoid, 그리고 sesquiterpenoids로 나뉘어 진다. Limonoid는 최근곤충 방제제로서 주목받고 있다. 가장 잘 알려진 Limonoid는 azadirachtin이다. Butterworth and Morgan (1968)은 neem tree *Azadirachta indica*에 포함되어 있는 곤충 성장저해제와 섭식저해제로 영향을 미치는 oxygenated triterpenes인 azadirachtins을 개발하였다(Schmutterer and Rembold, 1980).

Mulla and Su(1999)은 neem tree가 위생적, 수의학적으로 중요한 곤충 즉, 모기, 파리, 바퀴,벼룩, 이 등과 같은 곤충 종에대한 azadirachtins과 다른 물질들에 대하여 서술하였다.

Teucrium 속은 clerodane diterpenes이 가장 풍부한 것 중에 하나이고 새로운 천연물질에 대하여 알려져있다(Piozzi et al., 1998). 6-Acetylteucjaponin B

와 Fruticolone은 *Tenebrio molitor* larvae에 대하여 섭식저해활성이 보고되었다 (Sosa et al., 1994; Coll and Tandron, 2004).

Wu 등(2001)은 armyworm, *Mythimna separate*에 대하여 살충활성을 보인 *Celastrus angulatus*에서 b-dihydro-agarofuran골격에 근간을 한 5개의 새로운 sesquiterpenoids polyol esters를 보고하였다.

식물체 유래 물질과 함께 많은 연구가 진행되고 있는 것이 식물체 정유와 이들이 함유하고 있는 화학 물질 이라고 할 수 있다.

식물체 정유는 식물을 증기로 증류하여 얻을 수 있는데, 이렇게 얻은 식물체 정유는 monoterpenoids 와 sesquiterpenoids등 phenol과 관련된 물질들을 많이 함유하고 있다(Isman 2000). 이런 식물체 정유의 화학적 성분은 기피제나 섭식저해제(예, citronella oil)로 peterson(2001)에 의해보고 되었다. 또한 저장물의 보호제로 이용되어져 왔다. 꿀풀과(Lamiaceae)와 도금향과(Myrtaceae)에 속하는 몇몇 방향성 식물체들에 대해서는 많은 연구가 수행되어졌다. 이에 속하는 식물체 정유 화합물질들은 적은 분자량과 높은 휘발성으로 인해 넓은 범위의 곤충에 대해서 접촉 독성과 훈증 독성을 가진다.

효과적인 물질로 보고된 것은 cloves(*Eugenia caryophyllus*, myrtaceae)로부터 분리한 eugenol, garden thyme(*Thymus vulgaris*, Lamiaceae)로부터 분리한 thymol, Cinnamon(*Cinnamomum zeylandicum*, Lauraceae)에서 분리한 cinnamaldehyde 등이 있다(Huang et al. 1998). 몇몇 식물체 정유는 온실에서 많은 문제가 되고 있는 식물 해충인 aphid와 spider mite에 대해서 훈증효과를 보인다(Tuni and Sahinkaya, 1998).

Coats(1991)에 의하면 몇 종의 식물체 정유는 *Perplanera americana*와 *Blattella germanica*에 대해 우수한 살충효과를 가지고 있고, 집파리인 *Musca domestica*에 대해 살충 활성을 보고하고 있다. 농업해충에 대한 독성으로는 western corn rootworm인 *Diabrotica vigifera*와 European cornborer인 *Ostrinia nubilalis*에 대해 Lee(1997)등에 의해서 보고되었고, 담배거세미나방인 *Spodoptera litura*와 green peach aphid인 *Myzus persicae*에 대한 살충력은

Isman(2000)에 의해 보고 되었다. 다른 식물체 정유와 그 성분은 심각한 외부 기생충인 *Varroa mite*에 높은 효과를 가지고 있는 것을 확인 하였다(Calderone et al. 1997).

