

115086
-2

이중
활성의
미생물을
이용한
해충
및
식물병의
동시
관리
기술
개발

최
종
보
고
서

2018
농
림
식
품
기
술
기
획
평
가
원
농
림
축
산
식
품
부

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)

농생명산업기술개발사업 최종보고서

발 간 등 록 번 호

11-1543000-002215-01

이중 활성 미생물을 이용한 해충 및 식물병의 동시 관리 기술 개발 최종보고서

2018. 01. 31.

주관연구기관 / 충북대학교 산학협력단

농 립 축 산 식 품 부
농림식품기술기획평가원

2. 제출문

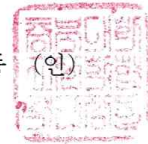
제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “이중 활성의 미생물을 이용한 해충 및 식물병의 동시 관리 기술 개발”
(개발기간 : 2015. 12. 18 ~ 2017. 12. 17.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 01. 31.

주관연구기관명 : 충북대학교 산학협력단 (대표자) 우 수 동 (인)



주관연구책임자 : 우 수 동 (인)



국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의
합니다.

보고서 요약서

과제 고유 번호	115086-2	해당단계 연구기간	2015. 12. 18 - 2017. 12. 17 (24개월)	단계구분	(총단계1)
연구사업명	중사업명	농식품기술개발사업			
	세부사업명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대과제명				
	세부과제명	이중 활성의 미생물을 이용한 해충 및 식물병의 동시 관리 기술 개발			
연구책임자	우 수 동	해당단계 참여연구원 수	총: 17명 내부: 17명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부: 200,000천원 민간: 천원 계: 200,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 17명 내부: 17명 외부: 명	총 연구개발비	정부: 200,000천원 민간: 천원 계: 200,000천원
연구기관명 및 소속 부서명	충북대학교 응용생명공학부			참여기업명	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내·외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제24조의4에 해당하지 않음
-------------------	--

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설·장비	기술요약 정보	소프트웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

<p>요약</p> <ul style="list-style-type: none"> - 점박이응애 및 복숭아혹진딧물 살충성 곰팡이 중 살충력 및 환경에 대한 안정성이 뛰어나며 잿빛곰팡이병균에 대한 대치 배양을 통한 항진균 활성 및 배양액의 항진균 활성을 평가하여 4개의 균주를 최종 선발함. - aerial conidia, blastospore, 배양액을 이용한 살충력은 모든 처리구에서 70%이상이었으며, 특히 blastospore와 배양액의 혼합 처리시 낮은 LT50값과 높은 살충력을 확인함. - 곤충병원성 곰팡이의 효율적인 생산을 위해 GY배지에서 20~25℃, pH 5.0~5.5의 조건으로 7일간의 액체배양으로 높은 활성을 지닌 배양액 및 충분한 blastospore 수를 확인 - 높은 항진균 활성을 보였던 균주 배양액의 활성은 살균 활성으로 확인되었으며 100℃ 처리에도 그 활성이 유지되며, 친수성과 소수성층에서 모두 활성을 지니고 있어 항진균 물질은 다수 물질로 구성됨을 확인함 - 딸기 유묘에 대해서 엽면처리 활성을 확인한 결과, 해충 및 병원균에 대한 직접적 효과 대비 높은 활성의 확인은 어려우나 향후 제제화 연구를 통해 활성 증대가 기대됨 - 병해충 방제와 더불어 식물생장에 긍정적인 영향을 주는 새로운 활성 미생물 제품 개발을 위한 단기간의 추가 연구가 필요하며 추 후 산업체로의 기술이전 및 제품화가 가능할 것임 	<p>보고서 면수</p>
--	---------------

요약문

연구의 목적 및 내용	<p>본 연구는 친환경 바이오농약으로써, 해충 및 식물병원균의 동시 방제 가능성 검정을 통해 선발된 살충 및 항균의 이중 활성을 지닌 다수의 곤충병원성 곰팡이에 대하여 산업적 이용 기술개발을 목표로 함</p> <p>세부 목표로는 이중 활성미생물의 식물체에서의 실증적 유효성 입증과 그 적용 기술 개발을 목표로 함</p> <p>○이중 활성 미생물의 유효성에 대한 실증 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> - 살충 및 항균의 이중 활성 균주를 이용한 해충 및 식물병 억제 효능 검정 - 최적 이중 활성 미생물의 선발 <p>○이중 활성 미생물의 식물에 대한 영향 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> - 식물 생육에 대한 영향 평가 - 식물과 미생물의 상호작용 평가 <p>○맞춤형 활성 증대 기술 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - 각 활성 최적화를 위한 미생물 균주별 환경 조건 탐색 및 결정 <p>○이중 활성 미생물의 효율적 생산 기술 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - 활성의 요인으로 확인된 포자와 배양액의 단독 생산 후 각각의 효능 평가 - 포자와 배양액의 동시 생산을 통한 효능 비교 평가 <p>○이중 활성 미생물의 적용 기술 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - 유효활성 성분별 적정량 및 혼용비율 결정 - 엽면 및 토양 등 처리 방법, 시기, 횟수, 처리량 평가 <p>○활성물질의 특성 구명</p> <ul style="list-style-type: none"> - 뛰어난 항균활성을 보이는 물질들의 기본적인 물리·화학적 특성 구명 - 활성물질의 항균능력 구명
연구개발성과	<p>○이중 활성 미생물의 유효성에 대한 실증 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> - 점박이용애 살충성 곰팡이와 복숭아혹진딧물 살충성 곰팡이 중 살충력 및 환경에 대한 안정성이 뛰어난 균주 선발. - 선발된 균주의 식물 잣빛곰팡이병균에 대한 대치 배양을 통한 항진균 활성 및 배양액의 항진균 활성을 평가하여 살충력 및 항진균 활성이 뛰어난 4개의 균주를 최종 선발함. <p>○이중 활성 미생물의 식물에 대한 영향 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> - 곤충병원성 곰팡이 배양액을 이용하여 오이, 콩, 상추에 대해 성장촉진효과를 평가한 결과, 배양액 자체로의 성장 촉진효과는 미미함. - 선발된 균주의 처리 후 식물체 내생 여부를 확인한 결과 내생력은 없는 것으로 확인됨 <p>○이중 활성 미생물의 효율적 생산 기술 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - 고체 배양을 통한 aerial conidia와 액체배양을 통한 blastospore 그리고 배양액을 각각 단독 및 혼합 처리하여 점박이용애와 복숭아혹진딧물에 대한 살충력을 평가한 결과, 모든 처리구에서 70%이상의 높은 살충력을 확인하였으며, 특히 액체배양을 통해 생산된 blastospore와 배양액의 혼합 처리의 경우 낮은 LT_{50}값과 높은 살충력을 확인함. <p>○맞춤형 활성 증대 기술 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - 곤충병원성 곰팡이에 대해서 배지, 온도, pH, 배양기간에 따라 배양하여 효율적인 생산 조건에 대한 평가 결과, 각각의 균주마다 약간의 차이가 있으나

	<p>GY배지(또는 PDB배지)에서 20~25℃, pH 5.0~5.5의 조건으로 7일간의 액체배양으로 높은 활성을 지닌 배양액 및 충분한 blastospore 수율을 확인함.</p> <p>○활성물질의 특성 구명</p> <ul style="list-style-type: none"> - 높은 항진균 활성을 보였던 균주 배양액의 작용기작 검정 결과, 항진균 활성은 살균 활성으로 확인됨. - 배양액의 항진균 활성은 100℃ 처리에도 그 활성이 유지되며, 친수성과 소수성층에서 모두 활성을 지니고 있어 항진균 물질은 다수 물질로 구성됨을 확인함. - 단백질 분해효소 처리에도 항진균 활성이 유지되어, 활성 물질은 단백질이 아닌 것으로 확인됨. <p>○이중 활성 미생물의 적용 기술 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - 목적 대상 해충과 식물병을 고려할 때, 주로 식물체의 잎과 줄기에서 피해를 주므로 엽면 처리 방법이 적절한 것으로 판단되었음. - 딸기 유묘에 대해서 엽면처리 활성을 확인한 결과, 해충 및 병원균에 대한 직접적 효과 대비 높은 활성의 확인은 어려우나 향후 제제화 연구를 통해 활성 증대가 기대됨 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>○ 병해충 방제와 더불어 식물생장에 긍정적인 영향을 주는 새로운 활성 미생물 제품 개발을 위해 산업화를 위한 단기간의 추가 연구가 필요하며 그를 통해 산업체로의 기술이전 및 제품화가 가능할 것임</p> <p>○ 식물병 방제까지 그 적용 범위가 확대된 곤충병원성 곰팡이의 이용 가능성 제시를 통해 기존 미생물 농약 시장의 확대와 관련 산업의 활성화가 기대됨</p> <p>○ 이중 활성 미생물의 살충 소재 외의 다양한 소재 활용 기술은 농업 분야 뿐 아니라 식의약 소재 영역까지 확대 적용이 가능할 것으로 기대됨</p> <p>○ 본 연구 결과를 통해 곤충병원성 미생물을 비롯한 다양한 미생물 자원의 활용 분야 확대에 대한 연구 개발의 촉진이 기대됨</p> <p>○ 궁극적으로 식물병해충 방제를 위한 새로운 이중 활성 미생물제품의 개발로 국내 친환경 및 유기농업의 경쟁력 강화가 기대됨</p>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>곤충병원성 곰팡이</p>	<p>점박이응애</p>	<p>복숭아혹진딧물</p>	<p>갯빛곰팡이병</p>	<p>이중 활성</p>

영문 요약문

< SUMMARY >

		D-02
Purpose & Contents	<p>This study aimed to develop the industrial application technology as environment-friendly bio-pesticides using a number of entomopathogenic fungi having both insecticidal and antimicrobial activities. Entomopathogenic fungi used in this study have already been selected through the possibility of simultaneous control of pests and plant pathogens.</p> <p>The other purpose was to demonstrate the dual activities of these fungal isolates in plants and to develop their application technologies.</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Evaluation of the efficacy of dual active microorganisms <ul style="list-style-type: none"> - Examination of insecticidal and antimicrobial activities against pest and plant pathogen - Selection of optimum dual active microorganisms ○ Evaluation of the effect of dual active microorganisms on plants <ul style="list-style-type: none"> - Evaluation of effects for plant growth - Study of interactions between plants and microorganisms ○ Development of active enlargement technique <ul style="list-style-type: none"> - Detection and determination of environmental conditions for activity optimization against each fungal isolates ○ Development of efficient production technology for dual active fungal isolates <ul style="list-style-type: none"> - Evaluation of efficacy for individual production of solid culture and liquid culture, respectively - Evaluation of efficacy by simultaneous production of spores and fungal culture filtrate in liquid culture ○ Development of application technology of dual active microorganisms <ul style="list-style-type: none"> - Determination of capacity and mixing ratio of active ingredients - Treatment timing, number of times, and method in leaf surface or soil ○ Characterization of active substances <ul style="list-style-type: none"> - Basic physical-chemical properties of substances with antimicrobial activity - Antimicrobial ability of active substance 	
Results	<ul style="list-style-type: none"> ○ Evaluation of the efficacy of dual active microorganisms <ul style="list-style-type: none"> - Selection of several fungal isolates having high insecticidal and environmental stability from mite-pathogenic fungi and aphid-pathogenic fungi - Second selection of the isolates with high insecticidal and antimicrobial activity by evaluating the antimicrobial activities against <i>Botrytis cinerea</i> and <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> from the selected fungal isolates. 	

	<ul style="list-style-type: none"> ○ Evaluation of the effect of dual active microorganisms on plants <ul style="list-style-type: none"> - Evaluation of growth promoting effect for cucumber, soybean and lettuce by using entomopathogenic fungal culture filtrate. - No observation for the plant growth promoting effect by the culture filtrate - Endophytic effect of tested fungi was not observed ○ Development of active enlargement technique <ul style="list-style-type: none"> - Culture of entomopathogenic fungi according to temperature, pH, and culture period. - As a result of examination of efficient production conditions, there was a slight difference in each isolate, and GY medium (or PDB medium) showed high antifungal activity and blastospore yields at liquid culture for 7~10 days under temperature 20~25°C and pH 5.0~5.5. ○ Development of efficient production technology of dual active isolates <ul style="list-style-type: none"> - Evaluation of individual virulence of aerial conidia, blastospore and culture filtrate against two-spotted spider mites and green peach aphids - As a result, mixture of blastospore and culture filtrate showed a low LT₅₀ value and high insecticidal activity. ○ Characteristics of active substances <ul style="list-style-type: none"> - Antifungal activities of selected fungal isolates was confirmed to be fungicidal activity. - Fungal culture filtrates of the four isolates were stable at high temperature of 100°C and had both hydrophilic and hydrophobic properties, and antifungal substances of fungal culture filtrate did not show characteristics of the protein. ○ Development of application technology of dual active microorganisms <ul style="list-style-type: none"> - The endophytic activity of selected fungi was not observed - The fungal culture products should be treated in the leaves and stems of the plants when considering habitat of the pests and diseases. - The result of treatment to strawberry seedlings showed low activities and this is assumed owing to the insufficient amount of active substance. - The sufficient high activity of fungal cultural products would be achieved through formulation process.
<p style="text-align: center;">Expected Contribution</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ Further short-term study for industrialization of our results will enable the transfer of technology to company and commercialization of our result. ○ Expansion of microbial pesticide market and revitalization of related industries are expected through the development of new products using entomopathogenic fungi not only for insecticide but also for plant disease control.

	<ul style="list-style-type: none"> ○ It is anticipated that the application technology of various materials by dual active microorganisms will be extended to the various fields with food and medicine as well as agriculture. ○ The results of this study are expected to promote research and development on the expansion of applications of various microbial resources including entomopathogenic fungi. ○ The development of novel dual active microbial products is expected to enhance domestic eco-friendly and organic agriculture. 				
Keywords	Entomopathogenic fungi	<i>Tetranychus urticae</i>	<i>Myzus persicae</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Dual active

영문 목차
< CONTENTS >

Chapter 1. Summary 5

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	10
2. 국내외 기술개발 현황	15
3. 연구수행 내용 및 결과	17
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	51
5. 연구결과의 활용계획 등	53
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	54
7. 연구개발성과의 보안등급	56
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	57
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	58
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	62
11. 기타사항	64
12. 참고문헌	65

1. 연구개발과제의 개요

D-03

1-1. 연구개발 목적

- 본 연구는 친환경 바이오농약으로써, 해충 및 식물병원균의 동시 방제 가능성 검정을 통해 선발된 살충 및 항균의 이중 활성을 지닌 다수의 곤충병원성 곰팡이에 대하여 산업적 이용 기술개발을 목표로 함
- 세부 목표로는 이중 활성 미생물의 식물체에서의 실증적 유효성 입증과 그 적용 기술 개발을 목표로 함

1-2. 연구개발의 필요성

가. 친환경 바이오 농약

- 산업화 시대를 거쳐 고도의 경제발전을 이룩한 우리 인류가 질 높은 삶을 영위하기 위하여 당면한 국내·외적 주된 해결과제는 안전한 농산물의 지속 가능한 확보와 건강한 육체 유지에 있음
- 식생활에 있어서 우리나라를 포함한 다른 많은 나라의 섭취 식품 원천은 대부분 육류와 작물이 차지하고 있으며, 작물 재배는 근래 질 높은 삶에 대한 '웰빙시대'의 개막으로 안전한 농산물의 선호도가 더욱 증대되고 있음
- 식물 생육의 장애요인으로는 물, 온도 그리고 영양분 등의 환경적 요인들과 더불어 생물적 장애요인으로 식물을 가해하는 **해충(pest)과 여러 가지 식물병(disease)**이 있음
- 이들 장애 요인들 중 특히, 경제적인 관점에서 식물을 키우는 사람들의 가장 큰 관심사는 식물병과 해충으로써 이들 문제점을 해결하기 위하여 살균제, 진균제, 바이러스제제 등 식물병 방제를 위한 농약과 해충을 방제하기 위한 살충제에 대한 연구 개발 및 이용이 현재에도 전 세계적으로 활발히 이루어지고 있음
- 기본적으로 식량 생산을 위한 농업과 산림 그리고 조경수, 잔디 등 다양한 목적으로 식물을 키우는데 있어서 이들 식물병 및 해충방제를 위한 작물보호제는 필수적으로 여겨지고 있으며, 그로 인하여 식물병 및 해충으로부터 식물을 보호하기 위하여 막대한 경제적 비용 발생이 초래되고 있음
- 특히, 최근에는 이들 작물보호제의 환경 위해성 문제와 더불어 인간에게 안전한 농산물 생산의 중요성이 강조되면서 식물병 및 해충의 친환경 방제법에 대한 관심이 높아지고 실제로 그러한 방제법이 확대 실시되고 있음
- 여러 가지 친환경 방제 방법들 중 **가장 효율적이며 경제적인 방법**으로 인정받고 있는 것은 **미생물을 이용한** 방법으로써 해충 및 식물병의 방제를 위해 다양한 미생물을 이용한 방법이 전 세계적으로 개발되었고 또한 진행 중에 있음

나. 곤충병원성 미생물

- 해충 방제에 이용될 수 있는 미생물을 곤충병원성 미생물이라고 하며 세균, 바이러스 곰팡이 등 매우 다양한 종류의 미생물이 존재하여 이들을 이용하여 해충을 방제할 수 있도록 개발된 것이 미생물 살충제임

- 미생물 살충제로 이용될 수 있는 여러 가지 곤충병원성 미생물들은 자연 상태에서 기주의 밀도를 조절하는 역할을 하며 높은 기주특이성으로 인해 목적 해충에게만 특이적으로 병원성을 나타내고 일반적으로는 환경, 인축에 대한 독성이 없다고 보고되어짐
- 미생물 살충제를 대표하는 것은 곤충병원성 세균인 *Bacillus thuringiensis*를 이용한 BT제로써 전 세계적으로 널리 이용되어 왔으나, 최근 해충의 저항성이 문제시 되면서 그 해결 방안 및 대안에 대한 연구가 활발히 진행 중임
- 현재까지 곤충병원성 곰팡이를 이용한 미생물살충제는 총 12종의 곰팡이를 이용한 171개의 상품이 개발되어 사용되고 있으나, 곰팡이 살충제의 느린 효과와 더불어 이용 방법의 어려움으로 인해 국내에서는 거의 활용되지 못하고 있는 실정임
- 그에 따라 최근에는 **살충제로써 뿐만 아니라 곤충병원성 곰팡이의 다른 부가적인 작용 효과를 통해 곰팡이 살충제의 단점을 보완하려는 시도가 활발히 이루어지고 있으며, 그 대표적인 활용방법이 식물병의 동시 방제 가능성에 대한 것으로** 내생균으로써 길항작용과 더불어 곰팡이의 대사산물을 활용한 식물병 방제에 대한 연구 개발이 활발히 이루어지고 있음
- 또한 곤충병원성 곰팡이가 **근권 생물**로서의 역할과 함께 **식물 성장 촉진**의 역할 등 식물체에 대한 새로운 역할이 계속하여 보고됨으로써 살충제로써의 역할 외에 다양한 부가적인 효과를 기대할 수 있을 것으로 여겨져 곤충병원성 곰팡이의 새로운 활용방안 제시가 이루어질 것으로 여겨지고 있음
- 특히, 진핵생물인 곤충병원성 곰팡이의 증식과정 중 생성되는 **이차대사산물들은 다양한 생리활성**을 나타내며, 이러한 물질들은 살충 능력을 포함하여 항균, 항바이러스, 항암, 항우울, 항산화, 항말라리아활성 등 매우 다양한 활성이 보고되고 있어 새로운 생리활성 자원으로 인식되어 연구 개발이 활발히 진행되고 있음

다. 국내 곤충병원성 곰팡이 연구 현황

- 국내에서 곤충병원성 곰팡이에 대한 연구 개발은 매우 제한된 연구진에 의해 이루어지고 있으며, 그 중에서도 본 연구팀에서는 국내에서는 유일하며 세계적으로도 많은 사례를 찾을 수 없을 만큼 매우 다양한 곤충병원성 곰팡이 자원을 국내 환경에서 수년간 수집하여 약 300여종 이상의 곤충병원성 곰팡이 자원을 확보 보유하고 있음
- 분리 확보된 곤충병원성 곰팡이 균주들에 대해서는 기본적으로 살충성과 더불어 산업적 유용성을 고려하여 열안정성 및 자외선 안정성 등의 환경 평가를 통해 수종의 난방제 해충들에 대해 우수한 방제 효과를 지닌 다수의 곰팡이 균주를 확보할 수 있었음
- 또한 이들 분리 균주들에 대하여 식물병 방제의 가능성 확인을 위하여 세균 및 곰팡이의 식물병원균에 대한 활성 평가를 통해 항균 활성을 지닌 다수의 균주를 분리 확보하고 있음
- 특히, 살충 및 항균활성을 동시에 지닌 이중 활성의 곤충병원성 곰팡이 균주를 다수 확보함으로써 이들 균주들의 산업적 활용 기술 개발이 필요한 실정임
- 곤충병원성 곰팡이의 살충제로써 뿐만 아니라 살균제로써 이용 가능성에 의해 현재 전 세계적으로 그 연구가 활발히 진행 중에 있으나 아직 까지 실용화된 제품 개발은 보고되지 않음으로써, 본 연구진에서 매우 많은 균주들을 대상으로 연구를 수행함으로써 확

보가 가능하였던 다수의 곰팡이 균주들에 대한 산업적 이용 기술 개발과 함께 실용화 기술개발은 새로운 미생물 제제 시장의 형성에 있어 주도권을 확보할 수 있을 것으로 기대함

