

최 중
연구 보고서

핵다각체병바이러스 대량증식 및 제형화 연구

Mass production and formulation on
Spodoptera exigua nucleopolyhedrovirus

연구기관

전라남도농업기술원

순천대학교

(주) 경 농

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “핵다각체병바이러스 대량증식 및 제형화 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005년 10월 15일

주관연구기관명 : 전라남도농업기술원

총괄연구책임자 : 박 종 대

세부과제책임자 : 박 종 대

세부과제책임자 : 김 선 곤

선 임 연 구 원 : 김 도 익

협동연구기관명 : 순 천 대 학 교

협동연구책임자 : 김 상 수

협동연구기관명 : (주) 경 농

협동연구책임자 : 황 인 천

요 약 문

I. 제목

핵다각체병바이러스 대량증식 및 제형화 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

과밤나방(*Spodotera exigua*)의 기주는 그 범위가 넓어 채소, 화훼, 과수 등의 40과 200여종에 달하는 것으로 알려져 있고 특히 1~2령 시기를 제외하고는 영기가 진행됨에 따라 약제에 대한 감수성이 현저히 낮다. 현재 피해가 심한 지역은 전남 남부해안지역의 과 재배단지이고 그 외에 채소, 화훼, 전특작 등 거의 모든 농작물에 발생하여 피해를 주고 있으며 전국적으로 발생하고 있는 것으로 알려져 있다

최근에까지 이 해충의 방제는 유기합성 농약을 위주로 방제가 이루어지고 있으며 이러한 유기합성 농약의 계속적인 사용은 해충의 약제 저항성은 물론 천적상의 파괴, 잠재해충의 key pest화, 인축 독성, 환경오염 등 심각한 문제를 야기하고 있다. 이러한 유기합성 농약 중심의 해충 방제의 부작용을 최소화하기 위하여 해충 종합관리라는 새로운 개념의 전략이 선진농업국을 중심으로 1960년대부터 환경에 대한 영향과 부작용이 적은 생물농약 개발과 실용화 연구가 점진적으로 증대되어 오고 있는 실정이다. 이와 같은 생물적 방제는 해충을 경제적 피해수준이하로 유지하기 위해 기생성 및 포식성 천적과 곤충병원 미생물 등을 활용하는 방법으로 특히 곤충병원 미생물 중 곤충 핵다각체병바이러스(Nucleopolyhedrovirus; NPV)는 기주곤충에 대한 특이성이 높고 목적 해충만을 방제할 수 있다. 또한 인축과 환경에 무해하고 안정성이 높다는 장점을 가지고 있어 일부 선진국에서는 미생물살충제가 상품화되어 시판되고 있다.

우리나라 곤충바이러스 연구는 1974년 뽕나무해충인 흰불나방에서 핵다각체병바이러스를 분리하여 병원성이 매우 높은 것을 확인하면서 화학 살충제의 환

경오염 및 저항성문제를 해결하기 위해 대체 방제기술인 친환경적 미생물적 방제 기술 개발을 위해 곤충바이러스의 탐색과 농작물 해충의 방제이용 연구가 시작되었다. 곤충에 질병을 일으키는 바이러스는 900여종에 14과(Family)가 알려져 있으며 이 중 Baculoviridae 속의 곤충핵다각체병바이러스(Nucleopolyhedro virus ; NPV)은 520여종, 과립병 바이러스(Granulosis Virus ; GV)은 70여종이 보고되고 있다. 이들 바이러스병은 기주곤충에만 감염하는 기주특이성이 있고 인축과 환경에 무해하고 안정성이 높기 때문에 여러 나라에서 바이러스살충제 개발에 주목하고 있다. 이 Baculovirus 살충제는 효율적인 면에서 기존의 화학 살충제와 비교하여 살충범위가 좁고, 살충효과가 늦게 나타나고, 저장중이나 야외 살포 후 태양광선에 의해 바이러스의 병원성이 낮아지는 등 개선할 점이 있다. 이와 같은 단점을 해결하기 위하여 과밤나방핵다각체병바이러스(SINPV)의 생화학적 특성, 대량생산을 위한 저렴한 인공사료, 바이러스의 안정화 물질 선발 및 태양광선의 자외선에 의한 불활성화 조건 등을 구명하고 실제 농가 포장에서 살포 할 적정 농도를 판단하여 이를 제형방법별로 검정하여 가장 좋은 제형을 선발하여 과밤나방에 합성농약이 아닌 새로운 미생물 친환경 해충 방제제를 개발하고자 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

과밤나방핵다각체병바이러스의 제형화를 통해 농약잔류나 인축에 독성이 없는 환경 친화적인 해충 방제제 개발을 위하여 과밤나방의 사육에 가장 안정된 인공사료 성분을 구명하여 안정화된 사육 체계를 개발하고 핵다각체병바이러스의 최적생산조건, 안정성, 살포방법 등을 구명하여 대량 생산체계 구축한다. 또한 핵다각체병바이러스의 분자생물학적 및 조직세포학적 특성을 검정하고 이 바이러스의 어독성, 경피독성 등 안정성을 검정하고 제형별로 살충력을 검정하여 친환경 생물적 방제제로 제품화한 본 과제의 세부 내용 및 범위를 요약하면 다음과 같다.

1. 기주 곤충의 안정화된 사육법 개발

파밤나방의 대량 사육을 위해서 인공사료는 값이 싸면서 쉽게 구할 수 있고 파밤나방의 생육을 좋게 하기 위하여 기존 사료 주성분 변형하고 미량성분 교체 및 투입량 조절하여 인공사료를 조성하였다. 파밤나방의 사육 최적조건을 찾기 위해서 온도, 습도, 용기크기별 적정 마리수 등의 조건을 구명하여 앞으로 파밤나방을 사육하여 다른 연구를 수행할 연구자들에게 중요한 자료로 이용할 수 있게 하였다.

2. 핵다각체병바이러스의 대량 생산체계 구축

핵다각체병바이러스 대량생산에는 기주 생체 증식하는 바이러스 특성 때문에 기주곤충을 이용한 대량 증식법이 이용되고 있다. 이에 맞는 최적 생산조건을 구명하기 위하여 핵다각체병바이러스 접종농도, 유충영기, 온도 조건 등을 조사하였다. 저장중이나 야외 살포 후 태양광선에 의한 바이러스의 병원성이 낮아지는 문제점을 해결하기 위하여 기주식물에서 바이러스 안정성 검정하고 온도조건, 보관조건, 태양광선 등 핵다각체병바이러스 불활성화에 미치는 영향을 밝혔다. 또한 바이러스 살포농도, 살포방법 등을 확립하여 농업인이나 제조 회사가 바이러스를 안전하게 사용하고 제조할 수 있게 하였다.

3. 핵다각체병바이러스 생화학적 특성 검정

Baculovirus subgroup A에 속하는 파밤나방 핵다각체병바이러스 (*Spodoptera exigua* nucleopolyhedro virus : SeNPV)는 circular double stranded DNA를 갖는 봉상의 바이러스, 다각체 단백질 내에 바이러스 입자가 매립되어 있다. 나방류 바이러스 수집 및 분리는 6종을 실시하여 보관 중이다. 생화학적 특성 검정은 다각체 및 비리온 단백질 전기영동, 바이러스 DNA의 제한효소 분석하였다. 또한 SeNPV가 파밤나방에 침입한 후 과발현되는 IAP, Serpin, 그리고 SOCS을 연구하였으며 핵다각체병바이러스 병원성 검정을 유묘 및 포장 검정을 실시하여 효과를 살충효과를 판정하였다.

4. 핵다각체병바이러스 제형화

핵다각체병바이러스를 제형화하고 안정성을 검정하기 위하여 환경안전성 기초어독시험, 수서생물에 대한 독성, 경구, 경피 처리에 따른 병원성을 검정하고 독성시험으로 안전막 자극, 변이원성을 실시하여 안정성을 확보하였다. 제형의 기본과정으로 부자재 종류별 제형화, 상품화를 위한 제형별, 제형화를 위한 첨가제 선발, 약효증진용 부자재 탐색하여 환경친화형 제형화 기술 확립하였다. 또한 유효성분 분석법 확립하기 위하여 온도별 학대시험, QC확립을 위한 생물검정을 하였다. 생산 가능성을 증명을 위해 실험실 규모의 제조방법 확립, 제품 생산담당자와 공동으로 pilot test 실시, 포장시험 및 제조허가용 시제품 제조, 생산 공정의 문제점 분석 및 해결하였고 제품등록을 위한 시험 추진하여 팜가드란 상표명으로 미생물농약 등록 시험 중이다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 곤충 바이러스의 다른 해충으로 추가 연구의 필요성

3년으로 계획된 본 연구가 성공적으로 이루어져 많은 곤충 병원성 바이러스들이 확보되었다. 지금까지 연구 결과로 볼 때 핵다각체병바이러스를 제형화에 성공하여 좋은 결과를 도출하였다. 그러나 이 바이러스의 특성상 해충 한가지에만 작용하는 단점이 있기 때문에 여러 바이러스를 조합하여 여러 종의 해충을 방제할 수 있는 제품을 개발하여 요즘 문제가 되는 농업인의 인력난을 해소하고 작물 재배 시 문제가 되는 해충을 동시에 방제할 수 있는 제형을 만들려고 시도하고 싶다. 실제로 담배거세미나방과 과밤나방 핵다각체병바이러스를 혼합하여 농가에서 실증한 결과 두 가지 해충의 방제가 가능하였다.

2. 포장 및 타 작물로의 확대의 필요성

본 연구에서 얻어진 결과는 주로 하우스와 온실 위주의 고소득 작물에서 이루어진 작물이고 또한 제형화된 팜가드는 일부지역에서 한 작물만을 대상으로

국한되었으므로 좀더 광범위한 작물과 시설이 아닌 노지재배 작물에도 확대 적용해야 할 것이다. 따라서 팜가드는 더 많은 작물의 파밤나방에 대하여 3년 정도의 포장시험을 수행해야 할 것으로 사료된다.

Summary

I . Title

Mass production and formulation on *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus

II. Research content and scope

RESULTS AND DISCUSSION

1. Mass rearing condition of *Spodoptera exigua* *in vivo*

Nucleopolyhedrovirus(NPV) is a well-known entomopathogenic virus. In an attempt to develop it as a potential biocontrol agent in Korea, we have studied rearing condition of *S. exigua*.

The rearing of *S. exigua* larvae on three different artificial diet was tested under the various conditions such as major food constituents, vitamins, temperature, humidity and rearing cage size. This study showed that yellow soybean powder was working well as an alternative major nutrients constituents. Vitamins seem to play a critical role to complete the life cycle of *S. exigua*. As temperature goes higher from 20°C to 32°C, the larval weight of *S. exigua* was gradually increased. In addition, optimal humidity was 60% at 28°C. The optimal ratio between rearing cage and number of larva was turned out to be as follows; 31×25×19cm/250~300, 27×20×14cm/150~200, 7×12.5×6cm/100~150.

2. Larval growth of *S. exigua* by different artificial diet

Compared to standard artificial diet, artificial diet 1 was better in producing total number of eggs per female. However, it was quite similar in number of egg masses laid per female, hatchability, developmental periods between artificial diet 1 and 2. Using these larva produced from rearing conditions, it was possible to mass produce SeNPV.

3. Optimal production condition of SeNPV on *S. exigua* larva

SeNPV extracts was isolated using 55% sucrose gradients and centrifugation method. Optimal conditions for SeNPV concentrations on the life cycle of *S. exigua* at various temperature such as 20°C, 24°C, 28°C, and 32°C. Also, the overall growth of the larvae infected with SeNPV was estimated by RGRi, RCRI, and ECD.

4. Yields of SeNPV by different temperature and *S. exigua* larval stage

The larval mortality was examined using 2nd to 4th instar larvae at both 20°C and 28°C by applying various concentration of SeNPV on artificial diet. We found out that the individual mortality was increased SeNPV concentration goes up and the production of SeNPV was best under the condition; 28°C, 3rd instar larva, and 1.0×10^5 PIBs/ml. Furthermore, the same conditions were applied to the mass rearing of *S. exigua* larvae in the cage(31×25×19cm). Taken together, we have established both stable rearing condition of *S. exigua*, and mass production for SeNPV.

5. The Effect of Temperature, Storage and Sunlight on the Pathogenicity of the *S. exigua* nucleopolyhedrovirus

A nucleopolyhedrovirus of the beet armyworm, *Spodoptera exigua* would be a promising agent for the control of the insect.

To develop a viral insecticide using *S. exigua* NPV, effect of spray on temperature, storage and sunlight on the pathogenicity of the virus were studied as follows. Stability of *S. exigua* NPV was quickly decreased at the higher temperature than 60°C and at the longer exposure to the higher temperature. Storage of the virus at -20°C was kept higher pathogenicity after 6 months. Viral activity was maintained more than 9 days on the sprayed entire, under of leaves in green house and PVC house, but decreased at 2 days after spray in the leaf surface when exposed the virus to sunlight

6. Selection of spray method and sprayer of SeNPV

We have investigated to find optimal sprayer on kidney bean seedling and chrysanthemum. On the kidney bean, mortality of *S. exigua* by hand and delivery sprayer were higher than that by electronic sprayer. Electronic sprayer was high mortality at 3 days after treatment but SeNPV did not spread out to leaf surface so the mortality was low at 7 days after treatment. In automatic sprayer mortality was 92.2% at SeNPV 1×10^8 PIBs/ml as 5% higher than other sprayer. It could feed easy by *S. exigua* cause of SeNPV spread out all leaves surface.

7. Stability and pathogenicity of SeNPV formulation

Formulations of SeNPV were additive matters to increase mortality. Kaoline and bentonite affect mortality of *S. exigua* larva. It suggested that these mineral materials indigest on the midgut of *S. exigua*. Presample made 7 times and among them, water dispersible granule(WG) was suggestion to

production. On the experiment to increase and long time residue of SeNPV on the plant, fluorescent brightener which induced stilbene disulfonic acid was highest mortality as 97%.

8. Biochemical characteristics of SeNPV

Nucleopolyhedrovirus collected and conserved 6 species on lepidopteran. Polyhedron and virus particles appeared on the infected tissue which is corpulent nuclear compared to normal tissue. The shape of polyhedron was quadrangle and octagon in the electron microscope. Various virus particles was found in the polyhedron and a number of nucleocapsid within a envelop embedded. The number of virion band waas nine and virion band showed six clear.

9. Effects of different temperatures on pathogenicity of *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus(SeNPV)

This experiment was conducted to investigate pathogenicity of *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus(SeNPV) with different temperatures for mass production. In laboratory condition, LC₅₀ values of SeNPV were 9.797×10^3 PIBs/ml at 20°C and 3.351×10^2 PIBs/ml at 32°C in 2nd instar larvae. LC₅₀ of the other larval stage were similar to that of 2nd instar. LT₅₀ values of SeNPV was 9.0 days in 1.0×10^3 PIBs/ml but 6.9 to 3.5 days in $1.0 \times 10^{4-6}$ PIBs/ml against 3rd instar of *Spodoptera exigua*. LT₅₀ Values of 1.0×10^4 PIBs/ml were 5.7, 5.5 and 4.9 days in 24, 28 and 32°C, respectively. As a results, LT₅₀ was shortened with increase of temperatures up to 32°C and also dependent on viral concentration and larval instars.

10. Field experiment and enhanced effectiveness of SeNPV with additives

Values of lethal time (LT_{50}) of *S. exigua* treated SeNPV after 7 days treatment on the kidney bean seedling in open field and PVC house were 5.96 days on 1×10^6 PIBs/ml, 4.91 days on 1×10^8 PIBs/ml in the open field and 5.84 days on 1×10^6 PIBs/ml, 4.86 days 1×10^8 PIBs/ml. Lethal time was gradually short on the high concentration of SeNPV. Cumulative mortality of *S. exigua* after spray of SeNPV on the kidney bean seedling in the greenhouse increased fast 4 days after spray on the concentration of 1×10^7 , 10^8 PIBs/ml such as 90% mortality after 10 days. On the concentration of 1×10^6 PIBs/ml, the mortality of *S. exigua* was low which is not suggestion concentration. Values of lethal time (LT_{50}) of *S. exigua* treated SeNPV on the chrysanthemum in open field and PVC house were 7.1 and 6.5 days on 1×10^8 PIBs/ml, respectively. Protection value of *S. exigua* after spray of SeNPV 1×10^8 PIBs/ml on the chrysanthemum in the open field and PVC house were 92.3%. Values of lethal time (LT_{50}) of *S. exigua* treated SeNPV with Tinopal-UNPA-GX and Fluostain on artificial diet were 4.39 and 4.25 days, respectively.

11. Cloning and partial characterization of SeIAP, SeSerp and SeSOCS genes overexpressed after SeNPV infection

Insect innate immunity has been one of the hot issues in conjunction with host-pathogen interactions. Our laboratory has recently been involved in investigating the interactions between *S. exigua* and SeNPV. Thus, we have cloned and partially characterized serpin and suppressor of cytokine signaling (SOCS) from *S. exigua* and inhibitor of apoptosis (IAP) from SeNPV. It has been known that IAP play a critical role in the early phase after SeNPV

invasion. In order to estimate the level of IAP-2 and IAP-3 transcripts, RT-PCR analysis was conducted. It showed that these genes were specifically induced in response to SeNPV. The level of IAP-3 was higher than that of IAP-2. In addition, IAP-2 was cloned into pRSET expression vector to produce the recombinant protein and polyclonal antibody against it.

Recent report on serpin from *Anopheles gambiae* indicates that the level of serpin was also induced in the midgut at the time of Plasmodium invasion. This lead us to clone and characterize the homologous serpin gene that may have important functions in response to pathogens from *S. exigua*. Using the RT-PCR and TA cloning approach, we found a partial fragment (514 bp) of serpin from *S. exigua*. It has a homology to various insects such as *Bombyx mori* (67%), *Manduca sexta* (52%), *Anopheles gambiae* (42%), and *Drosophila melanogaster* (41%). Temporal expression patterns of SeSerpins were examined using RT-PCR after being immune-challenged with SeNPV and laminarin. It showed that SeSerpins were strongly upregulated by SeNPV and laminarin.

Suppressor of cytokine signaling (SOCS) is known to play a key role in the insect defense system. SOCS has been characterized as a negative feedback regulator in JAK-STAT signaling cascade involved in NOS production. This context lead us to clone and characterize a SOCS gene that may have important functions in response to pathogens. Using the RT-PCR and TA cloning approach, we found a partial fragment (416bp) of SOCS5 from *S. exigua*. Blast search and multiple alignment data showed that it has a homology to various insects such as *Anopheles gambiae* (78%), *Aedes aegypti* (75%), *Drosophila Melanogaster* (77%), *Mus musculus* (69%), and *Homo sapiens* (69%). Temporal induction patterns of SeSOCS5 were analysed after being immune-challenged with NPV and laminarin. It showed that the level of SeSOCS5 mRNA was strongly induced in response to SeNPV and

laminarin, respectively. Future work will be focused on the cellular distribution of SeNPV-IAP, SeSerp, and SeSOCS5 in the NPV-invaded cells using confocal microscopy and the polyclonal antibodies against the three genes, respectively.

12. Formulation of SeNPV

Formulation for SeNPV could make suspension concentrate in liquid and water dispersible granular in solid which with high mortality on *S. exigua*. We selected additives to enhance effectiveness of SeNPV and could establish on water dispersible granular. To evaluate of environmental safety, we research toxic of humans and animals and toxic of environmental ecology on the suspension concentrate and water dispersible granular. The results were third degree of fish virulence which could make production.

CONTENTS

Chapter 1 Outline of research	22
Section 1 Purpose and aim of research	24
1. Purpose	24
2. Necessity	25
Section 2 Objective and content	27
1. Objective	27
2. content and range of research	29
3. System of research processing	32
Chapter 2 Current status of related research developed in Korea and foreign country	33
Section 1 Research status in Korea	35
Section 2 Research status in foreign country	36
Section 3 Prospect	37
Chapter 3 Results of research	38
Section 1 Mass rearing condition of <i>Spodoptera exigua in vivo</i>	40
1. Introduction	40
2. Materials and method	40
3. Results and discussion	42
Section 2 Larval growth of <i>S. exigua</i> by different artificial diet	48
1. Introduction	48
2. Materials and method	48
3. Results and discussion	49
Section 3 Optimal production condition of SeNPV on <i>S. exigua</i> larva	53

1. Introduction	53
2. Materials and method	53
3. Results and discussion	55
Section 4 Yields of SeNPV by different temperature and <i>S. exigua</i> larval stage	61
1. Introduction	61
2. Materials and method	61
3. Results and discussion	63
Section 5 The Effect of Temperature, Storage and Sunlight on the Pathogenicity of <i>S. exigua</i> nucleopolyhedrovirus	68
1. Introduction	68
2. Materials and method	68
3. Results and discussion	70
4. Abstract	75
Section 6 Selection of spray method and sprayer of SeNPV	77
1. Introduction	77
2. Materials and method	77
3. Results and discussion	80
Section 7 Stability and pathogenicity of SeNPV formulation	83
1. Introduction	83
2. Materials and method	83
3. Results and discussion	85
Section 8 Biochemical characteristics of SeNPV	90
1. Introduction	90
2. Materials and method	90
3. Results and discussion	93
Section 9 Effects of different temperatures on pathogenicity of <i>Spodoptera exigua</i> nucleopolyhedrovirus(SeNPV)	101

1. Introduction	101
2. Materials and method	101
3. Results and discussion	103
Section 10 Field experiment and enhanced effectiveness of SeNPV with additives	110
1. Introduction	110
2. Materials and method	111
3. Results and discussion	113
Section 11 Cloning and partial characterization of SeIAP, SeSerp and SeSOCS genes overexpressed after SeNPV infection	120
1. Introduction	120
2. Materials and method	120
3. Results and discussion	122
4. Abstract	130
Section 12 Formulation of SeNPV	132
1. Introduction	132
2. Materials and method	132
3. Results and discussion	147
Chapter 4 Achievements of aims and contribution to related area	175
Section 1 Achievements of research aims	177
1. Aims, evaluation score and achievements of the first year research ..	177
2. Aims, evaluation score and achievements of the second year research	178
3. Aims, evaluation score and achievements of the third year research	179
4. Overall evaluation on achievements of the research	179
Section 2 Contribution to related area	180
1. Technical aspects	181
2. Academic aspects	181

3. Economical and industrial aspects	183
Chapter 5 Application of results	184
Section 1 Necessity of continuing research	186
1. Necessity of additional research to other insect pest and entomopathogene virus	186
2. Necessity of enlargement to other field and crop	186
Section 2 Direction of industrialization	186
Chapter 6 Information collected from abroad during the research period	187
Section 1 Institute of insect biological control on USDA	189
1. Outline of business trip	189
2. Working of business trip	190
3. Meeting and Men	194
Chapter 7 References	195

목 차

제1장 연구과제의 개요	22
제1절 연구개발의 목적 및 필요성	24
1. 연구개발의 목적	24
2. 연구개발의 필요성	25
제2절 연구개발의 목표 및 내용	27
1. 연구개발 목표	27
2. 연구의 내용 및 범위	29
3. 연구개발 추진 체계	32
제2장 국내외 기술 개발 현황	33
제1절 국내기술 현황	35
제2절 국외기술 현황	36
제3절 앞으로 전망	37
제3장 연구개발 수행 내용 및 결과	38
제1절 파밤나방의 대량 사육조건 구명	40
1. 서 언	40
2. 재료 및 방법	40
3. 결과 및 고찰	42
제2절 인공사료 조성별 파밤나방 유충 생육	48
1. 서 언	48
2. 재료 및 방법	48
3. 결과 및 고찰	49
제3절 파밤나방 핵다각체병바이러스 최적 생산조건 구명	53
1. 서 언	53
2. 재료 및 방법	53

3. 결과 및 고찰	55
제4절 온도 및 영기에 따른 과밤나방 핵다각체병바이러스의 수량	61
1. 서 언	61
2. 재료 및 방법	61
3. 결과 및 고찰	63
제5절 온도, 저장조건 및 태양광선이 과밤나방핵다각체병바이러스 활성화에 미치는 영향	68
1. 서 언	68
2. 재료 및 방법	68
3. 결과 및 고찰	70
4. 결과 요약	75
제6절 과밤나방 핵다각체병바이러스 바이러스 살포방법 구명	77
1. 서 언	77
2. 재료 및 방법	77
3. 결과 및 고찰	80
제7절 핵다각체병바이러스의 제형의 안정성 및 효과 검정	83
1. 서 언	83
2. 재료 및 방법	83
3. 결과 및 고찰	85
제8절 핵다각체병바이러스의 생화학적 특성 검정	90
1. 서 언	90
2. 재료 및 방법	90
3. 결과 및 고찰	93
제9절 온도조건에 따른 과밤나방핵다각체병바이러스 (SeNPV)의 병원 활성화	101
1. 서 언	101
2. 재료 및 방법	101
3. 결과 및 고찰	103

제10절	핵다각체병바이러스 포장 검정 및 살포효과 증진 물질 선발	110
1.	서 언	110
2.	재료 및 방법	111
3.	결과 및 고찰	113
제11절	SeNPV가 과밤나방(<i>Spodoptera exigua</i>)에 감염된 후 과발현된 IAP, Serpin, 과 SOCS 유전자에 관한 연구	120
1.	서 언	120
2.	재료 및 방법	120
3.	결과 및 고찰	122
4.	결과 요약	130
제12절	과밤나방 핵다각체병바이러스 제형화	132
1.	서 언	132
2.	재료 및 방법	132
3.	결과 및 고찰	147
제4장	목표달성도와 관련분야에서의 기여도	175
제1절	목표 달성도	177
1.	제 1 차년도 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도	177
2.	제 2 차년도 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도	178
3.	제 3 차년도 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도	179
4.	최종 평가의 착안점 및 목표 달성도	179
제2절	관련 분야에의 기여도	180
1.	기술적 측면에서의 기여도	181
2.	학문 발전에의 기여도	181
3.	경제, 산업적 측면에의 기여도	183
제5장	연구개발결과의 활용계획	184
제1절	추가연구의 필요성	186

1. 곤충 바이러스의 다른 해충으로 추가 연구의 필요성	186
2. 포장 및 타 작물로의 확대의 필요성	186
제2절 기업화 추진방향	186
제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	187
제1절 미국 농무성 곤충 생물적 방제연구소	189
1. 출장개요	189
2. 출장수행 사항	190
3. 만난 사람들	194
제7장 참고문헌	195

제1장 연구과제의 개요

제1절 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

파밤나방(*Spodotera exigua*)의 기주는 그 범위가 넓어 채소, 화훼, 과수 등의 40과 200여종에 달하는 것으로 알려져 있고 특히 1~2령 시기를 제외하고는 영기가 진행됨에 따라 약제에 대한 감수성이 현저히 낮고 효과적인 약제가 있어도 부화한 다음 곧 과의 잎속으로 들어가 약제에 접촉할 기회가 적어 방제가 어려운 해충으로 알려져 있다. 현재 피해가 심한 지역은 전남 남부해안지역의 파 재배단지이고 그 외에 채소, 화훼, 전특작 등 거의 모든 농작물에 발생하여 피해를 주고 있으며 전국적으로 발생하고 있는 것으로 알려져 있다

최근에까지 이 해충의 방제는 유기합성 농약을 위주로 방제가 이루어지고 있으며 이러한 유기합성 농약의 계속적인 사용은 해충의 약제 저항성은 물론 천적상의 파괴, 잠재해충의 key pest화, 인축 독성, 환경오염 등 심각한 문제를 야기하고 있다. 이러한 유기합성 농약 중심의 해충 방제의 부작용을 최소화하기 위하여 해충 종합관리라는 새로운 개념의 전략이 선진농업국을 중심으로 1960년대부터 환경에 대한 영향과 부작용이 적은 생물농약 개발과 실용화 연구가 점진적으로 증대되어 오고 있는 실정이다. 이와 같은 생물적 방제는 해충을 경제적 피해 수준이하로 유지하기 위해 기생성 및 포식성 천적과 곤충병원 미생물 등을 활용하는 방법으로 특히 곤충병원 미생물 중 곤충 핵다각체병바이러스(Nucleopolyhedrovirus; NPV)는 기주곤충에 대한 특이성이 높고 목적 해충만을 방제할 수 있다. 또한 인축과 환경에 무해하고 안정성이 높다는 장점을 가지고 있어 일부 선진국에서는 미생물살충제가 상품화되어 시판되고 있다.