식물체 정유에 포함되어 있는 moterpenoids와 phenol은 한종류 이상의 해충에 독성을 나타내고 있다. 이러한 관점에서 이들이 가지는 구조-활성의 상관관계에 관한 연구도 진행되고 있다(Rica and Coats 1994, Tsao et al. 1997).

식물체 정유와 그들이 가지는 화합물의 작용기작은 신경에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 몇 종의 monoterpeneoid는 acetylcholine esterase에 영향을 주는 것으로 알려져 있으나, in vivo에서 곤충에 미치는 영향을 명확하지 않다(Miyazawa et al. 1997). 현재 연구된 바로는 식물체 정유에 존재하는 화합물은 octopamin nervous system에 영향을 주는 것을 Enan(2001)이 증명하였다.

식물체 정유를 이용한 살충제는 합성살충제를 이용하는 것보다 환경에 미치는 영향이 적다. 또한 식물체 정유의 이용이 보다 유용하다고 할 수 있겠다. Juvenile rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*)를 가지고 실험한 Stroh (1998)의 실험 결과에서는 thymol이 살충제인 pyrethrum보다 400배 독성이 적은 것으로 나타났다. 또한 organophosphate 살충제인 azinphosmethyl 보다는 4,000배 독성이 적은 것으로 나타났다.

위의 연구들로 보아 식물체 및 식물체 정유, 식물체 정유 화합물들은 중요한 해충 방제에 효과적으로 이용될 수 있을 것이다.

외국의 경우 symposium을 2년마다 한번 씩 개최하여 자국의 식물체를 이용한 biopesticide 개발에 많은 노력을 하고 있다.

태국의 경우는 Proceeding International Conference on Biopesticides를 2년 마다 개최하고 있다. 2005년에는 Phytochemicals and natural products for the Progress of Mankind라는 제목으로 개최되었으며, 대표적인 발표 내용으로는 Akkagraisee외 2명(2005)은 쥐의 서식지에서 발견되는 식물체 *Piper sarmentosum* Roxd., *Paepelia* sp., *Erythrina fusca* Lour, *Citrus hystix* DC., *Garcinia mangostanna* L., *C. reticulata* Balnco., *C. maxima* (Burm. F) Merr.,

Azadirachta indica A. Juss. var *siamensis* Valetton, *Chromolaena odoratum* (L.) R.M. King & H. Rob. 들의 잎들로부터 95% ethanol을 추출하여 두 가지 진드기 종류 *Leptotrobium deliense* 와 *L. imphalum*에 대한 살충효과에 대한 연구를 들수 있다. 또한 Udomporn Pangnakorn(2005)은 오렌지와 포도의 껍질의 건조분말을 이용하여 cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus* Fabr)에 살충효과에 관한 연구를 실시하였다.

인도에서는 매년 자국 내의 식물체 자원의 이용을 위해서 symposium을 개최하고 있다. 2002년도에 인도에서는 Positioning Biopesticides in Pest Management Systems라는 주제로 symposium이 개최되었다. 대표적인 biopesticide에 대한 내용으로는 A.K. Khamis 등 (2002)이 *Deris elliptica*라는 식물체로부터 Bioflavonoids 성분을 추출하여 bio-pesticide로서의 이용 가능성에 관한 연구를 진행하였고, bio-pesticide로서 활성이 있는 주요 구성 물질로는 rotenone을 밝혀냈다. Apiwat tawatsin 등(2002)은 9가지 식물체 *Alpinia galanga*, *Boesenberigia pandurata*, *Curcuma longa*, *Elettaria cardamomum*, *Azadirachta indica*, *Siamese cassia*, *Cymbopogon nardus*, *Eucalyptus* and *Eupatorium odoratum*를 재료로 모기향(mosquito coils)을 제작하여 5가지속 (*Aedes*, *Anopheles*, *Armigeres*, *Culex* and *Mansonia*)에 속하는 12종의 모기에 대한 살충활성을 확인하는 연구를 진행하였다. 또한 약재식물(medicinal plants)로 잘 알려진 *Ageratum conyzoides*, *Artemisia nilagarica*, *Eupatorium adenophorum*, *Eupatorium riparium*, *Lantana camara*의 Rice Grasshopper *Oxya hyla*에 대한 살충효과에 관하여 연구를 진행하였다. 이 연구에서는 이러한 식물체들이 먹이섭식활성과 행동적 패턴, 발달에 영향을 주어 살충효과를 나타내는 것으로 확인되었다(Dainingstar marngar et al, 2002). Rattanaporn promsattha 등(2002)은 태국을 비롯한 많은 열대국가에서 서식하는 *Lantana camara*의 잎, 꽃, 종자로부터 정유를 추출하여 이들 정유를 GC-MS분석을 통해 주요구성성분을 확인하였다. 확인된 물질에는 1,8-cineol, linalool, camphor, borneol, terpineol이었으며 이들 정유의 diamondback moth(*Plutella xylostella*)에 대한 살충효과에 대하여 연구를 진행하였다. Yang Yong-Hong 등(2002)은 독버섯의 일종인