라. 국외 곤충병원성 곰팡이 연구 현황

- 곤충병원성 곰팡이는 현재 곤충병원성 역할 뿐만 아니라 내생균(endophyte), 식물병원체에 대한 길항균, 근권 생물로서의 역할, 식물 성장 촉진 역할 등 자연에서의 새로운 역할이 발견되고 있음
- 식물체 안에 침입 증상 없이 존재하는 내생균은 식물체내 어디에나 존재하고, 다양한 역할을 한다고 알려져 있음 이러한 내생균 생활을 하는 몇몇의 곰팡이는 기주 식물을 식물병원체 및 초식동물로부터 보호 하는데, 이러한 곰팡이 중 일반적으로 곤충병원성 곰팡이로 알려져 있는 *Acremonium*, *Beauveria*, *Cladosporium*, *Clonostachys*, *Isaria* 등도 최근 분리되고 있음
- 내생균의 식물병원체에 대한 길항 기작으로는, 다양한 대사산물(항생제, 생리활성 물질(bioactive volatile compounds), 효소)을 이용한 식물병원체에 대한 직접적인 피해를 포함하여, 간접적인 작용으로 식물병원체와의 경쟁, 기생, 저병원성 균주화(hypovirulence), 식물체의 병저항성을 높이거나 성장 촉진의 효과로 식물병원체의 생존을 줄여 병의 발병정도를 완화 시킨다고 알려져 있으며, 이러한 작용 기작으로 식물체에 내생하는 곤충병원성 곰팡이 *Beauveria bassiana*와 *Lecanicillium*의 곰팡이도 식물병원체에 길항작용을 한다고 밝혀져 있음
- *Beauveria bassiana*의 길항기작은 항생물질에 의한 작용을 포함하여, 식물병원체와의 영양분 경쟁, 식물의 병저항성을 높이는 등 다양한 작용 기작을 보이며, *Lecanicillium*은 식물병원성 곰팡이에 기생하는 것으로 알려져 있음
- 곤충병원성 곰팡이 *Beauveria*, *Isaria*, *Metarhizium*은 다양한 토양 미생물들 중에 하나이며, 근권에서 식물병원체의 식물 침입을 방어하는 역할도 밝혀지고 있음
- 현재까지 근권에 존재하는 곤충병원성 곰팡이와 식물과의 관계는 명확하게 구명되어 있지 않지만, 식물은 곤충병원성 곰팡이에게 탄소원을 제공하고, 곤충병원성 곰팡이는 이를 생존과 성장을 위해 이용하고 근권에 존재하면서 다양한 대사산물을 이용하여 식물병원성 병원체나 초식동물로부터 식물체를 보호 한다는 ‘보디가드’ 이론이 정설화 되어 있음
- 결론적으로 식물 근권에 곤충병원성 곰팡이가 존재하면 식물체는 병해충으로부터 보호 받게 되고 생장이 촉진되는 효과를 보인다고 알려져 있음
- 현재 곤충병원성 곰팡이의 다양한 역할의 재발견으로 인해 이러한 곤충병원성 곰팡이의 특성을 이용하여 해충 및 식물병원균을 동시에 방제하기 위한 연구와 더불어 작물의 성장촉진효과를 보기위한 연구가 활발히 진행되고 있음

마. 연구개발 난방제 해충 및 식물병

- 이중 활성 미생물의 산업적 이용 기술 개발을 목표로 한 본 연구에서는, 대표적인 난방

제 해충 및 식물병 그리고 그 기주 식물로 다음과 같은 연구 대상을 결정하고 연구를 수행함으로써 기술개발의 표준화와 더불어 직접적 이용이 가능한 연구 결과를 도출하고자 함

1) 난방제 해충

- **점박이용애:** 점박이용애의 기주는 밤나무, 배나무, 사과나무, 뽕나무, 장미, 벚나무류 대부분의 활엽수와 채소, 과수, 화훼류, 각종 발작물을 포함한 배, 토마토, 사과, 배 복숭아 채소류, 잡초 등 기주범위가 넓어 가지과, 박과 작물과 딸기, 콩과, 과수, 화훼류 등 거의 모든 작물에 피해를 주고, 생활사가 빠르고 화학살충제에 대한 저항성 습득이 빨라 전 세계적으로 문제시되고 있는 난방제 해충임
- **복숭아혹진딧물:** 복숭아혹진딧물의 기주 또한 복사나무, 매화, 벚나무, 돈나무, 장미, 찔레, 해당화, 매실, 사과, 배, 초피나무, 굴, 사철나무, 감, 고욤나무, 개나미, 협죽도, 작살나무, 구기자나무, 참오동나무 등 십자화과 식물, 복숭아나무, 살구나무, 자두나무, 벚나무, 굴나무, 감자, 담배, 목화, 가지, 고추, 배추, 무 및 기타 수십 종의 작물에 큰 피해를 주며, 현재까지 세계적으로 66과 300여종의 식물에 피해를 주는 기주 범위가 아주 넓은 해충으로 이 역시 생활사가 빠르고 화학살충제에 대한 저항성 습득이 빠른 전 세계적으로 문제시되고 있는 난방제 해충임

2) 식물병원균

- **젓빛곰팡이병:** 젓빛곰팡이병을 일으키는 *Botrytis cinerea*는 전 세계적으로 널리 분포하며 여러 가지 초·목본식물에 여러 기관을 통해 침입하여 피해를 주며, 저장, 수송, 판매 중에도 발생하여 고추, 딸기, 사과, 오이, 토마토, 인삼 등 총 86종의 경제 작물에서 발생하여 큰 피해를 일으킨다고 보고되고 있으며, 이로 인해, 젓빛곰팡이병 방제용 살균제 시장이 무려 1,500~2,500백만 달러에 육하고 있으나, 친환경적 방제를 위한 유기농자재와 미생물제제 개발은 아직 미흡한 상황임.

바. 국내 연구 개발의 필요성

- 국내를 비롯하여 전 세계적으로 곤충병원성 곰팡이와 같은 **이중 활성 미생물**의 이용 가능성만이 입증된 현 시점에서 **새로운 시장을 주도적으로 선점**할 수 있는 기회로써 산업 기술 개발의 필요
- 유기농을 비롯하여 친환경 바이오 살충제로 대표되고 있으나, 생물제제의 특성상 국내 사용자에게 낮은 만족도를 보여 그 이용이 저조한 **국내 곰팡이 살충제 시장을 활성화**시킬 수 있는 새로운 제품 개발의 가능성
- 국내 연구진에 의해 그리고 국내 미생물 자원으로써 수년간의 연구 결과를 통해 확보된 새로운 그리고 효과적인 **바이오농약 자원의 적극적인 활용** 필요

1-3. 연구개발 범위

○이중 활성 미생물의 유효성에 대한 실증 평가

- 살충 및 항균의 이중 활성 미생물을 이용한 발생, 발병 억제 효능 검증
- 최적 이중 활성 미생물의 선발

- 이중 활성 미생물의 식물에 대한 영향 평가
 - 식물 생육에 대한 영향 평가
 - 식물과 미생물의 상호작용 평가
- 맞춤형 활성 증대 기술 개발
 - 각 활성 최적화를 위한 미생물 균주별 환경 조건 탐색 및 결정
- 이중 활성 미생물의 효율적 생산 기술 개발
 - 활성의 주요인으로 확인된 포자와 배양액의 각각 단독 생산 후 효능 평가
 - 포자와 배양액의 동시 생산을 통한 효능의 비교 평가
- 이중 활성 미생물의 적용 기술 개발
 - 혼용 기술 : 유효활성 성분별 적정량 결정, 유효활성 성분의 혼용비율 결정
 - 적용 기술 : 엽면 및 토양 등 처리방법, 처리 시기, 처리 횟수, 처리량 평가
- 활성물질의 특성 구명
 - 뛰어난 항균활성을 보이는 물질들의 기본적인 물리·화학적 특성 구명
 - 활성물질의 항균능력 구명(정균·살균)

2. 국내외 기술개발 현황

D-04

- 현재 국내에서 곤충병원성 곰팡이에 대한 연구 개발은 매우 제한된 연구진에 의해 이루어지고 있으며, 그 중에서도 본 연구팀에서는 국내에서는 유일하며 세계적으로도 많은 사례를 찾을 수 없을 만큼 매우 다양한 곤충병원성 곰팡이 자원을 국내 환경에서 수년간 수집하여 약 300여종 이상의 곤충병원성 곰팡이 자원을 확보 보유하고 있음
- 분리 확보된 곤충병원성 곰팡이 균주들에 대해서는 기본적으로 살충성과 더불어 산업적 유용성을 고려하여 열안정성 및 자외선 안정성 등의 환경 평가를 통해 수종의 난방제 해충들에 대해 우수한 방제 효과를 지닌 다수의 곰팡이 균주를 확보할 수 있었음
- 또한 이들 분리 균주들에 대하여 식물병 방제의 가능성 확인을 위하여 세균 및 곰팡이의 식물병원균에 대한 활성 평가를 통해 항균 활성을 지닌 다수의 균주를 분리 확보하고 있음
- 특히, **살충 및 항균활성을 동시에 지닌 이중 활성의 곤충 병원성 곰팡이 균주를 다수 확보함**
- 곤충 병원성 곰팡이의 살충제로써 뿐만 아니라 살균제로써 이용 가능성에 의해 현재 전세계적으로 그 연구가 활발히 진행중에 있으나 아직 까지 실용화된 제품 개발은 보고되지 않음
- 곤충병원성 곰팡이는 현재 곤충병원성 역할 뿐만 아니라 내생균(endophyte), 식물병원체에 대한 길항균, 근권 생물로서의 역할, 식물 성장 촉진 역할 등 자연에서의 새로운 역할이 발견되고 있음
- 식물체 안에 침입 증상 없이 존재하는 내생균은 식물체내 어디에나 존재하고, 다양한 역할을 한다고 알려져 있음
- 이러한 내생균 생활을 하는 몇몇의 곰팡이는 기주 식물을 식물병원체 및 초식동물로부터 보호 하는데, 이러한 곰팡이 중 일반적으로 곤충병원성 곰팡이로 알려져 있는 *Acremonium*, *Beauveria*, *Cladosporium*, *Clonostachys*, *Isaria* 등도 최근 분리되고 있음
- 내생균의 식물병원체에 대한 길항 기작으로는, 다양한 대사산물(항생제, 생리활성 물질(bioactive volatile compounds), 효소)을 이용한 식물병원체에 대한 직접적인 피해를 포함하여, 간접적인 작용으로 식물병원체와의 경쟁, 기생, 저병원성 균주화(hypovirulence), 식물체의 병저항성을 높이거나 성장 촉진의 효과로 식물병원체의 생존을 줄여 병의 발병정도를 완화 시킨다고 알려져 있으며, 이러한 작용 기작으로 식물체에 내생하는 곤충병원성 곰팡이 *Beauveria bassiana*와 *Lecanicillium*의 곰팡이도 식물병원체에 길항작용을 한다고 밝혀져 있음
- *Beuaveria bassiana*의 길항기작은 항생물질에 의한 작용을 포함하여, 식물병원체와의 영양분 경쟁, 식물의 병저항성을 높이는 등 다양한 작용 기작을 보이며, *Lecanicillium*은 식물병원성 곰팡이에 기생하는 것으로 알려져 있음
- 곤충병원성 곰팡이 *Beauveria*, *Isaria*, *Metarhizium*은 다양한 토양 미생물들 중에 하나이며, 근권에서의 식물병원체의 식물 침입을 방어하는 역할도 밝혀지고 있음
- 현재까지 근권에 존재하는 곤충병원성 곰팡이와 식물과의 관계는 명확하게 구명되어 있지 않지만, 식물은 곤충병원성 곰팡이에게 탄소원을 제공하고, 곤충병원성 곰팡이는 이를

생존과 생장을 위해 이용하고 근권에 존재하면서 다양한 대사산물을 이용하여 식물병원성 병원체나 초식동물로부터 식물체를 보호 한다는 ‘보디가드’ 이론이 정설화 되어 있음

- 결론적으로 식물 근권에 곤충병원성 곰팡이가 존재하면 식물체는 병해충으로부터 보호 받게 되고 생장이 촉진되는 효과를 보인다고 알려져 있음
- 현재 곤충병원성 곰팡이의 다양한 역할의 재발견으로 인해 이러한 곤충병원성 곰팡이의 특성을 이용하여 해충 및 식물병원균을 동시에 방제하기 위한 연구와 더불어 작물의 생장촉진효과를 보기위한 연구가 활발히 진행되고 있음

3. 연구수행 내용 및 결과

D-05

○ 연구내용

1) 곤충병원성 곰팡이의 고체 배양

- 연구에 이용된 곤충병원성 곰팡이는 PDA (potato dextrose agar, pH 5.6)배지에 접종하고, 25℃에서 2주간 배양하였고, 2주간 배양한 곤충병원성 곰팡이를 각 실험에 사용하였으며 단기보관 시에는 4℃, 장기보관 시에는 cork borer를 이용하여 6 mm로 자른 후 20% glycerol이 포함된 SDYB (Saboraud dextrose broth with 1% yeast extract, pH 5.6)배지에 접종하여 -70℃에 보관함.
- 곤충병원성 곰팡이의 포자를 수거하기 위해, 2주간 배양된 곰팡이 표면을 긁어 수확된 포자를 0.02% tween 80을 이용하여 포자현탁액을 만들고, 멸균된 탈지면으로 균사를 제거 후 균사가 제거된 포자현탁액을 hemocytometer로 계수하여 실험에 이용함.
- 포자현탁액은 실험에 사용 시까지 4℃에 보관하였고, 보관기간은 3일을 넘기지 않았음.

2) 액체 배양 및 배양액 제작

- 고체 배양을 통해 얻어진 포자현탁액은 액체배지에 접종하기 전 SDAY (pH 5.6) 배지에 0.05% benomyl (95% active ingredient (Sigma, USA))이 첨가된 SDAY+B 배지에서 포자의 발아 여부를 확인하여, 90% 이상 viability를 보이는 경우만 사용함.
- 포자현탁액 50 ul (9×10^5 conidia/ml)를 30 ml의 PDB (pH 5.6) 배지가 들어있는 100 ml 플라스크에 접종하여 25℃, 150 rpm, 암조건에서 14일간 배양하였고, 14일간 배양된 배양산물을 10,000 x g, 4℃, 20분동안 원심분리하여 균체와 배양액을 분리함.
- 얻어진 배양액은 filter paper (ADVANTEC, No. 2)로 1차 여과한 후, 항진균 활성 검정과 항세균 활성 검정을 위해 배양액을 각각 pH 5.6, 7.4로 NaOH와 HCl을 이용하여 조절하였으며, NaOH와 HCl은 배양액 총 양의 1% 내외로 첨가되도록 조절함.
- pH 조절 후 0.45 um filter (28 mm syringe filter, Corning, USA)를 이용한 2차 여과로 얻어진 순수한 배양액을 실험에 사용함.
- 생물검정 및 생산량 측정을 위한 blastospore 수거는 원심분리 후 분리된 균체를 멸균된 증류수로 2번 washing하여 배양액을 제거하고, 증류수를 본래의 배양액만큼 넣어준 후 vortexing하여 현탁액을 제조하였으며, 이 후 멸균된 거즈로 균체를 제거하고 blastospore를 수거하여 실험에 이용함.

3) 점박이용애에 대한 곤충병원성 곰팡이의 살충성 검정

- PDA 배지에서 2주 동안 배양된 곰팡이 표면을 긁어 수확된 포자를 0.05% Tween 80을 이용하여 포자현탁액을 만들고 hemocytometer를 이용하여 계수하였으며, 생물검정 전 포자의 viability는 benomyl 배지에서 발아 여부를 확인하여 90% 이상 viability를 보이는 것만을 생물검정에 이용함.
- 과습된 탈지면이 포함된 60 mm petri dish에 지름 25 mm로 잘린 기주식물체 잎을 놓

고, 그 위에 하루 전에 우화한 점박이응애 성충 20마리를 올려놓은 후에 준비된 각 균주의 포자현탁액 1 ml (1×10^8 conidia/ml with 0.05% tween80)을 미술용 air brush와 원통 케이지로 구성된 SD tower sprayer를 사용하여 접종함.

- 점박이응애 접종 후 온도 25°C, 광조건 12L:12D, 습도 70% 조건으로 유지하고 24시간 간격으로 5일 동안 매일 관찰하였으며, 대조구로는 0.05% tween-80 용액만을 처리하였고 생물검정은 3반복 수행함.
- 사충들은 표피에서 곰팡이의 발생이 육안으로 관찰될 경우만 접종한 곰팡이에 의한 치사로 인정함.

4) 복숭아혹진딧물에 대한 곤충병원성 곰팡이의 살충성 검정

- PDA 배지에서 2주 동안 배양된 곰팡이 표면을 긁어 수확된 포자를 0.05% Tween 80을 이용하여 포자현탁액을 만들고 hemocytometer를 이용하여 계수하였으며, 생물검정 전 포자의 viability는 benomyl 배지에서 발아 여부를 확인하여 90% 이상 viability를 보이는 것만을 생물검정에 이용함.
- 1.5% agar가 얇게 분주된 90 mm petri dish에 60 mm로 잘린 기주식물체 잎을 놓고, 그 위에 복숭아혹진딧물 성충 20마리를 조심스럽게 올려놓은 후에 준비된 각 균주의 포자현탁액 1 ml (1×10^8 conidia/ml with 0.05% tween80)을 미술용 air brush와 원통 케이지로 구성된 SD tower sprayer를 사용하여 스프레이 방법으로 접종함.
- 복숭아혹진딧물 접종 후 온도 25°C, 광조건 16L:8D, 습도 70% 조건으로 유지하고 24시간 간격으로 7일 동안 매일 관찰하였으며, 대조구로는 0.05% Tween 80 용액만을 처리하였고 생물검정은 3반복 수행함.
- 사충들은 표피에서 곰팡이의 발생이 육안으로 관찰될 경우만 접종한 곰팡이에 의한 치사로 인정함.

5) 식물병원성 곰팡이

- 항진균 활성 실험에 사용된 식물병원성 곰팡이 토마토 잿빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea* T3-4), 고추 탄저병균(*Colletotrichum acutatum* 15AS32), 고추 역병균(*Phytophthora capsici* P13-1), 딸기 탄저병균(*Colletotrichum fructicola* CGF160401), 토마토 균핵병균(*Sclerotinia sclerotiorum* 11-49)은 충북대학교 식물진균병학 연구실에서 분양받았으며, 균주들은 PDA배지에 접종하고 *B. cinerea* T3-4와 *P. capsici* P13-1는 22°C, 나머지 균주는 25°C 조건으로 배양하여 실험에 사용함.

6) 식물병원성 세균

- 항세균 활성 실험에 사용된 식물병원성 세균 토마토 궤양병균(*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* LMG 7333)은 충북대학교 식물세균병학 연구실에서 분양받아 King's B medium (2% Proteose peptone no.3, 1% glycerol, 0.15% K₂HPO₄, 0.15% MgSO₄ · 7H₂O, pH 7.4)에서 27°C 조건으로 배양하면서 실험에 사용함.

7) 식물병원성 곰팡이와 곤충병원성 곰팡이의 대치배양

- 식물병원성 진균 *B. cinerea*에 대한 항진균 활성이 뛰어난 곰팡이 균주를 선발하기 위해 PDA배지에서 5일간 배양한 *B. cinerea* 균총의 가장자리를 cork borer를 이용하여 6 mm로 자른 후, 새로운 PDA배지(pH 5.6) 중앙을 기준으로 15 mm 좌측에 접종하고, 우측 15 mm에 PDA배지에서 7일간 배양한 곤충병원성 곰팡이 균주의 가장자리 6 mm 균총을 접종함.
- 접종 후, 25°C, 암 조건에서 4일간 배양하여 형성되는 inhibition zone의 크기를 측정함.

8) 곤충병원성 곰팡이 배양액을 이용한 식물병원성 진균에 대한 항진균 활성 검정

- 균주 배양액의 항진균 활성 검정은 *B. cinerea*를 PDA배지에서 배양하여 포자형성을 유도하였고, 곰팡이 표면을 긁어 수확된 포자를 10% PDB배지를 이용하여 포자현탁액을 제작함.
- 수거한 포자현탁액을 멸균된 거즈를 이용하여 *B. cinerea*의 균사를 제거하였으며, 포자를 hemocytometer로 계수하고 2 X PDB배지(pH 5.6)를 이용하여 약 2×10^4 conidia/ml이 되도록 조절한 후, 96 well plate에 100 ul 접종함.
- 접종 후, 100% 곰팡이 배양액과 멸균수로 희석한 1%, 10% 배양액을 100 ul씩 접종하고, 22°C, 암조건에서 48시간 배양 후 595 nm에서 흡광도를 측정하여 *B. cinerea*의 생장을 관찰하였으며, 대조구는 배양액 대신 100 ul의 멸균수를 사용함.
- 다른 식물병원성 곰팡이인 고추 탄저병균, 고추 역병균, 딸기 탄저병균, 토마토 균핵병균에 대한 항진균 활성도 동일한 방법으로 수행함.

9) 곤충병원성 곰팡이 배양액을 이용한 식물병원성 궤양병균에 대한 항세균활성 검정

- 균주 배양액의 항세균활성 검정은 *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*를 배양하여 2 X KB배지(pH 7.4)에서 650 nm로 흡광도(O.D)를 측정하여 균수를 약 1×10^8 CFU/ml이 되도록 한 후, 멸균수를 이용하여 약 5×10^5 CFU/ml로 조절한 뒤 96 well plate에 100 ul 접종함.
- 접종 후, KB배지(pH 7.4)로 1%, 10%, 100% 희석된 곰팡이 균주의 배양액 100 ul를 접종하고 27°C에서 36시간 배양 후 650 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 대조구는 100 ul의 KB배지(pH 7.4)에 멸균수를 사용함.

10) 곤충병원성 곰팡이 배양액의 식물에 대한 영향 평가

- 고추와 토마토 유묘의 잎을 소독한 가위를 이용하여 절단하고, 각각의 잎을 과습된 탈지면 위에 치상한 뒤 곤충병원성 곰팡이 배양액을 각각의 잎에 1ml씩 분사하였으며, 온도 25°C, 광조건 16L:8D, 습도 70% 조건으로 유지하였음.
- 대조구는 1ml의 증류수를 분사하였으며, 대조구와 비교하여 표면의 변화를 관찰함.

- 열매에 대한 영향 평가로 고추와 토마토 열매에 각각 1ml씩 배양액을 분사하여 접종하고 관찰하였으며, 유묘에 대한 영향 평가로는 6~7엽기 유묘에 각 잎당 1ml씩의 배양액을 분사하고, 온도 25℃, 광주조건 16L:8D, 습도 70% 조건으로 유지하였음.
- 대조구는 각 잎당 1ml의 증류수를 분사하였으며, 대조구와 비교하여 표면의 변화를 관찰함.

11) 식물체에서의 곤충병원성 곰팡이의 내생 유무 검정

- 2주간 배양된 곰팡이 표면을 긁어 수확된 포자를 0.05% tween-80을 이용하여 포자현탁액을 만들고 멸균된 탈지면을 이용하여 filtering하여 균사를 제거한 뒤, 균사가 제거된 포자현탁액을 hemocytometer를 이용하여 계수하였고 액체배지에 접종하기 전 benomyl 배지를 이용한 포자의 viability를 측정하여 90% 이상인 것을 이용함.
- 포자 현탁액을 1×10^8 conidia/ml with 0.05% tween80로 희석하고, 4~5엽기의 고추와 토마토 유묘에 5ml씩 분사하여 접종한 후 온도 25℃, 광주조건 16L:8D, 습도 70% 조건으로 유지하였음.
- 접종 2주일 후, 식물체를 수거하여 잎과 줄기, 뿌리를 멸균된 가위를 이용하여 각각 약 1cm의 크기로 자른 후 2% 차아염소산에서 5분간 침지, 70% 에탄올에서 1분간 침지 후 멸균수로 차아염소산과 에탄올을 제거해줌.
- 소독된 절편을 1.5 ml tube에 2 mm bead, 400 ul의 멸균수와 같이 넣어주고 homogenizer를 이용하여 5분간 마쇄한 후, 마쇄된 현탁액을 슬라이드 글라스에 20 ul 점적 후 커버 글라스를 덮어준 후 위상차 현미경을 통해 미생물의 여부를 관찰함.
- 현미경을 통해 미생물의 여부를 관찰한 후, 여부가 확인된 절편을 선택배지 (Streptomycin과 chloramphenicol이 포함된 항생제 배지)에서 배양하고 배양된 곰팡이에 대한 형태학적, 분자생물학적 동정을 통해 접종 균주인지를 확인함.