그러나 해충방제를 위해 이용하는 곤충 핵다각체병바이러스 대량생산에는 기주 생체 증식하는 바이러스 특성 때문에 기주곤충을 이용한 대량 증식법이 이용되고 있으나 기존의 화학 살충제와 비교하여 살충범위가 좁고, 살충효과가 늦으며, 저장중이나 야외 살포 후 태양광선에 의한 바이러스의 병원성이 낮아지는 문제점이 있다.

본 연구과제에서는 3년간의 연구를 통하여 파밤나방핵다각체병바이러스

(SINPV)의 생화학적 특성, 대량생산을 위한 저렴한 인공사료, 바이러스의 안정화 물질 선별 및 태양광선의 자외선에 의한 불활성화 조건 등을 구명하고 실제 농가 포장에서 살포 할 적정 농도를 판단하여 이를 제형방법별로 검정하여 가장 좋은 제형을 선별하여 파밤나방에 합성농약이 아닌 새로운 미생물 친환경 해충 방제제를 개발하고자 하였다.

2. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

우리나라 곤충바이러스 연구는 1974년 뽕나무해충인 흰불나방에서 핵다각체병 바이러스를 분리하여 병원성이 매우 높은 것을 확인하면서 화학 살충제의 환경 오염 및 저항성문제를 해결하기 위해 대체 방제기술인 친환경적 미생물적 방제 기술 개발을 위해 곤충바이러스의 탐색과 농작물 해충의 방제이용 연구가 시작되었다. 곤충에 질병을 일으키는 바이러스는 900여종에 14과(Family)가 알려져 있으며 이 중 Baculoviridae 속의 곤충핵다각체병바이러스(Nucleopolyhedrovirus ; NPV)은 520여종, 과립병 바이러스(Granulosis Virus ; GV)은 70여종이 보고되고 있다. 이들 바이러스병은 기주곤충에만 감염하는 기주특이성이 있고 인축과 환경에 무해하고 안정성이 높기 때문에 여러 나라에서 바이러스살충제 개발에 주목하고 있다. 이 Baculovirus 살충제는 효율적인 면에서 기존의 화학 살충제와 비교하여 살충범위가 좁고, 살충효과가 늦게 나타나고, 저장중이나 야외 살포 후 태양광선에 의해 바이러스의 병원성이 낮아지는 등 개선할 점이 있다. 또한 기주 생체 증식하는 바이러스 특성 때문에 기주곤충의 대량사육시설과 기술체계 확립이 필요하고 곤충배양 세포주를 이용할 경우에는 보다 저렴한 생산비로 대량 증식하는 기술이 필요하다.

그러나 우리나라의 곤충바이러스연구는 외국의 곤충병리 연구현황과 비교할 때 국내 연구수준은 기주곤충과 바이러스의 대량증식 시설이나 바이러스 살충제 제제화 등에 관한 연구가 매우 미진하다. 특히 우리나라는 일본이나 중국의 곤충상과 유사하여 농업해충별 곤충 바이러스병의 종류도 중첩되는 경우가 대부분이다.

나. 경제·산업적 측면

세계적으로 생물농약은 185종으로 작물보호시장의 1%에 지나지 않고 있으며 이중 곤충바이러스 살충제는 24종을 차지하고 있다. 외국에서의 바이러스 살충제 개발은 1960년대를 시작으로 미국에서 1973년 목화 해충인 *Heliothis zea*와 *H. virescens* 방제약제로 Elcar라는 상표로 상품화한 것이 처음이며 지금까지 각 나라의 주요 방제해충을 대상으로 수 십 여종의 바이러스살충제가 개발되어 시판되고 있다. 농업해충에 대한 바이러스살충제 개발 연구를 위해 이미 일본에서는 16종, 중국에서는 22종에 대해 각각 포장시험을 마치고 일부 상품화 단계에 있어 각 국의 바이러스살충제 상품권 등록 경쟁은 치열할 것이다. 그리고 세계 농약시장에서 화학 살충제의 경우 연간 성장률이 둔화되고 있는 반면 미생물 살충제는 10~30%의 현저한 성장률을 보이고 있다. 또한 미생물 살충제 등을 이용 환경 친화적으로 생산된 농산물 역시 시장에서 높은 경제성을 가지고 있는 실정이다.

다. 사회·문화적 측면

국내 농약사용량은 '90년대 중반 ha당 12.9kg으로 OECD회원국 중 일본에 이어 4위를 차지하였고 OECD국가 평균 농약 사용량 263kg의 4.6배나 되어 농약을 과다 사용하고 있는 국가 중의 하나이다. 그러나 곤충 병원 바이러스를 이용한 해충방제는 자연환경 구성원인 일종의 미생물을 선발하여 화학 살충제처럼 인축을 비롯한 동식물 등 자연환경을 파괴할 위험이 없으며 일단 해충에 병을 일으킨 후 바이러스를 재생산하여 이차적 감염원으로 전파되어 야외에 잔류하다가 다음 세대 또는 다음해에 발생한 해충에 병을 일으키는 잔효성이 있으며 기주 특이성이 좋아 목적해충만을 죽이므로 천적 등에 영향을 주지 않고 또한 저항성 해충이 출현할 가능성이 매우 낮은 장점이 있다. 바이러스 살충제는 유기합성 살충제의 잔류독성이 강하여 인축이나 자연환경에 유해하거나 살충제 저항성 해충이 출현할 때 유용한 방제법이 될 것이다.

제2절 연구개발의 목표 및 내용

1. 연구개발 목표

최종 목표 : 파밤나방핵다각체병바이러스의 제형화를 통해 농약잔류나 인축에 독성이 없는 환경 친화적인 해충 방제제 개발을 위하여

1. 파밤나방의 사육에 가장 안정된 인공사료 성분을 구명하여 안정화된 사육 체계를 개발하고
- 2) 핵다각체병바이러스의 최적생산조건, 안정성, 살포방법 등을 구명하여 대량 생산체계 구축하고
- 3) 핵다각체병바이러스의 분자생물학적 및 조직세포학적 특성을 검정하고
- 4) 핵다각체병바이러스의 어독성, 경피독성 등 안정성을 검정하고 제형별로 살충력을 검정하여 친환경 생물적 방제제로 제품화하고자 한다.

농업생산성을 향상시키기 위해 과다하게 사용되는 농약이 자연환경과 인축을 위협하는 시점에서, 생산성을 유지하고 소비자가 선호에 맞출 수 있는 유일한 대안은 환경친화적인 생물농약의 개발이다. 이를 해결하기 위한 방안중 하나로 생물적 방제법을 도입하여 화학적 방제의 보완 또는 대체수단으로서 종합적 해충 방제 체계 확립에 연구의 초점을 집중시키고 있으며 그 중에서도 곤충 질병을 일으키는 세균, 바이러스, 사상균, 원생동물 등 해충의 방제에 큰 비중을 두고 있다. 이중에서 미생물 바이러스는 기주곤충에 대한 특이성이 높으며 인축과 환경에 무해하고 안정성이 높다. 그리고 농작물이나 산림해충 방제에 효과적이어서 이미 일부 선진국에서는 살충제가 상품화되고 있다.

그러나 이들 곤충병원성바이러스는 효율적인 면에서 기존의 화학 살충제와 비교하여 살충범위가 좁고 살충효과가 늦게 나타나고 저장중이나 야외 살포 후 태양광선에 의해 바이러스의 병원성이 낮아지는 등 개선할 점이 있다. 또한 기주 생체 증식하는 바이러스 특성 때문에 기주곤충의 대량사육시설과 기술체계 확립

이 필요하고 곤충배양 세포주를 이용할 경우에는 보다 저렴한 생산비로 대량 증식하는 기술이 필요하다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 기주 곤충인 파밤나방의 대량 사육법 개발, 파밤나방핵다각체병바이러스의 대량 생산체계 구축, 생화학적 특성 검정 및 제형화 방법을 구명하여 제품화 하고자 한다.

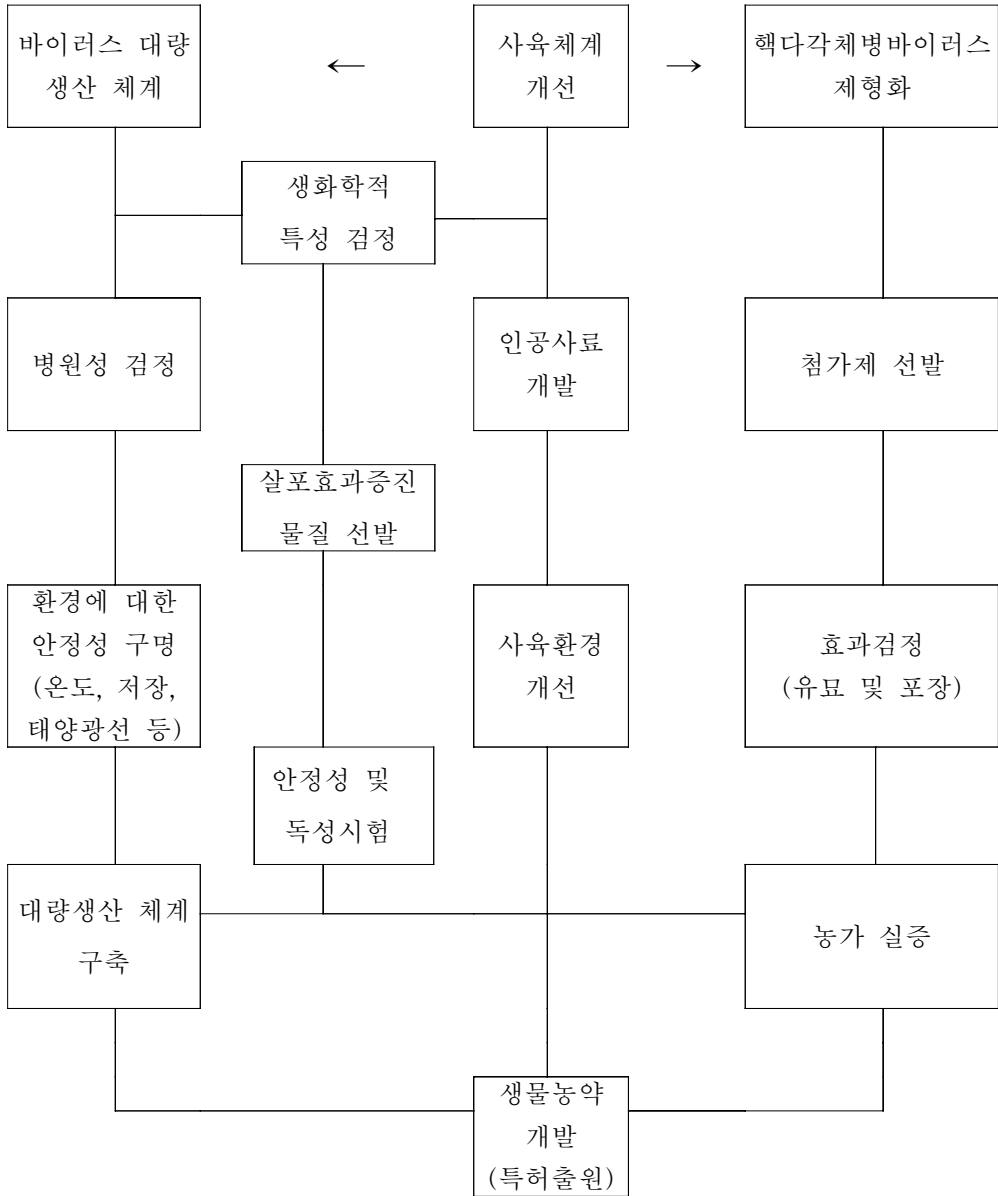
2. 연구의 내용 및 범위

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2002)	기주 곤충의 안정화된 사육법 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○기주 곤충의 대량 사육법 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 인공사료 개선 : 기존 사료 조성분 변형 <ul style="list-style-type: none"> · 강낭콩 등 주성분 교체 · 미량성분 교체 및 투입량 조절 - 사육 최적조건 구명 <ul style="list-style-type: none"> · 온도조건 : 20℃ ~ 30℃ · 습도조건 : 40% ~ 70% · 사육용기, 통풍관계 등
	핵다각체병바이러스의 대량 생산체계 구축	<ul style="list-style-type: none"> ○핵다각체병바이러스 대량 생산 <ul style="list-style-type: none"> - 핵다각체병바이러스 병원체 분리 및 접종 - 핵다각체병바이러스 최적 생산조건 구명 <ul style="list-style-type: none"> · 접종농도 : $1.0 \times 10^2 \sim 10^8$ PIBs/ml · 유충영기 : 2령 ~ 5령 · 온도 조건 : 20, 24, 28, 32℃ ○핵다각체병바이러스 안정성 구명 <ul style="list-style-type: none"> - 기주식물에서 바이러스 안정성 검정 - 바이러스 불활성화에 미치는 영향 <ul style="list-style-type: none"> · 온도조건 : 30~100℃에 시간별 처리 · 보관조건에 따른 병원성 지속 기간 검정 보관온도 및 기간 : -20 ~ 25℃, 1 ~ 12개월 · 태양광선 : 태양광 노출에 의한 불활성 정도
	핵다각체병바이러스 생 화학적 특성 검정	<ul style="list-style-type: none"> ○나방류 바이러스 수집 및 분리 ○생화학적 특성 검정 <ul style="list-style-type: none"> · 다각체 분리 및 비리온 정제, 전자현미경 관찰 ○핵다각체바이러스 병원성 검정(실내검정) <ul style="list-style-type: none"> · 접종농도 : $1.0 \times 10^2 \sim 10^8$ PIBs/ml · 접종유충 : 2, 3, 4, 5령 · 처리온도 : 20, 24, 28, 32℃
	핵다각체병바이러스 제형화	<ul style="list-style-type: none"> ○ 문헌, 특히 자료조사 ○ 기초 제형화 <ul style="list-style-type: none"> - 제제의 특성 연구 - 제제조건 분석 및 기본 제제화 - QC확립을 위한 생물검정(실내, 포장) ○ 환경안전성 연구 <ul style="list-style-type: none"> - 기초 독성시험 : 기초어독시험 - 기초 병원성시험: 경구, 경피 처리에 따른 병원성 - 적용 작물에 대한 잔류 허용기준 검토

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
2차 년도 (2003)	기주 곤충의 안정화된 사육법 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○기주 곤충의 대량 사육법 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 인공사료 개선 : 기존 사료 조성분 변형 <ul style="list-style-type: none"> · 강낭콩 등 주성분 교체 · 미량성분 교체 및 투입량 조절 - 사육 최적조건 구명 <ul style="list-style-type: none"> · 온도조건 : 20℃ ~30℃ · 습도조건 : 40% ~70 · 사육용기, 통풍관계 등
	핵다각체병바이러스의 대량 생산체계 구축	<ul style="list-style-type: none"> ○핵다각체병바이러스 대량 생산 <ul style="list-style-type: none"> - 핵다각체병바이러스 병원체 분리 및 접종 - 핵다각체병바이러스 최적 생산조건 구명 <ul style="list-style-type: none"> · 접종농도, 유충영기, 온도 조건 등 ○핵다각체병바이러스 안정성 구명 <ul style="list-style-type: none"> - 기주식물에서 바이러스 안정성 검정 - 불활성화에 미치는 영향 <ul style="list-style-type: none"> · 온도조건, 보관조건, 태양광선 등 ○바이러스 살포량 및 살포방법 구명 <ul style="list-style-type: none"> - 살포농도, 살포기구 등
	핵다각체병바이러스 생화학적 특성 검정	<ul style="list-style-type: none"> ○나방류 바이러스 수집 및 분리 ○생화학적 특성 검정 <ul style="list-style-type: none"> - 다각체 및 비리온 단백질 전기영동 - 바이러스 DNA의 제한효소 분석 ○핵다각체병바이러스 병원성 검정 <ul style="list-style-type: none"> - 유묘 및 포장 검정 : <ul style="list-style-type: none"> · 1년차 선발된 바이러스 농도 작물별 적용 ○바이러스 살포효과 증진 <ul style="list-style-type: none"> - 섭식유인 및 자외선 차단물질 선발 - 살충력 증가 바이러스 혼합물질 선발
	핵다각체병바이러스 제형화	<ul style="list-style-type: none"> ○ 제형화 연구 <ul style="list-style-type: none"> - 제형화를 위한 첨가제 선발 - 약효증진용 부자재 탐색 - 부자재 종류별 제형화 연구 - 상품화를 위한 제형별 연구 <ul style="list-style-type: none"> · 수화제, 액상 수화제, 과립형 제제 - 환경친화형 제형화 기술 확립 - 유효성분 분석법 확립 - 온도별 학대시험 - QC확립을 위한 생물검정 ○ 환경안전성 연구 <ul style="list-style-type: none"> - 기초 어독성 시험 : 수서생물에 대한 독성 - 독성시험 : 경구독성, 경피독성

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
3차 년도 (2004)	기주 곤충의 안정화된 사육법 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○기주 곤충의 대량 사육법 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 인공사료 개선 : 기존 사료 조성분 변형 · 강낭콩 등 주성분 교체 · 미량성분 교체 및 투입량 조절 - 사육 최적조건 구명 <ul style="list-style-type: none"> · 온도조건 : 20℃ ~30℃ · 습도조건 : 40% ~70 · 사육용기, 통풍관계 등
	핵다각체병바이러스의 대량 생산체계 구축	<ul style="list-style-type: none"> ○핵다각체병바이러스 대량 생산 <ul style="list-style-type: none"> - 핵다각체병바이러스 병원체 분리 및 접종 - 핵다각체병바이러스 최적 생산조건 구명 <ul style="list-style-type: none"> · 접종농도, 유충영기, 온도 조건 등 ○핵다각체병바이러스 안정성 구명 <ul style="list-style-type: none"> - 기주식물에서 바이러스 안정성 검정 - 불활성화에 미치는 영향 <ul style="list-style-type: none"> · 온도조건, 보관조건, 태양광선 등 ○바이러스 살포량 및 살포방법 구명 <ul style="list-style-type: none"> - 살포농도, 살포기구 등
	핵다각체병바이러스 생화학적 특성 검정	<ul style="list-style-type: none"> ○나방류 바이러스 수집 및 분리 ○생화학적 특성 검정 <ul style="list-style-type: none"> - 다각체 및 비리온 단백질 전기영동 - 바이러스 DNA의 제한효소 분석 ○바이러스 살포효과 증진 <ul style="list-style-type: none"> - 섭식유인 및 자외선 차단물질 선발 - 살충력 증가 바이러스 혼합물질 선발 ○핵다각체병바이러스 병원성 검정 <ul style="list-style-type: none"> - 농가실증 <ul style="list-style-type: none"> · 1, 2년차 선발된 바이러스 현장적용 · 살포증진물질 혼합 작물별로 농가에 적용
	핵다각체병바이러스 제형화	<ul style="list-style-type: none"> ○ 제형개발 <ul style="list-style-type: none"> - 핵다각체병바이러스 제형처방 후 생산 가능성 검토 - 가능제형 추가검토(내한,내열성 검정) - 효과안정성 확보를 위한 제형개발 ○ 생산 가능성 연구 <ul style="list-style-type: none"> - 실험실 규모의 제조방법 확립 - 제품 생산담당자와 공동으로 pilot test 실시 - 포장시험 및 제조허가용 시제품 제조 - 생산 공정의 문제점 분석 및 해결 - 제품등록을 위한 시험 추진 ○ 환경안전성 연구 <ul style="list-style-type: none"> - 독성시험 : 안전막 자극, 변이원성

3. 연구개발 추진 체계



제2장 국내외 기술 개발 현황

제1절 국내기술 현황

우리나라 곤충바이러스 연구는 1974년 뽕나무해충인 흰불나방에서 핵다각체 병바이러스를 분리하여 병원성이 매우 높은 것을 확인하면서 화학 살충제의 환경오염 및 저항성문제를 해결하기 위해 대체 방제기술인 친환경적 미생물적 방제 기술 개발을 위해 곤충바이러스의 탐색과 농작물 해충의 방제이용 연구가 시작되었다. 그러나 우리나라의 곤충바이러스연구는 교육 및 연구기관의 관심부족으로 전문 연구조직이 전무한 상태로 외국에서 친환경 미생물살충제 개발에 각축을 벌이고 있는 것과 대조적이다. 과거 곤충 바이러스 연구는 곤충바이러스의 분리 동정, 병원성 검정을 중심으로 포장방제 이용평가를 실시하였으나 외국의 곤충병리 연구현황과 비교할 때 국내 연구수준은 기주곤충과 바이러스의 대량증식 시설이나 바이러스 살충제 제제화 등에 관한 연구가 매우 미진하다. 그러나 최근에는 바이러스 살충효과를 높이기 위해 국내에서도 *Bacillus thuringiensis* 내독소와 초록색형광물질을 *Autographa californica* 유전자와 재조합하여 recombinant ColorBtrus.의 빠른 살충효과를 확인함으로써 새로운 곤충바이러스 살충제 개발연구에 가능성을 보였으며, 유기산 등을 혼합하여 살포함으로써 살충기간을 단축하고 살충효과도 높이는 연구도 수행되고 있다. 우리나라는 일본이나 중국의 곤충상과 유사하여 농업해충별 곤충 바이러스병의 종류도 중첩되는 경우가 대부분이다. 앞으로 국내에서도 곤충바이러스뿐만 아니라 세균이나 곤충 기생 곰팡이를 이용한 해충의 미생물 방제 연구를 위해 집중투자를 함으로서 국내 미생물 방제자원의 보호 및 부가가치를 높여야 할 것이다.

제2절 국외기술 현황

전 세계에서 생물농약은 185종으로 작물보호시장의 1%에 지나지 않으며 이중 곤충바이러스 살충제는 24종을 차지하고 있다. 외국에서의 바이러스살충제 개발은 1960년대를 시작으로 미국에서 1973년 목화 해충인 *Heliothis zea*와 *H. virescens* 방제약제로 Elcar라는 상표로 상품화한 것이 처음이며 지금까지 각 나라의 주요 방제해충을 대상으로 수 십 여종의 바이러스살충제가 개발되어 시판되고 있다. 농업해충에 대한 바이러스살충제 개발 연구를 위해 이미 일본에서는 16종, 중국에서는 22종에 대해 각각 포장시험을 마치고 일부 상품화 단계에 있어 각 국의 바이러스살충제 상품권 등록 경쟁은 치열할 것이다.

곤충바이러스를 이용한 최초의 포장시험은 1913년 알팔파에 담배나방류의 병사충을 물에 현탁하여 살포하였고, 그 후 1940년대 후반부터 미국, 캐나다, 프랑스 및 동구권 국가에서 본격적으로 연구 개발되어 있다. 그리고 최근에는 곤충조직의 기저막(basement membrane)이 외부에서 병원체 침입을 막는 기능을 파괴하기 위해 수종의 단백질분해효소를 처리하는 연구과정에서 AcMLF9.ScathL 프로모터를 사용시 *H. virescens* 가 30%가 빠른 살충효과를 보고하였으며 살충기간이 길고 효과가 낮은 점을 개선하기 위해 전갈이나 응애의 독이나 BT 독소를 곤충바이러스와 재조합함으로써 25%-40%가 살충기간이 단축되어 속효성으로 개선되었으며 살충범위도 확대되는 효과를 얻고 있다. 앞으로 유전공학 기술의 개발과 곤충바이러스 살충제 연구는 계속 개선될 전망이다. 또한 바이러스살충제의 단점은 태양광선이나 부적합한 환경에 대한 병원성의 감소로 인한 곤충바이러스 다각체를 보호하기 위해 peroxidases, uric acids, p-aminobenzoic acid 등 UV 보호제를 이용한 연구 보고가 있으며 최근 곤충바이러스의 환경 적응력을 개선하기 위해 Tinopal UNPA-GX라는 형광표백제를 처리함으로써 살충기간을 단축시킬 뿐 아니라 살충효과도 90배 높일 수 있다는 보고가 있다.

곤충바이러스 살포효과 증식으로 살포기구, 작물생육, 바이러스 제제형태 및 기후 등 여러 요인이 관여하고 있다. 즉 성충에 의한 병 바이러스의 자동분산방

법으로 바이러스 액제나 분제를 유아등이나 떡이에 오염시키거나 페로몬과 조합하여 암컷성충에 감염시키는 방법 등을 포장에서 실용화할 단계에 있다.