Russula nigricans, *Pulveroboletus rave*, *Amanita phalloides*, *Tyromyces sulphureus*의 건조시킨 과육을 이용하여 peach miner에 대한 살충효과에 관한 연구를 수행하였다.

최근 사용되어지고 있는 농약들은 잔류성이 낮고 처리비율도 낮아야하고 선택성은 높아야 하며 부작용(Reduced risk)이 적은 농약들을 선호하여 사용되고 있다.

Reduced risk 농약이란 인체와 포유류에 독성이 낮아야 하고 비목적 생물에 영향을 적게 미쳐야하며 지표수의 오염 가능성이 낮아야 함. 또한 해충 저항성발현이 낮아야 하고 해충의 종합적 방제를 위하여 높은 적합성을 가져야 한다. Reduced risk 살충제로는 여러 종류가 있는데 neem tree와 FDA GRAS 리스트에 있는 essential oil들이 있고 곤충 성장조절제들은 methoprene과 diflubenzuron과 같은 것들이 있고 미생물제제로는 *Bacillus thuringiensis*, *B. sphaericus* 과 같은 것들이 있다. 새로운 화합물로는 spinosyns, imidacloprid, fipronil과 같은 물질들이 알려져 있다.

식물체를 이용한 살충제는 100,000종 또는 그 이상의 2차 대사산물들이 알려져 있다. 이들이 곤충에 영향을 주는 기작으로는 행동학적으로 기피, 섭식억제, 산란억제가 있고 물리적으로 급성독성, 발달장애, 성장억제 등이 있다. 이들과 같은 활성을 보인 식물체유래 물질들이 있으나 이들을 이용한 살충제는 극소수에 이른다. 이 이유는 자원 이용가능성과 지속성과 제품으로 만들었을때의 안정성과 표준화, 상품질을 유지시킬 수 있는 제어력, 그리고 독성에 대한 등록등과 같은 문제점들이 해결되어야만 살충제로서 사용될 수 있게 되는 것이다.

최근에 사용되고 있는 식물유래 살충제로는 Neem (*Azadirachta indica* A. Juss)이 대표적이며, 정유로는 *Cymbopogon*, *Eucalyptus*, *Eugenia*, *Cinnamomum*, *Citrus*, *Thymus*와 같은 오일들이 이용되고 있다. Neem은 인도, 호주, 중앙 아메리카에서 자생하며 limonoids와 azadirachtin이 10-25%가량 차지하여 활성을 보이는 주요 성분들이다. 이들은 곤충의 ecdysone antagonist로 작용하며 곤충 성장 조절제와 섭식저해제로 활성을 보인다. 이것의 rat 경구독성은

LD50>5,000mg/kg으로 낮은 독성을 보인다.(Isman, 2001)

이와 같은 식물체 유래의 물질들은 이용가능성이 무한한데, 상품화가 되기 위해서는 대량생산과 가격적인 면이 고려되어야 한다. Neem과 같은 경우는 활성은 좋다 하더라도 가격적인 면과 생산적인 면에서 공급이 어렵기 때문에 고가 상품으로 널리 사용되고 있지 못하는 실정이다.