12) 곤충병원성 곰팡이 균주별 환경 조건 탐색

- 균주별 환경 조건 탐색으로 PDB배지를 아래와 같은 조건(표 1)으로 제작하고 배양을 수행함.
- 2주간 배양된 곰팡이 표면을 긁어 수확된 포자를 0.05% tween-80을 이용하여 포자현탁액을 만들고 멸균된 탈지면을 이용하여 filtering하여 균사를 제거한 뒤, 균사가 제거된 포자현탁액을 hemocytometer를 이용하여 계수하였고 액체배지에 접종하기 전 benomyl 배지를 이용한 포자의 viability를 측정하여 90% 이상인 것을 이용하여, 얻어진 포자현탁액을 50 ul (9×10^5 conidia/ml with 0.05% tween80)를 pH별로 접종하고 25℃, 10일간 배양함.
- 온도와 기간에 따른 변화 평가 방법은 위의 포자현탁액을 PDB배지(pH 5.6)에 접종하고 온도별, 기간별로 배양하였으며, 이 후 배양액을 수거하여 filtering한 후 균주별 항균활성 평가를 수행함.

표 1. 곤충병원성 곰팡이 환경 조건

조 건	세부조건
pH	4.5, 5.0, 5.5, 6.0
온도	15도, 20도, 25도, 30도
배양기간	4일, 7일, 10일, 14일

13) 곤충병원성 곰팡이 배양산물을 이용한 점박이응애에 대한 살충력 검정

- 곤충병원성 곰팡이의 배양산물을 이용한 점박이응애 생물검정은 과습된 탈지면이 포함된 60 mm petri dish에 지름 25 mm로 잘린 콩잎을 놓고, 그 위에 미술용 brush를 이용하여 점박이응애 약충 20마리를 올려놓은 후에 준비된 각 균주의 고체배양으로 수거된 aerial conidia 1 ml (1×10^8 conidia/ml with 0.02% tween-80)과 액체배양으로 수거된 blastospore 1 ml (1×10^8 blastospore/ml with distilled water), 배양액 1 ml, aerial conidia와 blastospore를 원심 분리하여 침전시킨 뒤 배양액을 이용하여 현탁한 혼합액 각각 1 ml (1×10^8 conidia/ml with fungal culture filtrate), 1 ml (1×10^8 blastospore/ml with fungal culture filtrate)을 원통 케이지로 구성된 SD tower sprayer를 사용하여 각각 접종함.
- 접종 후 점박이응애는 온도 25°C, 광주조건 12L:12D, 습도 70% 조건으로 유지하고 24시간 간격으로 7일 동안 매일 관찰, 기록하였으며, 대조구로는 0.02% tween-80 용액만을 처리하였고 생물검정은 3반복 수행함.

14) 곤충병원성 곰팡이 배양산물을 이용한 복숭아혹진딧물에 대한 살충력 검정

- 곤충병원성 곰팡이의 배양산물을 이용한 복숭아혹진딧물 생물검정은 1.5% agar가 얇게 분주된 90 mm petri dish에 60 mm로 잘린 배춧잎을 놓고, 그 위에 복숭아혹진딧물 성충 20마리를 미술용 brush를 이용하여 올려놓은 후에 준비된 각 균주의 고체배양으로 수거된 aerial conidia 1 ml (1×10^8 conidia/ml with 0.02% tween-80)과 액체배양으로 수거된 blastospore 1 ml (1×10^8 blastospore/ml with distilled water), 배양액 1 ml, aerial conidia와 blastospore를 원심 분리하여 침전시킨 뒤 배양액을 이용하여 현탁한 혼합액 각각 1 ml (1×10^8 conidia/ml with fungal culture filtrate), 1 ml (1×10^8 blastospore/ml with fungal culture filtrate)을 원통 케이지로 구성된 SD tower sprayer를 사용하여 각각 접종함.
- 접종 후 복숭아혹진딧물은 온도 25°C, 광주조건 16L:8D, 습도 70% 조건으로 유지하고 24시간 간격으로 7일 동안 매일 관찰, 기록하였으며, 대조구로는 0.02% tween-80 용액만을 처리하였고 생물검정은 3반복 수행함.

15) 항진균 활성물질의 작용 기작 결정

- *B. cinerea*에 대해서 높은 항진균 활성을 가지는 배양액의 작용 기작을 확인하기 위하여, *B. cinerea* 현탁액 50 ul (2×10^5 conidia/ml)와 각각의 배양액 1 ml을 1.5 ml microtube에 접종하고 vortexing 한 후, 22°C에 정지배양 하였다. 각각의 처리구를 다양한 시간(1, 2, 4, 8, 16, 24, 32, 48시간)동안 처리 후 수거하고, 13,000 rpm, 10분 동안 원

심 분리하여 균주를 침전시켰다. 이 후 침전물에 멸균수 1 ml을 넣어서 vortexing 후 다시 침전하는 방법을 2회 반복하여 배양액을 제거하였으며, 멸균수로 희석된 1 ml 현탁액을 10%로 희석하고 100 ul를 PDA배지에 도말하였다. 이 후 22℃에서 각각 4일간 배양하여 균사의 생장을 관찰하였다. 대조구는 배양액 대신 멸균수를 이용하였다.

16) 항진균 활성물질의 열 안정성

- 배양액 활성물질의 열에 대한 안정성 확인을 위해서 곰팡이 배양액을 다양한 온도(50℃, 80℃, 100℃, 121℃)에서 15분 동안 처리함.
- 처리한 배양액들은 바로 얼음에 두어 실온 조건으로 안정화시키고, *B. cinerea*에 대한 항진균 활성을 검정하였고, 대조구는 4℃에서 보관된 배양액을 사용함.

17) 항진균 활성물질의 친수성/소수성

- 활성물질의 친수성 또는 소수성 성질을 알아보기 위해서 acetone 침전법을 이용함.
- 준비된 배양액에 미리 -20℃에서 차갑게 준비한 acetone (Sigma, USA)을 배양액량의 4배에 해당하는 양으로 첨가하여 vortexing하고 -20℃에 24시간 방치하고, 24시간 후 13,000 × g, 10분간 원심 분리하여 상층액과 침전물을 분리하고 분리된 두 층은 동결 건조하여 acetone을 제거함.
- 건조된 친수성/소수성 물질은 멸균수를 이용하여 1 X 배양액의 농도로 용해시킨 후 *B. cinerea*에 대한 항진균 활성을 평가하였고, 대조구는 무처리한 배양액을 사용하였다.

18) 항진균 활성물질의 정상

- 배양액의 활성물질의 정상을 확인하기 위해 proteinase K (Takara, Japan)와 pronase E (Amresco, USA)를 사용함.
- Proteinase K와 pronase E는 곰팡이 배양액에 최종농도 1 mg/ml, 300 ug/ml가 되도록 각각 처리한 후, 37℃, 150 rpm조건으로 proteinase K는 2시간, pronase E는 24시간동안 처리함.
- 처리 후, proteinase K는 121℃에서 15분, pronase E는 80℃에서 20분 처리하여 각각의 proteinase를 불활성화한 뒤, *B. cinerea*에 대한 항진균 활성을 검정하였고, 대조구는 무처리구와 proteinase들을 첨가하지 않고 다른 조건들은 동일하게 처리한 것을 사용함.

19) 곤충병원성 곰팡이 효율적 배양배지 탐색

- 선발된 균주들의 배지에 따른 blastospore 생산 효율과 항진균활성을 비교하고자, 각각 PDB (Potato dextrose broth; 0.4% potato starch, 2% dextrose, pH 5.5), SDB (Sabouraud dextrose broth; 0.5% peptic digest of animal tissue, 0.5% pancreatic digest of casein, 2% dextrose, pH 5.5), GY (2% glucose, 0.2% yeast extract, 0.02% MgSO₄ · 7H₂O, 0.1% K₂HPO₄, pH 5.5), Adamek's (4% glucose, 4% yeast extract, 3% corn steep liquor, pH 5.5) 배지 100ml을 250ml 플라스크에 분주하고, 각각의 균주를 100 ul (1 × 10⁸ conidia/ml)씩 접종하여 25℃, 150 rpm, 암조건에서 7일간 배양하여

blastospore 생산량과 항균활성을 확인함.

- Blastospore 생산량 측정은 7일간 배양한 산물을 원심 분리하여 분리된 균체에 멸균수를 2회 처리하여 배양액을 제거하고, 멸균수를 다시 1 X의 농도로 첨가하고 vortexing 하여 현탁액을 제작하여 멸균된 거즈를 이용해 균체를 제거하고, blastospore를 수거하여 hemocytometer로 계수함.
- 항진균 활성 측정은 배양산물을 원심분리 후 얻어진 배양액을 filter paper로 1차 여과한 후, 항진균 활성 검정을 위해 배양액을 pH 5.6으로 NaOH와 HCl을 이용하여 조절하였으며, 다시 0.45 um filter를 이용한 2차 여과로 얻은 순수한 배양액을 각각 농도별(1, 10, 20, 40, 60, 80, 100% with sterile distilled water)로 희석한 후 *B. cinerea*에 대한 항진균 활성을 검정함.

20) 유묘와 과실에서의 곤충병원성 곰팡이 배양액의 항진균 활성 검정

- 딸기 유묘에서 잿빛곰팡이병에 대한 배양액의 항진균 활성을 확인하기 위하여, 딸기 유묘(설향; 왕대박딸기)를 원예용 상토(보급자리; 농우바이오)가 담긴 9 cm 컵 포트에 옮겨주고, 증류수로 희석한 다양한 농도(1, 10, 20, 40, 60, 80, 100%)와 양(5, 10, 15 ml)의 배양액을 유묘의 잎에 분무 접종하고, 다음 날 *B. cinerea* 현탁액 5 ml (1×10^5 conidia/ml)씩 분무 접종함.
- 이 후 검은색 봉지를 24시간 동안 덮어주어 높은 습도와 빛의 차단으로 발병을 유도하고, 배양액 처리구는 추가적으로 2일 뒤 배양액을 초기 접종 농도와 양으로 분무기를 이용하여 추가 접종하였으며, 병 발생 정도는 감염된 유묘의 잎 수와 형성된 병반의 직경을 측정하고자 하였고, 대조구는 배양액 대신 멸균수를 같은 방법으로 처리함.
- 추가로 딸기 과실에서 잿빛곰팡이병에 대한 배양액의 발병억제 효과를 확인하기 위하여, 딸기 과실을 70% 에탄올과 1% NaClO 용액을 이용하여 각각 1분간 표면 소독하고, 증류수로 2회 세척한 후 클린벤치 내에서 물기를 건조하고 100% 농도의 배양액에 30초간 침지하였음.
- 이 후 *B. cinerea* 현탁액 1 ml (2×10^3 conidia/ml)씩 분무 접종하고, 소독한 플라스틱 용기(30 x 20 x 10 cm, W x L x H)에 넣고 20°C, 광조건 16L:8D, 습도 70% 조건에서 관찰하였으며, 대조구로는 배양액 대신 멸균수를 같은 방법으로 처리한 것과 배양액을 같은 방법으로 처리하고 *B. cinerea*를 처리하지 않은 것으로 5반복 수행함.

○ 연구결과

1) 점박이용애에 대한 병원성 곰팡이의 살비성 및 생물학적 특성 검정

- 점박이용애에 대한 살비성 곰팡이를 이용하여 기주식물에서 점박이용애에 대한 병원력을 반수치사시간(LT₅₀)값을 이용하여 평가하였으며, 그 결과 모든 실험구들은 2.7~4.7일에서 반수 치사 능력을 가지는 것으로 확인됨(그림 1, A).
- 특히, *B. bassiana* 2R-4-7, *M. anisopliae* 4-2, *P. lilacinum* 2R-4-6 균주의 경우 80% 이상의 높은 살비율을 보였으며, 처리구에서 사멸한 모든 응애는 전형적인 곰팡이병 증상을 보임(그림 1, B)
- 살비성 곰팡이들의 야외 환경에서의 적용을 위해 포자의 고온 안정성, UV-B 안정성,

저온 발아력을 평가한 결과 각각의 균주마다 다른 생물학적 특성을 보였으며, 추후 야외 환경에 적용시 제제화 단계에서의 여러 가지 첨가물의 필요성이 확인됨(그림 1, A)

A

Species / isolates	Mortality (%)	LT ₅₀ (d)	Conidial germination rate (%)								
			Exposure to 45°C				Exposure		Incubating at 4°C		
			1 h	2 h	3 h	4 h	0.1 joule	0.2 joule	5 d	10 d	15 d
<i>Beauveria bassiana</i>											
5-1	55	4.1	76	47	20	1	42	0	0	27	95
6	67	3.7	21	0	0	0	47	0	0	28	94
2R-3-3-1	75	2.7	73	1	0	0	48	0	0	30	99
2R-4-5	67	2.6	82	7	3	1	90	4	2	37	81
2R-4-7	82	4.0	88	13	5	4	98	32	97	99	100
SDTu	59	4.7	82	17	4	3	98	17	5	36	77
<i>Metarhizium anisopliae</i>											
2-2	69	3.8	93	48	6	1	25	0	0	0	0
4-2	100	2.9	95	15	2	0	5	0	0	0	0
<i>Lecanicillium attenuatum</i>											
4-1	100	2.8	35	3	13	4	99	15	87	100	100
<i>Aspergillus flavus</i>											
7	59	4.2	89	88	72	77	98	80	0	0	0
<i>Purpureocillium lilacinum</i>											
2R-4-6	84	3.1	99	96	89	85	40	0	0	0	15

B

그림 1. 점박이용애에 대한 곰팡이의 살비성 및 생물학적 특성

(A) 병원성 곰팡이의 살충률, 반수치사시간, 생물학적 특성;

(B) 병원성 곰팡이에 의해 사멸한 사충

- 2) 복숭아혹진딧물에 대한 곤충병원성 곰팡이의 살충성 및 생물학적 특성 검정
- 복숭아혹진딧물에 대한 살충성 곰팡이를 이용하여 기주식물에서 복숭아혹진딧물에 대한 병원력을 반수치사시간(LT₅₀)값을 이용하여 평가하였으며, 그 결과 실험구들은 2.2~4.8 일에서 반수 치사 능력을 가지는 것으로 확인됨(그림 2, A).
 - 특히, *L. attenuatum* SDMp1, SDMp2, *B. bassiana* 2-19-4, 4-2, *M. anisopliae* 1-5 균주의 경우 80% 이상의 높은 살충율을 보였으며, 처리구에서 사멸한 모든 진딧물은 전형적인 곰팡이병 증상을 보임(그림 2, B).
 - 살충성 곰팡이들의 야외 환경에서의 적용을 위해 포자의 고온 안정성, UV-B 안정성, 저온 발아력을 평가한 결과 각각의 균주마다 다른 생물학적 특성을 보였으며, 추후 야외 환경에 적용시 제제화 단계에서의 여러 가지 첨가물의 필요성이 확인됨(그림 2, A)

Species / isolates	Mortality (%)	LT ₅₀ (days)	Conidial germination rate (%)					
			Exposure to 45°C		Incubating at 4°C		Exposure	
			1h	2h	7 day	14 day	0.1 joule	0.2 joule
L. attenuatum								
SDMp1	100	2.2	23.3	5.6	100	100	98.3	63
SDMp2	98.3	3.1	11	0	100	100	96.7	52.6
B. bassiana								
1-3	73.3	4.5	29.9	4.6	90.3	100	98.3	56.3
2-8	70	4.3	17.3	0	60.6	94.3	95	35.6
2-19-4	80	4.0	18	0	99.6	99.7	95	74.6
2-20	51.6	4.8	83.8	28.3	75	82.3	40.3	3.3
3-3	50	4.8	55.6	14.3	99.3	100	91.7	32.3
3-5	55	4.3	20	6.6	93.6	94.7	93.3	17.6
4-2	81.6	3.8	16.3	5.3	95.6	99	92.7	64
M. anisopliae								
1-5	100	2.8	84.7	35.7	1	88	87.7	27.3
P. lilacinus								
4-4	71.6	4.2	92	67.2	93.3	100	99	82
4-5	60	4.3	96.1	81.7	89	100	89	22.6



그림 2. 복숭아혹진딧물에 대한 곰팡이의 살충성 및 생물학적 특성

(A) 병원성 곰팡이의 살충률, 반수치사시간, 생물학적 특성;

(B) 병원성 곰팡이에 의해 사멸한 사충

3) 잿빛곰팡이병균에 대한 곤충병원성 곰팡이 포자의 항균 활성

- 점박이용애와 복숭아혹진딧물에 병원성을 가진 곤충병원성 곰팡이 중 식물병원성진균 *B. cinerea*에 대한 항진균 활성을 가지는 균주를 선별하기 위하여, 각각의 곤충병원성 곰팡이와 *B. cinerea*를 대치 배양하는 방법을 이용하였음
- 그 결과, *B. cinerea*의 생장에 전혀 영향을 주지 않는 곰팡이와 4 mm 이상의 저해능을 보이는 곰팡이 등 다양한 척도의 항진균 활성이 관찰되었음(그림 3).
- 각 곰팡이 균주의 항진균 활성은 두 곰팡이 사이의 저해능 길이가 4 mm 이상인 것, 2~4 mm 사이인 것(그림 3, D), 2 mm 이하인 것, 활성이 없는 것(그림 3, E)으로 총 4 단계로 나누었을 때, 점박이용애 병원성 곰팡이의 경우 4 mm 이상인 1개 균주(그림 3, C), 2~4 mm 사이인 5개 균주, 2 mm 이하인 2개 균주, 항진균 활성이 없는 3개 균주로 나누어졌음(그림 3, A).
- 복숭아혹진딧물 병원성 곰팡이의 경우는 4 mm 이상인 1개 균주, 2~4 mm 사이인 3개 균주, 2 mm 이하인 6개 균주, 항진균 활성이 없는 2개 균주로 나타났다(Table 3, B).

- 실험에 이용된 균주 중 21.7%에 해당하는 균주가 항진균 활성을 보이지 않았으며, 대체적으로 *B. bassiana*가 높은 항진균 활성을 나타내었고, *M. anisopliae*가 중간 항진균 활성, *P. lilacinum*은 낮은 항진균 활성을 보였으며, *L. attenuatum*의 경우 균주별로 큰 차이를 보였음.

A		B	
Species / isolates	Antifungal activities (Clear zone, mm)	Species / isolates	Antifungal activities (Clear zone, mm)
<i>Beauveria bassiana</i>		<i>L. attenuatum</i>	
5-1	2.6 ± 0.4	SDMp1	0 ± 0
6	2.1 ± 0.1	SDMp2	0.6 ± 0.2
2R-3-3-1	1.3 ± 0.3	<i>B. bassiana</i>	
2R-4-5	3.3 ± 0.3	1-3	2.3 ± 0.4
2R-4-7	0 ± 0	2-8	2.5 ± 0.1
SDTu	2.4 ± 0.6	2-19-4	0.5 ± 0
<i>Metarhizium anisopliae</i>		2-20	0.2 ± 0.2
2-2	2 ± 0.9	3-3	2.4 ± 0.2
4-2	1.8 ± 0.3	3-5	1.0 ± 0.1
<i>Lecanicillium attenuatum</i>		4-2	5.2 ± 0.3
4-1	4.1 ± 0.5	<i>M. anisopliae</i>	
<i>Aspergillus flavus</i>		1-5	1 ± 0
7	0 ± 0	<i>M. flavoviride</i>	
<i>Purpureocillium lilacinum</i>		<i>P. lilacinus</i>	
2R-4-6	0 ± 0	4-4	0.2 ± 0.2
		4-5	0 ± 0

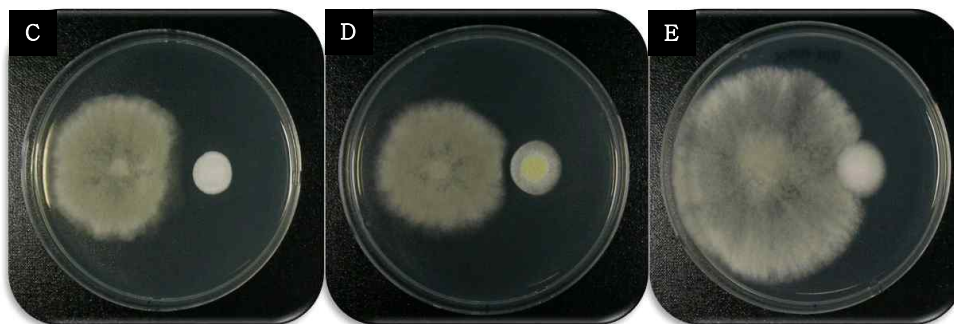


그림 3. 병원성 곰팡이와 *B. cinerea*의 대치 배양을 통한 저해능

- (A) 점박애응애 병원성 곰팡이의 *B. cinerea*에 대한 저해능;
- (B) 복숭아혹진딧물 병원성 곰팡이의 *B. cinerea*에 대한 저해능;
- (C) 높은 저해능(*L. attenuatum* 4-1); (D) 중간 저해능(*M. anisopliae* 4-2);
- (E) 낮은 저해능(*P. lilacinum* 2R-4-6)

4) 곤충병원성 곰팡이 배양액의 항진균 활성

- 곤충병원성 곰팡이 배양액의 *B. cinerea*에 대한 항진균 활성을 확인하기 위해서, PDB배지(pH 5.6)에서 동일한 환경으로 2주간 액체 배양한 뒤 얻은 배양산물로부터 균체를 제거하고, 동일한 pH조건에서의 항진균 활성을 검정하기 위해 모든 배양액을 pH 5.6 ± 0.2로 조절하였음.
- 얻어진 순수한 배양액을 이용하여 *B. cinerea*에 대한 항진균활성을 검정한 결과, 배양액 농도별로 다양한 항진균 활성을 보였음(그림 4).
- 배양액의 항진균 활성은 농도가 높을수록 활성이 증가되었고 1% 배양액의 경우 활성을 확인할 수 없었으며, 점박이응애 병원성 곰팡이 배양액의 경우 6개 균주(*B. bassiana*

5-1, 2R-3-3-1, 2R-4-5, SDTu, *M. anisopliae* 2-2, 4-2)가 10% 배양액에서도 높은 항진균 활성을 나타내었으며(그림 4, A), 복숭아혹진딧물 병원성 곰팡이 배양액의 경우 5개 균주(*B. bassiana* 2-19-4, 3-3, 3-5, 4-2, *M. anisopliae* 1-5)가 10% 배양액에서도 높은 항진균 활성을 보였음(그림 4, B).

- 앞서 실험한 균주와 배양액의 항진균 활성을 비교하였을 때, *A. flavus*와 *P. liacinum*는 두 결과 모두 항진균 활성을 거의 확인할 수 없었으며, *L. attenuatum*의 경우는 균주의 대치배양 실험에서 항진균 활성이 높았던 *L. attenuatum* 4-1 균주도 배양액에서는 항진균 활성을 보이지 않았음.