제3절 앞으로 전망

우리나라에서는 곤충바이러스를 이용한 농업해충 방제이용기술이 초기 단계에 있으나 농업환경의 개선 및 관리 측면과 소비자의 요구에 따라 해충방제는 화학살충제 의존에서 탈피할 수밖에 없는 것이 현실이다.

곤충 병원성바이러스의 해충방제 이용확대를 위해 개선 및 보완하여야 할 점은 ① 병원성의 증대와 빠른 살충효과, ② 환경에 대한 바이러스의 적응력개선, ③ 바이러스 증식효율 증대, ④ 바이러스살충제의 쉬운 제제화 및 환경지속성 증대, ⑤ 해충종합관리(IPM)와의 상호관계유지 ⑥ 환경보호 측면의 이점, ⑦ 사용자의 이해와 수용 등 해결해야 할 점이 많다.

따라서 주요 농업해충의 ① 곤충바이러스 탐색과 방제이용 지속연구 ② 곤충 바이러스 살충제의 등록 및 상업화 ③ 다국적 벤처연구를 모색하여 국내의 전문인력을 활용함과 동시에 바이러스살충제 상품화시 제품의 공동판매 수요를 보장할 수 있는 방법 등을 활용한다면 곤충바이러스를 이용한 농업해충방제 실용화가 밝다고 본다.

제3장 연구개발 수행 내용 및 결과

제1절 과밤나방의 대량 사육조건 구명

1. 서 언

과밤나방(*Spodoptera exigua*)은 기주범위가 넓어 채소, 화훼, 과수 등의 40과 200여종에 달하는 것으로 알려져 있고 국내에서도 최근 과, 배추, 수박 등에 발생하여 피해가 심한 것으로 보고되었으며, 1986년에 전남 진도에서 피해가 확인된 이후 1988년부터는 전국적으로 피해가 확산되어 발작물, 채소 등 50여종의 작물을 가해하여 극심한 피해를 주고 있다. 특히 3령 유충 이후에는 살충제에 대한 저항성이 강하여 방제가 어려운 해충으로 구분하고 있다. 이와 같이 유기합성 살충제에 저항성을 나타내며 *Bacillus thuringiensis*에도 감수성이 약한 과밤나방에는 바이러스를 이용한 방제법이 가장 효과적인 것으로 알려져 있다 곤충바이러스를 이용한 해충방제는 Ignoffo (1973)가 *Heliothis zea* 방제를 위해 처음 바이러스 살충제인 Elcar를 상품화 이래 새로운 방제법으로 대두되고 있다. 과밤나방 핵다각체병바이러스의 대량증식 방법은 숙주곤충의 대량사육을 통한 생체증식 방법이 주로 이용되고 있으며 곤충세포 배양계를 이용한 생산체계도 시도되고 있으나 경제적인 문제로 실용화되지 못하고 있으며, 생체증식에 의한 바이러스의 증식 목적은 숙주곤충의 조직을 최대한 이용하는 동시에 병원성이 높은 바이러스를 생산함에 있다. 따라서 본시험은 과밤나방 핵다각체병바이러스를 이용한 미생물 살충제 개발에 있어서 가장 중요한 바이러스 대량생산의 기초연구로서 과밤나방 인공사료를 개선하여 대량 사육하기 위하여 실시하였다.

2. 재료 및 방법

가. 인공사료 개선

과밤나방(*Spodoptera exigua*)은 포장에서 유충을 채집하여 Im *et al.*(1988)이

사용한 인공사료 조성 중에서 강낭콩 분말과 국내에서 많이 재배되고 손쉽게 구입 할 수 있는 노랑콩, 푸른콩, 검정콩분말로 변경하여 사용하였다. 또한 기존 사료에 들어 있지 않은 비타민을 증류수 1ℓ 당 10g을 첨가하여 기존 사료들과 비교하였다. 파밤나방 2령 유충을 사용하였으며 처리 당 50마리로 5반복 실시하였다.

나. 사육조건 개선

1) 온도 조건

인공사료는 30 ml 용량의 뚜껑이 있는 투명 플라스틱컵에 분주(5 ± 0.2 g)하여 4℃ 냉장고에서 식혀 사용하였으며 식물생장상(FLI-301N, EYELA Co.)에 온도 조건을 20, 24, 28, 32℃에서 개체 사육하면서 유충 체중 변화를 조사하였다. 처리 당 50마리씩 5반복 3회 실시하였다

2) 습도 조건

크기 3×3m으로 나누어진 사육실에서 각방의 온도를 22℃와 28℃로 나누어서 습도를 40~70% 범위에서 10%로 간격으로 조절하였으며 습도조절은 온습도계를 설치한 후 습도를 매일 조사하고 조절이 안되면 가습기를 이용하여 습도를 맞추어 주었다. 인공사료는 Im *et al.*(1988)이 사용한 인공사료 조성 중에서 강낭콩 분말 대신 국내에서 많이 재배되고 손쉽게 구입 할 수 있는 콩 분말로 변경하여 사용하였다. 파밤나방 3령 유충을 사용하였으며 매일 생체중과 사충율을 조사하였으며 30마리씩 5반복 실시하였다.

3) 사육용기

파밤나방 대량 사육을 위하여 용기를 대형(31×25×19 cm), 중형(27×20×14 cm), 소형(7×12.5×6 cm) 각각의 용기에 파밤나방 2령 유충을 100, 200, 300, 400마리로 나누어서 인공사료를 넣고 사육하였다. 일자 경과에 따른 사충율, 용화율, 우화율 등을 조사하였으며 사육온도는 28℃, 습도는 60%, light 16시간, dark 8시간으로 하였다

3. 결과 및 고찰

인공사료의 주성분교체에 따른 과밤나방의 생육은 노랑콩, 강낭콩, 푸른콩의 순으로 생육이 좋았으며, 검정콩에 있어서는 약간 떨어졌다(Fig. 1).

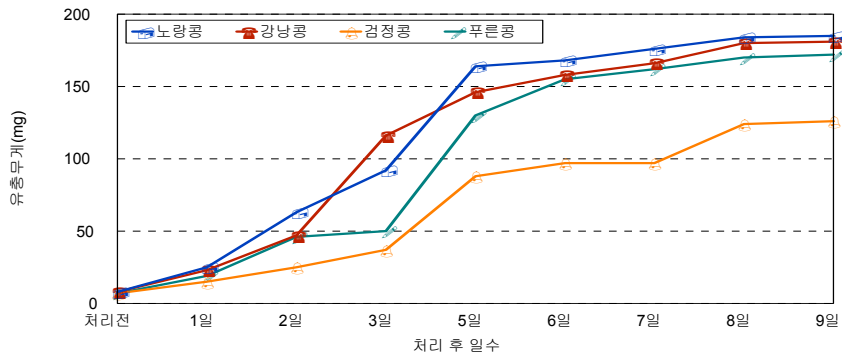


Fig. 1 Growth of *S. exigua* by change of major artificial diet component

현재 일반적으로 사용하고 있는 강낭콩 대신 우리나라에서 가장 쉽게 구할 수 있는 노랑콩으로 대체하여도 무난할 것으로 생각된다. 시중에서 유통되고 있는 가격에서도 강낭콩이 노랑콩에 비하여 2배 이상 비싸게 거래되고 있는 실정이다. 과밤나방 인공사료를 먹이로 사용할 때 오래된 콩보다는 신선한 콩을 사용하여 만든 인공사료를 선호하는 경향이 있다. 그러므로 손쉽게 구할 수 있는 노랑콩으로 주성분을 교체하면 과밤나방을 사육하는데 더욱 손쉬워 질 것이다.

현재 사용 중인 인공사료에 미량성분인 비타민을 첨가한 인공사료에서는 온도 28°C 조건에서 유충 무게가 접종 3일 후부터 급격히 증가하여 사육 9일째에는 노랑콩과 강낭콩에 관계없이 180mg인데 비하여 비타민을 첨가하지 않은 인공사료는 120mg 전 후였다. 온도조건 22°C에서도 약간의 차이는 있지만 비슷한 경향이 있었다(Fig. 2).

- Temperature : 28℃

- Temperature : 22℃

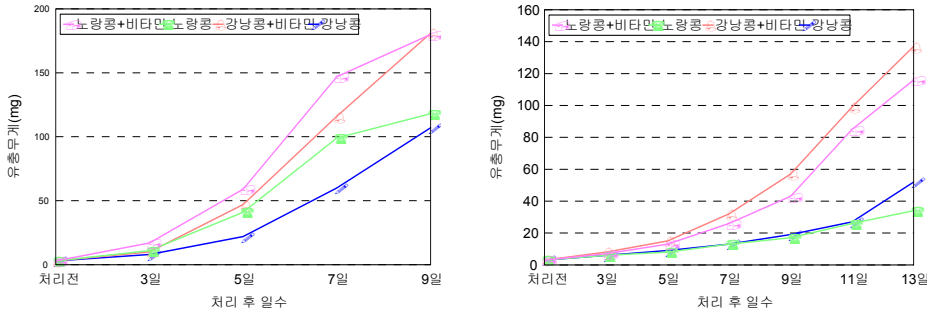


Fig. 2. Growth of *S. exigua* by change of minor artificial diet component

Table 1. Weight changes by temperature on 2nd larval instar of *S. exigua*

Temp.(℃)	Weight change (mg)					
	pre-treat.	1DAT	2DAT	4DAT	6DAT	8DAT
20	1	2	2	3	5	8
24	2	3	5	9	17	55
28	5	9	7	62	124	154
32	2	6	16	63	155	163

온도조건에 따른 2령 유충의 생육은 20℃의 경우에는 8일이 경과하여도 8mg 밖에 성장하지 못하였으나 24℃에서는 55mg, 28℃는 154mg, 32℃에서는 163mg까지 성장하여 온도가 높아질수록 생장이 좋고 빠름을 알 수 있었다(Table 1).

3령 유충에서도 2령과 마찬가지로 온도가 높아질수록 생육이 빠르고 좋았으나 20℃와 24℃에서는 다른 온도에 비하여 좋지 않은 생육을 보였으며 28℃와 32℃에서는 8일에 용화가 되었다(Table 2).

Table 2. Weight changes by temperature on 3rd larval instar of *S. exigua*

Temp.(°C)	Weight change (mg)					
	pre-treat.	1DAT	2DAT	4DAT	6DAT	8DAT
20	15	16	22	31	42	43
24	12	18	28	40	85	97
28	19	22	52	107	153	용화
32	15	20	67	139	164	용화

4령도 역시 2, 3령과 마찬가지로 20°C에서도 생육이 부진하지만 다른 영 기보다 좋은 생장을 보였다. 낮은 온도인 24°C는 8일째에 용화가 되었으나 28°C와 32°C에서는 6일째에 용화가 이루어졌다(Table 3).

Table 3. Weight changes by temperature on 4th larval instar of *S. exigua*

Temp.(°C)	Weight change (mg)					
	pre-treat.	1DAT	2DAT	4DAT	6DAT	8DAT
20	67	87	135	140	146	141
24	68	94	136	141	147	용화
28	68	101	121	176	용화	
32	67	139	194	201	용화	

Table 4. Growth of *S. exigua* larva by different temperature

Temp. (°C)	egg	Larval instar					Pupa	total
		1	2	3	4	5		
20	5.6	3.6	2.9	2.8	3.3	6.1	10.4	34.7
24	3.0	3.1	1.9	1.8	2.2	4.1	8.7	24.8
28	2.2	2.8	1.7	1.4	1.7	3.3	5.3	18.4
32	1.9	2.1	1.3	1.3	1.4	2.6	5.2	15.8

과밤나방에 있어서 발육비율과 각 단계의 상대적인 기간은 온도에 매우 의존성이 강하다(Table 4). 20℃에 있어서는 총 발육기간이 34.7일, 24℃에서는 24.8일, 28℃는 18.4일, 32℃에서는 15.8일로 완성된다. 이상과 같이 온도가 올라갈수록 20℃와 32℃ 사이에 두배 이상이 소요되는 것으로 나타났다.

Table 5. Growth of *S. exigua* of 3rd larva by different humidity at 28℃

Humidity (%)	Change of larva weight(mg)						Mortality (%)
	pre-treat.	1DAT	2DAT	4DAT	6DAT	8DAT	
40	19	20	27	42	73	81	29
50	19	21	30	49	80	90	15
60	22	29	42	71	99	112	14
70	23	31	37	53	84	101	16

온도 28℃에서 습도조건을 다르게 했을 때 과밤나방 3령 유충의 생육을 8일째 조사한 결과 40%에서는 81mg, 50%는 90mg, 60%는 112mg, 70%에서는 101mg로 습도조건 60%에서 과밤나방의 생육이 가장 좋았다. 사충율에 있어서도 40%에서는 29%인데 반하여 습도 60%에서는 사충율 14%로 가장 낮았다(Table 5). 22℃ 조건에서는 28℃보다는 생육이 부진하고 습도 40%, 50%에서는 8일째에 유충체중이 80mg인데 반하여 60%의 습도조건에서 102 mg으로 생육이 가장 좋았으며 사충율에 있어서도 12%로 가장 낮았다(Table 6)

Table 6 . Growth of *S. exigua* of 3rd larva by different humidity at 22℃

Humidity (%)	Change of larva weight(mg)						Mortality (%)
	pre-treat.	1DAT	2DAT	4DAT	6DAT	8DAT	
40	17	20	21	29	45	80	22
50	18	20	24	35	50	80	16
60	18	25	27	40	64	102	12
70	19	23	25	37	60	92	18

과밤나방을 대량사육하기 위하여 용기별로 적정 마리수를 결정하기 위하여 실험한 결과 대형 사육용기(31×25×19 cm)에서는 용화율은 100마리에서는 87.8%, 200마리 85.3%, 300마리 80.4%, 400마리에서는 77.1%로 마리수가 많아질수록 용화율이 떨어졌으며 부화율에 있어서도 300마리 이하에서는 95% 이상이였으나 400마리에서는 85%로 떨어졌다. 또한 사충율에 있어서도 400마리 이상을 사육했을 때는 25% 이상의 높은 사충율을 보였다(Table 7). 그리고 밀도도 너무 높은 구에서는 서로 잡아먹는 현상이 일어나 이 사육용기에서는 300마리 정도를 사육하는 것이 좋을 것으로 생각 된다.

Table 7. Mass production of *S. exigua* by big rearing cage(31×25×19 cm)

Density	Mortality(%)					Pupation (%)	Hatch. (%)
	1DAT	2DAT	4DAT	6DAT	8DAT		
400	1.7	7.8	14.3	17.2	25.9	77.1	85.6
300	0.9	1.0	4.3	5.2	4.3	80.4	97.1
200	0.2	0.9	1.2	1.7	2.3	85.3	96.3
100	0.0	0.3	0.5	1.6	1.9	87.7	97.5

Table 8. Mass production of *S. exigua* by middle rearing cage(27×20×14 cm)

Density	Mortality(%)					Pupation (%)	Hatch. (%)
	1DAT	2DAT	4DAT	6DAT	8DAT		
400	2.2	10.9	19.7	27.3	40.6	73.3	80.2
300	1.5	2.6	12.3	15.5	23.2	77.2	86.7
200	0.1	0.4	2.9	3.3	4.7	80.9	95.4
100	0.1	0.1	0.7	2.8	4.1	80.3	97.1

중형사육용기(27×20×14 cm)에서는 300마리 이상을 사육했을 때는 20% 이상의 높은 사충율을 보였으며 200마리 이하에서는 용화율은 80%이상, 우화율은 95% 이상으로 300마리 77%, 86%보다 높아(Table 8) 이 사육용기에서는 300마리보다

적게 사육하는 것이 좋을 것으로 생각된다.

소형사육용기(7×12.5×6 cm)에서도 200마리 이상을 사육했을 때는 30% 이상의 높은 사충율을 보였다. 우화율은 처리간에 비슷하지만 용화율에서도 300마리에서는 64.4%인데 반하여 200마리에서는 72.3%로 높아져(Table 9) 이 사육용기에서는 200마리 이하를 사육하는 것이 좋을 것으로 생각된다.

Table 9. Mass production of *S. exigua* by small rearing cage(7×12.5×6 cm)

Density	Mortality(%)					Pupation (%)	Hatch. (%)
	1DAT	2DAT	4DAT	6DAT	8DAT		
400	13.3	17.9	32.7	40.5	49.7	53.2	92.7
300	7.7	12.0	19.7	22.4	30.0	64.4	94.5
200	0.7	0.9	3.3	5.7	12.6	72.3	94.2
100	0	0.1	0.4	2.2	3.9	78.8	96.3

제2절 인공사료 조성별 파밤나방 유충 생육

1. 서 언

최근 새로운 해충 방제 기술로 널리 연구되고 있는 생물적 방제는 병해충 방제방법 중 가장 성공적인 비화학적 접근방법의 하나로 병해충을 경제적 피해수준이하로 유지하기 위해 곤충바이러스, 병원균, 기생성 및 포식성 천적 등을 이용하는 방법이다. 또한 최근에는 식물에서 추출한 물질을 이용한 식물성 농약의 상용화가 이루어지고 있는 추세이다. 이 중에서 미생물 바이러스는 기주곤충에 대한 특이성이 높고 목적해충만을 방제할 수 있다는 장점을 가지고 있어 원예해충을 중심으로 한 농작물이나 산림해충 방제에 효과적이며 현재 세계적으로 환경과 인류건강 문제에 대한 관심이 높아져 일부 선진국에서는 미생물살충제가 상품화되어 시판되기 시작했다.

그러나 NPV의 증식은 기주곤충과 배양 세포계에서 가능하지만 세포배양액이 비싸서 살충제용 바이러스 생산에는 기주곤충의 대량사육법이 이용되고 있어 값이 싸고 실용적인 인공사료 개발 등이 선행되어야 한다. 따라서 본 연구는 파밤나방을 대량생산하여 천적인 핵다각체병 바이러스를 안정적으로 생산하기 위하여 인공사료의 조성물을 손쉽게 구할 수 있으며 값이 싼 재료로 변형하고 실시하였다.

2. 재료 및 방법

파밤나방은 포장에서 유충을 채집하여 기존의 강낭콩 분말을 국내에서 많이 재배되고 손쉽게 구입 할 수 있는 노랑콩 분말로 변형(인공사료 2)하고, 인공사료 1은 콩 분말을 제외하고 다른 성분을 조합하여 사용하였다. 사료별로 유충을 각각 100마리씩 처리하였으며 5반복으로 조사하였다. 번데기가 된 개체를 수거하여 유산지로 만든 삼각통(가로 50, 세로 30, 높이 30 cm)에 넣고 우화시켰으며

유산지 통 안에 10% 설탕물을 공급하여 산란을 유도하였다.

우화한 성충이 산란한 부분의 유산지를 난과 함께 떼어내어 인공사료(5±0.2 g) 위에 난괴를 접종하여 플라스틱 사레(20×12×12 cm)내에서 2령까지 사육하였다. 3령부터는 cannibalism을 막기 위하여 개체 사육용기(4×4×3 cm)에 1마리씩 넣고 4~5일 간격으로 인공사료가 마르면 교체하면서 번데기를 유도하였다. 충의 퇴화를 막기 위해 10세대 이상 누대 사육한 개체는 가능한 wild type과 교미시켜 충의 활력을 유지하였으며, 사육실내 사육조건은 온도 25±2℃, RH 60%, 광주기 16L : 8D이었다.



Artificial diet 1

Artificial diet 3

Artificial diet 2

3. 결과 및 고찰

파밤나방의 산란율을 높이면서 값싸고 구입이 용이한 인공사료를 만들기 위해서 기존 개발된 사료의 주재료를 달리하여 산란수 등을 조사한 결과 총 산란수는 조성을 바꾼 인공사료 1에서 393개로 인공사료 3(기존사료)의 351개에 비해 많았으며 주성분만을 교체한 인공사료 2는 기존사료와 비슷하였다. 난괴수는 기존사료보다는 인공사료 1과 인공사료 2에서 약간 많아지는 경향이었으나 산란수는 20개 정도로 비슷하였다(Table 1).

Table 1. Number of the eggs and egg mass oviposited by female adult of *S. exigua* with food sources

Food sources	Total no. of eggs/female	No. of egg masses laid/female	No. of eggs/egg mass/female
Artificial diet 1	393.6±32.3a ¹⁾	9.6±0.97a ¹⁾	24.4±3.43a ¹⁾
Artificial diet 2	351.9±36.3b	9.5±0.97ab	22.2±3.49a
Artificial diet 3 (current)	351.4±34.3b	9.4±1.65b	20.5±3.99a

¹⁾ Means with each column followed by the same letter are not significantly different(p=0.05, Duncan's multiple range test [SAS Institute, 1988]).

부화율은 모든 사료가 90% 수준으로 비슷하였다(Table 2). 기주식물에서는 온도에 관계없이 부화율이 거의 100% 인데 이는 기주식물의 잎이 수분을 함유하고 있어 건조하지 않기 때문에 난이 잘 부화하기에 좋은 조건 때문인 것으로 생각되어지는데 반해, 인공사료는 쉽게 건조해지므로 기주식물보다 낮은 부화율을 나타낸 것으로 판단되었다.

Table 2. Hatchability of *S. exigua* reared by food sources

Food sources	No of egg masses tested	Hatchability(%)
Artificial diet 1	50	91.0±2.05a ¹⁾
Artificial diet 2	50	91.4±1.84a
Artificial diet 3 (current)	50	89.6±2.48a

¹⁾ Means within a column followed by the same letter are not significantly different(p=0.05, Duncan's multiple range test [SAS Institute, 1988]).

먹이 종류에 따른 발육기간은 사육실에서 온도는 25℃, 습도는 60%, 광은 16시간, 암은 8시간으로 하여 조사한 결과 알(3일), 유충(13일),蛹(7일)의 1세대 기간(23일)로 먹이 source에 따라 거의 차이가 없었다(Table 3). 유충에서蛹이 되는 비율은 인공사료 1에서 84.3%로 가장 높았으며 인공사료 2에서도 기존사료보다

높은 81.9%의 용화율을 나타내었다. Bae 등(1999)은 담배거세미나방의 용화율은 유충기의 식이기주에 따라 차이를 보인다고 한 결과와 일치하여 기주나 사료의 선발이 필요함을 알 수 있었다.

Table 3. Developmental periods of *S. exigua* with different food sources

Food sources	Developmental periods (Day)			
	Egg	Larval	Pupal	Total
Artificial diet 1	2.9±0.8a ¹⁾	13.0±2.2a ¹⁾	7.8±1.8a ¹⁾	23.7±3.3
Artificial diet 2	2.9±0.8a	13.6±2.4a	7.6±2.6a	24.1±3.2
Artificial diet (current)	3.0±0.8a	13.4±2.0a	7.4±1.8a	23.8±3.0

¹⁾ Means with each column followed by the same letter are not significantly different(p=0.05, Duncan's multiple range test [SAS Institute, 1988]).

번데기 무게는 약 0.8mg와 성충 출현율 96%로 기존 사료와 변형 사료에서 모두 비슷한 경향을 보였다 (Table 4). 부화유충을 각 먹이에 접종하여 일자별로 사망율을 조사한 결과 2일째에 각 먹이 모두 높은 사망율을 보였으며 총 사충율에 있어서 인공사료 1에서 15.2%로 다른 사료에 비해 약간 낮았다. 전체적인 생육사항을 보면 인공사료 1에서 기존사료와 주성분만 교체한 사료에 비해 과밤나방의 생육이 전반적으로 양호했다(Table 5). 그러나 기존의 사료인 강낭콩 분말과 시중에서 값싸고 손쉽게 구할 수 있는 콩 분말에서는 과밤나방의 생태는 거의 같은 수준이었다.

Table 4. Pupation and Adult emergence of *S. exigua* with different food sources

Food sources	Pupation(%)	Pupal weight(mg)	Adult emergence(%)
Artificial diet 1	84.3±3.4ab ¹⁾	0.86±0.06a ¹⁾	96.7±2.5a ¹⁾
Artificial diet 2	81.9±4.2b	0.82±0.05a	96.5±1.8a
Artificial diet 3 (current)	79.4±5.3c	0.84±0.03a	96.8±1.5a

¹⁾ Means with each column followed by the same letter are not significantly different (p=0.05, Duncan's multiple range test [SAS Institute, 1988]).

Table 5. The larval mortality of *S. exigua* after fed by different food sources

Food sources	No. larva tested	% Mortality of larva					Total mortality(%)
		2d ¹⁾	4d	6d	8d	11d	
Artificial diet 1	100	5.0	2.1	2.0	3.1	3.0	15.2a ²⁾
Artificial diet 2	100	6.2	4.0	2.1	3.0	3.2	18.5b
Artificial diet 3 (current)	100	4.2	4.2	2.5	3.6	3.6	18.1b

¹⁾ day

²⁾ Means with each column followed by the same letter are not significantly different(p=0.05, Duncan's multiple range test [SAS Institute, 1988]).

강낭콩의 재배면적은 매년 감소추세에 있으며 '99에는 2.9천ha에서 3천톤 정도를 생산, '91년보다 32%정도 감소하였고, 재배지도 일부에 한정되고 있다. 또한 국내에서 생산되는 강낭콩은 풋콩으로 많이 이용되고 있으며, 과자 속용으로는 20천톤 정도를 수입하여 충당하고 있는 실정이다. 시중에서 유통되고 있는 가격에서도 강낭콩이 노랑콩에 비하여 2배 이상 비싸게 거래되고 있는 실정이다. 파밤나방 인공사료를 먹이로 사용할 때 오래된 콩보다는 신선한 콩을 사용하여 만든 인공사료를 선호하는 경향이 있다. 그러므로 손쉽게 구할 수 있는 노랑콩으로 주성분을 교체하면 파밤나방을 사육하는데 더욱 손쉬워 질 것이다.