그에 반해, 식물 정유는 일반적으로 식물체를 증기로 증류하여 얻어지는데 mono-, sesquiterpenoids와 생물학적으로 연관된 phenol등과 같은 물질들의 혼합물로 구성되어있는데 정유 성분에서는 monoterpenoids가 높은 비율을 차지하고 있으며 5-30% 정도가 활성을 보이는 물질로 구성되어 있다. 이들 정유들은 위생 해충 방제제로 이용도리 수 있을 것이다. 이들은 전세계 널리 분포할 뿐만 아니라 상대적으로 저가이며 포유독성도 낮고 환경에 대하여 안전하기 때문이다. 그러나 곤충에 대해서는 접촉이나 혼증독성을 보임으로서 살충제로 이용이 가능하다. 정유는 일반적으로 octopamine antagonists로 작용을 하며 접촉과 Knockdown과 같은 살충활성을 보이는데 포유류에는 없는 작용기작을 가짐으로서 포유류에는 독성이 없어 개발 가능성이 매우 높은 재료들이다. 또한 몇몇 정유들은 FIFRA section 25(b)에 따르면 부작용이 최소한으로 적은 농약이고 US EPA GRAS리스트에 포함됨으로서 독성평가가 면제되어 쉽게 사용될 수 있다. 그러므로 정유의 이용은 높은 활성성분 함유율과 낮은 가격, 생산이 용이한 점을 앞세워 많은 벤처회사가 살충제의 개발에 정유나 그들의 성분을 이용한 제품생산에 가속이 붙을 것이라 생각된다.

제 7 장 참고문헌

Ahn, Y.J., Kwon, M., Park, H.M. and Han, C.G. 1997. Potent insecticidal activity of Ginkgo biloba derived trilactone terpenes against *Nilaparvata lugens*. In *Phytochemicals for pest control*, ed. by P.A. Hedin, R.M. Hollingworth, E.P. Masler, J. Miyamoto and D.G. Thompson, ACS Symp. Ser. 380, Am. Chem. Soc., Washington, DC, pp. 90-105.

Ahn, Y.J., Lee, S.B., Lee, H.S. and Kim, G.H. 1998. Insecticidal and acaricidal activity of carvacrol and β -thujaplicine derived from *Thujopsis dolabrata* var. *hondai* sawdust. *J. Chem. Ecol.* 24: 1-9.

Akkagraisee, W., Sitthicharenchaid, and Ierdthusnee K. 2005. Efficacy of plant extracts on *Leptotrombidium* (Acari: Trombiculidae) chiggers. *Proceedings of International Conference on Biopesticides 4*. Chiang Mai, Thailand.

Al-Amidi, A.H.K. 1995. *Science and Cultivation of Edible Fungi*. pp. 539-544.

Anonymous. 1999. Mushroom-compost making and cultivation technique of edible mushroom. *Mushroom Association of Korea*. 3: 326.

Arnason, J.T., Philogene, B.J.R. and Morand, P. 1989. Insecticides of plant origin. *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.* 387.

Bartletta, G.R. and Keila, C.B.O. 1997. Identification and characterization of a permethrin resistance mechanism in populations of the fungus gnat *Lycoriella mali* (Fitch) (Diptera: Sciaridae). *Pestic. Biochem. Physiol.* 58(3): 173-181.

Bowers, W.S., Ohta, T., Cleere, J.S. and Marsella, P.A. 1976. Discovery of antijuvenile hormones in plants. *Science* 193: 542-547.

Cantelo, W.W. 1979. *Lycoriella mali*: Control in mushroom compost by incorporation of insecticide into compost. *J. Econ. Entomol.* 71: 703-705.

Champ, B.R. and Dyte, C.E. 1977. FAO global survey of pesticide susceptibility of stored grain pests. *FAO Plant Prot. Bull.* 25: 49-67.

Christiansen, M.E., Costlow, J.D. Jr. and Monroe, R.J. 1979. Effects of the insect growth regulator 39 Dimilin (TH-6040) on the larval development of two estuarine crabs. *Marine Biol.* 50(40): 29-36.