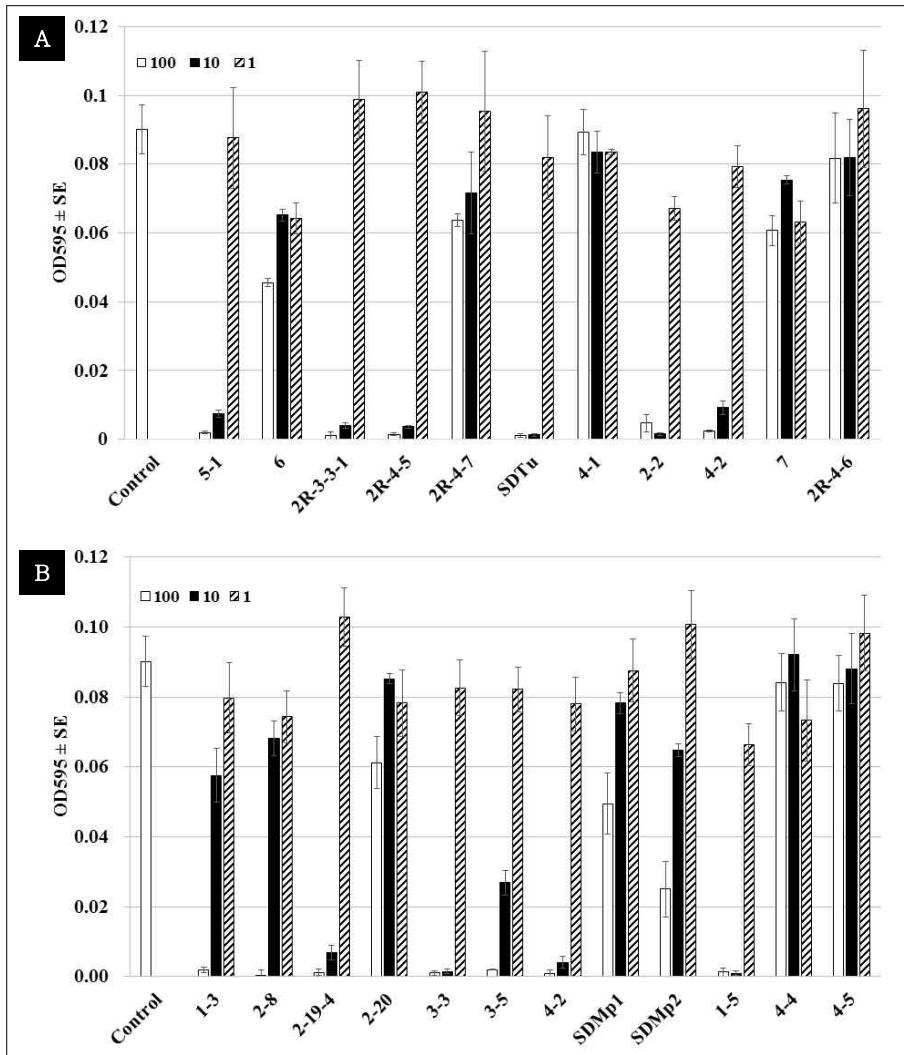


그림 4. 곤충병원성 곰팡이 배양액의 *B. cinerea*에 대한 항진균 활성

(A) 점박애응에 병원성 곰팡이 배양액의 항진균 활성;

(B) 복숭아혹진딧물 병원성 곰팡이 배양액의 항진균 활성

5) 곤충병원성 곰팡이 배양액의 항세균 활성

- 곤충병원성 곰팡이 배양액의 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*에 대한 항세균 활성을 확인하기 위해서, PDB배지(pH 5.6)에서 동일한 환경으로 2주간 액체 배양한 뒤 얻은 배양산물로부터 균체를 제거하고, 동일한 pH조건에서의 항세균 활성을 검

정하기 위해 모든 배양액을 pH 7.4 ± 0.2로 조절하였음.

- 얻어진 순수한 배양액을 이용하여 *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*에 대한 항세균활성을 검정한 결과, 배양액 농도별로 다양한 항세균 활성을 보였음(그림 5).
- 대부분의 균주의 배양액은 높은 항세균 활성을 나타내지 않았으며, 점박이응애 병원성 균주의 배양액에서는 *M. anisopliae* 2-2, *A. flavus* 7가 100% 배양액에서 높은 항세균 활성을 나타내었으며(그림 5, A), 복숭아혹진딧물 병원성 균주의 배양액에서는 *B. bassisana* 3-3가 100% 배양액에서 높은 항세균 활성을 나타내었음(그림 5, B).

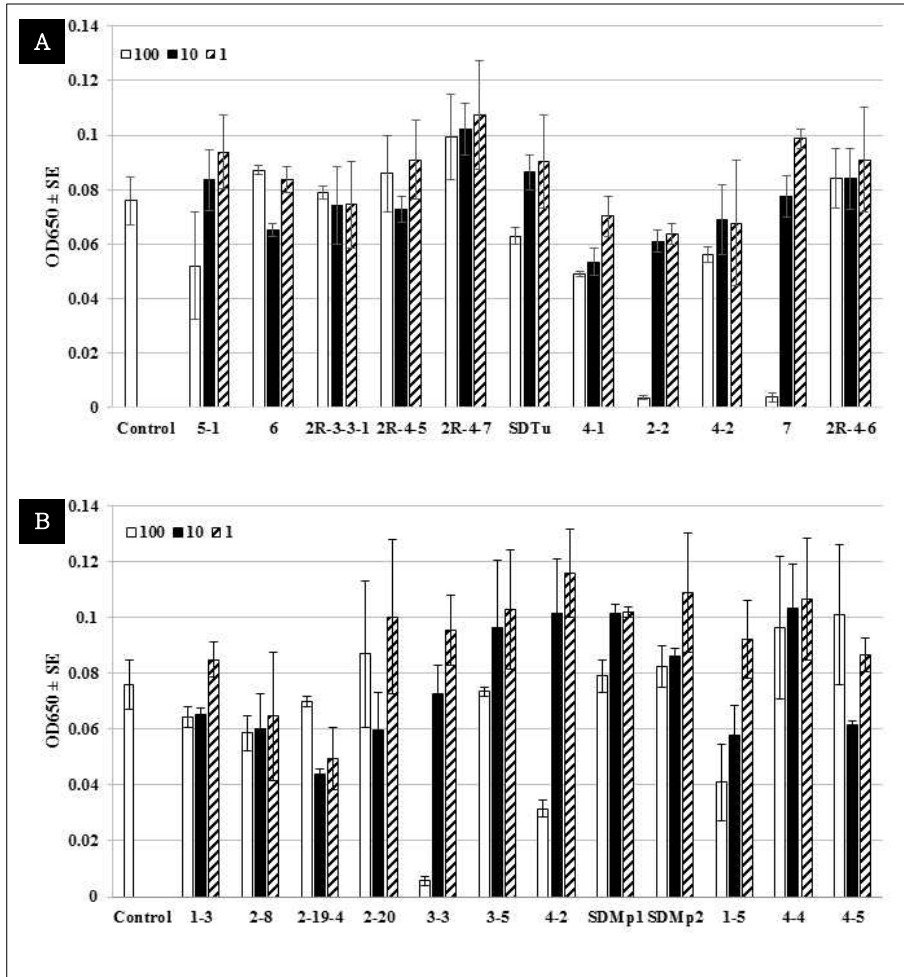


그림 5. 곤충병원성 곰팡이 배양액의 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*에 대한 항세균 활성

(A) 점박이응애 병원성 곰팡이 배양액의 항세균 활성;

(B) 복숭아혹진딧물 병원성 곰팡이 배양액의 항세균 활성

6) 곤충병원성 곰팡이 배양액의 식물 생육에 대한 영향 평가

- 곤충병원성 곰팡이 포자의 경우는 세계적으로 상용화되어 널리 사용되어지고 있기 때문에 식물에 대한 약해에 대해서는 큰 피해가 없을 것으로 판단되어지나, 실험에서 보고자하는 식물병원균에 대한 활성 효과는 흔히 사용되지 않았던 배양액을 사용하기 때문에 식물 생육에 대한 배양액의 영향 평가를 실시함.

- 배양액의 항세균 및 항진균활성 실험 결과를 토대로 우수한 활성을 보인 6개 균주(*B. bassiana* 2-19-4, 3-3, 5-1, *M. anisopliae* 1-5, 2-2, *A. flavus* 7)의 배양액을 고추 및 토마토 열매와 고추 잎에 spray 접종하여 관찰한 결과, 열매에서는 모든 균주에서 어떠한 약해를 관찰 할 수 없었으나(그림 6, A), 고추잎에 대해서는 6개 균주 중 4개 균주에서는 약해가 관찰되지 않았으나 2개의 균주(*B. bassiana* 2-19-4, 5-1)의 경우 약한 약해 가능성을 보였으나(그림 6, B), 고추에 직접 적용 시에는 어떠한 약해도 보이지 않았음.
- 곤충병원성 곰팡이 배양액에 의한 고추 잎의 약해는 곰팡이의 여러 가지 이차대사산물에 의한 것으로 추정되며, 곰팡이에 의한 이차대사산물의 생성은 곰팡이 균주마다 서로 다른 특성을 보이므로 식물병의 방제 목적으로 곰팡이 배양액을 이용하기 위해서는 다양한 측면에서 식물체에 대한 위해성 평가가 반드시 필요함을 지적하는 결과였음.

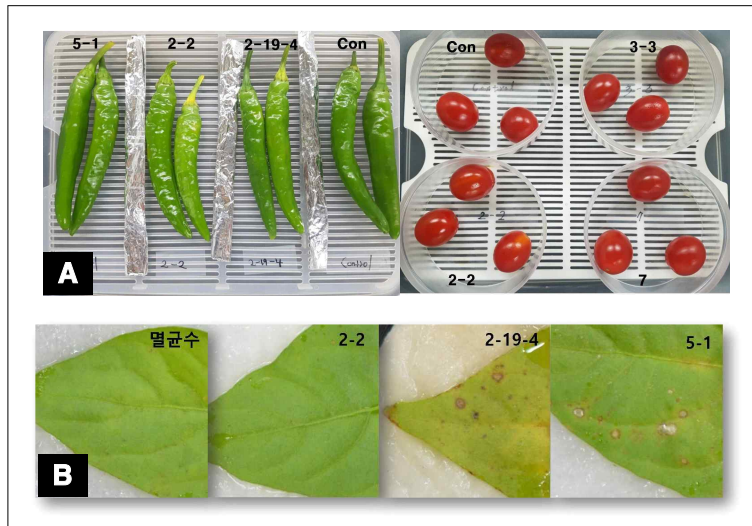


그림 6. 기주식물체에서 대한 배양액 약해

(A) 고추와 토마토 열매에 대한 배양액 약해 검정; (B) 고추 잎에 대한 배양액 약해 검정

7) 식물체에서의 곤충병원성 곰팡이 내생 여부 확인 검정

- 최근 연구에서 곤충병원성 곰팡이가 곤충병원성 역할 뿐만 아니라 내생균 등 자연에서의 새로운 역할들이 발견되어 지면서 식물병원체 및 초식동물로부터 보호하는 가능성이 밝혀지고 있음.
- 실험에서 이용된 곤충병원성 곰팡이 균주들의 내생균으로서 활용 가능성을 확인하고자 고추와 토마토 유묘에 우선적으로 선발된 균주들 중 종별로 하나의 균주씩 선발하였고(표 2), 포자 현탁액을 접종 후 2주일 뒤에 식물체를 수거하여 잎과 줄기, 뿌리의 현탁액을 만들고 내생균 여부를 현미경 상에서 관찰함.
- 미생물의 존재를 확인하여, 실험에 이용된 곤충병원성 곰팡이의 증식에 따른 것인지에 대한 동정을 위해 고체 배지상에서 배양하고(그림 7)이며, 배양 후 균의 형태학적 동정과 분자생물학적 동정을 통하여 동정 결과, 곤충병원성 곰팡이가 아닌 *Aspergillus flavus*, *Botrytis cinerea* 등 다른 토양 곰팡이로 동정됨.
- 곤충병원성 곰팡이의 내생균 역할에 대해서는 추후 연구가 더 필요할 것으로 판단됨.

Species / isolates		Mortality (%)	LT ₅₀ (d)	Antimicrobial activities		
				using spore		using fungal filtrate
				anti-fungal	anti-fungal	anti-bacterial
<i>B. bassiana</i>						
	2R-3-3-1	75	2.7	1.3 ± 0.3	10*	•
<i>M. anisopliae</i>						
	2-2	69	3.8	2 ± 0.9	10	100**
<i>L. attenuatum</i>						
	4-1	100	2.8	4.1 ± 0.5	•	•

Species / isolates		Mortality (%)	LT ₅₀ (d)	Antifungal activities		
				using spore		Using fungal filtrate
				anti-fungal	anti-fungal	anti-bacterial
<i>B. bassiana</i>						
	4-2	81.6	3.6	5.2 ± 0.3	10	•
<i>M. anisopliae</i>						
	1-5	100	2.8	1 ± 0	10	•
<i>L. attenuatum</i>						
	SDMp2	98.3	3.1	0.6 ± 0.2	•	•

표 2. 식물체 내생여부 확인 검정 선발 균주

(A) 점박이응애 살비성 곰팡이 균주; (B) 복숭아혹진딧물 살충성 곰팡이 균주

* : 10% 배양액에서 식물병원균 저해율 90% 이상; * * : 100% 배양액에서만 식물병원균 저해율 90% 이상



그림 7. 내생균 동정을 위한 선택배지를 이용한 고체 배지 배양

8) 활성 최적화를 위한 곤충병원성 곰팡이 균주별 환경 조건 탐색

- 곰팡이의 성장에 영향을 주는 조건인 pH, 온도, 배양기간 등에 따라 균주를 배양하여 식물병의 억제 효능을 평가하여 효능과 환경에 대한 최적의 조건을 확립하고자 우선적으로 8개의 균주를 선발(표 3)하였으며 이 균주들에 대해서 배지의 pH, 배양 온도와 기간에 차이를 두어 배양함.
- 같은 PDB배지(pH 5.6)에서 균주를 동일한 온도(25°C)로 일차별(4일, 7일, 10일, 14일)간 수거하여 pH를 측정한 결과(그림 8), 시간이 지남에 따라 각각 균주의 배양액 pH가 다르게 변함을 확인하였고 pH는 모두 낮아지는 양상을 나타냄.

A				Antimicrobial activities		
				using spore anti-fungal	using fungal filtrate anti-fungal	using fungal filtrate anti-bacterial
Species / isolates	Mortality (%)	LT ₅₀ (d)				
<i>B. bassiana</i>						
5-1	55	4.1	2.6 ± 0.4	10*	•	
2R-3-3-1	75	2.7	1.3 ± 0.3	10	•	
<i>M. anisopliae</i>						
2-2	69	3.8	2 ± 0.9	10	100**	
<i>L. attenuatum</i>						
4-1	100	2.8	4.1 ± 0.5	•	•	

B				Antifungal activities		
				using spore anti-fungal	Using fungal filtrate anti-fungal	Using fungal filtrate anti-bacterial
Species / isolates	Mortality (%)	LT ₅₀ (d)				
<i>B. bassiana</i>						
2-19-4	80	4.0	0.5 ± 0	10	•	
4-2	81.6	3.6	5.2 ± 0.3	10	•	
<i>M. anisopliae</i>						
1-5	100	2.8	1 ± 0	10	•	
<i>L. attenuatum</i>						
SDMp2	98.3	3.1	0.6 ± 0.2	•	•	

표 2. 균주별 환경 조건 탐색 선발 균주

(A) 점박이응애 살비성 곰팡이 균주; (B) 복숭아혹진딧물 살충성 곰팡이 균주

* : 10% 배양액에서 식물병원균 저해율 90% 이상; * * : 100% 배양액에서만 식물병원균 저해율 90% 이상

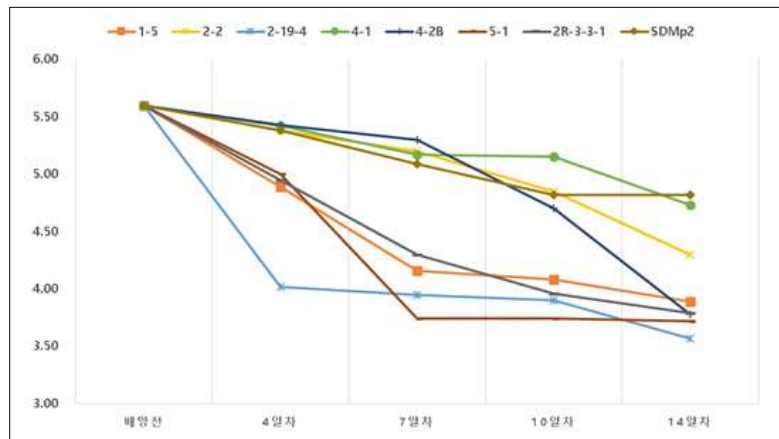


그림 8. 곤충병원성 곰팡이 배양액의 일차별 pH 변화

- 일차별 배양액을 이용하여 식물병원균에 대한 항균 활성을 평가한 결과(그림 9), 배양기간에 따라 균주의 성장 및 항균활성이 다름을 확인할 수 있었고 배양기간에 따라 활성이 증가되고 pH 변화와 유사함을 확인함.
- 4개의 pH조건으로(4.5, 5.0, 5.5, 6.0)로 균주를 배양하고, 균주의 배양간 초기 pH별 식물병원균에 대한 항균활성을 평가한 결과(그림 10), 초기의 pH 조건은 항균활성에 큰 영향이 없음을 확인함.
- 4가지의 온도(15°C, 20°C, 25°C, 30°C)로 균주를 배양하고, 균주의 온도별 배양액을 이용하여 식물병원균에 대한 항균활성을 평가한 결과(그림 11), 각각의 온도 조건에 따라 균

주의 생장 및 항균 활성이 다름을 확인하였고 대부분의 균주가 20℃, 25℃에서 가장 우수한 활성을 나타냄.

- 이러한 각 균주별 환경 조건 탐색과정은 추후 우수한 균주를 선발하여 제제화, 상용화가 이루어질 때 문제시 될 수 있는 균주의 배양 기간을 단축하면서 최대의 양적·질적 효과를 기대할 수 있을 것임.

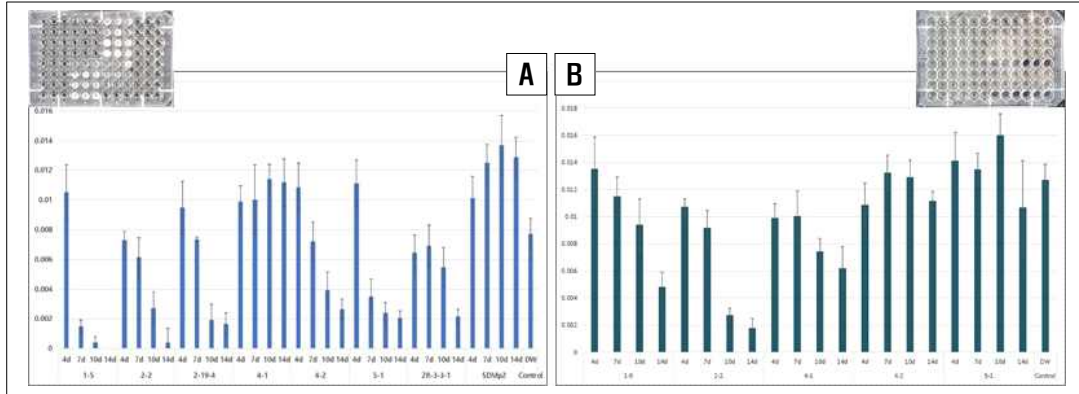


그림 9. 곤충병원성 곰팡이 배양액의 일자별 항균 활성

(A) 잿빛곰팡이병에 대한 항진균 활성; (B) 궤양병에 대한 항세균 활성

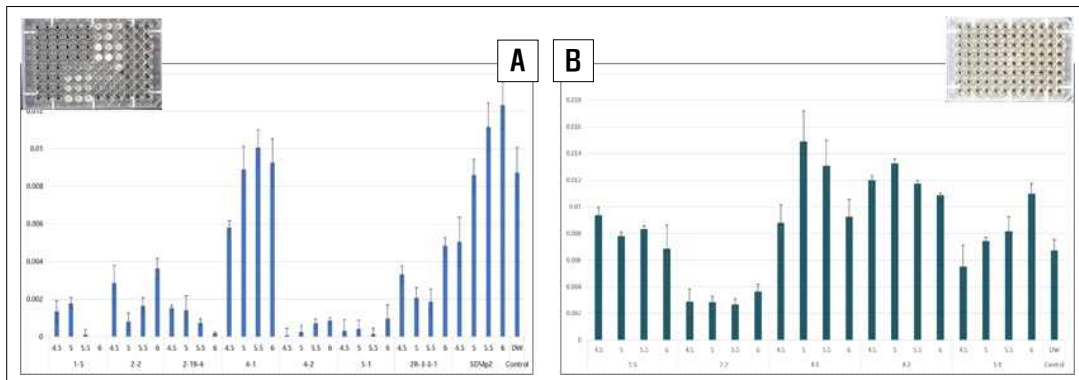


그림 10. 곤충병원성 곰팡이 배양액의 pH별 항균 활성

(A) 잿빛곰팡이병에 대한 항진균 활성; (B) 궤양병에 대한 항세균 활성

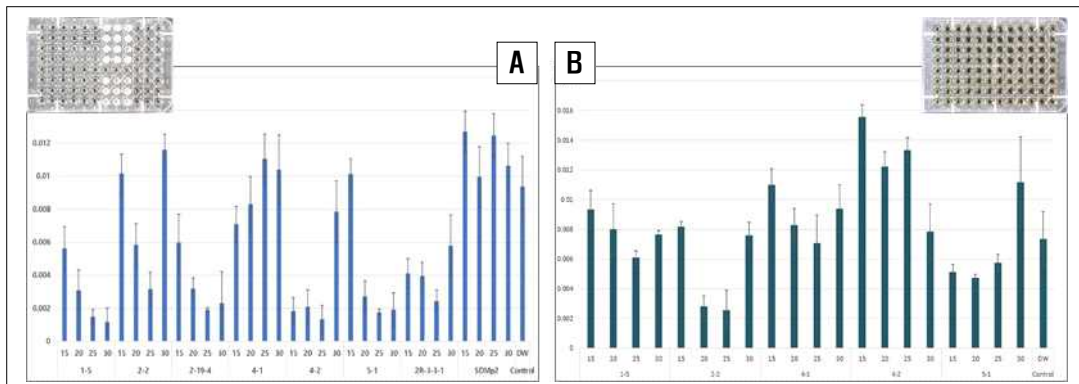


그림 11. 곤충병원성 곰팡이 배양액의 온도별 항균 활성

(A) 잿빛곰팡이병에 대한 항진균 활성; (B) 궤양병에 대한 항세균 활성

9) 우수한 이중활성 곤충병원성 곰팡이 선발

- 균주마다 대치배양 결과와 배양액의 항진균 활성과 활성 정도의 차이를 보였으며 살충력 평가 자료(그림 1, 2)와 균주와 배양액의 항진균 활성 결과(그림 3, 4)를 종합하여 점박이응애 병원성 곰팡이 중 *B. bassiana* 2R-3-3-1, *M. anisopliae* 4-2 균주, 복숭아혹진딧물 병원성 곰팡이 중 *B. bassiana* 4-2, *M. anisopliae* 1-5 균주를 높은 살충력과 항진균 활성을 지닌 균주로 선발하여 다음 실험을 진행하였음.
- 항세균 활성의 경우는 100% 배양액에서만 효과를 보였기에, 추후 액체 배양산물로써 식물체에 적용 시 효과가 크게 떨어질 것으로 판단되어 항세균 활성은 이후 평가에서 제외하였음.