제3절 파밤나방 핵다각체병바이러스 최적 생산조건 구명

1. 서 언

최근까지 다른 해충과 마찬가지로 파밤나방도 화학적 방제가 주를 이루고 있었으나 약제에 대한 저항성으로 방제가 어려워 재배작물이 큰 피해를 입을 뿐 아니라 저항성해충의 출현, 인축이나 동식물에 대한 직·간접적인 피해와 잔류성으로 인한 환경오염 및 생태계 파괴 등의 심각한 문제를 야기 시키고 있다. 이를 해결하기 위한 방안중 하나로 생물적 방제법을 도입하여 화학적 방제의 보완 또는 대체수단으로서 종합적 해충방제 체계 확립에 연구의 초점을 집중시키고 있으며 그 중에서도 곤충 질병을 일으키는 세균, 바이러스, 사상균, 원생동물 등 해충의 방제에 큰 비중을 두고 있다. 이 중에서 미생물 바이러스는 기주곤충에 대한 특이성이 높아, 농작물이나 산림해충 방제에 효과적이어서 이미 일부 선진국에서는 살충제가 상품화되고 있다.

곤충바이러스는 숙주곤충에 대한 특이성이 높고 누에나 꿀벌과 같은 익충에는 피해를 주지 않으면서 목적해충을 방제할 수 있다는 장점을 지니고 있어 바이러스를 살충제화 하여 해충방제에 널리 이용하고 있다. 곤충바이러스를 생물적 방제 인자로 이용할 경우 유기합성 농약의 획일적인 대량사용으로 인한 문제의 심각성을 경감시키기 위하여 핵다각체병바이러스의 병원에 따른 파밤나방의 생육 및 바이러스 감염충의 생장을 보기 위하여 실시하였다.

2. 재료 및 방법

가. 바이러스 병원체 분리 및 증식

핵다각체병바이러스 형태를 관찰하기 위한 분리, 정제는 Im *et al*(1989)의 방법을 사용하였으며 핵다각체병바이러스 감염유충에 약 10배(v/w)의 0.01% SDS용액을 가하여 마쇄한 후 이중거즈로 여과하고 3~4회 원심분리(3,000 rpm, 10min.)하여 유백색의 다각체 침전물을 얻었다. 이 침전물을 10^9 PIBs/ml가 되도록

록 0.01% SDS에 부유시킨 다음 40ml 원심분리관에 40~60% 연속 당밀도구배를 만들어 위에 다각체 부유물 8ml를 서서히 분주 후 원심분리(22,000 rpm)하여 다각체 band를 얻었다. 이 band를 증류수로 희석하여 원심분리(15,000 rpm, 30 min.)하여 당을 제거한 후 -20℃에 보관하면서 사용하였다.

나. 과밤나방 증식

과밤나방(*Spodoptera exgua*)은 포장에서 유충을 채집하여 Im *et al.*(1988)이 사용한 인공사료 조성중에서 강낭콩 분말 대신 국내에서 많이 재배되고 손쉽게 구입 할 수 있는 콩 분말로 변경하여 사용하였다. 채란을 위하여 암수 20~30개의 번데기를 유산지로 만든 삼각통(가로 50, 세로 30, 높이 30 cm)에 넣고 성충으로 우화시켰으며, 유산지 통안에 10% 설탕물을 공급하여 산란을 유도하였다. 교미한 암컷 성충이 산란한 부분의 유산지를 난과 함께 떼어내어 인공사료(5±0.2 g) 위에 난피를 접종하여 플라스틱 용기(20×12×12 cm)내에서 2령까지 사육하였다. 3령부터는 cannibalism을 막기 위하여 개체 사육용기(4×4×3 cm)에 1마리씩 넣고 4~5일 간격으로 인공사료가 마르면 교체하면서 번데기가 될 때까지 사육하였다. 한편 사육곤충의 활력을 유지하고 퇴화를 막기 위해 10세대 이상 누대 사육한 개체는 wild type과 교미시켰으며, 사육조건은 온도 25±2℃, RH 65%, 광주기 16L : 8D이었다.

다. 핵다각체병바이러스 농도에 따른 과밤나방 생육 검정

인공사료는 30 ml 용량의 뚜껑이 있는 투명 플라스틱컵에 분주(5±0.2 g)하여 4℃ 냉장고에서 식혀 사용하였다. 바이러스 농도는 1령충은 $1.0 \times 10^{2-7}$ PIBs/ml, 3령과 5령은 $1.0 \times 10^{3-8}$ PIBs/ml 농도로 컵당 100 μ l씩을 전착제인 TritonX-100(0.1%)과 함께 표면에 도포하고 1시간 정도 음건한 다음 영기별로 접종하여 식물생장상(FLI-301N, EYELA Co.)에 온도조건을 20, 24, 28, 32℃에서 각각 개체 사육하면서 유충 체중 변화를 조사하였다. 처리당 10마리씩 5반복 3회 실시하였으며 검정의 결과는 Abbot식으로 살충율을 보정하여 Finney(1971)의 probit분석법에 의하여 LC₅₀과 LT₅₀을 산출하였다

라. 핵다각체병바이러스 감염층의 생장

인공사료의 표면에 10^2 , 10^4 , 10^6 PIBs/ml의 농도로 바이러스를 처리한 후 2령 유충을 접종하여 28°C에서 개체 사육하였다. 바이러스 처리된 인공사료는 이틀 간격으로 공급되었으며 매 처리 시 유충의 무게, 유충의 소화기분비물 무게, 기존 인공사료의 무게, 새로이 공급된 인공사료의 무게를 조사하여 상대생장율 (Relative growth rate: RGRi= mg weight gained per mg initial larval weight per day), 상대소비율(Relative consumption rate: RCRi= mg mg⁻¹ day⁻¹), 섭취된 먹이의 이용 효율(Efficiency of conversion of ingested food: ECI= Weight gained/Food ingested ×100)을 구하였다. 30마리씩 공시하여 5반복으로 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 핵다각체병바이러스 병원체 분리 및 접종

SeNPV를 분리하기 위하여 다각체를 연속 당밀도구배로 원심분리하여 55% Sucrose층에 선명한 1개의 다각체 band를 얻었다(Fig. 1). 이 band를 취하고 당을 제거한 후 정제된 다각체의 순도 및 형태를 관찰하였다. 투과전자현미경으로 관찰된 다각체의 외부형태는 4각형, 5각형 및 8각형 등 부정형의 모양이 혼재되어 있으며 주사전자현미경에서는 다수의 각을 갖는 입체형태를 보였다. 다각체는 0.9 μm~1.3 μm의 크기로 차이는 많이 났지만 평균 1.6μm였다. 식물체에 다각체를 뿌렸을 때 부착된 모양을 보기 위하여 국화 잎에 SeNPV를 10^8 PIBs/ml로 희석한 후 전착제인 Triton-100을 0.1% 혼합하여 살포한 뒤에 주사 전자현미경으로 부착 상태를 촬영하였다(Fig. 2). 다각체는 식물체 표면에 부착이 잘되는 편이었다.

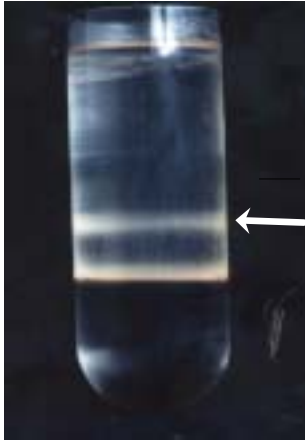


Fig.1. Polyhedra band

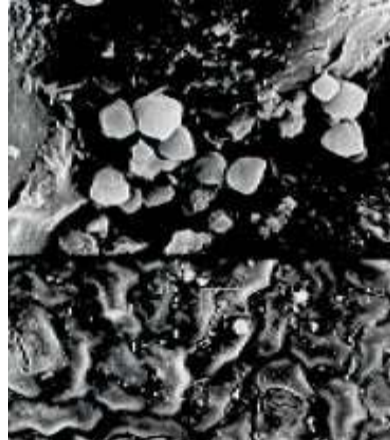


Fig. 2. Polyhedra on plant

나. 핵다각체병바이러스 최적 생산조건 구명

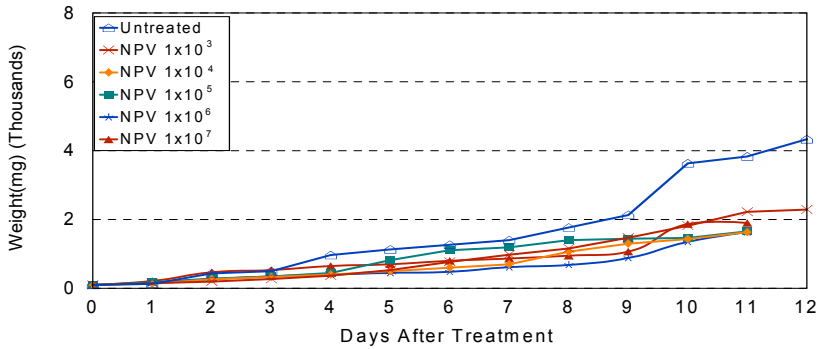


Fig. 3. Changes of body weight of *S. exigua* larva by different concentration of SeNPV at 20°C

핵다각체병바이러스 농도에 따른 파밤나방 생육 검정을 보기 위하여 온도조건을 달리하였을 때 유충 체중의 변화는 20°C에서는 농도에 관계없이 초기에는 무처리와 비슷하였으나 4일 이후에 조금씩 차이를 보였다. 그리고 농도가 높을수록 발육이 늦어졌으며 사충까지는 10일 이상이 소요되었다(Fig. 3).

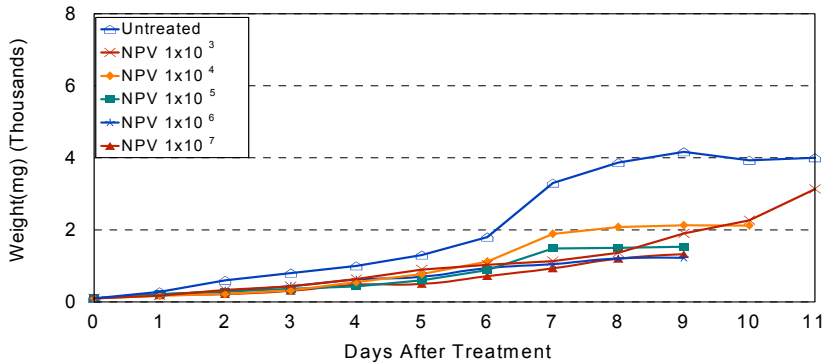


Fig 4. Changes of body weight of *S. exigua* larva by different concentration of SeNPV at 24°C

24°C에서는 접종 후 2일째부터 생육 차이를 보이기 시작하여 1×10^5 PIBs/ml에서는 9일 이후에는 생존한 개체가 없었으며 체중변화도 20°C보다 차이가 컸다 (Fig. 4). 28°C에서 무처리와 SeNPV 처리 간에 차이가 가장 많이 나타났으며 SeNPV 농도가 높을수록 발육이 느려졌고 9일째에는 더 이상 발육이 되지 않았다 (Fig. 5).

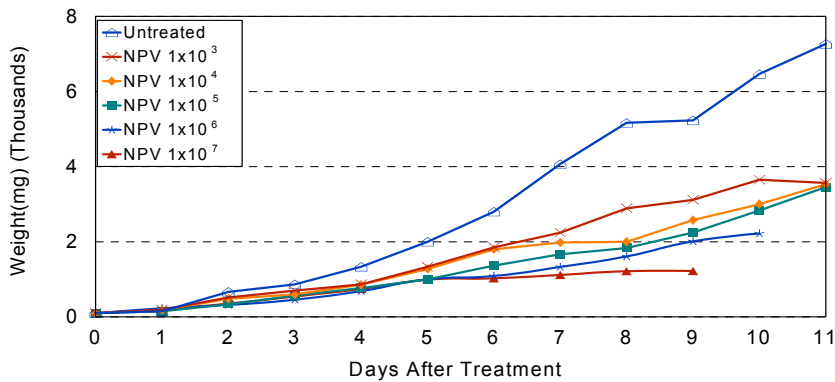


Fig 5. Changes of body weight of *S. exigua* larva by different concentration of SeNPV at 28°C

그러나 고온인 32℃에서는 28℃보다 무처리에서 생육이 부진하여(Fig. 6), 20℃ 이하의 저온과 32℃이상의 고온에서의 바이러스 활성이 높지 않은 것으로 판단되었다

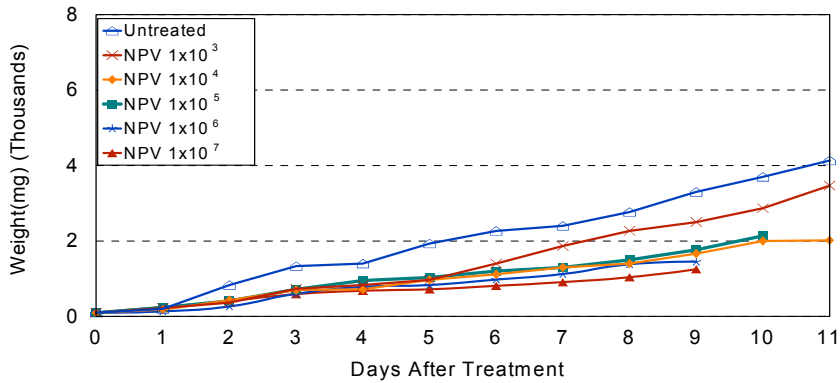


Fig. 6. Changes of body weight of *S. exigua* larva by different concentration of SeNPV at 32°C

다. 핵다각체병바이러스 감염충의 생장

Table 1. Relative growth rate of *S. exigua* by different concentration of SeNPV

Concentration (PIBs/ml)	RGRi(mg mg ⁻¹ day ⁻¹)			
	2DAT	4DAT	6DAT	8DAT
control	0.011	0.086	0.149	0.377
10 ²	0.018	0.075	0.109	0.311
10 ⁴	0.015	0.058	0.099	-
10 ⁶	0.011	0.037	0.061	-

파밤나방 핵다각체병바이러스를 처리한 후 감염된 파밤나방의 생육을 조사한 바 2일차에서는 10² PIBs/ml에서 0.018로 가장 높은 상대생장율을 보였으며 이는

4일차, 6일차까지 동일한 양상을 보였다. 상대성장율은 10^2 PIBs/ml까지는 상대 성장율이 증가하지만 그 이후의 고농도부터는 감소하는 것으로 나타났다(Table 1).

먹이의 소비율은 처리 후 2일차에서 10^2 PIBs/ml 이후의 농도에서 점차 감소하였는데 이는 4일, 6일차에도 비슷한 양상을 나타내었다. 또한 10^2 PIBs/ml, 10^4 PIBs/ml의 경우 시간이 경과할수록 먹이 소비율이 증가하였으나 10^6 PIBs/ml에서는 감소를 나타내었다(Table 2).

Table 2. Relative consumption rate of *S. exigua* by different concentration of SeNPV

concentration (PIBs/ml)	RCRi(mg mg ⁻¹ day ⁻¹)			
	2DAT	4DAT	6DAT	8DAT
control	0.284	0.303	0.818	0.816
10^2	0.262	0.272	0.508	0.570
10^4	0.193	0.246	0.454	-
10^6	0.178	0.160	0.123	-

바이러스를 처리 2일에는 10^2 PIBs/ml가 무처리보다 오히려 높은 먹이 이용효율을 나타내었으나 4일차에서는 무처리에 비해 낮은 효율을 보였다. 무처리의 경우 먹이 이용효율은 6일경과 이후부터 감소하였는데 바이러스를 처리시 농도가 높아질수록 그 감소일은 더욱 단축되어 10^2 PIBs/ml의 경우 4일, 10^4 , 10^6 PIBs/ml는 처리 2일차부터 감소하였다(Table 3).

Table 3. Efficiency of conversion of ingested food of *S. exigua* by different concentration of SeNPV

concentration (PIBs/ml)	ECI(%)			
	2DAT	4DAT	6DAT	8DAT
control	4.655	12.212	15.906	12.757
10 ²	5.618	7.207	4.542	3.028
10 ⁴	4.209	3.781	2.861	-
10 ⁶	3.495	1.466	1.183	-

제4절 온도 및 영기에 따른 파밤나방 핵다각체병바이러스의 수량

1. 서 언

파밤나방(*Spodotera exigua*)은 기주범위가 넓어 채소, 화훼, 과수 등의 40과 200여종에 달하는 것으로 알려져 있고 국내에서도 최근 사과, 배추, 수박 등에 발생하여 피해가 심한 것으로 보고되었으며, 1986년에 전남 진도에서 피해가 확인된 이후 1988년부터는 전국적으로 피해가 확산되어 발작물, 채소 등 50여종의 작물을 가해하여 극심한 피해를 주고 있다. 특히 3령 유충 이후에는 살충제에 대한 저항성이 강하여 방제가 어려운 해충으로 구분하고 있다. 이와 같이 유기합성 살충제에 저항성을 나타내며 *Bacillus thuringiensis*에도 감수성이 약한 파밤나방에는 바이러스를 이용한 방제법이 가장 효과적인 것으로 알려져 있다 곤충바이러스를 이용한 해충방제는 Ignoffo (1973)가 *Heliothis zea* 방제를 위해 처음 바이러스 살충제인 Elcar를 상품화 이래 새로운 방제법으로 대두되고 있다. 파밤나방 핵다각체병바이러스의 대량증식 방법은 숙주곤충의 대량사육을 통한 생체증식 방법이 주로 이용되고 있으며 곤충 세포배양계를 이용한 생산체계도 시도되고 있으나 경제적인 문제로 실용화되지 못하고 있으며, 생체증식에 의한 바이러스의 증식 목적은 숙주곤충의 조직을 최대한 이용하는 동시에 병원성이 높은 바이러스를 생산함에 있다. 따라서 본시험은 파밤나방 핵다각체병바이러스를 이용한 미생물 살충제 개발에 있어서 가장 중요한 바이러스 대량생산의 기초연구로서 파밤나방 영기 및 온도에 따른 파밤나방 핵다각체병바이러스의 생체증식 효율을 조사하였다.

2. 재료 및 방법

가. 파밤나방 증식

파밤나방(*Spodoptera exgua*)은 포장에서 유충을 채집하여 Im *et al.*(1988)이 사용한 인공사료 조성 중에서 강낭콩 분말 대신 국내에서 많이 재배되고 손쉽게 구입 할 수 있는 콩 분말로 변경하여 사용하였다. 채란을 위하여 암수 20~30개의 번데기를 유산지로 만든 삼각통(가로 50, 세로 30, 높이 30 cm)에 넣고 성충으로 우화시켰으며, 유산지 통 안에 10% 설탕물을 공급하여 산란을 유도하였다. 교미한 암컷 성충이 산란한 부분의 유산지를 난과 함께 떼어내어 인공사료(5±0.2 g) 위에 난피를 접종하여 플라스틱 용기(20×12×12 cm)내에서 2령까지 사육하였다. 3령부터는 cannibalism을 막기 위하여 개체 사육용기(4×4×3 cm)에 1마리씩 넣고 4~5일 간격으로 인공사료가 마르면 교체하면서 번데기가 될 때까지 사육하였다. 한편 사육곤충의 활력을 유지하고 퇴화를 막기 위해 10세대 이상 누대 사육한 개체는 wild type과 교미시켰으며, 사육조건은 온도 25±2℃, RH 65%, 광주기 16L : 8D이었다.

나. 핵다각체병바이러스 분리 및 증식

파밤나방 핵다각체병바이러스(SeNPV)는 포르말린을 넣지 않은 인공사료(5±0.2 g) 표면에 500 μ l의 바이러스를 처리한 후 1시간 정도 음건시켜 개체 사육용기(4×4×3 cm)에 넣고 4령 유충이 완전히 섭식하게 한 후 사육하면서 죽은 유충을 수확하였다. Im *et al.*(1989)의 방법에 따라 수확한 이병충에 10배(v/w)의 0.01% SDS 용액을 가하여 마쇄한 후 이중 거즈로 여과하고 1,000 rpm으로 5분 동안 원심분리하여 유충의 찌꺼기를 제거한 후 2~3회 3,000 rpm의 저속 원심분리와 40~65% 설탕 밀도구배 원심(25,000 rpm, 60 min.)으로 다각체를 순화시켜 바이러스 농도가 1.0×10⁹ PIBs/ml 되도록 조제하였다. 이 바이러스 용액을 -20℃ 냉동고에 보관하면서 사용하였다.

다. 핵다각체병바이러스 접종에 의한 바이러스 수량

개체접종은 인공사료의 표면에 바이러스 농도로 10²~10⁷ PIBs/ml를 각각 처리하였다. 처리된 인공사료에 2령, 3령, 4령 유충을 각각 개체 사육통에 넣고 incubator의 온도를 28℃, 20℃로 맞추어 사육하여 접종 후 7일째에 수확하였다.

대량사육은 인공사료에 바이러스 1.0×10^5 PIBs/ml을 도포하여 사육용기(31×25×19 cm)에 넣고 파밤나방 3령 유충을 접종하여 접종 후 7일째에 수확하여 바이러스 분리방법에 의하여 농도를 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

Table 1. Yields of SeNPV after inoculum of different SeNPV concentration on 4th *S. exigua* larva at 28°C

Inoculum conc. (PIBs/ml)	No. of polyhedra production per larva(±SD)	Mortality(%)
1.0×10^2	$8.4 \pm 1.8 \times 10^7$	58
1.0×10^3	$5.8 \pm 1.3 \times 10^8$	73
1.0×10^4	$8.3 \pm 2.1 \times 10^8$	84
1.0×10^5	$9.6 \pm 2.0 \times 10^8$	92
1.0×10^6	$6.9 \pm 1.3 \times 10^8$	95
1.0×10^7	$4.9 \pm 1.6 \times 10^8$	99

핵다각체병바이러스 개체접종에 따른 바이러스 수량을 보기 위하여 온도, 유충 영기별로 바이러스 농도별로 처리하여 조사한 결과 온도 28°C, 4령 유충에 접종하여 7일째 수확한 결과 유충당 다각체수는 1.0×10^2 PIBs/ml에서는 $8.4 \pm 1.8 \times 10^7$ PIBs/ml, 1.0×10^6 PIBs/ml에서는 $6.9 \pm 1.3 \times 10^8$ PIBs/ml로 접종농도가 많아 질수록 많은 다각체가 생산되었으나 1.0×10^7 PIBs/ml에서는 $4.9 \pm 1.6 \times 10^8$ PIBs/ml로 낮아졌다(Table 1). 그러나 유충 사충율에 있어서는 농도가 높아질수록 높았다.

3령 유충에 있어서는 1.0×10^2 PIBs/ml에서 $9.1 \pm 1.6 \times 10^7$ PIBs/ml 였으나 1.0×10^5 PIBs/ml에서 $9.8 \pm 1.9 \times 10^8$ PIBs/ml로 높아졌으나 그 이상의 접종농도에서는 수량이 떨어지는 경향이였다(Table 2). 역시 유충 사충율은 농도가 높을수록 높았다.

Table 2. Yields of SeNPV after inoculum of different SeNPV concentration on 3rd *S. exigua* larva at 28°C

Inoculum conc. (PIBs/ml)	No. of polyhedra production per larva(±SD)	Mortality(%)
1.0×10^2	$9.1 \pm 1.6 \times 10^7$	67
1.0×10^3	$5.4 \pm 1.5 \times 10^8$	80
1.0×10^4	$9.6 \pm 1.1 \times 10^8$	88
1.0×10^5	$9.8 \pm 1.9 \times 10^8$	94
1.0×10^6	$8.6 \pm 1.8 \times 10^8$	95
1.0×10^7	$5.4 \pm 1.2 \times 10^8$	99

Table 3. Yields of SeNPV after inoculum of different SeNPV concentration on 2nd *S. exigua* larva at 28°C

Inoculum conc. (PIBs/ml)	No. of polyhedra production per larva(±SD)	Mortality(%)
1.0×10^2	$3.5 \pm 1.5 \times 10^6$	72
1.0×10^3	$1.2 \pm 0.6 \times 10^7$	89
1.0×10^4	$8.6 \pm 1.8 \times 10^7$	91
1.0×10^5	$3.9 \pm 1.5 \times 10^8$	94
1.0×10^6	$3.3 \pm 1.3 \times 10^8$	99
1.0×10^7	$2.8 \pm 1.6 \times 10^8$	100

2령 유충에 있어서도 3령과 4령과 마찬가지로의 경향이었으나 1.0×10^5 PIBs/ml에서 $3.9 \pm 1.5 \times 10^8$ PIBs/ml로 가장 높아 4령보다 낮은 농도에서 가장 많은 다각체를 형성되었으며 유충 사충율은 역시 농도가 높을수록 높았다(Table 3).

저온인 20°C에서는 4령 유충은 접종농도가 1.0×10^2 PIBs/ml일 때는 유충당 다각체수는 $4.5 \pm 1.5 \times 10^5$ PIBs/ml였으나 1.0×10^7 PIBs/ml에서는 $5.5 \pm 1.8 \times 10^7$ PIBs/ml로 가장 많은 다각체가 생산되어 농도가 높아질수록 유충당 다각체수가

많아지는 경향이었으나 28℃ 보다는 다각체수와 유충 사충율이 떨어졌다(Table 4).

Table 4. Yields of SeNPV after inoculum of different SeNPV concentration on 4th *S. exigua* larva at 20℃

Inoculum conc. (PIBs/ml)	No. of polyhedra production per larva(±SD)	Mortality(%)
1.0×10 ²	4.5 ± 1.5 ×10 ⁵	38
1.0×10 ³	1.2 ± 1.8 ×10 ⁶	52
1.0×10 ⁴	5.4 ± 1.6 ×10 ⁶	59
1.0×10 ⁵	4.9 ± 1.6 ×10 ⁷	66
1.0×10 ⁶	5.4 ± 1.2 ×10 ⁷	72
1.0×10 ⁷	5.5 ± 1.8 ×10 ⁷	84

3령에 있어서도 2령과 마찬가지로 접종농도가 높아질수록 유충당 다각체수가 많아져 1.0×10⁷ PIBs/ml에서 5.1 ± 1.4 ×10⁷ PIBs/ml로 가장 많은 다각체가 생산되었으나 역시 28℃ 보다는 낮았다(Table 5).