Christiansen, M.E., Costlow, J.D., Jr. and Monroe, R.J. 1977. Effects of the juvenile hormone mimic 36 ZR-512 (Altozar) on larval development of the mud-crab *Rhithropanopeus harrisi* at 37 various cyclic temperatures. *Marine Biol.* 39(38): 281-288.

Christiansen, M.E., Costlow, J.D., Jr. and Monroe, R.J. 1977. Effects of the juvenile hormone mimic ZR-515 (Altosid) on larval development of the mud-crab, *Rhithropanopeus harrisi* in 34 various salinities and cyclic temperatures. *Marine Biol.* 39(35): 269-279.

Clift, A.D. and Toffolon, R.B. 1981. Insect and mites associated with mushroom cultivation on three commercial farms near Sydney, N.S.W., Australia. *Mushroom Sci.* 11: 537-549.

Coats, J.R., Karr, L.L. and Drewes, C.D. 1991. Toxicity and neurotoxic effects

of monoterpenoids in insects and earthworms. ACS Symp. Ser. 449, Am. Chem. Soc. pp. 306-316

Cutler, H.G. 1988. Natural products and their potential in agriculture. In *Biologically Active Natural Products*, ed. by H.G. Cutler, ACS Symp. Ser. 380, Am. Chem. Soc., Washington, DC., pp. 1-22.

Harborne, J.B. 1993. *Introduction to Ecological Biochemistry*. Academic Press. London, pp. 1-41.

Hedin, P.A., Hollingworth, R.M., Masler, E.P., Miyamoto, M. and Thompson, D.G. 1997. Phytochemicals for pest control. ACS Symp. Ser. 658, Am. Chem. Soc. Symp.

Huang Y. and Ho, S.H. 1998. Toxicity and antifeedant activities of cinnamaldehyde against the grain storage insects, *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motsch. *J. Stored Prod. Res.* 34: 110-117.

Ishitani, E, Gotoh, T. and Kawasaki, T. 1997. Development sticky light trap and attractiveness to mushroom-infesting Sciarids, *Lycoriella mali* and *Bradysia paupera*. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 41: 141-146.

Ishitani, E., Kijima, K. and Ito, M. 1993. Damage of mushroom (*Agaricus bisporus*) attacked by *Lycoriella mali* in Chiba Prefecture. *Trans. Jpn. Soc.y*, 44: 175-176.

Isman, M.B. 1995. Leads and prospects for the development of new botanical insecticides. *Rev. Pestic. Toxicol.* 3: 1-20.

Isman, M.B. 1997. Neem and other botanical insecticides: barriers to commercialization. *Phytoparasitica* 25(4): 339-344.

Isman, M.B. 2001. Pesticides based on plant essential oils for management of plant pests and diseases. In International Symposium on Development of Natural Pesticides from forest resources, Korea Forest Research Institute, Seoul, Republic of Korea, pp. 1-9.

Jacobson, M. 1989. *The Unsaturated Isobutylamides*. Marcel Decker. New York, pp. 137-176.

Jarretta, P., Whitea, P. and Pethybridgea, N.J. 1997. Biological control of dipteran pests of the genus lycoriella using *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnol. Advan.* 15(1): 285.

Khamis, A.K., Sarmidi, M.R., Mohamad, M.F. and Ngadiran, S. 2002. Extractio of bioflavinoids rotenoids from *Derris elliptica*. Proceedings of International Conference on Biopesticides 3. Kuala Lumpur, Malaysia.

Kim, K.C. and C.Y. Hwang. 1996. An investigation of insect pest on the mushroom (*Lentinus edode*, *Pleurotus ostreatus*) in south region of Korea. *Kor. J. Appl. Entomol.* 35: 45-51.

Lee, H.S. 1997. Effect of temperaure and host fungi on the development of a mushroom-infesting sciarid fly, *Bradysia* sp. (Diptera: Sciaridae). M.S. thesis of Chonnam University, pp. 35.