10) 점박이응애에 대한 곤충병원성 곰팡이 배양산물의 살충성

- 점박이응애 병원성 곰팡이 배양산물들 각각의 살충성을 확인하기 위해서 고체배양의 aerial conidia와 액체배양의 blastospore, 배양액을 실험에 이용하였으며, 또한 배양액과 aerial conidia, blastospore를 각각 혼합한 현탁액도 점박이응애에 각각 분무 접종하여 살충력을 평가함
- 그 결과, 대조구와 비교하여 4일차부터 배양액 단독 처리를 제외한 모든 처리에서 60% 이상의 높은 살충력이 나타났고(그림 12), 접종 후 7일차에서 살충률은 77~100%까지 매우 다양하게 나타났음(표 3).
- 특히 배양액의 단독 처리도 *M. anisopliae* 4-2는 77%, *B. bassiana* 2R-3-3-1은 83.3%로 높은 살충률을 보였으며, 단독 처리에서는 *M. anisopliae* 4-2의 경우 98.3%, *B. bassiana* 2R-3-3-1의 경우 96.7%로 blastospore의 처리가 가장 높은 살충률을 보였고, 혼합 처리에서는 aerial conidia와 blastospore 모두 혼합 처리시 살충률이 단독 처리보다 증가되는 것으로 나타났으며, blastospore와 배양액의 혼합 처리가 *M. anisopliae* 4-2는 100%, *B. bassiana* 2R-3-3-1은 98%로 가장 높은 살충률을 보였음.
- 하지만 중간치사시간은 단독처리와 비교하였을 때, 배양액과의 혼합 처리에 따른 영향은 나타나지 않았다(표 3). 두 균주의 살충률을 비교하였을 때, 배양액 단독 처리를 제외한 모든 처리에서 *M. anisopliae* 4-2가 *B. bassiana* 2R-3-3-1보다 높은 살충률을 보였음.

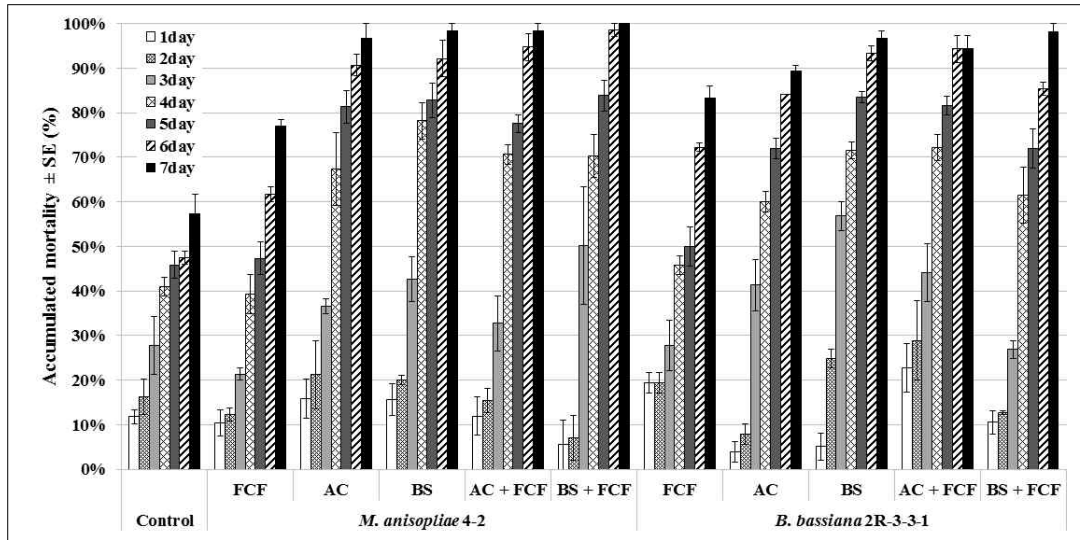


그림 12. 점박이용애에 대한 곤충병원성 곰팡이 배양산물의 살충력
Control, 0.02% tween-80; FCF, fungi cultural filtrate; AC, aerial conidia; BS, blastospore.

Isolate / Treatment	LT50 (day)	Mortality (%)
<i>Metarhizium anisopliae</i> 4-2		
FCF	4.79	77 ± 1.5 b
AC	2.85	96.7 ± 3.3 de
BS	2.69	98.3 ± 1.7 e
AC + FCF	3.01	98.2 ± 1.8 e
BS + FCF	3.02	100 ± 0 e
<i>Beauveria bassiana</i> 2R-3-3-1		
FCF	3.96	83.3 ± 2.7 b
AC	3.52	89.3 ± 1.3 cd
BS	2.78	96.7 ± 1.6 de
AC + FCF	2.49	94.3 ± 3.1 de
BS + FCF	3.35	98 ± 2 e
Control	5.97	57.4 ± 4.3 a

표 3. 점박이용애에 대한 곤충병원성 곰팡이 배양산물의 LT50 및 살충력

11) 복숭아혹진딧물에 대한 곤충병원성 곰팡이 배양산물의 살충성

- 복숭아혹진딧물 병원성 곰팡이 배양산물들 각각의 살충성을 확인하기 위해서 고체배양의 aerial conidia와 액체배양의 blastospore, 배양액을 실험에 이용하였고, 또한 배양액과 aerial conidia, blastospore를 각각 혼합한 현탁액까지 복숭아혹진딧물에 분무 접종하여 살충력을 평가함.

- 그 결과, 대조구 대비 모든 처리에서 상당히 높은 살충력이 나타났으며(그림 13), 접종 후 7일차는 71.2~100%까지 매우 다양한 살충률을 보였고(표 4), 특히 배양액 단독 처리의 경우도 *M. anisopliae* 1-5는 98.3%, *B. bassiana* 4-2는 91.7%로 살충률이 매우 높았으며, 복숭아혹진딧물 병원성 곰팡이 2개 균주 모두 배양액의 단독 처리가 blastospore의 단독 처리보다 높은 살충률을 나타내었음(표 4).
- 혼합 처리의 경우, 2개 균주 모두 aerial conidia와 배양액의 혼합 처리는 살충률이 낮아졌으며, blastospore와 배양액의 혼합 처리는 살충률이 크게 증가되는 경향을 보였음.
- 특히 *M. anisopliae* 1-5의 경우 blastospore와 배양액의 혼합 처리시 중간치사시간이 1.59일로 매우 짧아졌으며(Table 6), 접종 후 3일 후부터 90% 이상의 살충률, 5일차에는 100%의 높은 살충률 결과(Fig. 11)를 보았을 때, *M. anisopliae* 1-5의 경우 높은 살충력을 가진 배양액과 blastospore의 시너지 효과가 매우 큰 것으로 판단되었음.
- 두 균주 배양산물의 살충률을 비교하였을 때, 모든 처리에서 *M. anisopliae* 1-5가 *B. bassiana* 4-2보다 높은 살충률을 나타냄.

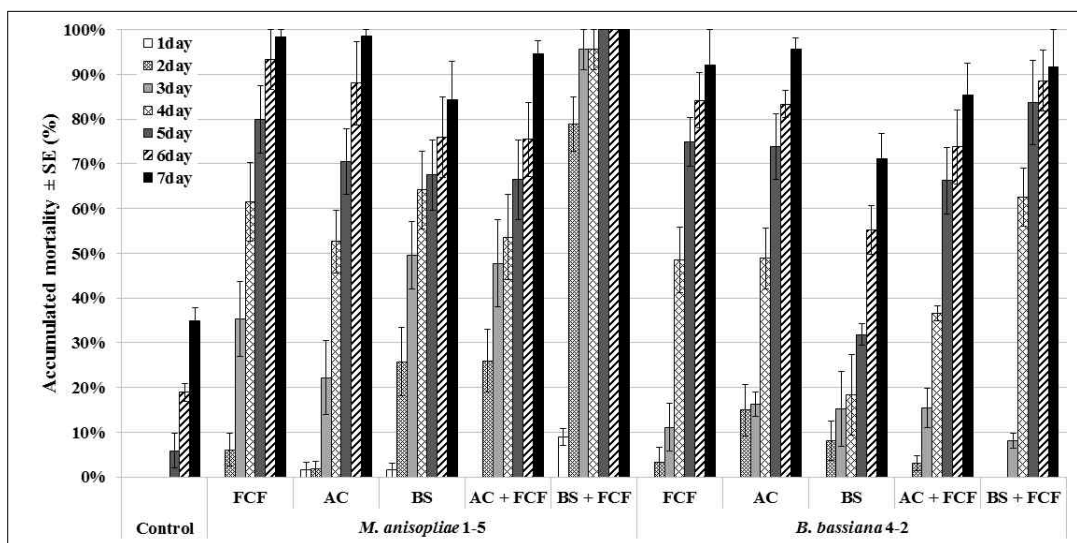


그림 13. 복숭아혹진딧물에 대한 곤충병원성 곰팡이 배양산물의 살충력

Control, 0.02% tween-80; FCF, fungi cultural filtrate; AC, aerial conidia; BS, blastospore.

Isolate / Treatment	LT50 (day)	Mortality (%)
<i>Metarhizium anisopliae</i> 1-5		
FCF	3.53	98.3 ± 1.7 bc
AC	3.96	98.6 ± 1.4 c
BS	3.34	84.4 ± 8.5 bc
AC + FCF	3.43	94.5 ± 3.0 bc
BS + FCF	1.59	100 ± 0 c
<i>Beauveria bassiana</i> 4-2		
FCF	4.16	92.0 ± 8.0 bc
AC	3.86	95.5 ± 2.6 bc
BS	5.77	71.2 ± 5.6 b
AC + FCF	4.49	85.3 ± 7.2 bc
BS + FCF	4.03	91.7 ± 8.3 bc
Control	7.65	34.9 ± 2.9 a

표 4. 복숭아혹진딧물에 대한 곤충병원성 곰팡이 배양산물의 LT50 및 살충력

12) 항진균 활성물질의 작용 기작

- 선발된 4개 균주의 *B. cinerea*에 대한 높은 항진균 활성이 살균 또는 정균 작용을 가지는지 확인을 위해서, *B. cinerea*의 포자를 각 균주의 배양액에 처리한 뒤, 시간별로 수거하고 잔여 배양액을 제거하는 과정을 거쳐 PDA배지에 도말함.
- 그 결과, 4개 균주의 배양액 모두 일정시간 처리 후 잔여 배양액이 제거되어도 *B. cinerea*가 성장하지 못하여 살균 작용을 하는 것으로 확인되었으며(그림 14), 특히 점박이용애 병원성 곰팡이 배양액 중 *M. anisopliae* 4-2가 *B. bassiana* 2R-3-3-1보다 처리 시간에 따른 *B. cinerea*의 성장을 보았을 때, 더 빠른 살균 기작을 가지는 것으로 확인하였고(그림 14, A), 복숭아혹진딧물 병원성 곰팡이 배양액으로는 *M. anisopliae* 1-5가 *B. bassiana* 4-2보다 빠른 살균 기작을 가지는 것으로 확인되었음(그림 14, B).
- 4개의 균주 배양액 모두 4일차 관찰시 *B. cinerea*가 성장하지 못한 처리구는 2주일 후에도 생장이 관찰되지 않았으며, *M. anisopliae*가 *B. bassiana*보다 빠른 살균 기작을 나타내었으며, 멸균수가 처리되었던 대조구의 *B. cinerea*는 모든 처리 시간에서 생장이 관찰되었음.

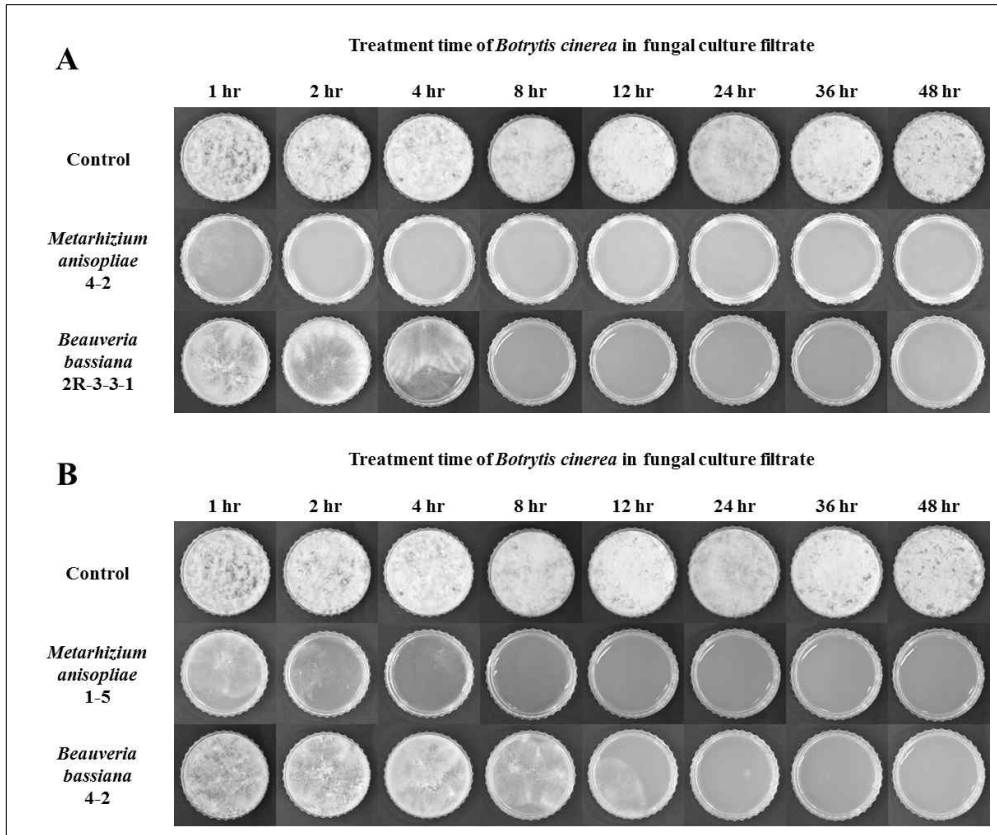


그림 14. 곤충병원성 곰팡이 배양액의 작용 기작

(A) 복숭아혹진딧물 병원성 곰팡이 배양액;

(B) 점박이용애 병원성 곰팡이 배양액

13) 항진균 활성물질의 열 안정성

- *B. cinerea*에 높은 항진균 활성을 가지는 4개 균주 배양액에서 항진균 활성 물질의 기본적인 특성을 파악하고자 하였다. 열 안정성은 각 균주의 배양액을 다양한 조건에서 열처리한 후, *B. cinerea*에 대한 항진균 활성을 측정하여 열에 대한 활성물질의 안정성을 평가하였음.
- 그 결과, 4개 균주 배양액의 항진균 활성 물질은 대조구와 비교하였을 때, 100℃ 열처리에도 *B. cinerea*의 성장을 강하게 억제하여 고온에 매우 안정적인 것으로 확인되었음 (그림 15).
- 하지만, 고압멸균기를 통한 고온, 고압의 환경에서는 점박이용애 병원성 곰팡이 *M. anisopliae* 4-2 (그림 15, A)와 복숭아혹진딧물 병원성 곰팡이 *B. bassiana* 4-2 (그림 15, B)는 항진균 활성이 저해되었으며, 나머지 두 균주는 고온, 고압의 환경에서도 매우 안정적인 것으로 확인되었음.

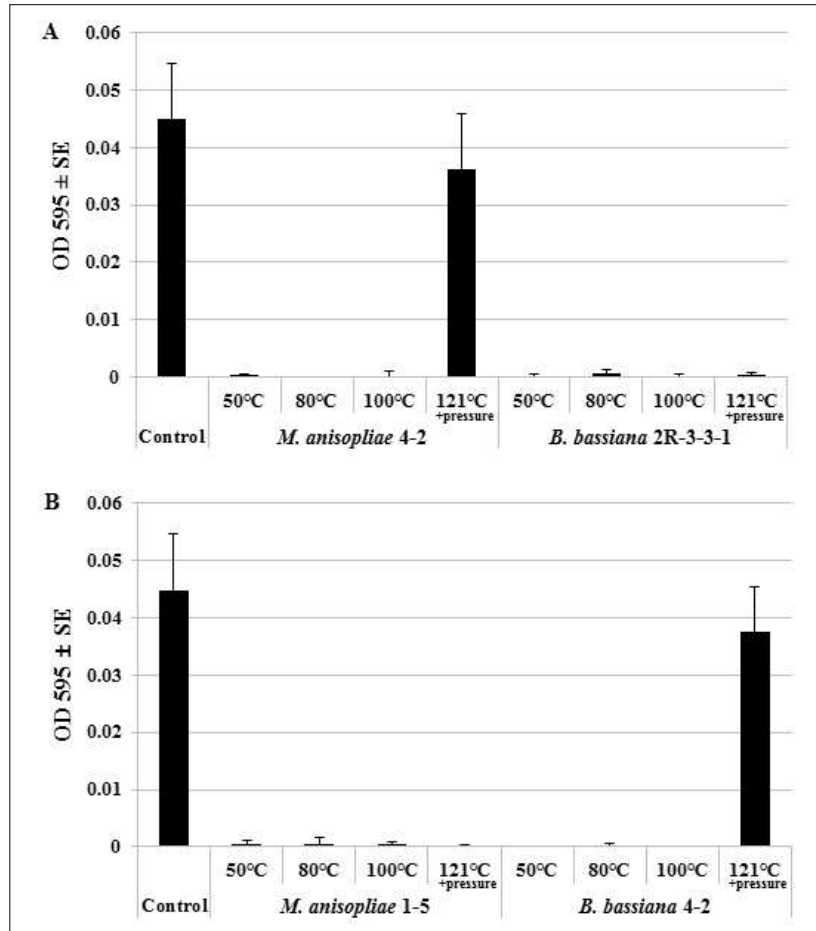


그림 15. 곤충병원성 곰팡이 배양액의 열 안정성

(A) 복숭아혹진딧물 병원성 곰팡이 배양액;

(B) 점박이용애 병원성 곰팡이 배양액

14) 항진균 활성물질의 친수성/소수성

- 균주 배양액의 항진균 활성 물질들이 친수성 또는 소수성 성질을 가지고 있는지 확인하기 위해서, 배양액에 acetone을 첨가하여 친수성을 지닌 물질들은 침전시키는 방법으로 친수성, 소수성 층으로 나누어 항진균 활성을 평가함.
- 그 결과, 대조구와 비교하였을 때, 모든 배양액의 항진균 활성 물질들은 친수성과 소수성 층 모두에 존재하는 것으로 확인되었음(그림 16).
- 점박이용애 병원성 곰팡이의 배양액 중 *B. bassiana* 2R-3-3-1의 경우는 소수성 물질보다는 친수성 물질에서 더 높은 활성의 항진균 물질을 포함하고 있는 것으로 확인되었으며(그림 16, A), 복숭아혹진딧물 병원성 곰팡이 배양액의 경우에도 같은 속, 종인 *B. bassiana* 4-2에서 소수성 층보다 친수성 층에서 더 높은 항진균 활성을 나타냈음(그림 16, B).
- *M. anisopliae* 1-5, 4-2의 배양액은 친수성과 소수성 성질 모두 높은 활성을 가지고 있는 것으로 확인되었음(그림 16).

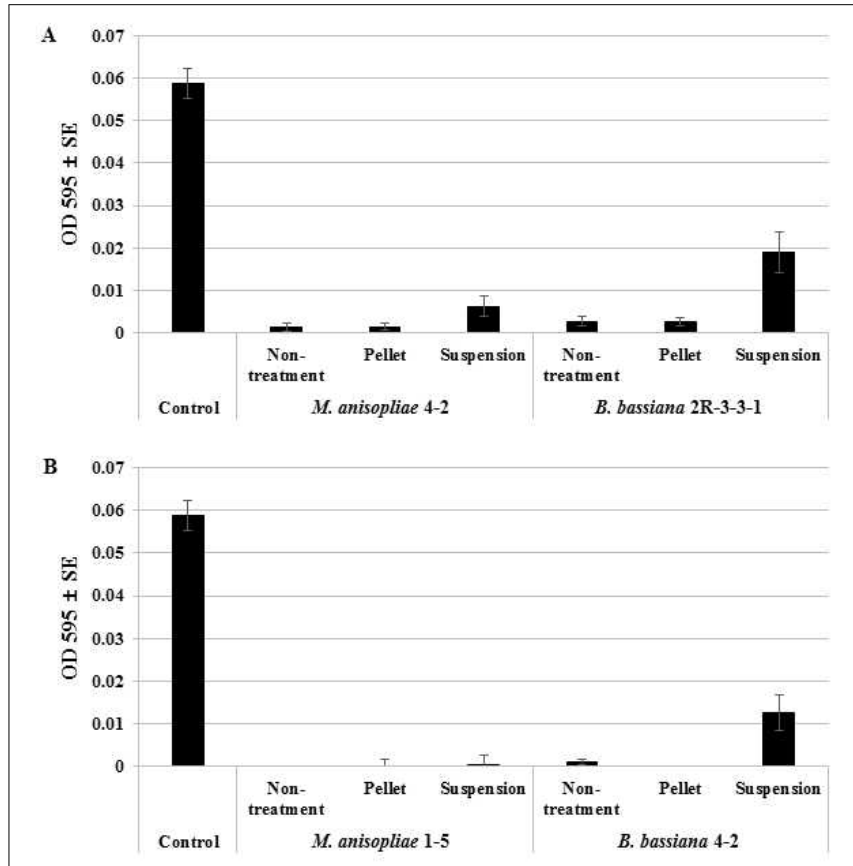


그림 16. 곤충병원성 곰팡이 배양액의 친수성/소수성
 (A) 복숭아혹진딧물 병원성 곰팡이 배양액;
 (B) 점박이용애 병원성 곰팡이 배양액

15) 항진균 활성물질의 성상 결정

- 배양액에서 높은 항진균 물질의 성상을 구명하기 위해, proteinase K와 pronase E를 처리하여 항진균 활성을 평가하였음.
- proteinase K 처리의 경우 점박이용애 병원성 곰팡이 배양액 *M. anisopliae* 4-2와 복숭아혹진딧물 병원성 곰팡이 배양액 *B. bassiana* 4-2의 경우 항진균 활성을 나타내지 못하였는데(그림 17), 이는 proteinase K의 비활성화 조건인 121°C, 15분 열처리 조건에서 열 안정성을 가지지 못함을 확인하였고(그림 15), 이러한 이유로 성상을 파악할 수 없다는 판단함.
- 80°C, 20분 조건으로 비활성화 가능한 pronase E를 처리하여 활성물질의 성상을 구명한 결과, 모든 균주 배양액의 물질들은 pronase E 처리 후에도 항진균 활성이 저해되지 않았으며(그림 18), 선발된 4개 균주 배양액의 항진균 활성 물질들은 모두 단백질이 아닌 것으로 판단하였음.