Table 5. Yields of SeNPV after inoculum of different SeNPV concentration on 3rd *S. exigua* larva at 20℃

Inoculum conc. (PIBs/ml)	No. of polyhedra production per larva(±SD)	Mortality(%)
1.0×10 ²	3.2 ± 1.8 ×10 ⁵	49
1.0×10 ³	2.1 ± 1.6 ×10 ⁶	58
1.0×10 ⁴	8.8 ± 1.0 ×10 ⁶	70
1.0×10 ⁵	2.5 ± 1.6 ×10 ⁷	74
1.0×10 ⁶	4.6 ± 1.8 ×10 ⁷	79
1.0×10 ⁷	5.1 ± 1.4 ×10 ⁷	90

Table 6. Yields of SeNPV after inoculum of different SeNPV concentration on 2nd *S. exigua* larva at 20°C

Inoculum conc. (PIBs/ml)	No. of polyhedra production per larva(±SD)	Mortality(%)
1.0×10^2	$8.0 \pm 1.4 \times 10^4$	56
1.0×10^3	$4.3 \pm 1.2 \times 10^5$	68
1.0×10^4	$6.6 \pm 1.6 \times 10^6$	76
1.0×10^5	$8.9 \pm 1.4 \times 10^6$	84
1.0×10^6	$8.8 \pm 1.5 \times 10^6$	89
1.0×10^7	$1.1 \pm 1.8 \times 10^7$	95

2령도 3, 4령과 마찬가지로 1.0×10^7 PIBs/ml에서 $1.1 \pm 1.8 \times 10^7$ PIBs/ml로 가장 많은 다각체가 생산되었으나 전체적으로 유충당 다각체수가 28°C보다 낮았으며 유충 사충율도 떨어지는 경향이였다(Table 6). 이상의 결과로 개체 사육에 의해 바이러스를 생산하기 위해서는 28°C에 3령 유충을 가지고 1.0×10^5 PIBs/ml 농도로 접종 하였을 때 가장 많은 생산을 할 수 있을 것으로 생각된다.

Table 7. Yields of SeNPV polyhedra from 3rd instar *S. exigua* larvae by different density at the same rearing cage

No. of larva/cage	No. of polyhedra/larva (PIBs/ml)	No. of polyhedra/cage (PIBs/ml)
100	5.2×10^8	8.2×10^{10}
200	6.8×10^8	9.8×10^{10}
300	7.6×10^8	2.4×10^{11}
400	6.3×10^8	4.8×10^{11}
500	3.4×10^8	5.6×10^{11}

파밤나방 대량사육에 의한 바이러스 생산하기 위해서 인공사료에 바이러스 1.0×10^5 PIBs/ml을 도포하여 사육용기(31×25×19 cm)에 넣고 파밤나방 3령 유충을 접종하여 7일 후에 수확하였다. 사육 용기 당 100마리 일 때는 유충 당 다각체수가 5.2×10^8 PIBs/ml이고 300마리에서는 7.6×10^8 PIBs/ml로 가장 높았으며 그 이상의 밀도가 될 때는 유충 당 다각체수가 떨어지는 경향이였다. 용기 당 다각체수는 유충수가 많을수록 높았지만 사육 마리 수에 있어 300마리일 때 7.6×10^8 PIBs/ml로 가장 높아 바이러스 대량 생산에 적정할 것으로 생각된다(Table 7)

제5절 온도, 저장조건 및 태양광선이 과밤나방핵다각 체병바이러스 활성화에 미치는 영향

1. 서 언

곤충바이러스는 숙주곤충에 대한 특이성이 높고 누에나 꿀벌과 같은 익충에는 피해를 주지 않으면서 목적해충을 방제할 수 있다는 장점을 지니고 있어 바이러스를 살충제화 하여 해충방제에 널리 이용하고 있다. 곤충바이러스를 생물적 방제 인자로 이용할 경우 바이러스의 병원력, 기주식물에 대한 영향, 태양광선에 의한 불활성화, 바이러스 보관 시 온도의 영향 등 환경에 대한 안정성 연구가 수행되어야 살충효과를 증진시킬 수 있다. 특히 태양광선에서 나오는 자외선은 핵다각체병바이러스를 둘러싸고 있는 결정성 단백질을 불활화 시키기 때문에 이를 방지하기 위한 연구가 중요하다. 따라서 과밤나방 핵다각체병바이러스의 기주식물, 온도에 의한 영향, 보관조건 및 태양광선에 대한 불활화에 대한 안정성을 밝힘으로서 본 바이러스에 대한 방제효과를 높이고자 실시하였다.

2. 재료 및 방법

가. 과밤나방 증식

과밤나방(*Spodoptera exgua*)은 포장에서 유충을 채집하여 Im *et al.*(1988)이 사용한 인공사료 조성 중에서 강낭콩 분말 대신 국내에서 많이 재배되고 손쉽게 구입 할 수 있는 콩 분말로 변경하여 사용하였다. 채란을 위하여 암수 20~30개의 번데기를 유산지로 만든 삼각통(가로 50, 세로 30, 높이 30 cm)에 넣고 성충으로 우화시켰으며, 유산지통 안에 10% 설탕물을 공급하여 산란을 유도하였다. 교미한 암컷 성충이 산란한 부분의 유산지를 난과 함께 떼어내어 인공사료(5±0.2 g) 위에 난피를 접종하여 플라스틱 용기(20×12×12 cm)내에서 2령까지 사육하였다. 3령부터는 cannibalism을 막기 위하여 개체 사육용기(4×4×3 cm)에 1마리씩

넣고 4~5일 간격으로 인공사료가 마르면 교체하면서 번데기가 될 때까지 사육하였다. 한편 사육곤충의 활력을 유지하고 퇴화를 막기 위해 10세대 이상 누대 사육한 개체는 wild type과 교미시켰으며, 사육조건은 온도 25±2℃, RH 65%, 광주기 16L : 8D이었다.

나. 핵다각체병바이러스 분리 및 증식

파밤나방 핵다각체병바이러스(SeNPV)는 포르말린을 넣지 않은 인공사료(5±0.2 g) 표면에 500 μ l의 바이러스를 처리한 후 1시간 정도 음건시켜 개체 사육용기(4×4×3 cm)에 넣고 4령 유충이 완전히 섭식하게 한 후 사육하면서 죽은 유충을 수확하였다. Im *et al*(1989)의 방법에 따라 수확한 이병충에 10배(v/w)의 0.01% SDS 용액을 가하여 마쇄한 후 이중 거즈로 여과하고 1,000 rpm으로 5분 동안 원심분리하여 유충의 찌꺼기를 제거한 후 2~3회 3,000 rpm의 저속 원심분리와 40~65% 설탕 밀도구배 원심(25,000 rpm, 60 min.)으로 다각체를 순화시켜 바이러스 농도가 1.0×10⁹ PIBs/ml 되도록 조제하였다. 이 바이러스 용액을 -20℃ 냉동고에 보관하면서 사용하였다.

다. 기주식물에서 바이러스 안정성 및 병원성

파밤나방 기주 식물인 국화, 배추, 콩에 2령 유충을 접종한 후 바이러스를 1.0×10⁸ PIBs/ml를 살포하여 살충율을 조사하였으며 기주의 약해 유무를 관찰하였다.

라. 온도 조건이 불활성화에 미치는 영향

파밤나방 2령 유충 30마리에 SeNPV를 1.0×10⁷ PIBs/ml의 농도로 처리하였다. 처리온도는 30℃, 40℃, 50℃, 60℃, 80℃, 100℃이며 처리시간은 30℃, 40℃, 50℃, 60℃에서는 각각 1시간, 3시간, 5시간, 8시간을 60℃, 80℃, 100℃에서는 각각 1분, 5분, 10분, 15분, 20분을 처리하였다. 바이러스가 준비된 팔콘 튜브를 항온 수조에 넣어 온도조건을 맞춘 다음 인공사료에 접종하여 유충에게 섭식시키고 사충수를 조사하였다.

마. 보관 조건이 SeNPV 불활성화에 미치는 영향

보관 조건이 SeNPV 불활성화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 보관온도 조건을 -20℃, -5℃, 5℃, 15℃, 25℃, 상온으로 처리하였으며 접종 농도는 1.0×10^7 PIBs/ml이며 매일 10일경 각 보관 온도별 바이러스를 10배 희석하여 인공 사료에 접종한 후 유충에게 섭식시켜 매일 사충수를 조사하였다.

바. 태양 광선이 SeNPV의 불활성화에 미치는 영향

식물체상의 SeNPV가 태양 광선에 의해 불활성화 되는 시기를 알아보기 위하여 강낭콩을 기주로 하여 바이러스를 1.0×10^6 의 농도로 각각 잎의 앞면, 뒷면, 전면의 3가지 방법으로 살포한 뒤 태양광선에 노출시켰다. 바이러스를 처리한 기주는 노지, 하우스, 유리온실의 3장소에 분산시켰으며 처리 후 48시간이 경과한 시점부터 2일에 한번씩 기주의 잎을 채집하여 2령 유충 20마리에 섭식 시켰으며 2 반복하였다. 만 하루 동안 충분히 강낭콩을 섭식한 2령 유충은 인공사료로 먹이를 전환하여 개체사육하며 사충수를 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

기주식물에서 바이러스 안정성 및 병원성을 보기 위하여 기주 식물별로 파밤나방 2령 유충을 접종한 후 바이러스를 1.0×10^8 PIBs/ml를 살포한 결과 모든 작물에서 95% 이상의 살충율을 보였으며, 평균 살충기간도 6일 정도였다. 그리고 약해 증상도 보이지 않아 기주식물에 안정하였다(Table 1).

Table 1. Mortality of *S. exigua* on different host after spray of SeNPV

concentration (PIBs/ml)	chrysanthemum		chiness cabbage		soybean	
	mortality	duration	mortality	duration	mortality	duration
1.0×10^8	95.0%	6.2	95.2%	6.4	96.0%	6.2
damage	none		none		none	

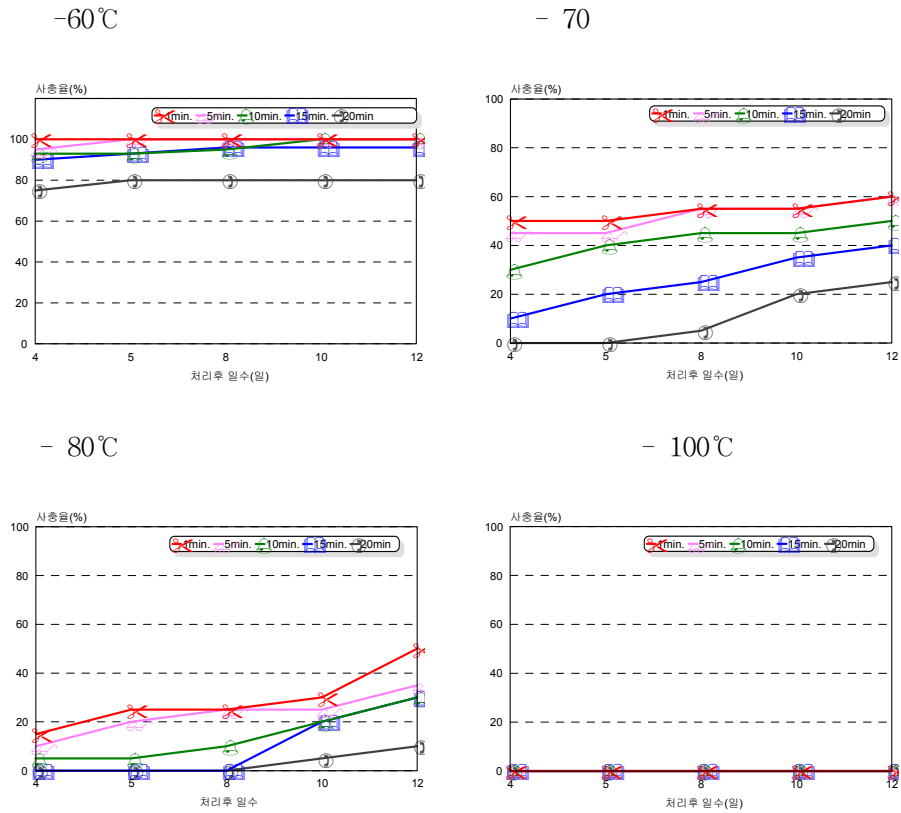
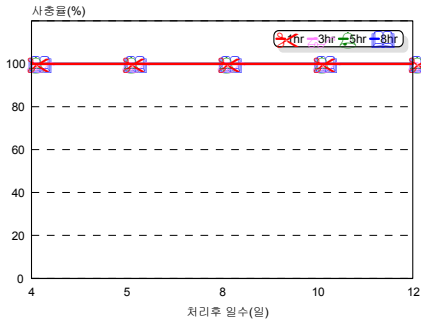


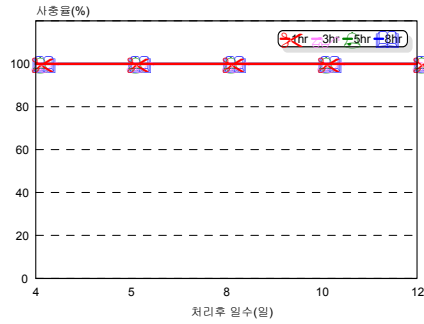
Fig. 1. Inactivity of SeNPV on relative high temperature

온도가 파밤나방 핵다각체병바이러스 불활성화에 미치는 영향을 보기 위하여 온도별, 처리시간별로 1×10^7 PIBs/ml 처리하였을 때 고온에 대한 바이러스의 안정성은 60°C에서는 20분 이상을 가열했을 때 약 20%정도의 병원성이 감소하였으나 70°C에서 1분 이상을 처리했을 때 50% 이상의 병원성이 감소되고, 80°C의 고온에서는 10분 이상 가열했을 때 병원성이 70% 이상 감소하였으며 100°C에서는 1분 처리에서도 병원성을 완전히 상실하였다(Fig. 1).

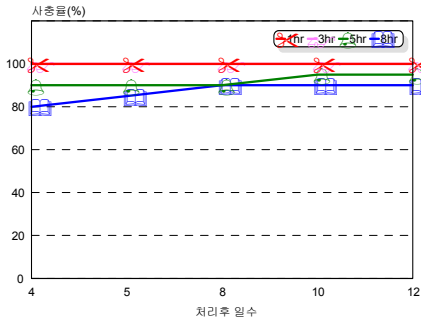
- 30°C



- 40°C



- 50°C



- 60°C

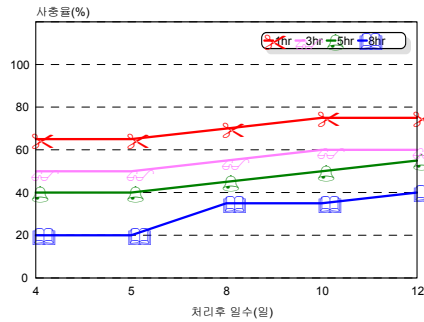


Fig. 2. Inactivity of SeNPV on relative low temperature

50°C 이하의 온도에서는 8시간을 처리했을 때도 파밤나방 핵다각체병바이러스 활동에는 크게 영향을 미치지 않았으나 60°C에서는 2시간을 경과하면서 50% 이상의 사충율을 보여 처리 시간이 길어질수록 병원성이 낮아졌다(Fig. 2).

보관조건이 파밤나방 핵다각체병바이러스(10^7 PIBs/ml) 불활성화에 주는 영향은 높은 온도보다는 -20°C에 동결 보관하는 것이 6개월까지 병원성의 손실 없이 지속되었으며, -5°C에서는 90일 정도 병원성의 상실이 없었다. 그러나 상온이나 25°C, 15°C, 5°C는 75일 이후부터 병원성이 떨어졌다(Fig. 3).

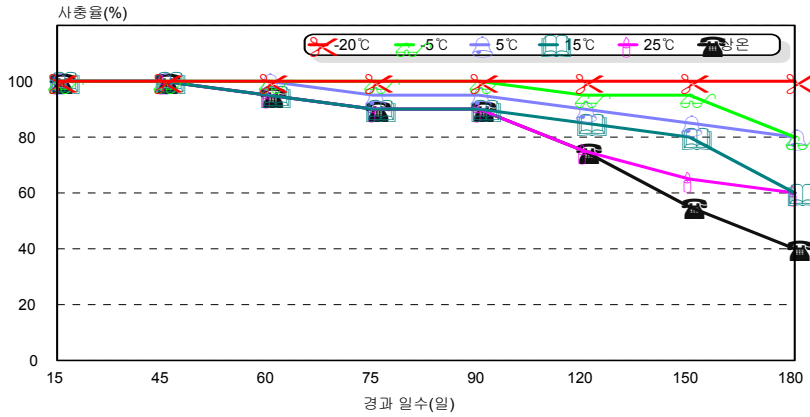


Fig. 3. Inactivity SeNPV by storage temperature

태양 광선이 파밤나방 핵다각체병바이러스의 불활성화에 미치는 영향을 보기 위하여 포트에 식재된 강낭콩의 잎표면, 뒷면, 전체에 SeNPV를 살포하여 온실, 비닐하우스, 노지 포장에 두고 태양광선에 방치 후 일별로 잎을 채취하여 2령 유충에 먹인 결과 온실에서는 5일부터 잎의 앞면 살포에서는 병원성을 상실하기 시작하였으나 뒷면과 전체에 살포한 것은 9일째부터 병원성이 상실되었다(Fig. 4).

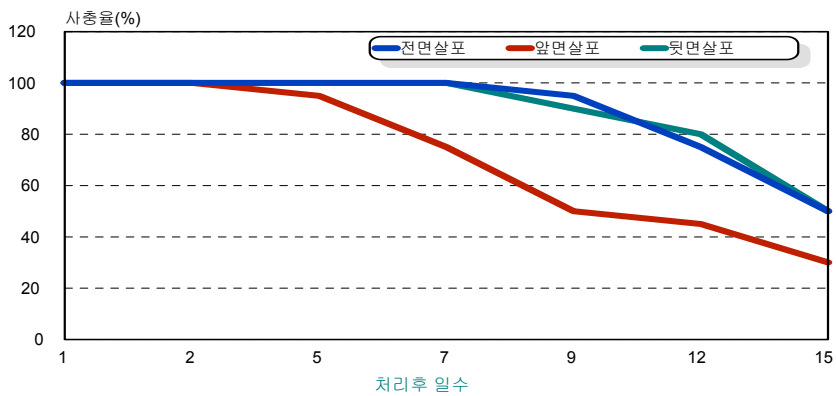


Fig. 4. Comparison of mortality of SeNPV by spray site on greenhouse

비닐하우스에서도 7일부터 살포 면에 관계없이 병원성을 상실하기 시작하였으나 뒷면과 전체에 살포한 것이 표면보다 안정되었다(Fig. 5).

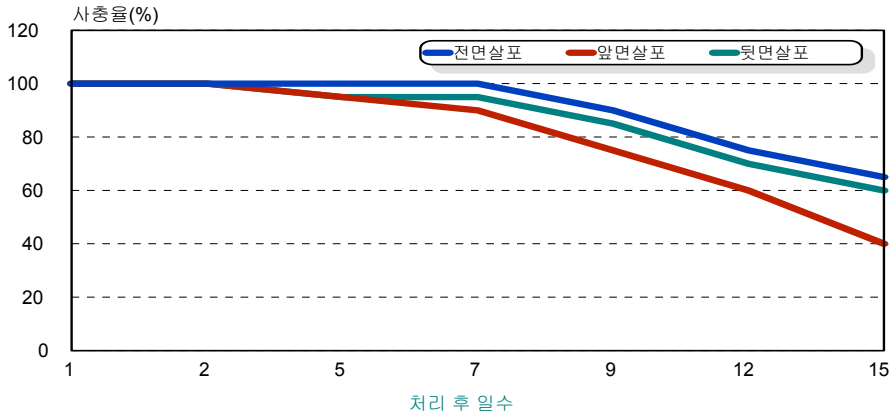


Fig. 5. Comparison of mortality of SeNPV by spray site on PVChouse

노지포장에서는 앞면 살포는 2일부터 불활성화가 나타나기 시작하여 15일 제에 병원성이 상실되었다. 뒷면과 전체는 조금 늦게 불활성화 되었지만 온실, 비닐하우스보다는 빨리 병원성이 상실되었다(Fig. 6).

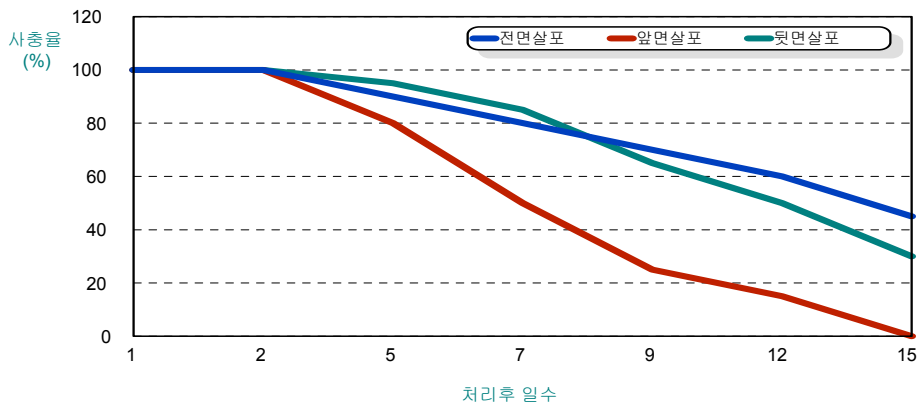


Fig. 6. Comparison of mortality of SeNPV by spray site on the field

바이러스가 다음 세대로의 전달은 후대에 10%에서 28%수준에서 발생하거나 발생하지 않은 것으로 나타났다(Table 2). 용 무게, 성충의 출현, 생식력과 난 부화율은 바이러스 처리구와 무처리구를 비교하면 차이가 나타나지 않았다.

Table 2. Effect of next generation after feed of SeNPV on 5th *S. exigua* larva

concentration (PIBs/ml)	Parent mortality(%)	progeny mortality(%)	Weight of pupa(mg)	Hatchability (%)
0	6.7±2.9	4.2±3.6	83	96.8
1×10 ⁴	34.1±10.1	11.1±7.5	82	95.6
1×10 ⁵	36.1±17.7	10.0±8.9	81	95.4
1×10 ⁶	54.9±5.2	28.3±16.8	82	95.0

이상의 결과로 바이러스를 후대에 영향은 담배거세미나방에서 핵다각체병 바이러스(5×10⁶ PIBs/ml)를 처리했을 때 감염된 성충으로부터 경란전염이 되는데 이는 건전한 성충이 핵다각체병 바이러스를 섭식했을 때 난 표면 coating에 의하여 자손에 바이러스를 전염한다고 하였으며 유충 사충율은 1일째 산란된 난에 가장 높았으며 감염 후 2일과 3일에는 감소되었다는 보고와 비슷하여 파밤나방에서도 같을 것으로 생각되어진다.

4. 결과 요약

파밤나방 핵다각체병바이러스(*Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus: SeNPV)를 이용한 미생물살충제로 개발의 기초자료를 얻기 위하여 처리온도, 저장조건 및 태양광선에 대한 안정성을 조사하였다. 바이러스를 60℃에서 20분 이상을 가열했을 때 약 20%정도의 병원성이 감소하였으나 70℃ 이상의 고온에서는 10분 이상 가열했을 때 병원성이 60% 이상 감소하였으며 100℃에서는 병원성을 완전히 상실하였다. 50℃ 이하에서는 8시간 처리했을 때 바이러스 활동에는 크게 영향을 미치지 않았다.

SeNPV는 -20°C 에 동결 보관에서 6개월 이상 병원성이 지속되었으며 -5°C 에서는 90일 정도 병원성 활성이 유지되었다. 그러나 5°C 이상에서는 75일 이후부터 병원성이 떨어졌다

강낭콩의 잎 앞, 뒷면, 전체에 SeNPV를 살포하여 온실, 비닐하우스, 노지 에서 태양광선에 방치 후 일별로 잎을 채취하여 2령 유충에 먹이로 공급한 결과 온실 과 비닐하우스에서는 5일째부터 잎의 앞면 살포에서는 병원성이 상실되기 시작 하였으나 뒷면과 전체에 살포한 것은 9일째부터 병원성이 상실되었다. 그러나 노 지 포장에서는 앞면 살포는 2일부터 병원성이 저하되기 시작하여 15일째에 병 원성이 상실되었다. 뒷면과 전체처리에서는 불활성화가 약간 늦게 나타났지만 온 실, 비닐하우스보다는 병원성이 빨리 상실되었다

제6절 파밤나방 핵다각체병바이러스 바이러스 살포방법 구명

1. 서 언

파밤나방(*Spodoptera exigua*)은 기주범위가 넓어 채소, 화훼, 과수 등의 40과 200여종에 달하는 것으로 알려져 있고 국내에서도 최근 사과, 배추, 수박 등에 발생하여 피해가 심한 것으로 보고되었으며, 1986년에 전남 진도에서 피해가 확인된 이후 1988년부터는 전국적으로 피해가 확산되어 발작물, 채소 등 50여종의 작물을 가해하여 극심한 피해를 주고 있다. 특히 3령 유충 이후에는 살충제에 대한 저항성이 강하여 방제가 어려운 해충으로 구분하고 있다. *B. thuringiensis*에도 감수성이 약한 파밤나방에는 바이러스를 이용한 방제법이 가장 효과적인 것으로 알려져 있다.

곤충바이러스는 숙주곤충에 대한 특이성이 높고 누에나 꿀벌과 같은 익충에는 피해를 주지 않으면서 목적해충을 방제할 수 있다는 장점을 지니고 있어 바이러스를 살충제화 하여 해충방제에 널리 이용하고 있다. 그러나 태양광선에서 나오는 자외선은 핵다각체병바이러스를 둘러싸고 있는 결정성 단백질을 불활화 시키기 때문에 이를 방지하기 위한 연구가 중요하다. 따라서 파밤나방 핵다각체병바이러스를 기주식물에 살포할 때 사용할 방제 기구를 선발함으로써 바이러스가 식물체에 잘 부착되어 숙주곤충인 파밤나방이 잘 섭식 할 수 있도록 하기 위하여 본 시험을 실시하였다.