Lee, H.S., Kim, H.G. and Lee, H.U. 1998. Effect of temperature on the

development of sciarid fly, *Bradysia* sp. (Diptera: Sciaridae). Korean J. Appl. Entomol. 37: 171-178.

Lee, H.S., Kim, K.J., Song, G.W. and Kim, J.H. 1999. Isolation method of mushroom ingesting pests from mushroom growing compost. Korean J. Mycol. 27:289-292.

Lee, K.L., Lee, C.O., Kim, H.W., Kim, J.H., Kim, S.W., Choi, E.C. and Kim, B.K. 1985. Studies on the constituents of the higher fungi of Korea (XXXVIII). Antitumor components extracted from the cultured mycelia of *Pleurotus pulmonarius*. Kor. J. Mycol. 13: 11-21.

Ley, S.V. 1990. Synthesis of antifeedants for insect: novel behaviour-modifying chemicals from plants. In Ciba Foundation Symposium 154; Bioactive Compounds from Plants. A Wiley-Interscience Publication, pp. 80-98.

Marnagar, D., Kharbuli, B., Syiem, D. and Kayang, H. 2002. Insecticidal activity of some extracats against rice grasshopper *Oxya hyla*. Proceedings of International Conference on Biopesticides 3. Kuala Lumpur, Malaysia.

Marr, K.L. and Tang, C.S. 1992. Volatile insecticidal compounds and chemical variability of Hawaiian *Zanthoxylum* (Rutaceae) species. Biochem. Syst. Ecol. 20: 209-217.

Menn, J.J. 1996. Biopesticides: has their time come? J. Environ. Sci. Health B 31(3): 383-389.

Miyakado, M. 1986. The search for new insecticidal and fungicidal compounds from plants. *J. Pesticide Sci.* 11: 483-492.

Pangnakorn, U. 2005. Efficacy of orange and grapefruit peels on cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus* Fabr) control. Proceedings of International Conference on Biopesticides 4. Chiang Mai, Thailand.

Peterson, C.J. and Coats, J.R. 2001. Insect repellents—past, present and future. *Pestic. Outlook*, in press.

Promsattha, R., Sangwanish, A. and Pimsamarn, S. 2002. Chemical compositions of botanical pesticides from *Lantana camara*. Proceedings of International Conference on Biopesticides 3. Kuala Lumpur, Malaysia.

Rinker, D.L., Snetsinger, R.J. and Tetrault, R. 1989. control of sciarid fly with insecticides. *Mushroom Sci.* XII. pp. 867-876.

Saxena, B. P., Koul, O., Tikku, K. and Atal, D.K. 1989. A new insect chemosterilant isolated from *Acorus calamus* L. *Nature* 270: 512-513.

Schechter, S., Green, N. and Laforge, F.B. 1949. Constituents of pyrethrum flowers. XXIII. Cinerolone and the synthesis of related cyclopentenolones. *J. Am. Chem. Soc.* 71: 3165-3173

Scheepmaker, J.W.A., Geels, F.P., Van griensven, L.J.L.D. and Smits, P.H. 1996. Substrate dependant larval development and emergence of the mushroom pests *Lycoriealla auripila* and *Megaselia halterata*. *Entomol. Exp. Appl.* 79: 329-334.

Subramanyam, B. and Hagstrum, D.W. 1995. Resistance measurement and management. In *Integrated Management of Insects in Stored Products*, ed. by B. Subramanyam and D.W. Hagstrum. Marcel Dekker, New York, pp. 331-397.

Tawatsin, A., Thavara, U. and Chomposri, J. 2002. Field evaluation of mosquito coils derived from plants against night-biting mosquitoes in Thailand. *Proceedings of International Conference on Biopesticides 3*. Kuala Lumpur, Malaysia.

Thomas, C.A. 1959. Animal pests of cultivated mushrooms in the United States. *Mushroom Sci.* pp. 400-410.