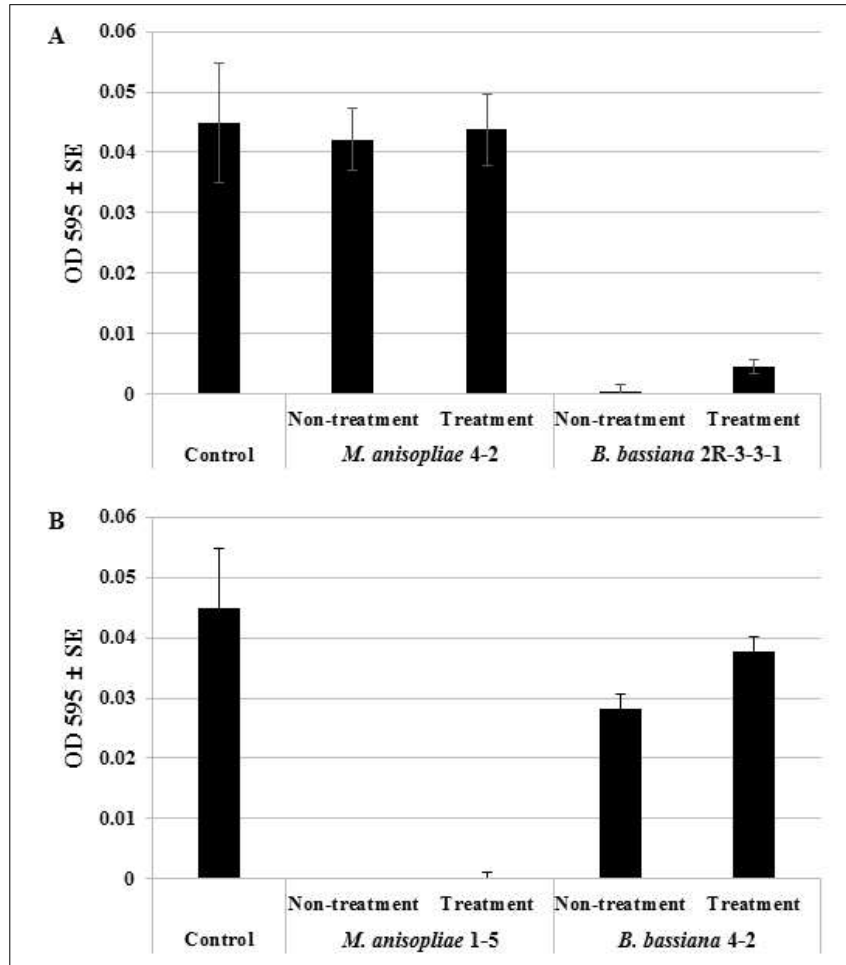


그림 17. 곤충병원성 곰팡이 배양액의 proteinase K 처리
 (A) 복숭아혹진딧물 병원성 곰팡이 배양액;
 (B) 점박이용애 병원성 곰팡이 배양액

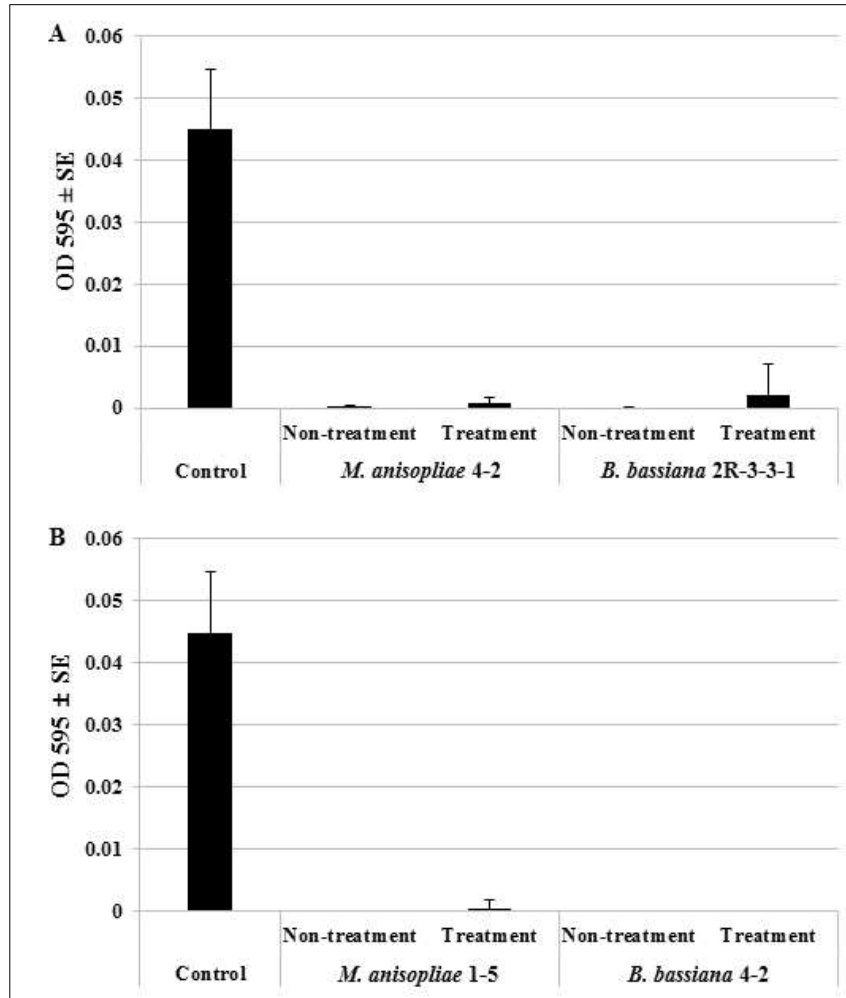


그림 18. 곤충병원성 곰팡이 배양액의 pronase E 처리

(A) 복숭아혹진딧물 병원성 곰팡이 배양액;

(B) 점박이용애 병원성 곰팡이 배양액

16) 선발 균주의 다른 식물병원균에 대한 항진균 활성

- 곤충병원성 곰팡이의 식물병에 대한 적용 범위를 확대하고자, 잣빛곰팡이병 이외에 다른 식물병원성 곰팡이에 대해서도 항진균 활성을 검정하였음.
- 균주의 항진균 활성은 각각의 곤충병원성 곰팡이와 3속 4종의 식물병원균을 대치 배양하는 방법을 이용하였으며, 그 결과 균주별로 각각의 식물병원균에 전혀 영향을 주지 않는 곰팡이와 7 mm 이상의 저해능을 보이는 곰팡이 등 다양한 척도의 항진균 활성이 관찰되었음(그림 19, 20).
- 각 식물병원균에 대한 항진균 활성은 두 곰팡이 사이의 저해능 길이를 측정하였으며, 점박이용애 병원성 곰팡이 중 *M. anisopliae* 4-2는 *P. capsici*와 *C. fructicola*에 대해서는 항진균 활성을 나타내지 못 하였고, *C. acutatum*에 1.4 mm, *S. sclerotiorum*에 0.5 mm의 낮은 항진균 활성을 보였다(그림 19). *B. bassiana* 2R-3-3-1은 *S. sclerotiorum*에 4.3 mm, *C. acutatum*에 3.7 mm의 높은 항진균 활성을 나타냈으나, *C. fructicola*와 *P. capsici*에는 높은 활성을 보이지 못하였다(그림 19).

- 복숭아혹진딧물 병원성 곰팡이 중 *M. anisopliae* 1-5가 모든 식물병원균에 항진균 활성을 나타내었으며, 특히 *P. capsici*에 대해 7.7 mm의 가장 높은 항진균 활성, *C. acutatum*에 대해 4.7 mm의 높은 항진균 활성을 보였고(그림 20), *B. bassiana* 4-2의 경우 *M. anisopliae* 1-5와 비교하였을 때, *C. acutatum*, *P. capsici*, *C. fructicola*에는 낮은 항진균 활성을 보였고, *S. sclerotiorum*에 대해선 3.7 mm의 높은 항진균 활성을 나타내었음(그림 20).
- 4개 균주 모두 *C. acutatum*과 *S. sclerotiorum*에 대해 항진균 활성을 나타냈으나, *P. capsici*와 *C. fructicola*에 대해서는 *M. anisopliae* 1-5가 *P. capsici*에 대한 7.7 mm의 높은 항진균 활성을 나타낸 것을 제외하고는 낮은 활성을 보이거나 활성을 보이지 못하였음.

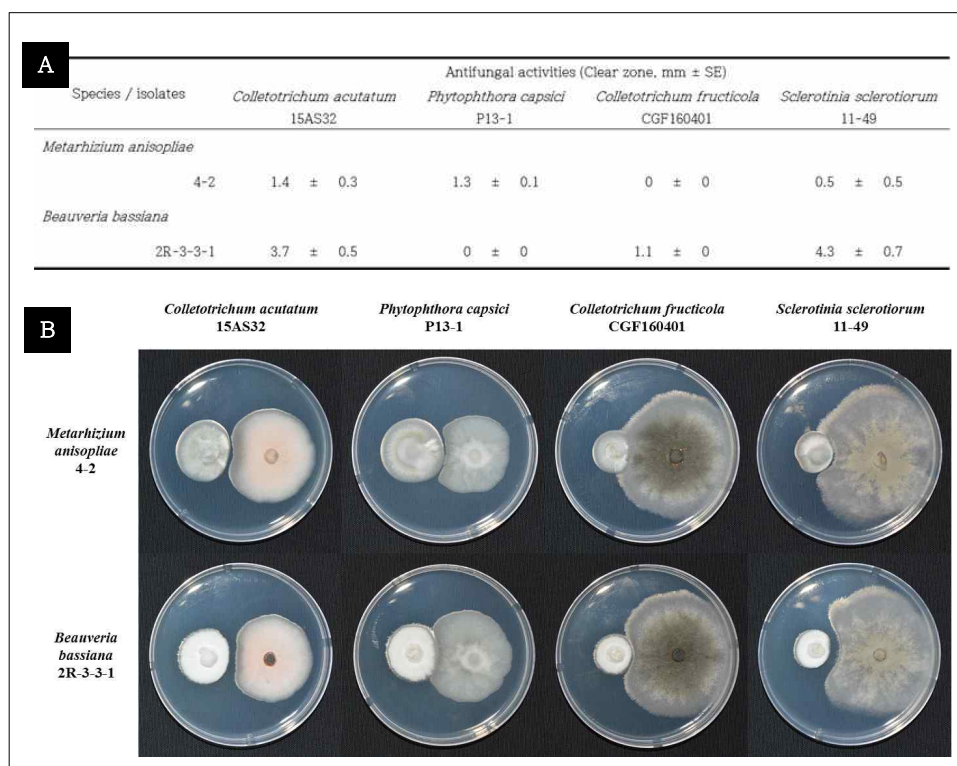


그림 19. 점박이용애 병원성 곰팡이의 식물병원성 곰팡이에 대한 항진균 활성

(A) 식물병원성 곰팡이에 대한 저해능;

(B) 점박이용애 병원성 곰팡이와 식물병원성 곰팡이의 대치 배양

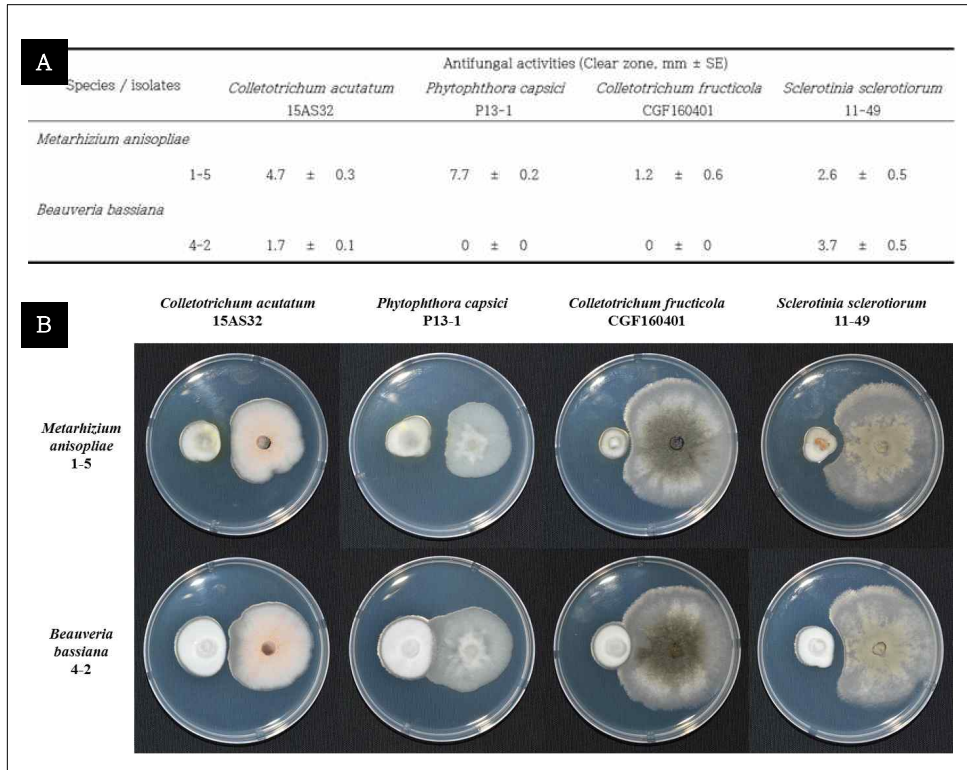


그림 20. 복숭아흑진딧물 병원성 곰팡이의 식물병원성 곰팡이에 대한 항진균 활성

(A) 식물병원성 곰팡이에 대한 저해능;

(B) 점박이용애 병원성 곰팡이와 식물병원성 곰팡이의 대치 배양

17) 곤충병원성 곰팡이 배양액의 다른 식물병원성 곰팡이에 대한 항진균 활성

- 곤충병원성 곰팡이 배양액의 *C. fructicola*와 *C. acutatum*에 대한 항진균 활성을 확인하기 위해서, PDB배지(pH 5.6)에서 동일한 환경으로 2주간 액체 배양한 뒤 얻은 배양산물로부터 균체를 제거하고, 동일한 환경에서의 항진균 활성을 검정하기 위해 모든 배양액을 pH 5.6 ± 0.2로 조절하였음.
- 얻어진 순수한 배양액을 이용하여 *C. fructicola*와 *C. acutatum*에 대한 항진균 활성을 각각 검정한 결과, 배양액 농도별로 다양한 항진균 활성을 보였음(그림 21, 22). 복숭아흑진딧물 병원성 곰팡이인 *B. bassiana* 4-2를 제외한 모든 배양액의 항진균 활성은 농도가 높을수록 활성이 증가되었으며, 1% 배양액의 경우 거의 활성을 보이지 않았고, 복숭아흑진딧물 병원성 곰팡이 *M. anisopliae* 1-5의 배양액은 10% 농도에서도 상당히 높은 항진균 활성을 보였음(그림 22).
- 앞서 실험한 균주와 배양액의 항진균 활성을 비교하였을 때, 복숭아흑진딧물 병원성 곰팡이인 *B. bassiana* 4-2의 경우 *C. fructicola*에 대해서는 균주의 대치배양 결과(그림 20, A)와 같이 항진균 활성을 나타내지 않았으나, *C. acutatum*에 대한 항진균 활성은 균주의 대치배양에서는 활성을 보였지만, 배양액에서의 활성은 보이지 않았음(그림 22, B).
- 점박이용애 병원성 곰팡이인 *M. anisopliae* 4-2는 *C. fructicola*에 대한 균주의 대치배양 결과(그림 19)와 다르게 항진균 활성을 나타내었으며(그림 21), 균주의 대치배양을 통한

항진균 활성은 *M. anisopliae* 1-5와 *B. bassiana* 2R-3-3-1가 비슷한 항진균 활성을 보였으나(그림 19, 20), 배양액의 항진균 활성에서는 상당한 차이를 보였음(그림 21, 22)

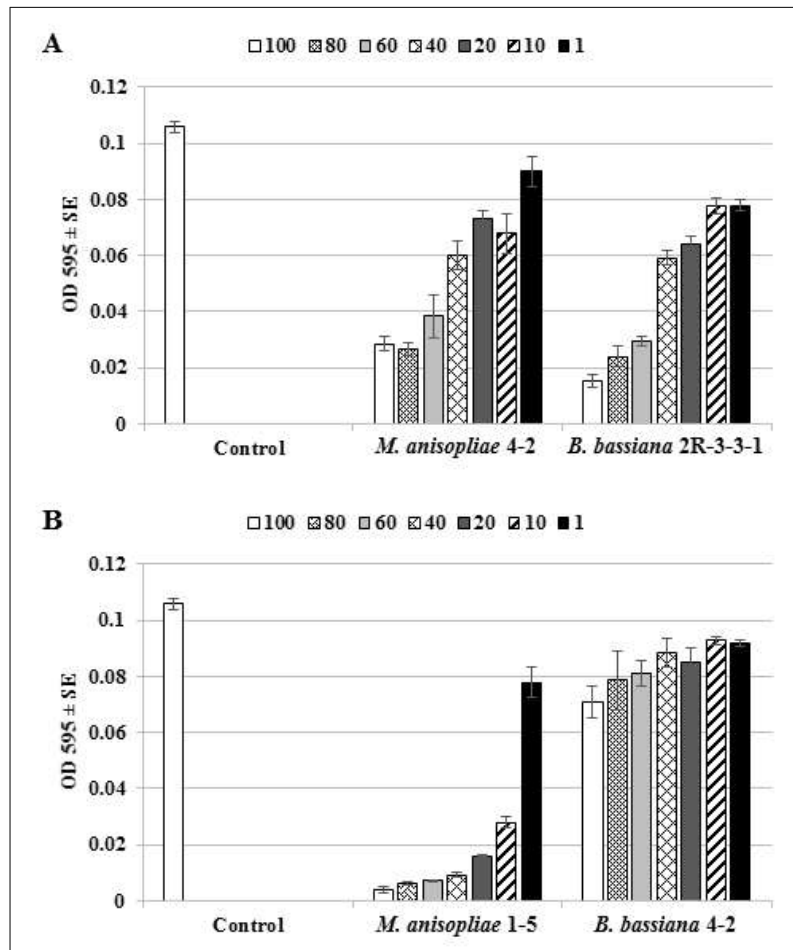


그림 21. 곤충병원성 곰팡이의 *Colletotrichum fructicola*에 대한 항진균 활성 (A) 점박이용애 병원성 곰팡이 배양액; (B) 복숭아흑진딧물 병원성 곰팡이 배양액

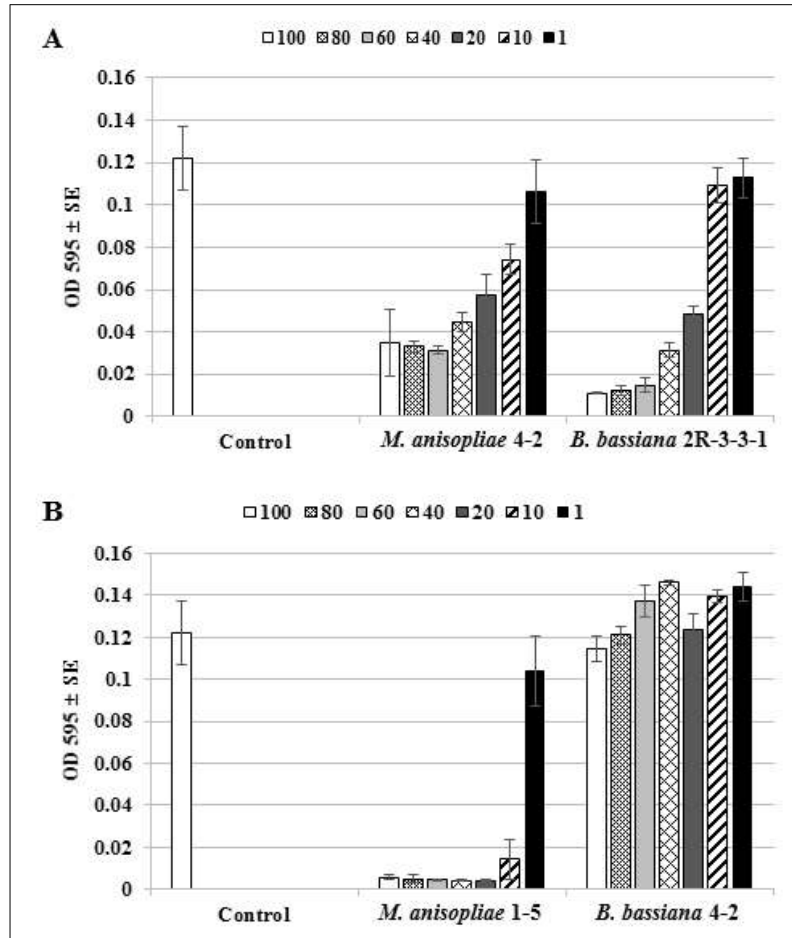


그림 22. 곤충병원성 곰팡이의 *Colletotrichum acutatum*에 대한 항진균 활성
(A) 점박이응애 병원성 곰팡이 배양액; (B) 복숭아혹진딧물 병원성 곰팡이 배양액

18) 곤충병원성 곰팡이의 효율적 배양배지 결정

- 선발된 높은 살충력, 항진균을 가지는 곤충병원성 곰팡이의 효율적인 배양을 위해서, PDB, SDB, GY, Adamek's 배지에 각각의 병원성 곰팡이를 배양하여 배지별 blastospore의 생산량과 항진균 활성을 평가하였음.
- 그 결과, 각각의 배지마다 균주의 blastospore 생산량과 항진균 활성의 차이가 나는 것을 확인하였고(그림 23, 24). 점박이응애 병원성 곰팡이의 경우 blastospore 생산량은 *M. anisopliae* 1-5의 경우 GY배지와 Adamek's배지에서 모두 큰 향상과 더불어 비슷한 포자 생산을 보였으나, *B. bassiana* 2R-3-3-1의 경우는 GY배지보다 Adamek's배지에서 더 높은 포자 생산량을 보였음(그림 23, A).
- 하지만 배양액의 항진균 활성 결과에서는 이와 다르게 PDB배지와 SDB배지가 주로 높은 활성을 보였으며, Adamek's배지의 경우는 항진균 활성이 크게 저하되었음(그림 24, A).
- 복숭아혹진딧물 병원성 곰팡이는 *M. anisopliae* 1-5, *B. bassiana* 4-2 모두 SDB, PDB, GY, Adamek's배지 순으로 포자 생산량이 증가하였으며(그림 23, B), 항진균 활성은 *M. anisopliae* 1-5의 경우 모든 배양액에서 매우 높은 항진균 활성을 보였으며, 그에 반하

여 *B. bassiana* 4-2의 항진균 활성은 GY배지 배양액의 경우는 농도가 낮아지면서 항진균 활성 또한 낮아지는 경향을 보였고, Adamek's배지 배양액의 경우는 활성이 전혀 나타나지 않았음(그림 24, B).