2. 재료 및 방법

가. 파밤나방 증식

파밤나방(*Spodoptera exigua*)은 포장에서 유충을 채집하여 Im *et al.*(1988)이 사용한 인공사료 조성중에서 강낭콩 분말 대신 국내에서 많이 재배되고 손쉽게 구입 할 수 있는 콩 분말로 변경하여 사용하였다. 체란을 위하여 암수 20~30개

의 번데기를 유산지로 만든 삼각통(가로 50, 세로 30, 높이 30 cm)에 넣고 성충으로 우화시켰으며, 유산지 통안에 10% 설탕물을 공급하여 산란을 유도하였다. 교미한 암컷 성충이 산란한 부분의 유산지를 난과 함께 떼어내어 인공사료(5±0.2 g) 위에 난피를 접종하여 플라스틱 용기(20×12×12 cm)내에서 2령까지 사육하였다. 3령부터는 cannibalism을 막기 위하여 개체 사육용기(4×4×3 cm)에 1마리씩 넣고 4~5일 간격으로 인공사료가 마르면 교체하면서 번데기가 될 때까지 사육하였다. 한편 사육곤충의 활력을 유지하고 퇴화를 막기 위해 10세대 이상 누대 사육한 개체는 wild type과 교미시켰으며, 사육조건은 온도 25±2℃, RH 65%, 광주기 16L : 8D이었다.

나. 핵다각체병바이러스 분리 및 증식

파밤나방 핵다각체병바이러스(SeNPV)는 포르말린을 넣지 않은 인공사료(5±0.2 g) 표면에 500 μ l의 바이러스를 처리한 후 1시간 정도 음건시켜 개체 사육용기(4×4×3 cm)에 넣고 4령 유충이 완전히 섭식하게 한 후 사육하면서 죽은 유충을 수확하였다. Im *et al*(1989)의 방법에 따라 수확한 이병충에 10배(v/w)의 0.01% SDS 용액을 가하여 마쇄한 후 이중 거즈로 여과하고 1,000 rpm으로 5분 동안 원심분리하여 유충의 찌꺼기를 제거한 후 2~3회 3,000 rpm의 저속 원심분리와 40~65% 설탕 밀도구배 원심(25,000 rpm, 60 min.)으로 다각체를 순화시켜 바이러스 농도가 1.0×10⁹ PIBs/ml 되도록 조제하였다. 이 바이러스 용액을 -20℃ 냉동고에 보관하면서 사용하였다.

다. 유묘검정

포트에 강낭콩을 식재하여 20일이 경과한 뒤에 포트당 파밤나방 난피(난 20~30개)를 2개씩 접종하여 한냉사로 망실을 만든 후 부화 후 10일째에 사전에 밀도를 조사한 후 바이러스를 1.0×10⁴, 10⁶, 10⁸ polyhedral inclusion bodies(PIBs)/ml 농도와 전착제인 TritonX-100(0.1%)를 혼합하여 살포기별, 농도별로 살포하여 매일 일정한 시간에 사충율을 조사하였다. 살포기는 수동식 분무기(거성, Safe Auto spray), 배부식분무기(홍농), 전기식 동력분무기(광성)를 이용하였으며 처리

당 10마리씩 10반복 실시하였다. 유묘검정 결과는 분산분석과 Duncan의 다중검정(SAS Institute, 1988)으로 비교하였다.

라. 포장검정



hand aprayer delivery sprayer



electronic spyer

바이러스를 살포할 때 가장 적절한 살포 기구를 선정하기 위하여 전라남도 화순에서 PVC하우스의 국화를 대상으로 수행하였다. 살포기구는 배부식분무기(홍농), 전기식 동력분무기(광성), 무인방제기(미스트 분무기, 테인테크 노즐)을 이용하였다. 시험구는 5×1.8×1.5 m 크기의 한냉사로 망실을 만들어 유충의 이동을 방지하였다. 망실 당 파밤나방 난괴를 50~60개를 접종하여 부화 후 10일째에 바이러스 농도 1.0×10^6 , 10^8 PIBs/ml가 되도록 10a당 100ℓ 양으로 희석한 후 전착제인 Triton X-100 0.1%를 첨가하여 분무기 종류별로 잎의 표면과 이면에 동시 살포하였으며 일정한 시간에 사충수를 조사하였고 5반복 실시하였다



automatic sprayer

3. 결과 및 고찰

현재 농가에서 사용하고 있는 살포 기구를 이용하여 유묘에 바이러스 농도별로 살포하여 파밤나방의 살충율을 조사하였다. 강낭콩 유묘에 파밤나방 난괴를 접종한 후 10일 후에 살포기별로 살포하여 살충율을 조사한 결과 1×10^4 PIBs/ml 살포시는 직접 잎 근처에서 살포한 노즐 크기가 작아 바이러스 입자가 골고루 살포된 수동식과 배부식이 75% 이상의 살충율을 보였다(Table 1). 그러나 전기식 동력분무기는 초기에는 살충력이 높으나 잎 전체에 고루 퍼지지 않아 살충력이 떨어지는 경향이였다.

Table 1. Mortality of *S. exigua* by spray of SeNPV 1×10^4 PIBs/ml on kidney bean seedling

Sprayer type	pop. pre-treat.	No of alive larva				Total mortality (%)
		3DAT	5DAT	7DAT	9DAT	
hand sprayer	162	138	82	46	38	76.5
delivery sprayer	160	136	89	44	40	75.0
electronic sprayer	168	125	86	58	51	69.6

1×10^6 PIBs/ml 살포 시에는 바이러스에 의한 사충은 3일째부터 나타나기 시작

하여 총 사충율은 배부식이 82.8%, 수동식이 81.9%로 1×10^4 PIBs/ml로 살포한 것보다 5~ 8% 정도 살충력이 증가하였으나 경향이 비슷하였다(Table 2).

Table 2. Mortality of *S. exigua* by spray of SeNPV 1×10^6 PIBs/ml on kidney bean seedling

Sprayer type	pop. pre-treat.	No of alive larva				Total mortality (%)
		3DAT	5DAT	7DAT	9DAT	
hand sprayer	155	132	89	36	28	81.9
delivery sprayer	151	129	83	31	26	82.8
electronic sprayer	158	125	89	49	37	76.6

역시 농도가 높은 1×10^8 PIBs/ml에서도 위의 두 결과와 같은 경향이었으며 살충율은 수동식과 배부식에서 95% 이상의 높은 살충율을 나타냈으나 전기식 동력 분무기는 88.9%로 떨어졌다(Table 3). 이상의 결과로 유묘에 바이러스를 살포할 때는 동력식을 사용할 때는 압력을 낮추어서 잎에 골고루 묻을 수 있게 하는 것이 좋을 것으로 생각된다.

Table 3. Mortality of *S. exigua* by spray of SeNPV 1×10^8 PIBs/ml on kidney bean seedling

Sprayer type	pop. pre-treat.	No of alive larva				Total mortality (%)
		3DAT	5DAT	7DAT	9DAT	
hand sprayer	150	124	21	14	7	95.3
delivery sprayer	148	120	18	12	5	96.6
electronic sprayer	162	115	31	25	18	88.9

Table 4. Mortality of *S. exigua* by spray of SeNPV 1×10^6 PIBs/ml on chrysanthemum

Sprayer type	pop. pre-treat.	No of alive larva				Total mortality (%)
		3DAT	5DAT	7DAT	9DAT	
delivery sprayer	989	683	492	272	219	77.9
electronic sprayer	1011	742	596	319	258	74.5
automatic sprayer	1006	623	421	216	196	80.5

Table 5. Mortality of *S. exigua* by spray of SeNPV 1×10^8 PIBs/ml on chrysanthemum

Sprayer type	pop. pre-treat.	No of alive larva				Total mortality (%)
		3DAT	5DAT	7DAT	9DAT	
delivery sprayer	1002	642	396	196	113	88.7
electronic sprayer	965	725	453	210	117	87.9
automatic sprayer	987	624	401	128	77	92.2

포장에서 바이러스를 살포할 때 가장 적절한 살포 기구를 선정하기 위하여 살포기구별로 국화가 식재된 농가포장에서 살포하였다. 국화의 크기는 초장 25cm 정도였으며 살포 10일전에 처리구당 난괴 50~60개를 접종하여 10일 뒤에 사전 밀도를 조사하였으며 바이러스 두 농도를 처리를 분무기별로 처리하였다. 낮은 농도인 1×10^6 PIBs/ml 처리한 결과 입자가 미세한 무인방제기(미스트분무기)가 80.5%로 다른 살포기구에 비하여 약간 높은 사충율을 보였다(Table 4).

바이러스 농도를 높여 1×10^8 PIBs/ml를 살포하였을 때 무인방제기는 92.2%의 방제가를 보여 다른 살포기보다 5%정도 높았다(Table 5). 이는 분무형태로 살포되기 때문에 잎 전체에 고루 살포되어 과밤나방의 섭식이 용이했기 때문으로 생각 되어진다

제7절 핵다각체병바이러스의 제형의 안정성 및 효과 검정

1. 서 언

최근까지 해충방제에는 화학적 방제가 주를 이루고 있으며 이로 인하여 환경 오염 및 생태계 파괴 등 심각한 문제로 대두되고 있다. 파밤나방도 약제에 매우 높은 내성으로 방제가 어려우며 가해하는 작물의 수도 많아 피해가 커서 화학 살충제를 남용하고 있다. 이를 해결하기 위한 방안중 하나로 생물적 방제법을 도입하여 화학적 방제의 보완 또는 대체수단으로서 종합적 해충방제 체계 확립에 연구의 초점을 집중시키고 있으며 그 중에서도 세균, 바이러스, 사상균, 원생동물 등 미생물을 이용한 해충의 방제에 큰 비중을 두고 있다. 세계적으로 생물농약은 185종으로 작물보호시장의 1%에 지나지 않고 있으며 이중 곤충바이러스 살충제는 24종을 차지하고 있다. 과거 곤충 바이러스 연구는 곤충바이러스의 분리·동정, 병원성 검정을 중심으로 실시하였으나 외국의 곤충병리 연구현황과 비교할 때 국내 연구수준은 기주곤충과 바이러스의 대량증식 시설이나 바이러스 살충제 제형화 등에 관한 연구가 매우 미진하다. 곤충 병원성바이러스의 해충방제 이용 확대를 위해 바이러스 살충제의 제형에 필요한 물질들의 안정성을 검정하고 가장 안정한 제형형태를 구명하기 위하여 실시하였다.

2. 재료 및 방법

가. 파밤나방 증식

파밤나방(*Spodoptera exgua*)은 포장에서 유충을 채집하여 Im *et al.*(1988)이 사용한 인공사료 조성중에서 강낭콩 분말 대신 국내에서 많이 재배되고 손쉽게 구입 할 수 있는 콩 분말로 변경하여 사용하였다. 체란을 위하여 암수 20~30개의 번데기를 유산지로 만든 삼각통(가로 50, 세로 30, 높이 30 cm)에 넣고 성충

으로 우화시켰으며, 유산지 통안에 10% 설탕물을 공급하여 산란을 유도하였다. 교미한 암컷 성충이 산란한 부분의 유산지를 난과 함께 떼어내어 인공사료(5±0.2 g) 위에 난괴를 접종하여 플라스틱 용기(20×12×12 cm)내에서 2령까지 사육하였다. 3령부터는 cannibalism을 막기 위하여 개체 사육용기(4×4×3 cm)에 1마리씩 넣고 4~5일 간격으로 인공사료가 마르면 교체하면서 번데기가 될 때까지 사육하였다. 한편 사육곤충의 활력을 유지하고 퇴화를 막기 위해 10세대 이상 누대 사육한 개체는 wild type과 교미시켰으며, 사육조건은 온도 25±2℃, RH 65%, 광주기 16L : 8D이었다.

나. 바이러스 효과검정

포트에 강낭콩을 식재하여 20일이 경과한 뒤에 포트당 과밤나방 난괴(난 20~30개)를 2개씩 접종하여 한냉사로 망실을 만든 후 부화 후 10일째에 사전에 밀도를 조사한 후 바이러스를 1.0×10^4 , 10^6 , 10^8 polyhedral inclusion bodies(PIBs)/ml 농도와 전착제인 TritonX-100(0.1%)를 혼합 살포하여 매일 일정한 시간에 사충율을 조사하였다. 처리 당 10마리씩 10반복 실시하였으며 유묘검정 결과는 분산분석과 Duncan의 다중검정(SAS Institute, 1988)으로 비교하였다.

다. 제형첨가제의 안정성 구명

제형화 검토를 위하여 보조제를 탐색하고자 제형에 들어가는 여러 가지 보조제를 인공사료에 도포하여 실내 검정법에 준하여 조사하였으며 또한 오이, 고추, 유채, 강낭콩 등의 유묘에 농도별로 직접 처리하여 유묘 검정법에 준하여 조사하였다.

라. 과밤나방핵다각체병바이러스의 제형별 살충율

제형별 살충율 검정은 (주)경농에서 제조한 액상, 입상수화제 등을 가지고 실내검정 및 유묘검정에 의하여 5반복 실시하였으며 제형첨가제는 액상수화제에서 검토되었던 boric acid를 대조로서 사용하였고 형광표백제로는 stilbene disulfonic acid 유도체인fluorescent brightener 28 (free acid, Sigma-Aldrich 제품 OBA),

같은 stilbene disulfonic acid 유도체이지만 구조가 다른 fluorescent brightener 113 (Bayer 제품 OBB) 그리고 stilbene disulfonic acid의 heterocyclic 유도체인 fluorescent brightener 191 (Bayer 제품 OBC)의 3종이 사용되었다. 시험방법은 유묘 검정에 준하여 10반복 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

Table 1. Growth of *S. exigua* by additive for formulation

additive	Weight of pre-treat(mg)	Weight after treatment(mg)			Mortality (%)
		1DAT	4DAT	7DAT	
White carbon	5.8	11.2	39.8	149.3	6.7
Diatomite	5.4	13.1	29.3	120.0	0
Talc	5.4	16.4	28.6	125.4	0
Kaolin	5.2	-	-	-	100
CaCO ₃	5.6	18.0	35.9	169.2	0
Bentonite	5.8	8.2	-	-	93.3
control	5.6	12.4	38.5	164.3	0

제형화 검토를 위하여 보조제를 탐색하고자 제형에 들어가는 여러 가지 보조제를 인공사료에 도포하여 과밤나방의 생육을 살펴본 결과 다른 첨가 물질들은 과밤나방 유충 생육에 지장을 주지 않았지만 Kaolin과 Bentonite는 과밤나방에 살충효과가 인정되었다. 이것은 이 두 물질이 광물질, 즉 돌가루이기 때문에 인공사료에 따로 처리되어 섭식 시 기계적인 소화불량에 의한 것으로 생각되어진다. 태양자외선 차단제로 알려진 White carbon도 6.7%의 사충율을 보여 첨가 시 농도를 고려하여야 할 것으로 생각된다(Table 1). 또한 이러한 물질들을 오이, 고추, 유채, 강낭콩 등의 유묘에 농도별로 직접 처리하여 약해를 검정한 결과 다른 물질들은 문제가 없었으나 소포제와 계면활성제에서 일부 약해가 발생하여 제형 시 농도를 조정하던지 다른 물질로 교체해야 할 것으로 생각되어진다(Table 2).

Table 2. Damage of additive for formulation

additive	dilute	cucumber seedling	red pepper seedling	rape	kidney bean
Bentonite	500배	×	×	×	×
	1000배	×	×	×	×
Kaoln	500	×	×	×	×
	1000	×	×	×	×
CaCO ₃	500	×	×	×	×
	1000	×	×	×	×
White carbon	500	×	×	×	×
	1000	×	×	×	×
Diatomite	500	×	×	×	×
	1000	×	×	×	×
Talc	500	×	×	×	×
	1000	×	×	×	×
antifoaming	0.2%	×	○	×	×
surfactant	7%	○	×	×	×

핵다각체병바이러스의 제형은 현재까지 액상수화제, 입상수화제, 액상 등 여러 가지 형태로 6차까지 이루어 졌으며 1차에서 5차까지는 일부 약해가 나오고 살충력도 낮은 편인 72% 이하였다(Table 3). 그러나 6차 제형에 있어서 액상과 액상수화제(DG)에서 1×10^7 PIBs/ml에서 유묘검정에서 80% 이상의 살충율을 보여 제형이 가능 할 것으로 생각되어진다.

Table 3. Mortality of SeNPV by formulation

Time	formulation	concentration (PIBs/ml)	Damage		Mortality (%)
			Kidney bean	cucumber	
1st	SC	1×10^7	○	○	38
2nd	SC	8.9×10^8	△(일부약해)	○	49
3rd	SC	1×10^8	×	△(일부약해)	68
	SC			△(일부약해)	53
4th	WG 2	1×10^{10}	×	×	69
	WG 3		×	×	58
5th	WG 2	1×10^9	×	×	72
	WG 2		×	×	50

Table 4. Mortality of SeNPV by 6th formulation

Formulation	Concentration(PIBs/ml)	Mortality(%)
Soluble Concentrate	1×10^8	84
	1×10^7	80
	1×10^6	71
Suspension Concentrate(SC)	1×10^8	76
	1×10^7	73
	1×10^6	62
Suspension Concentrate(DG)	1×10^8	81
	1×10^7	81
	1×10^6	68
SeNPV	1×10^8	94
	1×10^7	90
	1×10^6	86

6번째로 만들어진 액상, 액상수화제를 가지고 유묘에서 바이러스 농도별로 희

석하여 검정한 결과 액상과 액상수화제(DG)에서 80% 이상의 살충력을 나타내 바이러스 원액에 비하여서는 떨어지나 지금까지 제형에서 가장 높은 살충력을 나타내었다(Table 4). 여러 가지 형태로 만들어진 1~7차까지의 제형은 Fig. 1 과 같다.

핵다각체병 바이러스는 여러 가지 장점이 많지만 살충효과가 늦게 나타나고 죽기 직전까지 섭식활동을 계속하므로 살포 후 바이러스의 활성을 지속시키는 것이 중요하다. 또한 핵다각체병 바이러스는 태양광선의 자외선에 의하여 급격히 불활성화(McLeod 등, 1977) 되기 때문에 제형화를 위해서는 필수적으로 바이러스를 안정화시킬 수 있는 물질의 선발이 필요하다.

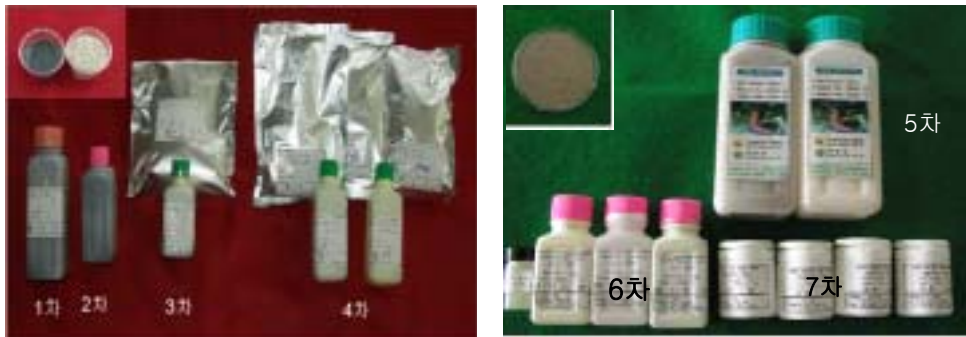


Fig. 1. Various presample(1~4)

(5~6)

시험에 사용된 물질들은 액상수화제에서 검토되었던 boric acid를 대조로서 사용하였고 형광표백제로는 stilbene disulfonic acid 유도체인fluorescent brightener 28 (free acid, Sigma-Aldrich 제품 OBA), 같은 stilbene disulfonic acid 유도체이지만 구조가 다른 fluorescent brightener 113 (Bayer 제품 OBB) 그리고 stilbene disulfonic acid의 heterocyclic 유도체인 fluorescent brightener 191 (Bayer 제품 OBC)의 3종이 사용되었다. 생물활성 검정결과, boric acid에 의한 효과보다는 형광표백제에 의한 약효상승효과가 우수하였고 형광표백제들 간에는 구조적으로 차이를 보여 stilbene disulfonic acid 유도체인 fluorescent brightener 28 (free acid, Sigma-Aldrich 제품 OBA)가 총살충율 97%로 가장 우수한 효과

를 보였다((Table 5).

Table 5. Mortality of *S. exigua* by SeNPV plus additive on kidney bean

Formulation	Mortality (%)							Total mortality (%)
	1DAT	2DAT	3DAT	4DAT	5DAT	6DAT	7DAT	
Water dispersible granule(WG) 1	-	-	6	35	19	21	5	86
WG 2	-	12	48	28	9	-	-	97
WG 3	-	-	14	36	25	16		91
WG 4	-	-	12	34	29	14	1	90
SC	-	-	6	31	24	11	9	81
SeNPV	-	-	-	38	42	8	6	94

제8절 핵다각체병바이러스의 생화학적 특성 검정

1. 서 언

화학 살충제의 남용으로 인하여 저항성해충의 출현, 인축이나 동식물에 대한 직·간접적인 피해와 잔류성으로 인한 환경오염 및 생태계 파괴 등의 심각한 문제를 야기 시켰다. 이를 해결하기 위한 방안중 하나로 생물적 방제법을 도입하여 화학적 방제의 보완 또는 대체수단으로서 종합적 해충방제 체계 확립에 연구의 초점을 집중시키고 있으며 그 중에서도 세균, 바이러스, 사상균, 원생동물 등 해충의 방제에 큰 비중을 두고 있다. 이중에서 미생물 바이러스는 기주곤충에 대한 특이성이 높고, 목적해충만을 방제할 수 있다는 장점을 갖고 있어 원예해충을 중심으로 한 농작물이나 산림해충 방제에 효과적이어서 이미 일부 선진국에서는 살충제가 상품화되고 있다.

Baculovirus subgroup A에 속하는 과밤나방 핵다각체병바이러스(*Spodoptera exigua* nucleopolyhedro virus : SeNPV)는 circular double stranded DNA를 갖는 봉상의 바이러스, 다각체 단백질 내에 바이러스 입자가 매립되어 있다. SeNPV를 미생물 살충제로 개발하기 위하여 여러 가지 연구와 더불어 우선 기본적인 생화학적 특성을 규명하고자 실시하였다.

2. 재료 및 방법

가. 과밤나방 증식

과밤나방(*Spodoptera exigua*)은 포장에서 유충을 채집하여 Im *et al.*(1988)이 사용한 인공사료 조성중에서 강낭콩 분말 대신 국내에서 많이 재배되고 손쉽게 구입 할 수 있는 콩 분말로 변경하여 사용하였다. 채란을 위하여 암수 20~30개의 번데기를 유산지로 만든 삼각통(가로 50, 세로 30, 높이 30 cm)에 넣고 성충으로 우화시켰으며, 유산지 통안에 10% 설탕물을 공급하여 산란을 유도하였다.

교미한 암컷 성충이 산란한 부분의 유산지를 난과 함께 떼어내어 인공사료(5 ± 0.2 g) 위에 난괴를 집중하여 플라스틱 용기($20\times 12\times 12$ cm)내에서 2령까지 사육하였다. 3령부터는 cannibalism을 막기 위하여 개체 사육용기($4\times 4\times 3$ cm)에 1마리씩 넣고 4~5일 간격으로 인공사료가 마르면 교체하면서 번데기가 될 때까지 사육하였다. 한편 사육곤충의 활력을 유지하고 퇴화를 막기 위해 10세대 이상 누대 사육한 개체는 wild type과 교미시켰으며, 사육조건은 온도 $25\pm 2^\circ\text{C}$, RH 65%, 광주기 16L : 8D이었다.

나. 핵다각체병바이러스 증식

파밤나방 핵다각체병바이러스(SeNPV)는 포르말린을 넣지 않은 인공사료(5 ± 0.2 g) 표면에 $500\ \mu\text{l}$ 의 바이러스를 처리한 후 1시간 정도 음건시켜 개체 사육용기($4\times 4\times 3$ cm)에 넣고 4령 유충이 완전히 섭식하게 한 후 사육하면서 죽은 유충을 수확하였다. Im *et al*(1989)의 방법에 따라 수확한 이병충에 10배(v/w)의 0.01% SDS 용액을 가하여 마쇄한 후 이중 거즈로 여과하고 1,000 rpm으로 5분 동안 원심분리하여 유충의 찌꺼기를 제거한 후 2~3회 3,000 rpm의 저속 원심분리와 40~65% 설탕 밀도구배 원심(25,000 rpm, 60 min.)으로 다각체를 순화시켜 바이러스 농도가 1.0×10^9 PIBs/ml 되도록 조제하였다. 이 바이러스 용액을 -20°C 냉동고에 보관하면서 사용하였다.

다. 바이러스의 정제 및 관찰

1) 다각체

핵다각체의 분리정제는 핵다각체병바이러스 염색유충에 약10배(v/w)의 0.01% SDS용액을 가하여 마쇄한 후 이중 거즈로 여과하고 3~4회 원심분리(3,000 rpm, 10분)하여 유백색의 다각체 침전물을 얻었다. 이 침전물을 10^{8-9} PIBs/ml가 되도록 0.01% SDS용액에 부유시킨 다음 40ml 원심분리관의 40-65% sucrose density gradient 32ml 위에 부유액 8ml를 서서히 sucrose 용액 위에 분주하고 원심분리(22,000 rpm, 1hr)하여 다각체 band를 얻었다. 이 band를 취하여 증류수로 희석해서 원심분리(15,000 rpm, 30분)하고 sucrose를 제거한 후 -20°C 에 보관하면서

실험에 사용하였다.

다각체의 전자현미경 관찰은 formvar로 coating 된 grid에 다각체 부유액을 떨어뜨려 말린 후 2% uranyl acetate로 negative 염색하여 투과전자현미경으로 관찰하였다. 한편 다각체 일부는 냉동건조 후 황금증착 후 주사전자현미경으로 외형을 관찰하였다. 다각체의 내부구조는 정제된 다각체 10^9 PIBs/ml의 농도로 원심하였다. 분리관에 농축시켜 침전된 다각체에 50°C로 가운시킨 2.0% agar를 혼합하였다. 굳은 agar를 1mm 크기로 잘라 2.5% glutaraldehyde와 1% osmium tetroxide로 고정된 후, alcohol계(30-100%) 및 Propylene oxide로 탈수하고 Epon812에 매몰시켰다. 박편은 Ultramicrotome(Sorvall® MT6000, Du Pont Co.)으로 만들어 2% uranylacetate와 0.3% lead citrate로 염색하여 투과전자현미경으로 관찰하였다.

2) Virion

정제된 다각체부유액(10^9 PIBs/ml) 5ml를 3,000rpm에서 10분간 원심분리하여 침전시키고 알칼리 용액(0.1M Na₂CO₃, 0.01M EDTA, 0.17M NaCl, pH10.9) 4ml에 부유시켜 37°C에서 30분간 처리하였다. 여기에 증류수를 가하여 8ml로 만들고 3,000rpm에서 10분간 원심분리하여 용해되지 않는 다각체를 제거하고 상층액을 취하였다.