Tuni, I, and Sahinkaya, S. 1998. Sensitivity of two greenhouse pests to vapours of essential oils. *Entomol. Exp. Appl.* 86: 183-187.

U.S. EPA. 2003.

<http://www.geocities.com/fragranceallergy/SeattleTimes04022002.html>

U.S. EPA.. 1998. FEDERAL INSECTICIDE, FUNGICIDE, AND RODENTICIDE ACT SCIENTIFIC ADVISORY PANEL MEETING,

[http://www.epa.gov/oscpmont/sap/1998/july/final3 .pdf](http://www.epa.gov/oscpmont/sap/1998/july/final3.pdf)

Wei, C.H., Hartman, F.C., Pfuderer, P. and Yang, W.K. 1974. Purification and characterization of two major toxic proteins from seeds of *Abrus precatorius*. *J. Biol. Chem.* 249: 3061-3067

White, N.D.G. and Leesch, J.G. 1995. Chemical control. In *Integrated*

Management of Insects in Stored Products, ed. by B. Subramanyam and D.W. Hagstrum. Marcel Dekker, New York, pp. 287-330.

Wink, M. 1993. Production and application of phytochemicals from an agricultural perspective. In Phytochemistry and Agriculture, ed. by van T. A., Beek and H., Breteler. Vol.34. Clarendon, Oxford, UK, pp.171~213.

Y.S. EPAwsroom. 2000.

http://www.epa.gov/epapages/epahome/headline_0608.htm,

Yang, Y.H., Huang, Q.Q., Sun, X.H., Xu, W.D. 2002. The effect of four toadstools on peach leaf miner. Proceedings of International Conference on Biopesticides 3. Kuala Lumpur, Malaysia.

김성렬, 최광호, 조은숙, 양원진, 진병래, 손홍대. 1999. 한국느타리버섯 재배지에 발생하는 주요 파리류 해충에 관한 연구. 한국응용곤충학회지 38(1): 41-46.

김형환, 추호렬, 이홍수, 박정규, 이동운, 진병래, 추영무. 2001. 곤충병원성 선충을 이용한 느타리버섯해충, 긴수염버섯파리(*Lycoriella mali*)의 생물적 방제. 한국응용곤충학회지 40(1): 59-67.

김형환, 추호렬, 이홍수, 조성래, 신현열, 박정규, 추영무. 2000. 육묘장내 작은뿌리 파리의 발생과 피해. 한국응용곤충학회지 39(2): 89-97.

농림부 통계자료. 2002. <http://www.maf.go.k/agriinfo2000/trade21.asp>

농림부 통계자료. 2002. <http://www.maf.go.kr/html/pds/pds0106.htm>

농림부 통계자료. 2002. <http://www.mushroom98.co.kr>

농림부(Agro-Mail Club). 2000. 9.1.부터 버섯 종균에 대한 식물검역 실시
<http://www.maf.go.kr/html/mains/data/20000901.htm>

박정규, 유주, Sasakawa M., 추호렬, 김형환, 이흥수. 1999. 신해충 작은뿌리파리
Bradysia agrestis (Diptera: Sciaridae)의 보고. 한국응용곤충학회지 38(1): 59-62.

이흥수, 김규진, 박정규, 신원교. 1999. 버섯해충 *Lycoriella mali* (긴수염버섯파리:
신칭)에 관한 보고. 한국응용곤충학회지 38(3): 209-212.

정영호, 김장억, 김정환, 이영득, 임치환, 허장현. 2000. 최신농약학. 시그마프레스.
서울, pp. 191-195.

조광연, 안종용, 안용준. 1987. 신규농약개발을 위한 스크리닝체제 확립, 과학기
술처, 서울, pp. 501-724.

최광호, 김성렬, 조은숙, 배진식, 진병래, 양원진, 손홍대. 1999. 버섯해충 *Coboldia*
fuscipes (Diptera: Scaropsidae) 번데기 호홉뿔에 관한 연구. 한국응용곤충학회지
38(3): 241-247.

한국농약공업협회 통계자료. 2003. <http://www.koreacpa.org>

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술 개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.