- 4개 균주의 포자 생산량과 항진균 활성을 종합한 결과, *B. bassiana* 4-2를 제외한 다른 균주들은 포자 생산량의 향상을 보이면서 높은 항진균 활성은 보인 GY배지를 배양배지로 선택하였으며, *B. bassiana* 4-2의 경우 포자생산량은 많지 않았지만 높은 항진균 활성을 보인 PDB배지로 선택하였다.

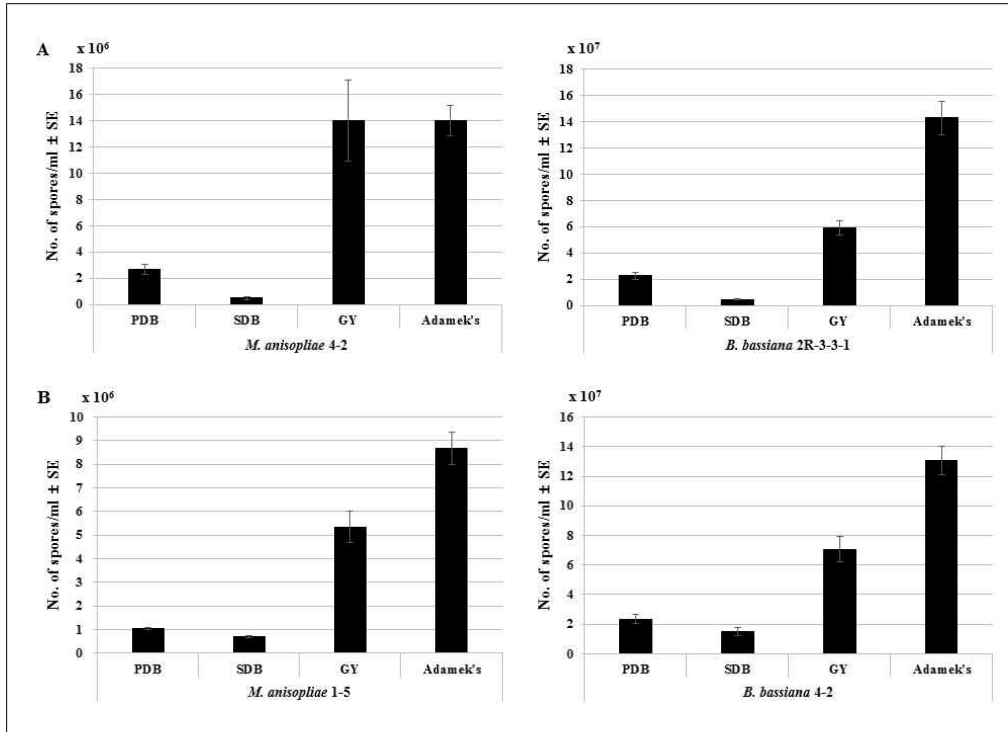


그림 23. 곤충병원성 곰팡이의 배지별 Blastospore 수율
(A) 집박이용애 병원성 곰팡이; (B) 복숭아혹진딧물 병원성 곰팡이

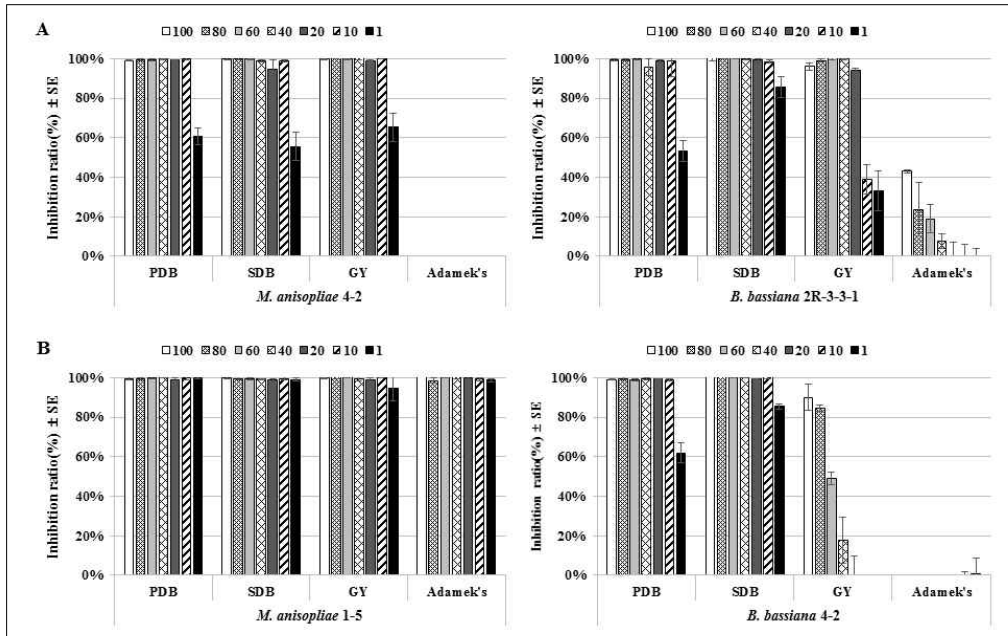


그림 24. 곤충병원성 곰팡이의 배지별 배양액의 항진균 활성

(A) 점박이응애 병원성 곰팡이; (B) 복숭아혹진딧물 병원성 곰팡이

19) 유묘와 과실에서 곤충병원성 곰팡이 배양액의 항진균 활성 검정

- 딸기 유묘에서 잿빛곰팡이병에 대한 곤충병원성 곰팡이 배양액의 항진균 활성을 검정한 결과, 다양한 처리 농도와 양, 추가 처리에도 항진균 활성을 확인할 수 없었음.
- 대조구와 비교하였을 때, 활성의 정도가 보이지 않았으며 반복적인 실험에도 유의한 결과를 볼 수 없었고, 이는 배양액의 활성성분만 이용한 것이 아닌 배양액 자체를 이용하였기 때문에 남아있는 배지 등의 성분으로 인한 것으로 판단되며 추후 제제화 등의 연구를 통해 극복 가능할 것으로 판단됨.
- 딸기 과실에서 항진균 활성의 경우 또한 활성을 확인할 수 없었으며, 병원균을 처리하지 않은 처리구에서도 나타났음.
- 이러한 결과는 배양액에 남아있을 배지 등의 성분뿐만 아니라 다양한 감염기작을 지니는 *B. cinerea*의 주 감염부위인 꽃을 감염하여 대부분 열매에 존재하는 상태로 유통되는 다른 연구들의 내용과 일치하는 결과로 판단되며, 이는 과실에 대한 곤충병원성 곰팡이 배양의 표면의 처리가 아닌 과실이 맺히기 전 예방적 처리를 해야 할 것으로 판단됨.

○ 연구개발 성과

1) 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자명	학술지명	Vol.(No.)	SCI구분
2017	Evaluation of virulence, tolerance to environmental factors and antimicrobial activities of entomopathogenic fungi against two-spotted spider mite, <i>Tetranychus urticae</i>	Tae Young Shin, Sung Min Bae, Dong Jun Kim, Hwi Geon Yun, Soo Dong Woo	Mycoscience	58(3)	SCIE
2017	Entomopathogenic Fungi as Dual Control Agents against Both the Pest <i>Myzus persicae</i> and Phytopathogen <i>Botrytis cinerea</i>	Hwi-Geon Yun, Dong-Jun Kim, Won-Seok Gwak, Tae-Young Shin, Soo-Dong Woo	Mycobiology	45(3)	SCIE
2017	Comparative Evaluation of Conidia, Blastospores and Culture Filtrates from Entomopathogenic Fungi against <i>Tetranychus urticae</i>	Hwi-Geon Yun, Dong-Jun Kim, Ji-Hoon Lee, Ji-In Ma, Won-Seok Gwak, Soo-Dong Woo	International Journal of Industrial Entomology	35(1)	KCI

2) 특허 성과

출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	기탁번호 (특허권주)
2016	해충방제 및 항균활성을 가지는 곤충병원성 곰팡이 메타리지움 아니소플리에 SD4-2 균주	윤휘건, 김동준, 광원석, 이지훈, 김인희, 이시내, 신태영, 우수동	대한민국	10-2016-0159958	KACC93 228P
2017	노제마병 병원균에 대해 항진균 활성을 가지는 패실로마이세스 마르칸디이 364 균주 및 이의 용도	우수동, 김동준, 광원석, 김인희, 윤휘건	대한민국	10-2017-0113628	KACC93 282P

3) 학술발표 성과

발표연도	발표제목	발표자	학술회의명	국내/국외
2016	Entomopathogenic fungi to control simultaneously both <i>Myzus persicae</i> (Green peach aphid) and plant diseases	In Hui Kim	49th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology	국외
2016	Evaluation of entomopathogenic fungi as the dual control agents against both <i>Tetranychus urticae</i> (Two-spotted spider mite) and plant pathogens	Dong Jun Kim	49th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology	국외
2016	Simultaneous control both of <i>Tetranychus urticae</i> (Two-spotted spider mite) and plant pathogens using entomopathogenic fungi	Hwi Geon Yun	2016 한국응용곤충학회 임시총회 및 추계학술발표회	국내
2017	Characterization and Evaluation of Entomopathogenic Fungi against <i>Myzus persicae</i> and Phytopathogens	Hwi Geon Yun	2017 한국응용곤충학회 정기총회 및 국제심포지엄	국내
2017	Various roles of mite pathogenic fungi against <i>Tetranychus urticae</i> (two-spotted spider mite)	Ji Hoon Lee	50th Annual Meeting and Golden Jubilee Celebration of the Society for Invertebrate Pathology	국외
2017	Diverse activities of entomopathogenic fungi with the virulence against <i>Myzus persicae</i> (green peach aphid)	Hwi Geon Yun	50th Annual Meeting and Golden Jubilee Celebration of the Society for Invertebrate Pathology	국외
2017	<i>Selection and evaluation of mite pathogenic fungi against pest Tetranychus urticae and phytopathogen Botrytis cinerea</i>	Hwi Geon Yun	2017 한국응용곤충학회 추계학술발표회 및 국제심포지엄	국내

4) 기술적 성과

- 세계적으로 곤충병원성 곰팡이를 이용한 다양한 제품들이 개발되어 적용되고 있지만, 국내에서는 큰 효과를 거두지 못하고 있다. 해충의 방제를 위한 생물학적 제제로 이용을 위해서는 살충력뿐만 아니라 고온, UV-B에 대한 안정성과 저온에서의 발아력 등 환경적인 요소들도 매우 중요한데, 한국에서의 생물학적 살충제 시장의 경우 대부분 외국에서 분리 및 개발된 미생물을 수입하여 적용해왔고, 국내 환경에서의 적용 및 실제의 활성

이 적절하지 못하여 제한이 많았다. 최근 한국 내에 몇몇 업체에서 곤충병원성 곰팡이를 이용한 미생물 제제를 제품으로 출시하여 오고 있지만, 대부분의 제품이 큰 성과를 거두지 못하고 있는 실정이다. 그 이유로는 미생물 제제 특성상 느린 효과뿐만 아니라 같은 속·종의 균주 사이에서도 살충력과 활성, 안정성 등의 차이가 크므로 효과가 뛰어난 균주를 이용하기 위해서는 **대량의 균주에서의 우수 균주선발이 필수적이다**. 본 연구에서는 **국내 토양에서 분리한 342개의 곤충병원성 곰팡이** 중 점박이용애와 복숭아혹진딧물에 대해 살충성을 지닌 균주를 분리하고, 그 중 **살충력과 환경 안정성이 뛰어난 균주를 선발하여** 이용하였다. 더욱이 해충에 대한 살충력과 더불어 다양한 식물을 감염시켜 피해를 일으키는 **갯빛곰팡이병에 대해서 항균 활성 검정을 통해 2차 선별함으로써, 해충과 식물병을 동시에 방제할 수 있는 곤충병원성 곰팡이**를 나타낸 연구라고 할 수 있다. 세계적으로 이러한 연구들이 이루어지고 있지만 앞서 언급한 것처럼 균주의 활성은 환경에 대한 적응 등에 따라서 크게 달라지므로 본 연구는 국내에서 미생물을 이용한 생물학적 제제로써의 가능성이 매우 높다고 판단된다. 추후 기업체와의 기술 이전 및 추가 연구가 이루어진다면 해충과 식물병을 동시 방제 가능한 우수한 생물학적 제제로의 가능성이 기대되어진다.

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

D-06

4-1. 목표달성도

○ 정량적 성과 (연구기간 내)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교 육 지 도	인력 양성	정책 활용·홍보		기 타 (타 연 구 활 용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	진 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 장 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
											SCI	비 SCI	논 문 평 균 IF						
단위	2										2	1		3		4			
연구기간 내 달성실적	2										2	1		7		5			
달성율 (%)	100										100	100		250		125			

- 본 연구기간('15. 12. 18 ~ '17. 12. 17)내의 정량적 목표로 특허출원 2건, 논문 3건(SCI 2건, 비SCI 1건), 학술발표 3건, 인력양성 4건에 대해서 100% 이상의 성과를 달성하였음. 특히 학술발표의 경우 국내외 학술대회 참가를 통해 4건의 해외 학술발표와 3건의 국내 학술발표 총 7건을 진행하였음.

○ 정성적 성과

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)
이중 활성 미생물의 유효성에 대한 실증 평가	20	20
이중 활성 미생물의 식물에 대한 영향 평가	10	10
맞춤형 활성 증대 기술 개발	20	20
이중 활성 미생물의 효율적 생산 기술 개발	20	20
이중 활성 미생물의 적용 기술 개발	10	10
활성물질의 특성 구명	20	20
합계	100	100

- 본 연구기간('15. 12. 18 ~ '17. 12. 17)내의 정성적 목표로 자체 평가 결과 100% 이상의 성과를 달성하였다고 판단되어짐. 점박이용애와 복숭아혹진딧물에 대한 높은 살충력과 잣빛곰팡이병 등 식물병원균에 대한 항균활성이 뛰어난 균주를 선발하였고, 식물에 대한 영향 평가를 실시하였음. 그리고 살충 및 항균 활성을 배양산물의 효율적인 생산을 위한 환경을 평가하였으며, 기존에 주로 사용되었던 방법이 아닌 액체 배양을 통한 배양산물의

높은 살충효과를 확인하였으며, 배양액이 지닌 높은 항균 효과의 작용 기작 및 특성을 평가함. 그러나 배양산물의 식물 성장 촉진효과나 내생균의 효과는 확인되지 않았으며, 식물체에 대한 실질적인 효과 또한 확인하지 못하여 이에 대해서는 기업과의 협력을 통한 추가적인 연구가 필요할 것으로 여겨짐.

4-2. 관련분야 기여도

- 현재 작물에 발생하는 병해충 방제를 위해 대부분의 농가에서 화학적 살충제 또는 살균제를 이용하고 있다. 그러나 화학적 살충제 및 살균제는 환경오염의 문제뿐만 아니라 인축에 대한 독성 등으로 문제시 되고 있으며, 특히 최근에는 살충제 계란 등이 이슈화되어 소비자들의 불안감이 증가되고 있는 실정이다. 이러한 소비자들의 요구에 따라서 생물학적 방제 등의 방법을 이용한 친환경 농산물의 생산하고자 하는 연구가 증가되고 있다. 본 연구에서 이용된 곤충병원성 곰팡이는 생물학적 방제제로서 본래 토양에서 서식하는 곤충병원성 곰팡이 중 선발한 자원으로서 인축에 대한 독성이 없다고 알려져 있으며 토양 등 환경에 대한 오염 등에도 안전하다. 또한 주요 난방제 해충으로 알려진 집박이응애와 복숭아혹진딧물에 대해서 높은 살충효과를 지니고, 그와 동시에 잿빛곰팡이병 등 다양한 식물병원균에 대한 높은 살균효과도 나타냄으로서 친환경 농산물에 대한 요구에 부응할 수 있다. 이러한 연구는 전 세계적으로 관심을 받고 있으나, 균주의 개발과 제품화, 실용화 등 연구는 부족한 실정이다. 본 연구는 국내에서 곤충병원성 곰팡이를 이용한 살충, 살균 효과를 지닌 이중 활성 미생물을 선발하고 개발하는 최초의 연구로서 그 의미가 크다고 할 수 있다. 이를 바탕으로 추가적인 연구가 이어진다면 난방제 해충 및 식물병 방제를 위한 비용, 인력, 효과와 환경문제 등 많은 부분에 대해서 우수성을 보일 수 있으며 생산자와 소비자의 요구에 모두 만족시킬 수 있는 성과가 될 것이다.

5. 연구결과의 활용계획

D-07

○ 추가 연구의 필요성

- 본 연구의 결과로서, 점박이용애, 복숭아혹진딧물에 대한 뛰어난 살충력을 지니고 잿빛곰팡이병 등 식물병원균에 대한 높은 항균 활성을 지닌 균주를 선발하는 데에는 성공하였으나 이를 제제화시에 대한 안정성 및 포장에서의 실증평가는 확인되지 않았음. 이는 실용화 분야로서 기업체와의 협동 연구나 기술 이전을 통해서 첨가제에 의한 추가 활성 및 대량 생산을 통한 효율 증대로 이루어질 수 있는 부분으로 판단되어짐. 해외에서도 in vitro 상에서의 활성은 많이 연구가 되고 있으나, 이를 이용한 in vivo에서의 활성은 명확한 결과가 나오지 않는 실정임. 따라서 추가적으로 대량 생산 및 제제화의 기술력을 가진 기업체와의 협력을 통해 본 연구결과가 실질적인 생물학적 제제로 적용될 수 있을 것으로 기대되어짐.

○ 타 연구에의 응용

- 기존에 잘 알려진 빠른 생산과 높은 항균 효과를 지닌 세균이나 방선균과는 다르게, 곤충병원성 곰팡이는 진핵생물로서 원핵생물이 생산하는 물질뿐만 아니라 다양한 물질을 만들어낼 수 있으며 이를 이용하여 해충에 대한 살충성과 식물병원균에 대한 항균작용뿐만 아니라 항암, 항산화 효과 등도 보고되고 있음. 따라서 본 연구를 통해 생산된 배양액의 다양한 활성을 이용하여 항암, 항산화 효과를 검증함으로써 그 이용범위를 확대시킬 수 있으며, 추가적으로 다른 균에 대해서도 항균 활성을 확인함으로써, 그 병을 예방·치료하는 천연물질로서도 응용될 수 있을 것임.

○ 기업화 추진방안

- 추가 연구의 필요성에서 언급하였듯이, 본 연구가 실용화되기 위해선 제제화, 대량생산, 식물체에 대한 추가 실증실험이 요구되며, 이를 위해서 연구에서 선발된 우수한 균주를 기술 이전하는 방안과 기업체와의 추가 협동 연구 방안이 고려되고 있음. 협동 연구가 진행된다면 현재 팜한농, 삼공, 고려바이오, 그린바이오텍 등 미생물 농약에 대한 제제화 등의 연구가 활발히 이루어지고 있는 기업체와의 협력을 통해 실질적인 이중 활성 미생물제제가 개발될 수 있을 것임.

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

D-08

곤충병원성 곰팡이는 생태학적으로 영양분 이용을 위해 기주 곤충에 곰팡이병을 일으켜 사멸하게 함으로써 자연 상태에서의 해충의 밀도를 조절하는 중요한 역할을 하고 있으며, 일반적으로 환경과 인축에 부정적인 영향이 없다고 보고되어 있다(Brownbridge *et al.*, 1993; Vega *et al.*, 2009; Roy *et al.*, 2010;). 특히 곤충병원성 곰팡이는 곤충의 표피를 관통하여 침입하기 때문에 일반적으로 방제가 어려운 흡즙성 해충에 효과적이며, 숙주의 저항성 기작이 잘 발현되지 않는 것으로 알려져 있다(Lacey *et al.*, 2001; Hajek *et al.*, 2003; Zimmermann, 2007). 현재까지 *Beauveria* spp., *Lecanicillium* spp., *Metarhizium* spp., *Nomurea* spp., *Isaria* spp. 등 22종 이상의 곰팡이가 복숭아혹진딧물을 비롯한 다른 해충들에 대해서 170개 이상의 해충방제제(표 1)로서 개발되어 왔다(de Faria and Wraight, 2007, Lacey *et al.*, 2015).

최근에는 곤충병원성 곰팡이의 식물에서 내생균(표 2), 식물병원균에 대한 길항작용, 근권 미생물, 생장촉진 효과 등 새로운 역할이 보고되고 있다(Vega *et al.*, 2008; Vega *et al.*, 2009; Ownley *et al.*, 2010). 그 예로, *B. bassiana*의 경우 다양한 식물체 내에서 내생할 수 있으며 해충과 식물병도 함께 방제 할 수 있는 잠재력을 지닌다고 보고되었다(Ownley *et al.*, 2008; Vega, 2008). 또한 곤충병원성 곰팡이는 다양한 향균물질, 화합물, 효소와 같은 대사산물들을 생산하며(Vega *et al.*, 2008), 곤충병원성 곰팡이의 이차대사산물의 경우 살충, 향균, 향암 향산화 효과 등의 효과가 보고되었고, 이러한 다양한 활성은 새로운 생물학적 제제로서의 잠재력으로 주목받아 왔다(Isaka *et al.*, 2005; Wang and Xu, 2012; Shin *et al.*, 2017).