이후 40-60% sucrose linear density gradient 32ml 위에 상기의 상층액 8ml를 서서히 분주하고 원심분리(25,000 rpm, 90분)하여 virion band를 얻었다. 이를 fraction collector(LKB2212, HEURAC)을 사용하여 virion band 별로 취하였다. 각 band에 2배의 증류수를 가한 후 UV Spectro Photometer (Pye Unicam UN-8800)로 260nm에서 흡광도를 측정하여 virion band를 얻고 원심분리(50,000 rpm, 40분) 하여 sucrose를 제거한 virion 침전물을 실험에 사용하였고 각 virion band는 negative 염색하여 투과전자현미경으로 관찰하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 나방류 바이러스 수집 및 분리

1). 나방류 바이러스 수집

가) 파밤나방 NPV : 영광지역 대과재배지역에서 핵다각체병바이러스에 감염된 종은 수집하여 바이러스 정제중

나) 담배거세미나방NPV : 화순 국화포장에서 핵다각체병바이러스에 감염된 종은 수집하여 바이러스 정제중

다) 배추좀나방 바이러스 : 채집장소는 수원근교 배추밭에서 감염된 유충을 채집하여 분리한 결과 배추좀나방 GV(Granulosis Virus)로 동정되었으며 정제된 바이러스는 -20℃에 보관중이다



Infected Diamond back moth

라) 뒷흰날개밤나방 바이러스 : 제주도 감귤나무피해 유충 야외채집

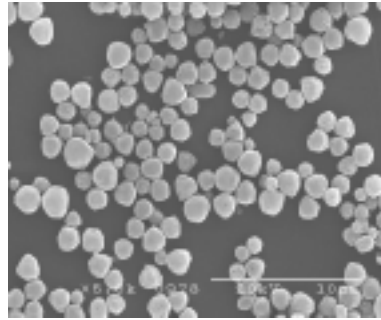
마) 도둑나방 핵다각체바이러스병 : 실내 사육중 발견

나. 수집바이러스병 이병 증상 및 바이러스의 형태적 특징

가). 뒷흰날개밤나방 핵다각체바이러스병(PsMNPV)



Symptom



Polyhedra outer shape(SEM)

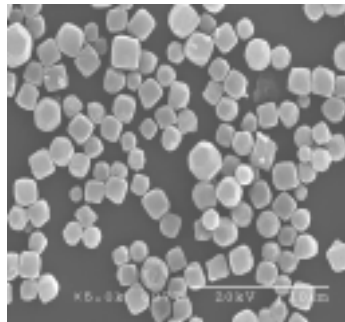
polyhedra inner shape (TEM)

다각체 형태는 4면체, 다각체 내부는 뉴클레오캡시드가 2 - 6개정도 포매됨

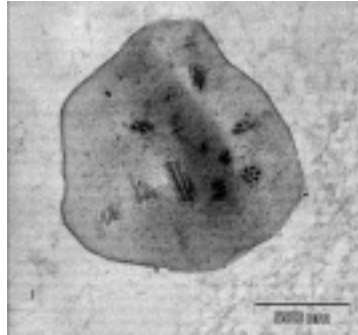
나). 도둑나방 핵다각체바이러스병 (MbMNPV)



Symptom



Polyhedra outer shape(SEM)



polyhedra inner shape (TEM)

다각체 형태는 PsNPV보다 작음. 뉴클레오캡시드는 PsNPV와 유사함.

다). 배추좀나방 과립바이러스병(PxGV)



Symptom



Polyhedra outer shape(SEM)

polyhedra inner shape (TEM)

원통형으로 1개의 뉴클레오캡시드가 포매된 전형적인 과립병바이러스 형태를 보임...

라). 바이러스입자의 설탕밀도구배법에 의한 분리



purified virus shape

다각체를 알칼리로 용해후 40% - 60% 설탕밀도구배원심결과 분자량이 서로 다른 5-6개의 밴드를 보임.

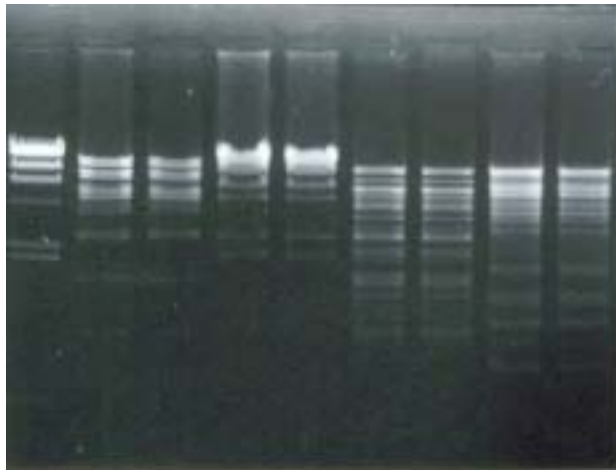
마). 다각체의 크기

뒷날개흰밤나방 (길이) $3.54\mu\text{m} \pm 0.70\mu\text{m}$, (폭) $3.02\mu\text{m} \pm 0.59\mu\text{m}$

도둑나방 (길이) $3.18\mu\text{m} \pm 0.56\mu\text{m}$, (폭) $2.79\mu\text{m} \pm 0.42\mu\text{m}$

다. 바이러스 DNA의 제한효소 분석

M 1 2 3 4 5 6 7 8



M, *Hind*III DNA digested; 1,3,5,7, Mamestrin MbNPV;

2,4,6,8, Korean MbNPV;

1,2, *Hind*III; 3,4, *Pst*I; 5,6, *Sal*I;

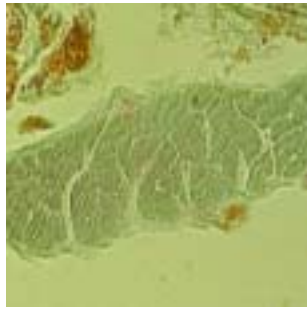
7,8, *Xho*

Compared with MbMNPV DNA

국내 수집 MbNPV DNA를 확인하기 위해 바이러스살충제로 이미 등록되어있

는 Mamestrin(프랑스) DNA를 와 비교하기 위해 *Hind*III등 제한효소 처리한 것과 같은 것으로 나타남.

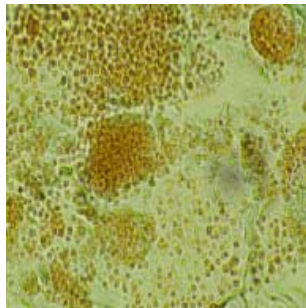
라. 과밤나방 핵다각체병바이러스 생화학적 특성 검정



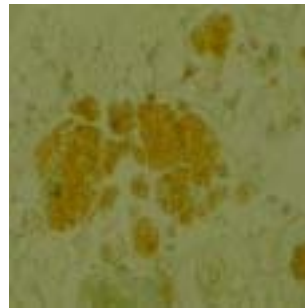
Muscle



Brain



Hemocyte



Fat body



Midgut cell



Tracheal matrix

바이러스에 감염된 유충은 심한 식욕부진을 보이며 탈피를 하지 못하고 복부의 체색은 백색을 띤다. 4령 이후 감염된 유충은 초기에는 섭식량이 급격히 줄어들고 어린 유충과는 달리 복부 배면이 분홍색을 띠는 것이 특징이다. 감염유충의 조직학적 관찰결과 여러 조직세포의 체내에 다각체가 형성되어 있으며 정상세포에 비하여 핵이 비대되어 있었다. 지방체, 근육세포, 뇌, 신경구, 기관세포 및 중장의 피막세포 등의 핵에서 다각체가 증식되었다.

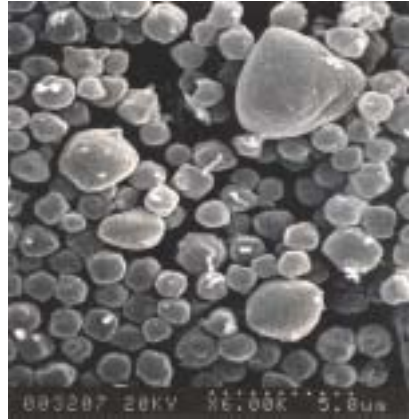


Purified polyhedral on sucrose linear density gradient

다각체를 sucrose linear density gradient로 초원심부리법에 의하여 정제한 결과, 55% sucrose 층에 선명한 1개 band의 다각체를 얻을 수 있었다. 이 다각체의 형태를 조사하기 위하여 band를 채취하여 negative 염색에 의한 투과전자현미경 및 주사전자현미경으로 가가 관찰하였다. 투과전자현미경 관찰에 의한 다각체의 외부형태는 4면체에 가까운 8각형과 4각형 등 부정형의 모양이었으며 주사전자현미경에서는 다각의 각을 갖는 입체형태로 나타났다.



Transmission electron microscope

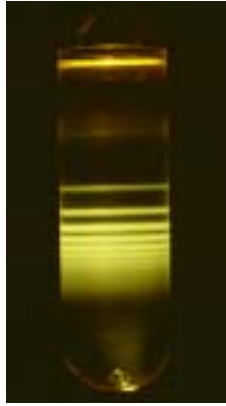


Scanning electron microscope



Polyhedra

다각체의 내부구조를 전자현미경으로 관찰한 결과 다각체내에는 많은 수의 바이러스입자가 들어 있으며 다수의 nucleocapsid가 하나의 envelope에 봉입된 형태를 보이고 있다. 이종은 envelope안에 여러 개의 nucleocapsid가 들어있는 MNPV에 속한다.



virion band



virion

순수 정제된 다각체를 알칼리 용액에 부유시켜 저속원심으로 용해되지 않은 다각체를 제거하고 sucrose density gradient에 의하여 분리하였다. 원심분리 후에 원심관에서 관찰된 virion band 수는 9개였으며 2~7번째의 6개 virion band는 선명하게 나타났다. band에 있어서 envelope 내의 virion 수와 그 형태를 관찰하기 위해서 전자현미경으로 확인하였다. envelope 내에 nucleocapsid가 3, 4개씩 들어있는 것이 대부분이었으나 간혹 유리된 nucleocapsid가 혼입되어 있는 것도 관찰되었다.

제9절 온도조건에 따른 과밤나방핵다각체병바이러스 (SeNPV)의 병원 활성

1. 서 언

과밤나방(*Spodoptera exigua*)은 기주범위가 넓어 채소, 화훼, 과수 등의 40과 200여종에 달하는 것으로 알려져 있고 국내에서도 최근 과, 배추, 수박 등에 발생하여 피해가 심한 것으로 보고되었으며(Ahn *et al.*, 1989). 1986년에 전남 진도에서 피해가 확인된 이후 1988년부터는 전국적으로 피해가 확산되어 발작물, 채소 등 50여종의 작물을 가해하여 극심한 피해를 주고 있다(Park *et al.*, 1991). 특히 3령 유충 이후에는 살충제에 대한 저항성이 강하여 방제가 어려운 해충으로 구분하고 있다(Park and Goh, 1992). 이와 같이 유기합성 살충제에 저항성을 나타내며 *Bacillus thuringiensis*에도 감수성이 약한 과밤나방에는 바이러스를 이용한 방제법이 가장 효과적인 것으로 알려져 있다(Smits and Vlask, 1988). 곤충바이러스를 이용한 해충방제는 Ignoffo (1973)가 *Heliothis zea* 방제를 위해 처음 바이러스 살충제인 Elcar를 상품화 이래 새로운 방제법으로 대두되고 있다. 과밤나방 핵다각체병바이러스의 대량증식 방법은 숙주곤충의 대량사육을 통한 생체증식 방법이 주로 이용되고 있으며 곤충 세포배양계를 이용한 생산체계도 시도되고 있으나 경제적인 문제로 실용화되지 못하고 있으며(Kurstak, 1982), 생체증식에 의한 바이러스의 증식 목적은 숙주곤충의 조직을 최대한 이용하는 동시에 병원성이 높은 바이러스를 생산함에 있다. 따라서 본시험은 2002년부터 2003년까지 과밤나방 핵다각체병바이러스의 온도별, 영기별 병원성을 검정하여 대량생산체계를 확립코자 실시하였다.

2. 재료 및 방법

가. 과밤나방 증식

과밤나방(*Spodoptera exigua*)은 포장에서 유충을 채집하여 Kim *et al.*(2003)이

사용한 인공사료 조성중에서 강낭콩 분말 대신 콩 분말로 변경하여 사용하였다. 채란을 위하여 암수 20~30개의 번데기를 유산지로 만든 삼각통(가로 50, 세로 30, 높이 30 cm)에 넣고 성충으로 우화시켰으며, 유산지 통 안에 10% 설탕물을 공급하여 산란을 유도하였다. 교미한 암컷 성충이 산란한 부분의 유산지를 난과 함께 떼어내어 인공사료(5±0.2 g) 위에 난괴를 접종하여 플라스틱 용기(20×12×12 cm)내에서 2령까지 사육하였다. 3령부터는 cannibalism을 막기 위하여 개체 사육 용기(4×4×3 cm)에 1마리씩 넣고 4~5일 간격으로 인공사료가 마르면 교체하면서 번데기가 될 때까지 사육하였다. 한편 사육곤충의 활력을 유지하고 퇴화를 막기 위해 10세대 이상 누대 사육한 개체는 wild type과 교미시켰으며, 사육조건은 온도 26±2℃, RH 65%, 광주기 16L : 8D이었다.

나. 핵다각체병바이러스 증식

파밤나방 핵다각체병바이러스(SeNPV)는 농업과학기술원 작물보호부 농업해충과 곤충병리연구실에서 분양 받아, 포르말린을 넣지 않은 인공사료(5±0.2 g) 표면에 500 μ l의 바이러스를 처리한 후 1시간 정도 음건시켜 개체 사육용기(4×4×3 cm)에 넣고 3령 유충이 완전히 섭식하게 한 후 사육하면서 죽은 유충을 수확하였다. Im *et al*(1989)의 방법에 따라 수확한 이병충에 10배(v/w)의 0.01% SDS 용액을 가하여 마쇄한 후 이중 거즈로 여과하고 1,000 rpm으로 5분 동안 원심분리하여 유충의 찌꺼기를 제거한 후 2~3회 3,000 rpm의 저속 원심분리와 40~65% 설탕 밀도구배 원심(25,000 rpm, 60 min.)으로 다각체를 순화시켜 바이러스 농도가 1.0×10¹⁰ PIBs/ml 되도록 조제하였다. 이 바이러스 용액을 -20℃ 냉동고에 보관하면서 사용하였다.

다. 핵다각체병바이러스 병원성 검정

인공사료는 30 ml 용량의 뚜껑이 있는 투명 플라스틱컵에 분주(5±0.2 g)하여 4℃ 냉장고에서 식혀 사용하였다. 바이러스 농도는 1.0×10^{1~6} PIBs/ml 농도로 컵당 100 μ l씩을 전착제인 TritonX-100(0.1%)과 함께 표면에 도포하고 1시간 정도 음건한 다음 영기별로 접종하여 식물생장상(FLI-301N, EYELA Co.)에 온도

조건을 20, 24, 28, 32℃에서 각각 개체 사육하면서 살충율을 조사하였다. 처리당 10마리씩 5반복 3회 실시하였으며 검정의 결과는 Abbot식으로 살충율을 보정하여 Finney(1971)의 probit분석법에 의하여 LC₅₀과 LT₅₀을 산출하였다

3. 결과 및 고찰

Table 1. Values of lethal concentration(LC₅₀) of SeNPV with different temperatures against 2nd instar of *S. exigua* larva

Temperatures (℃)	LC ₅₀ (PIBs/ml)	Regression line	95% Fiducial limits		χ ²
			Lower	Upper	
20	9.797×10 ³	3.89 + 0.35X	7.957×10 ³	6.460×10 ⁴	0.637
24	1.080×10 ³	4.16 + 0.25X	1.149×10 ²	3.025×10 ³	0.507
28	4.996×10 ²	4.35 + 0.35X	1.920×10 ²	1.596×10 ³	0.449
32	3.351×10 ²	4.70 + 0.24X	1.812×10 ²	1.703×10 ³	0.996

파밤나방 핵다각체병바이러스의 병원성을 검정하기 위해 영기에 따라 온도별로 LC₅₀을 조사하였다. 2령충의 20℃에서는 9.797×10³ PIBs/ml였으나, 24℃는 1.080×10³ PIBs/ml, 28℃는 4.996×10² PIBs/ml, 32℃는 3.351×10² PIBs/ml로 온도가 높아짐에 LC₅₀이 낮아졌다. (Table 1).

3령에 있어서도 2령과 마찬가지로 32℃에서 LC₅₀이 3.080×10² PIBs/ml로 가장 낮았다. 그러나 2령에 비하여 LC₅₀이 약간 높아지고 그 값의 범위도 3령에서 2령보다 좁게 나타났다(Table 2.). Im *et al*(1988)과 Kim *et al*(2003)에 의하면 충은 다르지만 담배거세미나방 핵다각체병바이러스(SINPV)는 담배거세미나방 령기에 따른 LC₅₀ 값은 영기가 진전됨에 따라 LC₅₀이 약 10배 정도 높았다는 결과와 농도에 있어서 약간의 차를 보이거나 경향은 비슷하게 나타났다.

Table 2. Values of lethal concentration(LC₅₀) of SeNPV with different temperatures against 3rd instar of *S. exigua* larva

Temperatures (°C)	LC ₅₀ (PIBs/ml)	Regression line	95% Fiducial limits		χ ²
			Lower	Upper	
20	4.930×10 ³	3.89 + 0.26X	2.144×10 ³	5.056×10 ⁴	0.329
24	1.118×10 ³	4.17 + 0.24X	9.622×10 ²	8.036×10 ³	0.488
28	9.796×10 ²	4.58 + 0.18X	7.957×10 ²	6.460×10 ³	0.179
32	3.080×10 ²	4.48 + 0.19X	1.884×10 ²	1.719×10 ³	0.507

4령에서도 20°C에서 5.996×10³ PIBs/ml, 28°C는 2.144×10³ PIBs/ml, 32°C는 1.304×10³ PIBs/ml로 온도에 있어서는 다른 영기와 차이가 없었으나 값의 범위는 3령에 비하여 높아졌는데(Table 3), 이는 같은 농도로 접종시킨 4령과 3령 유충에서 뚜렷한 차이를 보이지 않거나 오히려 4령 때의 값이 작은 것은 유충체중에 대한 사료 섭취량이 상대적으로 4령 때 훨씬 많아 바이러스를 먹는 양이 역시 많다는 Im *et al.*(1988)의 보고와 일치하는 결과를 보였다.

Table 3. Values of lethal concentration(LC₅₀) of SeNPV with different temperatures against 4nd instar of *S. exigua* larva

Temperatures (°C)	LC ₅₀ (PIBs/ml)	Regression line	95% Fiducial limits		χ ²
			Lower	Upper	
20	5.996×10 ³	3.90 + 0.25X	1.920×10 ³	1.596×10 ⁴	0.180
24	4.325×10 ³	4.38 + 0.17X	7.812×10 ²	1.374×10 ⁴	0.492
28	2.144×10 ³	3.86 + 0.24X	4.930×10 ²	5.057×10 ³	0.329
32	1.304×10 ³	4.19 + 0.24X	1.202×10 ²	8.896×10 ³	0.173

해다각체병바이러스 농도별 LT_{50} 은 20℃에서 2령은 1.0×10^4 PIBs/ml 농도에서 5.7일이 소요되었으며 농도가 1.0×10^2 PIBs/ml 이하에서는 10일 이상이 소요되었다. 3령과 5령은 1.0×10^4 PIBs/ml에서는 각각 6.9일과 6.1일이 소요되었으며 저농도로 갈수록 LT_{50} 은 길어졌다, 또한 영기에 있어서도 유충이 어릴수록 LT_{50} 은 짧아지는 경향이었는데(Table 4) 이는 Kim *et al.*(2003)은 바이러스 농도가 높고, 유충이 어릴수록 LT_{50} 은 농도에 관계없이 짧아진다는 보고와 일치하였다.

24℃에서는 20℃보다 기간이 단축되어 2령은 1.0×10^4 PIBs/ml 농도에서 5.1일이 소요되었으며 3령과 4령에서는 각각 5.7일, 5.9일이었고, 영기가 어릴수록 LT_{50} 값이 대체로 짧았는데 이는 영기가 어릴수록 바이러스에 대한 저항성이 낮음을 알 수 있었다. 이는 Im *et al.*(1988)의 같은 농도로 접종된 경우 어릴수록 LT_{50} 값이 작아진다는 결과와 일치하였다. (Table 5).

Table 4. Values of lethal time (LT₅₀) of SeNPV against 2nd, 3rd and 4th instar of *S. exigua* at 20°C

Instars	Concentrations (PIBs/ml)	LT ₅₀ (95%CL)	LT ₉₅ (95%CL)
2nd	1.0×10 ⁶	4.5 (3.4~5.4)	14.2 (11.1~20.9)
	1.0×10 ⁵	4.9 (3.8~5.9)	25.7 (19.6~39.1)
	1.0×10 ⁴	5.7 (4.4~6.9)	29.3 (17.4~51.8)
	1.0×10 ³	9.6 (7.7~11.6)	46.9 (21.9~74.9)
	1.0×10 ²	13.5 (11.4~16.3)	58.6 (31.1~96.3)
	1.0×10	24.0 (18.9~36.0)	91.5 (54.3~142.3)
3rd	1.0×10 ⁶	3.5 (2.6~4.3)	16.8 (13.1~24.8)
	1.0×10 ⁵	6.5 (5.5~7.1)	23.6 (17.6~36.5)
	1.0×10 ⁴	6.9 (5.5~7.8)	24.4 (18.2~38.9)
	1.0×10 ³	9.0 (7.4~10.7)	60.0 (39.0~98.5)
	1.0×10 ²	9.6 (8.0~11.5)	64.2 (41.2~128.9)
	1.0×10	16.9 (14.1~22.7)	94.2 (58.7~219.)
4th	1.0×10 ⁶	4.7 (4.3~5.1)	9.6 (8.7~11.4)
	1.0×10 ⁵	5.7 (5.0~6.4)	13.1 (11.4~15.9)
	1.0×10 ⁴	6.1 (4.8~7.2)	15.9 (11.9~26.6)
	1.0×10 ³	6.5 (5.3~7.5)	28.0 (20.7~52.2)
	1.0×10 ²	9.1 (7.9~10.5)	35.9 (24.8~69.0)
	1.0×10	14.3 (11.2~21.9)	116.9 (54.3~188.1)

Table 5. Values of lethal time (LT₅₀) of SeNPV against 2nd, 3rd and 4th instar of *S. exigua* at 24°C

Instars	Concentrations	LT ₅₀ (95%CL)	LT ₉₅ (95%CL)
	(PIBs/ml)		
2nd	1.0×10 ⁶	4.2 (3.5~4.8)	8.6 (6.7~14.8)
	1.0×10 ⁵	4.7 (3.9~5.2)	11.0 (9.0~15.2)
	1.0×10 ⁴	5.1 (4.1~5.9)	17.3 (12.5~31.5)
	1.0×10 ³	5.4 (4.8~6.6)	21.2 (14.5~45.6)
	1.0×10 ²	7.2 (5.9~9.4)	25.4 (15.1~59.4)
	1.0×10	14.8 (10.7~19.6)	32.6 (21.4~54.9)
3rd	1.0×10 ⁶	4.7 (3.9~5.5)	9.4 (7.5~13.2)
	1.0×10 ⁵	5.5 (4.8~6.1)	10.8 (9.2~14.2)
	1.0×10 ⁴	5.7 (5.3~7.1)	11.6 (9.2~18.2)
	1.0×10 ³	6.1 (5.1~7.3)	11.8 (9.1~21.9)
	1.0×10 ²	7.9 (6.5~12.1)	24.8 (14.8~45.5)
	1.0×10	10.8 (8.6~14.5)	43.1 (22.9~149.4)
4th	1.0×10 ⁶	5.1 (4.4~5.8)	9.2 (8.1~11.1)
	1.0×10 ⁵	5.6 (4.7~6.3)	12.7 (10.2~18.4)
	1.0×10 ⁴	5.9 (5.4~7.5)	14.2 (11.2~21.7)
	1.0×10 ³	6.2 (5.3~7.2)	17.5 (13.2~29.8)
	1.0×10 ²	8.4 (5.8~10.1)	24.0 (14.1~94.2)
	1.0×10	10.9 (6.1~29.2)	73.4 (24.4~116.9)

28°C에서 2령은 1.0×10⁴ PIBs/ml 농도에서 4.9일이 소요되었고, 3령과 4령은 각각 5.5일, 5.4일로 다른 온도처리와 비슷한 경향을 보였다(Table 6). 32°C에서 2령은 1.0×10⁴ PIBs/ml 농도에서 4.7일이 소요되었고, 3령과 4령은 각각 3.7일, 5.8일로 처리 온도 중 LT₅₀이 가장 짧았으며 28°C보다 LT₅₀이 짧아졌다(Table 7). 이는 El-Saadany *et al*(1992)은 NPV에 의한 *S. littoralis* 유충 사충율은 온도가 25°C에서 30°C로 증가함으로 높아지고, LT₅₀도 낮은 온도에서 더 길어진다고 한 결과와 일부 비슷한 경향이였다.