An overview of the entomopathogenic fungi that have been developed for microbial control of insect pests.*

Species names	Targeted insects	Produced in	Selected references
<i>Aschersonia aleyrodis</i>	Hemiptera (Aleyrodidae)	Russia	Fransen (1990), Meekers <i>et al.</i> (2002), Lacey <i>et al.</i> (2008a, 2008b), McCoy <i>et al.</i> (2009)
<i>Beauveria bassiana sensu lato</i>	Acarí, Coleoptera, Diplopoda, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, Isoptera, Lepidoptera, Orthoptera, Siphonoptera, Thysanoptera,	Africa, Asia, Australia, Europe, South & North America	de la Rosa <i>et al.</i> (2000), Wraight <i>et al.</i> (2000, 2007b), Brownbridge <i>et al.</i> (2001, 2006), Chandler <i>et al.</i> (2005), Wekesa <i>et al.</i> (2005), Brownbridge <i>et al.</i> (2006), Labbé <i>et al.</i> (2009)
<i>Beauveria brongniartii</i>	Coleoptera (Scarabaeidae)	Europe, Colombia, Reunion Island	Zimmermann (1992), Keller (2000), Keller <i>et al.</i> (2003), Dolci <i>et al.</i> (2006), Townsend <i>et al.</i> (2010)
<i>Conidiobolus thromboides</i>	Acarí Hemiptera, Thysanoptera	Colombia, India, South Africa	Papierok and Hajek (1997), Nielsen and Hajek (2005), Hajek <i>et al.</i> (2012)
<i>Hirsutella thompsonii</i>	Acarí	India	McCoy (1981), Chandler <i>et al.</i> (2000, 2005), McCoy <i>et al.</i> (2009)
<i>Isaria fumosorosea</i>	Acarí, Diptera, Coleoptera, Hemiptera, Thysanoptera,	Belgium, Colombia, Mexico, USA, Venezuela	Wraight <i>et al.</i> (2000, 2007a, 2007b), Lacey <i>et al.</i> (2008a, 2008b, 2011), Zimmermann (2008)
<i>Lagenidium giganteum</i>	Diptera (Culicidae)	USA	Kerwin and Petersen (1997), Skovmand <i>et al.</i> (2007)
<i>Lecanicillium longisporum</i>	Hemiptera	Brazil, Netherlands	Bird <i>et al.</i> (2004), Down <i>et al.</i> (2009), Kim <i>et al.</i> (2009)
<i>Lecanicillium muscarium</i>	Acarí, Hemiptera, Thysanoptera	Netherlands, Russia	Chandler <i>et al.</i> (2005), Cuthbertson and Walters (2005), Burges (2007), Goettel <i>et al.</i> (2008)
<i>Metarhizium anisopliae sensu lato</i>	Acarí, Blattoidea, Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Isoptera, Lepidoptera, Orthoptera	Africa, Asia, Australia, Europe, South, Central & North America	de la Rosa <i>et al.</i> (2000), Chandler <i>et al.</i> (2005), Wekesa <i>et al.</i> (2005), Jaronski and Jackson (2012), Lacey <i>et al.</i> (2011)
<i>Metarhizium acridum</i>	Orthoptera	Australia, South Africa, USA	Lomer <i>et al.</i> (1999, 2001), Thomas (2000)
<i>Nomurea rileyi</i>	Lepidoptera	Columbia, India	Moscardi and Sosa-Gomez (2007), Thakre <i>et al.</i> (2011)

표 1. 해충의 미생물 방제를 위해 개발된 곤충병원성 곰팡이(Lacey *et al.*, 2015)

Fungal species ^a	Plant	Reference
<i>Acremonium</i> spp.	<i>Coffea arabica</i> L. (N) (coffee)	Vega et al., in press
<i>Acremonium alternatum</i>	<i>C. arabica</i> (N)	Vega et al., in press
<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Zea mays</i> L. (I) (maize)	Vakili, 1990; Bing and Lewis, 1991, 1992a,b; Jones, 1994; Lomer et al., 1997; Cherry et al., 1999, 2004; Wagner and Lewis, 2000; Lewis et al., 2001
	<i>Z. mays</i> (N)	Jones, 1994; Arnold and Lewis, 2005
	<i>Solanum tuberosum</i> L. (I) (potatoes)	Jones, 1994
	<i>Gossypium hirsutum</i> L. (N, I) (cotton)	Jones, 1994
	<i>Xanthium strumarium</i> L. (I) (common cocklebur)	Jones, 1994
	<i>Datura stramonium</i> L. (N) (jimsonweed)	Jones, 1994
	<i>Lycopersicon esculentum</i> Miller (I) (tomato)	Lekie, 2002; Ownley et al., 2004
	<i>Theobroma gileri</i> Cuatrec. (N)	Evans et al., 2003
	<i>Carpinus caroliniana</i> Walter (N) (ironwood)	Bills and Polishook, 1991
	<i>Pinus monticola</i> D. Don (N) (western white pine)	Ganley and Newcombe, 2005
	<i>Papaver somniferum</i> L. (I) (opium poppy)	Quesada-Moraga et al., 2006
	<i>Phoenix dactylifera</i> L. (I) (date palm)	Gómez-Vidal et al., 2006
	<i>Musa paradisiaca</i> L. (I) (banana)	Akello et al., 2007
	<i>C. arabica</i> (N, I)	Posada and Vega, 2006; Posada et al., 2007; Vega et al., in press, submitted
	<i>Theobroma cacao</i> L. (I) (cocoa)	Posada and Vega, 2005
<i>Beauveria brongniartii</i>	<i>C. arabica</i> (N)	Vega et al., submitted
<i>Cladosporium</i> spp.	<i>C. arabica</i> (N)	Vega et al., in press
	<i>Avicennia officinalis</i> L., <i>Rhizophora mucronata</i> Lam., <i>Sonneratia caseolaris</i> (L.) Engl. (N) (mangroves)	Ananda and Sridhar, 2002
<i>Clonostachys rosea</i>	<i>C. arabica</i> (N)	Vega et al., in press
<i>Isaria</i> spp.	<i>C. arabica</i> (N)	Vega et al., in press
<i>Lecanicillium dimorphum</i> & L. c.f. <i>psalliotae</i>	<i>P. dactylifera</i> L. (I)	Gómez-Vidal et al., 2006
<i>Paecilomyces</i> spp.	<i>Musa acuminata</i> Colla (N) (banana)	Cao et al., 2002
	<i>Oryza sativa</i> L. (N) (rice)	Tian et al., 2004
<i>Paecilomyces farinosus</i> (= <i>Isaria farinosa</i>)	<i>C. caroliniana</i> (N)	Bills and Polishook, 1991
<i>Verticillium</i> (= <i>Lecanicillium</i>) <i>lecanii</i>	Araceae	Petrini, 1981
	<i>C. caroliniana</i> (N)	Bills and Polishook, 1991
	<i>Arctostaphylos uva-ursi</i> (L.) Sprengel	Widler and Müller, 1984

표 2. 다양한 식물에서 내생균으로 보고된 곤충병원성 곰팡이(Vega, 2008)

일반적으로 곤충병원성 곰팡이의 배양은 두 가지 방법을 이용하는데, 고체 배양을 통한 aerial conidia의 생산과 액체배양을 통한 blastospore의 생산이 있다. aerial conidia의 경우 blastospores보다 부적절한 환경 조건에서 더 안정적이지만, 짧은 기간내에 포자 등 대량의 배양산물을 얻기 위해서는 액체 배양이 필수적이다(Jackson *et al.*, 1997; Vega *et al.*, 1999; Jackson *et al.*, 2004). 또한, 곤충병원성 곰팡이의 액체 배양산물에는 다양한 화합물 및 대사산물을 포함하고 있으며, 이들은 다양한 활성을 지니고 있다. 특히 곤충 병원성 곰팡이에 의해 생산되는 protease, chitinase, chitinase와 같은 효소 및 bassianolide, beauvericin, destruxin과 같은 독소는 살충 활성과 밀접하게 관련되어 있다(Petlamul and Prasertsan, 2012). 최근에는 실제 포장에서의 효과를 높이기 위한 유전자 재조합을 통한 살균제 저항성 곰팡이와 높은 살충력을 가지는 곰팡이를 위한 연구(Inglis *et al.*, 2000; Fan *et al.*, 2007; Pava-Ripoll *et al.*, 2008)와 곤충병원성 곰팡이의 해충과 식물병원균에 대한 이중 활성 효과의 연구들이 계속되고 있다(Goettel *et al.*, 2008; Lozano-Tovar *et al.*, 2013).

7. 연구개발결과의 보안등급

		D-09
○		

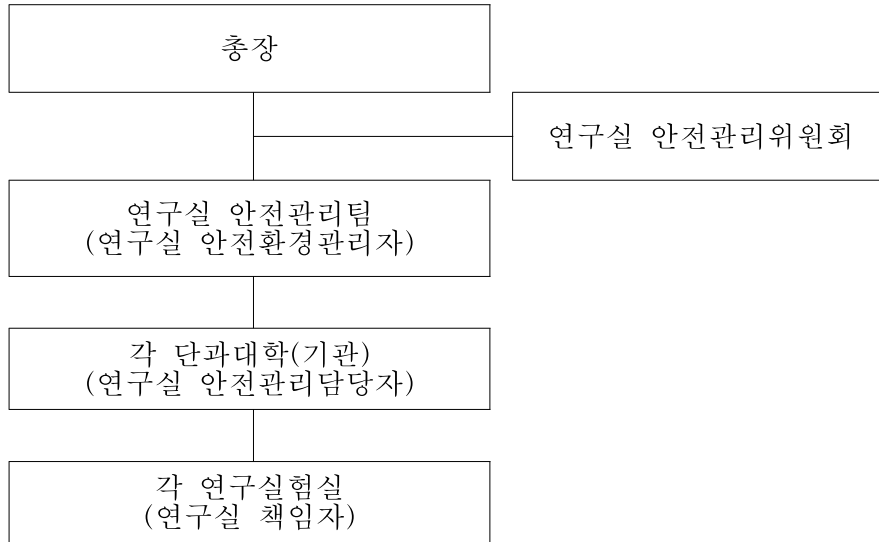
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

					D-10			
구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

○ 연구실 안전관리 추진현황

1. 연구실 안전관리 전담 조직 구성



2. 연구실 안전관리 현황

가. 실태조사 실시

구분	목적	조사주기	비고
실태조사	· 대학 연구실 안전관리 현황 조사 · 개별연구실 안전관리 실태조사	2년 1회	교육과학기술부
	· 정기점검 및 정밀안전진단 대상 연구실 조사	연 1회	연구실 안전관리팀

※ 정기점검 대상 : 가스·화학약품·유해물질·방사성 동위원소 사용, 실험폐기물 배출, 생물 및 동물 실험, 기계장비가 설치된 연구실

※ 정밀안전진단 대상 : 유해화학물질 관리법 제2조 7호에 따른 유해화학물질을 취급하는 연구실, 산업안전보건법 제39조에 따른 유해인자를 취급하는 연구실, 과학기술부령이 정하는 독성가스를 취급하는 연구실

나. 안전점검 실시

구분	점검대상	점검자	점검주기	점검방식	비고
일상점검	이화학 연구실 전체	연구활동종사자	매일 1회	일상점검표 (온라인 병행)	연구실별 실시
정기점검	정기점검 대상 연구실	안전점검 전문기관	연 1회	점검장비 및 점검표	연구실 안전관리팀

다. 정밀안전진단 실시

구분	진단대상	점검자	점검주기	점검방식	비고
정밀안전진단	관련법에서 정한 유해화학물질·유해인자·독성가스를 취급하는 연구실	정밀안전진단 전문기관	2년 1회	진단장비 및 점검표	연구실 안전관리 팀

라. 안전교육·훈련 실시

구분	교육대상	교육자	교육시기	교육시간	비고
정기교육	연구활동종사자 (교원 포함)	대학(기관), 각실 연구실책임자, 연구실안전환경관리자	실험시작전 또는 수시	반기별 6시간이상	대학(기관) 및 연구실별 실시
특별교육	대학원생, 연구원, 조교 등	연구실안전환경관리자, 전문강사	연1회	2시간 (집합교육)	연구실 안전관리팀
	신규 채용 등에 따른 교육·훈련(대학생·대학원생 등)	연구실안전환경관리자, 전문강사	연2회	2시간(회당) (집합교육)	연구실 안전관리팀
	연구실안전관리시스템 사용자	시스템 관리자	연2회	1시간(회당) (집합교육)	연구실 안전관리팀

※ 연구활동종사자 : 과학기술분야 모든 교원, 학부생, 대학원생, 연구(보조)원 등

※ 신규 채용된 연구활동종사자(계약직 포함) : 해당기관에서 자체 또는 외부 전문기관에 의뢰하여 위탁교육을 실시하여야 함(8시간 이상).

마. 건강검진 실시

구분	검진대상	검진기관	검진주기	비고
건강검진	인체에 치명적인 위험물질 및 바이러스 등에 노출될 위험성이 있는 연구활동종사자	특수건강진단기관	연 1회	연구실 안전관리팀

※ 단, 아래 항목에 해당하는 경우에 한하여 연구활동을 시작하기 전에 자체적으로 배치전 건강검진을 실시하여야 함.

- 1) Biosafety Level 2* 이상의 생물학적 유해인자를 다루는 연구활동인 경우
- 2) 연구활동종사자가 노출될 경우 변이원성, 생식독성, 발암성, 호흡독성 등의 독성을 일으킬 우려가 있는 화학물질을 다루는 연구활동의 경우
- 3) 특정 물질을 취급할 때 악화될 수 있는 의학적 소견을 보이는 연구활동종사자의 경우

바. 보험 가입 현황

보험명	보상내용(한도)	대상	주관부서
건물 및 물품* 보험	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 건물 <ul style="list-style-type: none"> - 화재(벼락), 폭발, 붕괴, 태풍, 홍수, 호우, 강풍, 풍랑, 해일, 대설 그 밖에 이와 유사한 사고로 인한 피해 ▶ 신체손해 <ul style="list-style-type: none"> - 공제가입한 교육연구시설의 화재(벼락), 폭발, 붕괴, 태풍, 홍수, 호우, 강풍, 풍랑, 해일, 대설로 인한 신체손해 - 사망/후유장애 : 호프만계수에 의해 산출한 실손해액 지급 - 부상 : 치료실비 	건물 및 신체손해 대상자	경리과
학교경영자배상 책임보험	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 신입생 상해손해 : 1인당 사망·후유장애 1억/의료비 5백만원 (보험기간 관계없이 O/T 기간내 보상) ▶ 대인배상 : 1인당 1억/1사고당 30억(자기부담금100,000원) ▶ 대물배상 : 1사고당 3천만원(자기부담금100,000원) ▶ 구내·외 치료비 : 1인당 5백만원/1사고당 5백만원(자기부담금 없음) 	신입생 및 재학생	학생처
교직원 단체보험	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 생명/상해 보장보험 : 1인당 5천만원 ▶ 의료비 보장보험 : 1인당 1천만원 	교직원 (공무원 및 기성회직)	총무과
연구실 안전공제 보험	<ul style="list-style-type: none"> · ▶ 사망/후유장애 : 1인당 1억원 ▶ 상해 : 1인당 1천만원 	연구활동 종사자	연구실 안전관리 팀

※ 연구실 안전공제 보험의 연구활동종사자란?

- 1) 과학기술분야 학부생, 대학원생, 수료 후 등록생 : 자동 가입
 - 2) 교원 : 가입 대상 아님
 - 3) 연구(보조)원 : 가입 대상(4대 보험 가입자는 제외)
 - 4) 그 외의 연구활동종사자 : 가입 대상
- 단, 3)과 4)에 해당하는 가입 대상자는 산학협력단에 가입을 요청하여야 함.

3. 기타 안전관리 사항

구분	내용	비고
1) 연구실 안전관리규정	충북대학교 연구실 안전관리규정 비치	연구실 안전관리시스템 (http://safe.chungbuk.ac.kr) 참조
2) 화학약품 관리	연구실별 보유 화학약품 등록 및 폐기 관리	연구실 안전관리시스템 (http://safe.chungbuk.ac.kr) 참조
3) MSDS 관리	연구실별 보유 화학약품의 MSDS 비치	연구실 안전관리시스템 (http://safe.chungbuk.ac.kr) 참조
4) 실험폐기물 관리	실험폐기물처리 준수사항 이행 및 위탁처리 관리	연구실 안전관리시스템 (http://safe.chungbuk.ac.kr)

		kr) 참조
5) 안전시설 점검 및 보수	비상샤워기, 세안기 등 작동 점검 및 보수	연구실 안전관리팀
6) 연구실험실 배치도 관리	주요 연구실험실 배치도 작성 관리	연구실 안전관리팀
7) 연구실험실 유해물질 관리	유해물질농도 측정	연구실 안전관리팀
8) 연구실험실 환기 등 연구환경 개선	연구실험실 환기 등 연구환경 개선 공사 시행	
9) 특수위험 실험실에 별도의 소화설비 설치	위험성이 큰 실험실에 별도의 특수 소화 설비를 설치하여 사고 확산을 예방	
10) 유기용매 보관시설 설치 등 및 액체질소 통합관리	1. 보관창고를 설치하여 통합관리 2. 액체질소를 통합관리	
11) 연구실험실 안전관리수칙 작성	연구실험실 안전수칙 보완 설치	
12) 가스 안전관리	고압가스용기 설치시 가스누설경보기, 전도방지장치 등 가스안전시설 설치	
13) 안전보호장비 시설 보완	안전보호장비와 안전표지 설치	
14) 개인보호구 지급	개인보호구 지급	
15) 연구실험실 출입자 관리	연구실험실별 출입자 관리	
16) 기타	기타 안전관리사항	

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/특허/기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	D-12	
								사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	특허 출원	해충방제 및 항균활성을 가지는 곤충병원성 곰팡이 메타리지움 아니소플리에 SD4-2 균주	충북 대학교		대한민국		2016.11.29	단독사사	
2	특허 출원	노제마병 병원균에 대해 항진균 활성을 가지는 패실로마이세스 마르판디이 364 균주 및 이의 용도	충북 대학교		대한민국		2017.09.06	단독사사	
3	논문	Evaluation of virulence, tolerance to environmental factors and antimicrobial activities of entomopathogenic fungi against two-spotted spider mite, <i>Tetranychus urticae</i>	충북 대학교	제1 저자	Mycoscienc e	1.01	2017.03.07	중복사사	SCIE
4	논문	Entomopathogenic Fungi as Dual Control Agents against Both the Pest <i>Myzus persicae</i> and Phytopathogen <i>Botrytis cinerea</i>	충북 대학교	제1 저자	Mycobiolog y	0.761	2017.09.30	단독사사	SCIE

5	논문	Comparative Evaluation of Conidia, Blastospores and Culture Filtrates from Entomopathogenic Fungi against <i>Tetranychus urticae</i>	충북대학교	제1저자	International journal of industrial entomology	0	2017.09.30	단독사사	KCI
---	----	--	-------	------	--	---	------------	------	-----

11. 기타사항

		D-13
○		

12. 참고문헌

D-14

- Brownbridge, M., R. A. Humber, B. L. Parker, and M. Skinner (1993), "Fungal entomopathogens recovered from vermont forest soils," *Mycologia*, 85(3), 358-361.
- de Faria, M. R., and S. P. Wraight (2007), "Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types," *Biological Control*, 43(3), 237-256.
- Fan, Y., W. Fang, S. Guo, X. Pei, Y. Zhang, Y. Xiao, D. Li, K. Jin, M. J. Bidochka, and Y. Pei (2007), "Increased insect virulence in *Beauveria bassiana* strains overexpressing an engineered chitinase," *Applied and Environmental Microbiology*, 73(1), 295-302.
- Hajek, A. E., I. D. Junior, and L. Butler (2003), "Entomopathogenic fungi as classical biological control agents," In Hokkanen, H. M. T., and A. E. Hajek (eds.), *Environmental impacts of microbial insecticides*, Dordrecht, NL : Springer.
- Inglis, P. W., F. J. I. Aragão, H. Frazão, B. P. Magalhães, and M. C Valadares-Inglis (2000), "Biolytic co-transformation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* Strain CG423 with green fluorescent protein and resistance to glufosinate ammonium," *FEMS Microbiology Letters*, 191(2), 249-254.
- Isaka, M., P. Kittakoop, K. Kirtikara, N. L. Hywel-Jones, and Y. Thebtaranonth (2005), "Bioactive substances from insect pathogenic fungi," *Accounts of Chemical Research*, 38(10), 813-823.
- Jackson, M. A., M. R. Mcguire, L. A. Lacey, and S. P. Wraight (1997), "Liquid culture production of desiccation tolerant blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*," *Mycological Research*, 101(1), 35-41.
- Jackson, M. A., A. R. Payne, and D. A. Odelson (2004), "Liquid-culture production of blastospores of the bioinsecticidal fungus *paecilomyces fumosoroseus* using portable fermentation equipment," *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 31(4), 149-154.
- Lacey, L. A., R. Frutos, H. K. Kaya, and P. Vail (2001), "Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future?," *Biological Control*, 21(3), 230-248.
- Lacey, L.A., D. Grzywacz, D. I. Shapiro-Ilan, R. Frutos, M. Brownbridge, M. S. Goettel (2015), "Insect pathogens as biological control agents: Back to the future," *Journal of Invertebrate Pathology*, 132, 1-41.
- Ownley, B. H., M. R. Griffin, W. E. Klingeman, K. D. Gwinn, J. K. Moulton, and R. M. Pereira (2008), "*Beauveria bassiana*: Endophytic colonization and plant disease control," *Journal of Invertebrate Pathology*, 98(3), 267-270.
- Ownley, B. H., K. D. Gwinn, and F. E. Vega (2010), "Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: Ecology and evolution,"

BioControl, 55(1), 113–128.

- Pava-Ripoll, M., F. J. Posada, B. Momen, C. Wang, and R. St. Leger (2008), “Increased pathogenicity against coffee berry borer, *hypothemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) by *Metarhizium anisopliae* expressing the scorpion toxin (AaIT) Gene,” *Journal of Invertebrate Pathology*, 99(2), 220–226.
- Petlamul, W., and P. Prasertsan (2012), “Evaluation of strains of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against *Spodoptera litura* on the basis of their virulence, germination rate, conidia production, radial growth and enzyme activity,” *Mycobiology*, 40(2), 111–116.
- Roy, H. E., F. E. Vega, D. Chandler, M. S. Goettel, J. K. Pell, and E. Wajnberg (2010), *The Ecology of Fungal Entomopathogens*, Dordrecht, NL: Springer.
- Shin, T. Y., S. M. Bae, D. J. Kim, H. G. Yun, and S. D. Woo (2017), “Evaluation of virulence, tolerance to environmental factors and antimicrobial activities of entomopathogenic fungi against Two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*,” *Mycoscience*, 58(3), 204–212.
- Vega, F. E., M. A. Jackson, and M. R. McGuire (1999), “Germination of conidia and blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* on the cuticle of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*,” *Mycopathologia*, 147(1), 33 - 35.
- Vega, F. E., M. S. Goettel, M. Blackwell, D. Chandler, M. A. Jackson, S. Keller, M. Koike, N. K. Maniania, A. Monzón, B. H. Ownley, J. K. Pell, D. E. N. Rangel, H. E. Roy (2009), “Fungal entomopathogens: New insights on their ecology,” *Fungal Ecology*, 2(4), 149–159.
- Vega, F. E., F. Posada, M. Catherine Aime, M. Pava-Ripoll, F. Infante, and S. A. Rehner (2008), “Entomopathogenic fungal endophytes,” *Biological Control*, 46(1), 72–82.
- Vega, F. E. (2008), “Insect pathology and fungal endophytes,” *Journal of Invertebrate Pathology*, 98, 277–279.
- Wang, Q., and L. Xu (2012), “Beauvericin, a bioactive compound produced by fungi: A Short Review,” *Molecules*, 17(3), 2367–2377.
- Zimmermann, G. (2007), “Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*,” *Biocontrol Science and Technology*, 17(9), 879–920.

뒷면지

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.