Table 6. Values of lethal time (LT_{50}) of SeNPV against 2nd, 3rd and 4th instar of *S. exigua* at 28°C

Instars	Concentrations (PIBs/ml)	LT_{50} (95%CL)	LT_{95} (95%CL)
2nd	1.0×10^6	3.6 (1.8~3.3)	7.8 (5.6~12.8)
	1.0×10^5	4.6 (3.9~5.3)	9.4 (7.6~12.5)
	1.0×10^4	4.9 (3.8~5.9)	11.4 (8.3~14.3)
	1.0×10^3	5.2 (4.2~6.2)	13.1 (10.7~16.2)
	1.0×10^2	5.3 (4.1~6.5)	17.9 (11.4~21.2)
	1.0×10	10.1 (8.2~13.8)	20.4 (16.1~26.7)
3rd	1.0×10^6	4.5 (4.0~5.0)	7.6 (6.7~9.4)
	1.0×10^5	5.2 (4.4~5.9)	12.8 (10.5~17.8)
	1.0×10^4	5.5 (4.6~6.5)	13.1 (10.0~19.1)
	1.0×10^3	6.5 (5.7~7.8)	14.8 (11.4~24.8)
	1.0×10^2	7.1 (6.6~8.2)	22.7 (13.7~37.9)
	1.0×10	11.3 (9.6~13.5)	24.1 (16.3~45.7)
4th	1.0×10^6	4.5 (2.9~5.7)	7.8 (5.9~9.1)
	1.0×10^5	5.1 (4.2~6.1)	10.9 (7.3~15.2)
	1.0×10^4	5.4 (4.4~6.6)	12.1 (8.1~16.9)
	1.0×10^3	6.0 (4.9~8.3)	18.0 (14.2~20.8)
	1.0×10^2	8.3 (6.2~10.3)	20.1 (15.3~33.2)
	1.0×10	10.1 (7.3~14.9)	22.9 (18.4~33.3)

또한 과밤나방에서 5령 유충에 바이러스를 접종 후 사육온도를 25°C에서 20°C로 낮출 경우, 25°C에서 계속 사육하였을 때 보다 1.0×10^7 PIBs/ml에서 1일 정도 길어진다고 한 결과(Choi *et al.*, 1996)와는 일치하였다. 이상의 결과에서와 같이 바이러스의 활성은 32°C에서 가장 높았는데 과밤나방이 고온성 해충이므로 포장에

서 미생물 살충제로 사용이 가능할 것으로 생각되어진다.

Table 7. Values of lethal time (LT₅₀) of SeNPV against 2nd, 3rd and 4th instar of *S. exigua* at 32°C

Instars	Concentrations (PIBs/ml)	LT ₅₀ (95%CL)	LT ₉₅ (95%CL)
2nd	1.0×10 ⁶	3.7 (2.9~4.4)	7.5 (6.1~11.1)
	1.0×10 ⁵	4.2 (3.4~4.9)	7.4 (6.2~10.5)
	1.0×10 ⁴	4.7 (4.0~5.4)	9.7 (8.1~13.4)
	1.0×10 ³	4.7 (3.8~5.6)	9.8 (7.6~18.0)
	1.0×10 ²	5.6 (5.1~9.0)	13.6 (11.3~19.4)
	1.0×10	7.6 (6.4~9.3)	18.2 (13.3~22.4)
3rd	1.0×10 ⁶	3.9 (3.1~4.8)	7.6 (6.1~9.9)
	1.0×10 ⁵	4.2 (3.3~5.8)	8.6 (7.4~11.6)
	1.0×10 ⁴	4.9 (4.1~6.4)	9.8 (7.8~15.3)
	1.0×10 ³	5.0 (4.2~7.0)	12.7 (9.6~18.7)
	1.0×10 ²	5.9 (4.8~7.4)	13.6 (10.2~20.4)
	1.0×10	8.9 (6.9~11.0)	17.5 (12.7~21.5)
4th	1.0×10 ⁶	4.4 (3.8~5.0)	9.8 (8.4~12.5)
	1.0×10 ⁵	4.8 (3.8~5.8)	12.1 (9.5~20.9)
	1.0×10 ⁴	5.8 (4.8~7.1)	16.6 (12.1~23.1)
	1.0×10 ³	7.2 (6.2~8.5)	18.6 (14.2~30.3)
	1.0×10 ²	8.3 (6.7~10.9)	19.8 (13.9~41.2)
	1.0×10	9.9 (8.4~13.8)	26.7 (17.4~78.2)

제10절 핵다각체병바이러스 포장 검정 및 살포효과 증진 물질 선발

1. 서 언

파밤나방(*Spodotera exigua*)은 기주범위가 넓어 채소, 화훼, 과수 등의 40과 200여종에 달하는 것으로 알려져 있고 국내에서도 최근 과, 배추, 수박 등에 발생하여 피해가 심한 것으로 보고되었으며, 1986년에 전남 진도에서 피해가 확인된 이후 1988년부터는 전국적으로 피해가 확산되어 발작물, 채소 등 50여종의 작물을 가해하여 극심한 피해를 주고 있다. 특히 3령 유충 이후에는 살충제에 대한 저항성이 강하여 방제가 어려운 해충으로 구분하고 있다.

최근까지 다른 해충과 마찬가지로 파밤나방도 화학적 방제가 주를 이루고 있었으나 약제에 대한 저항성으로 방제가 어려워 재배작물이 큰 피해를 입을 뿐 아니라 저항성해충의 출현, 인축이나 동식물에 대한 직·간접적인 피해와 잔류성으로 인한 환경오염 및 생태계 파괴 등의 심각한 문제를 야기 시키고 있다. 이를 해결하기 위한 방안중 하나로 생물적 방제법을 도입하여 화학적 방제의 보완 또는 대체수단으로서 종합적 해충방제 체계 확립에 연구의 초점을 집중시키고 있으며 그 중에서도 곤충 질병을 일으키는 세균, 바이러스, 사상균, 원생동물 등 해충의 방제에 큰 비중을 두고 있다. 이중에서 미생물 바이러스는 기주곤충에 대한 특이성이 높아, 농작물이나 산림해충 방제에 효과적이어서 이미 일부 선진국에서는 살충제가 상품화되고 있다.

국내에서는 파밤나방 핵다각체병바이러스를 이용하여 실제 포장에 이용할 수 있는 방제체계가 이루어지고 있지 않은 실정이다. 따라서 본 시험은 진라남도 농업기술원에서 자체 생산한 파밤나방 핵다각체병바이러스를 이용해서 파밤나방을 대상으로 유묘와 포장에서 이용 가능성을 검정코자 노지와 비닐하우스를 대상으로 실시하였다. 또한 제형화를 위한 바이러스의 안정화 물질을 선발하여, 초기 살충율을 향상시키고자 수행하였다.

2. 재료 및 방법

가. 과밤나방 증식

과밤나방(*Spodoptera exgua*)은 포장에서 유충을 채집하여 Im *et al.*(1988)이 사용한 인공사료 조성중에서 강낭콩 분말 대신 국내에서 많이 재배되고 손쉽게 구입 할 수 있는 콩 분말로 변경하여 사용하였다. 채란을 위하여 암수 20~30개의 번데기를 유산지로 만든 삼각통(가로 50, 세로 30, 높이 30 cm)에 넣고 성충으로 우화시켰으며, 유산지 통안에 10% 설탕물을 공급하여 산란을 유도하였다. 교미한 암컷 성충이 산란한 부분의 유산지를 난과 함께 떼어내어 인공사료(5±0.2 g) 위에 난피를 접종하여 플라스틱 용기(20×12×12 cm)내에서 2령까지 사육하였다. 3령부터는 cannibalism을 막기 위하여 개체 사육용기(4×4×3 cm)에 1마리씩 넣고 4~5일 간격으로 인공사료가 마르면 교체하면서 번데기가 될 때까지 사육하였다. 한편 사육곤충의 활력을 유지하고 퇴화를 막기 위해 10세대 이상 누대 사육한 개체는 wild type과 교미시켰으며, 사육조건은 온도 25±2℃, RH 65%, 광주기 16L : 8D이었다.

나. 핵다각체병바이러스 증식

과밤나방 핵다각체병바이러스(SeNPV)는 포르말린을 넣지 않은 인공사료(5±0.2 g) 표면에 500 μ l의 바이러스를 처리한 후 1시간 정도 음건시켜 개체 사육용기(4×4×3 cm)에 넣고 4령 유충이 완전히 섭식하게 한 후 사육하면서 죽은 유충을 수확하였다. Im *et al.*(1989)의 방법에 따라 수확한 이병충에 10배(v/w)의 0.01% SDS 용액을 가하여 마쇄한 후 이중 거즈로 여과하고 1,000 rpm으로 5분 동안 원심분리하여 유충의 찌꺼기를 제거한 후 2~3회 3,000 rpm의 저속 원심분리와 40~65% 설탕 밀도구배 원심(25,000 rpm, 60 min.)으로 다각체를 순화시켜 바이러스 농도가 1.0×10⁹ PIBs/ml 되도록 조제하였다. 이 바이러스 용액을 -20℃ 냉동고에 보관하면서 사용하였다.

다. 유묘검정

포트에 강낭콩을 식재하여 20일이 경과한 뒤에 포트당 파밤나방 난괴(난 20~30개)를 2개씩 접종하여 한냉사로 망실을 만든 후 노지와 비닐하우스에서 부화 후 7일째에 사전에 밀도를 조사한 후 바이러스를 1.0×10^4 , 10^6 , 10^8 polyhedral inclusion bodies(PIBs)/ml 농도와 전착제인 TritonX-100(0.1%)를 혼합하여 농도 별로 살포하여 매일 일정한 시간에 사충율을 조사하였다. 처리당 10마리씩 10반복 실시하였으며 유묘검정 결과는 분산분석과 Duncan의 다중검정(SAS Institute, 1988)으로 비교하였다.

라. 포장검정

바이러스 살충제의 살충효과는 전라남도 나주에서 PVC하우스와 노지포장에서 국화를 대상으로 2003년 8월 15일부터 10월15일에 걸쳐 수행하였다. 시험구는 $5 \times 1.8 \times 1.5$ m 크기의 한냉사로 망실을 만들어 유충의 이동을 방지하였고 대조구로는 무처리와 바이러스 현탁액을 살포하였다. 망실당 파밤나방 난을 150개씩 접종한 후 부화후 10일째에 바이러스 농도 1.0×10^6 , 10^7 , 10^8 PIBs/ml가 되도록 10a당 100ℓ 양으로 희석한 후 전착제인 Triton X-100 0.1%를 첨가하여 1.5ℓ 용량의 분무기로 잎의 표면과 이면에 동시 살포하였으며 매일 일정한 시간에 사충수를 조사하였고 5반복 실시하였다

마. 바이러스 살포효과 증진 물질 선발

핵다각체병바이러스(nucleopolyhedrovirus)를 안정화시킬 수 있는 물질을 선발하기 위하여 국내에서 사용되고 있는 New white 4종(CA, CB, CE, ERN)과 Tinopal -UNPA-GX, Fluostain I 을 바이러스와 혼합하여 인공사료에 각각 1,000ppm을 도포하여 반수치사시간(LT₅₀)과 유충의 성장량을 조사하였다. 위의 실내 검정법에 준하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 핵다각체병바이러스 유묘검정

비닐하우스와 노지에 포트에 식재하여 재배하고 있는 강낭콩 잎에 파밤나방 난괴(난 20~30개)를 주당 2개씩 집중하여 부화한 후 정착한 유충에 대하여 7일째에 핵다각체병바이러스를 농도별로 살포한 결과, LT_{50} 은 노지에서 1×10^6 PIBs/ml에서는 5.96일 1×10^8 PIBs/ml에서는 4.91일이었고, 비닐하우스는 1×10^6 PIBs/ml에 5.84일, 1×10^8 PIBs/ml에서는 4.86일로 농도가 높을수록 짧아지는 경향이었다(Table 1).

Table 1. Values of lethal tim(LT_{50}) of *S. exigua* treated SeNPV on the kidney bean seedling in open field and PVC house

Cultural pattern	Concentrations	$LT_{50}(95\%CL)$	$LT_{95}(95\%CL)$
Open Field	NPV 1×10^6 PIBs/ml	5.91(4.74~6.55)	9.55(8.96~11.24)
	NPV 1×10^7 PIBs/ml	5.34(4.07~5.68)	7.16(6.09~9.53)
	NPV 1×10^8 PIBs/ml	4.96(4.28~5.45)	6.91(6.89~8.23)
PVC house	NPV 1×10^6 PIBs/ml	5.84(4.38~7.45)	8.96(7.19~10.51)
	NPV 1×10^7 PIBs/ml	5.09(4.27~6.40)	7.11(6.12~8.57)
	NPV 1×10^8 PIBs/ml	4.86(4.00~5.75)	6.72(5.99~8.77)

누적 살충율은 노지재배에서 1×10^7 , 10^8 PIBs/ml 농도에서는 4일째부터 급격히 증가하기 시작하여 10일째에 90% 이상의 살충율을 보였으나 1×10^6 PIBs/ml에서는 살충율이 떨어져 포장살포 농도로는 부적당할 것으로 생각된다(Fig. 1). 비닐하우스에서도 노지에서와 같은 살충율을 보였다(Fig. 2).

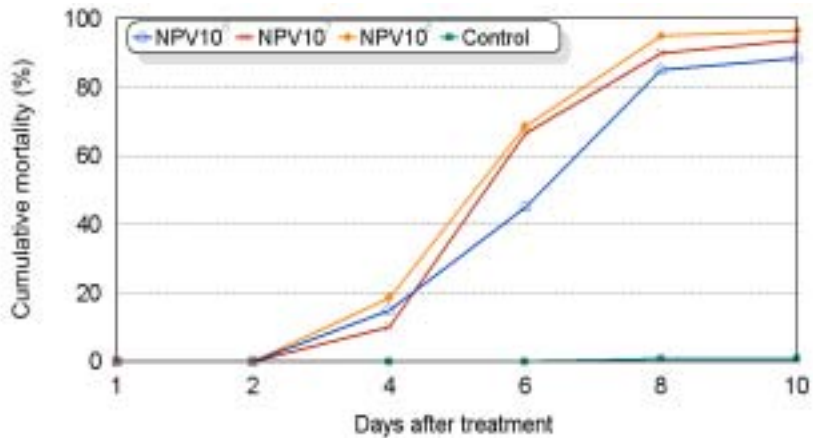


Fig. 1 Cumulative mortality of *S. exigua* after spray of SeNPV on the kidney bean seedling in the field

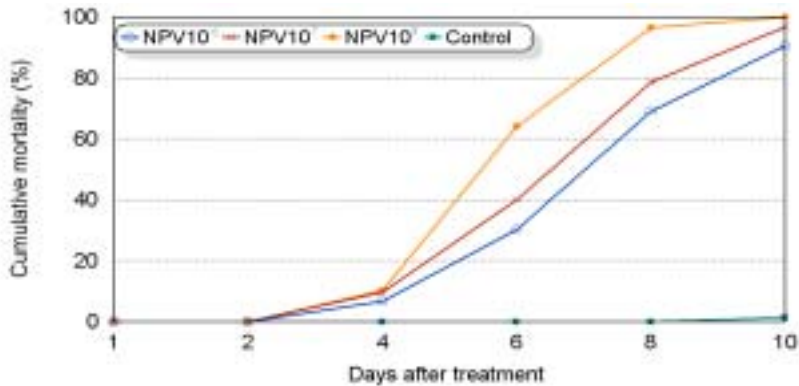


Fig. 2. Cumulative mortality of *S. exigua* after spray of SeNPV on the kidney bean seedling in the greenhouse

나. 핵다각체병바이러스 포장검정

국화가 재배되고 있는 노지포장과 PVC하우스에 5×1.8×1.5m 크기의 한냉사로 망실을 만들어 유충의 이동을 방지하였다. 핵다각체병바이러스에 전착제인 Triton X-100을 0.1% 첨가하여 살포하였을 때 노지포장에서 LT_{50} 은 1×10^8 PIBs/

ml에서는 7.1일인 반면 1×10^6 PIBs/ml 에서는 9.8일로 약 3일 정도 길어졌으며, LT_{95} 도 15.7일과 20.4일을 보여 바이러스 농도가 높을수록 살충시간이 짧아졌다. PVC하우스에서도 노지포장과 같은 경향을 보였다(Table 2).

Table 2. Values of lethal tim(LT_{50}) of *S. exigua* treated SeNPV on the chrysanthemum in open field and PVC house

Cultural pattern	Concentration	$LT_{50}(95\%FL)$	$LT_{95}(95\%FL)$
Open field	1×10^6 PIBs/ml	9.8(7.6~13.5)	20.4(14.1~30.5)
	1×10^7 PIBs/ml	7.4(7.71~8.45)	17.9(12.6~22.8)
	1×10^8 PIBs/ml	7.1(7.39~8.04)	15.7(10.3~19.9)
PVC house	1×10^6 PIBs/ml	9.4(7.5~11.3)	18.5(14.1~26.4)
	1×10^7 PIBs/ml	7.2(5.9~9.2)	16.6(12.3~19.2)
	1×10^8 PIBs/ml	6.5(5.2~8.6)	15.2(14.6~18.8)

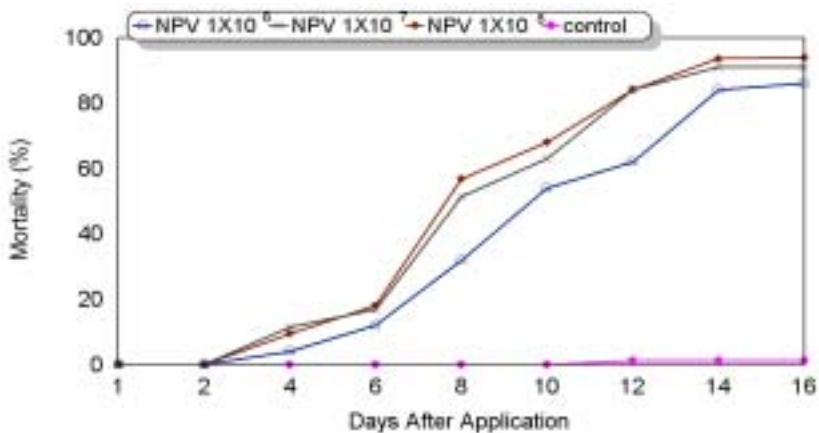


Fig 3. Cumulative mortality of *S. exigua* after spray of SeNPV on the chrysanthemum in the PVC house

노지포장과 PVC하우스에 재배되고 있는 국화에 핵다각체병바이러스 농도별로 살포하였을 때 바이러스에 의한 사충은 처리 후 4일째부터 나타나기 시작하여 16일까지 계속되었다(Fig. 3, 4).

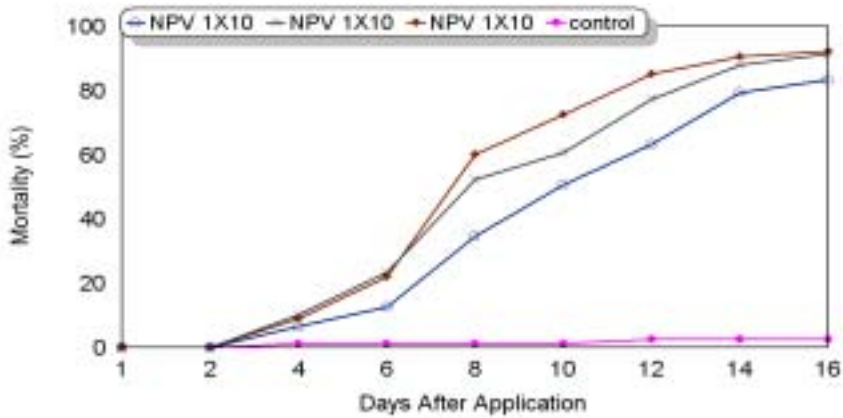


Fig. 4. Cumulative mortality of *S. exigua* after spray of SeNPV on the chrysanthemum in the open field

최종 방제가는 노지 포장에서 1×10^8 PIBs/ml이 92%, PVC하우스에서는 1×10^7 PIBs/ml이 94%로 가장 높았으나 다른 처리와 통계적인 유의차가 없었다(Table 3). 이러한 경향으로 보아 노지포장과 하우스포장에서 1×10^8 PIBs/ml 농도로 처리하면 파밤나방을 방제할 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 파밤나방 핵다각체병 바이러스(SeNPV)는 살포 후 4일째부터 살충효과가 나타나고 죽기 직전까지 섭식활동을 계속하므로 바이러스 살포 후에 초기 살충율을 높이는 방법과 자외선에 의해 병원활성을 파괴되기 때문에 바이러스의 활성을 지속시키는 것이 중요하다. 이를 위해서는 핵다각체병 바이러스의 병원성에 영향을 미치지 않고 초기 살충율을 높이고 활성을 장기간 유지 시킬 수 있는 부가제를 첨가하여 제형화하여야 할 것으로 생각되어진다.

Table 3. Protection value of *S. exigua* after spray of SeNPV on the chrysanthemum in the open field

treatment	protection value (%)	
	field	PVC house
1.0×10 ⁶ PIBs/ml	83.4 b ¹⁾	86.0 a ¹⁾
1.0×10 ⁷ PIBs/ml	91.4 ab	91.2 a
1.0×10 ⁸ PIBs/ml	92.3 a	92.3 a
control	-	-

¹⁾ Means with each column followed by the same letter are not significantly different(p=0.05, Duncan's multiple range test [SAS Institute, 1988]).

다. 바이러스 살포효과 증진 물질 선발

Table 4. Values of lethal tim(LT50) of *S. exigua* treated SeNPV with fluorescent brightener on artificial diet

Treatment	LT ₅₀ (95% CL)	LT ₉₅ (95% CL)
NPV 1×10 ⁵ PIBs/ml + CA ¹⁾	5.05(4.56~5.44)	7.32(6.67~9.81)
NPV 1×10 ⁵ PIBs/ml + CB ²⁾	5.52(5.10~5.99)	8.11(7.15~10.66)
NPV 1×10 ⁵ PIBs/ml + CE ³⁾	5.53(5.07~6.05)	8.48(7.33~11.81)
NPV 1×10 ⁵ PIBs/ml + ERN ⁴⁾	4.86(4.51~5.18)	6.52(5.97~7.70)
NPV 1×10 ⁵ PIBs/ml + T ⁵⁾	4.39(4.03~4.68)	5.70(5.25~6.73)
NPV 1×10 ⁵ PIBs/ml + F ⁶⁾	4.25(3.94~4.57)	5.81(5.28~6.96)
NPV 1×10 ⁵ PIBs/ml	5.25(4.88~5.63)	7.32(6.61~8.95)

¹⁾ CA : NEW white CA ²⁾ CB : NEW white CA ³⁾ CE : NEW white CA

⁴⁾ ERN : NEW white CA ⁵⁾ T : Tinopal-UNPA-GX ⁶⁾ F : Fluostain I

핵다각체병바이러스(nucleopolyhedrovirus)는 태양자외선에 의하여 급격히 불활성화되기 때문에 제형화를 위해서는 필수적으로 바이러스를 안정화시킬 수 있

는 물질의 선발이 필요하다. 새로운 바이러스 안정화 물질로서 형광표백제 (fluorescent brightner)는 LC_{50} 을 감소시키고 바이러스를 보호 잔존활동을 향상시켰다는 보고가 많아 국내에서 사용되고 있는 New white 4종, Tinopal-UNPA-GX와 Fluostain I 을 바이러스와 혼합하여 유묘 검정을 한 결과 Tinopal-UNPA-GX와 Fluostain I 은 바이러스 원액 살포가 5.25일에 비하여 4.39일, 4.25일로 LT_{50} 이 1일 정도 단축되었다. 그러나 국내에서 사용되고 있는 New white 계통은 ERN만 4.86일로 약간 단축되었으며 다른 종들은 차이가 없었다 (Table 4).

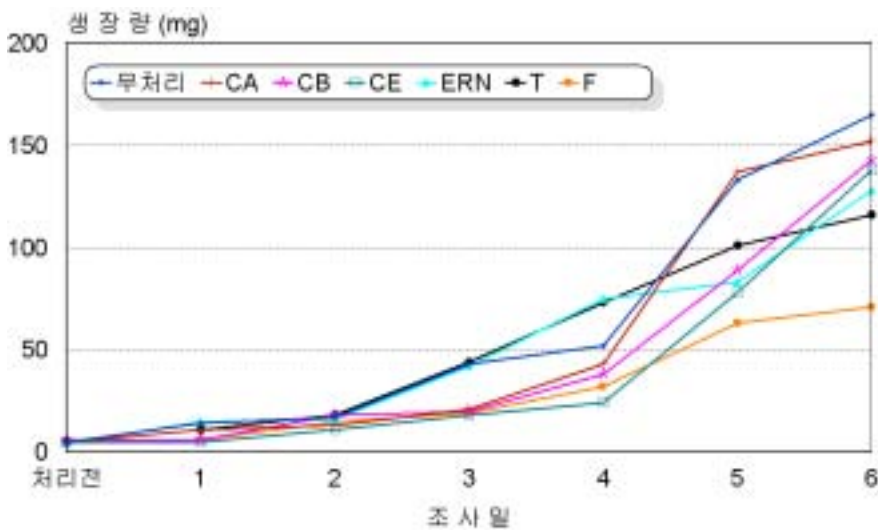


Fig. 5 Growth of *S. exigua* treated fluorescent brightener on artificial diet

- 1) CA : NEW white CA 2) CB : NEW white CA 3) CE : NEW white CA
 4) ERN : NEW white CA 5) T : Tinopal-UNPA-GX 6) F : Fluostain I

형광표백제의 효과를 보기 위하여 인공사료에 표백제별로 처리하여 파밤나방에 섭식을 시킨 결과 모두 무처리에 비하여 생육이 약간 떨어지는 경향이었으나 Fluostain I 이외에는 별 차이가 없고 사충도 일어나지 않아 자체적으로는 살충력을 가지고 있지 않은 것으로 판단되었다 (Fig. 5)

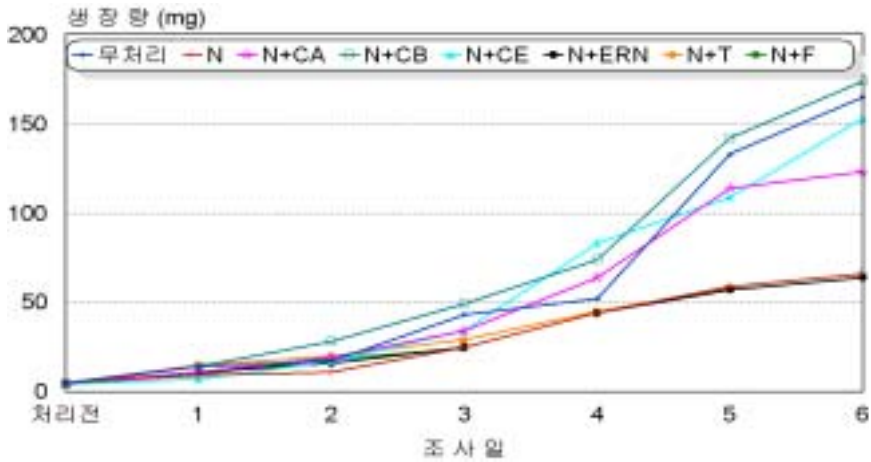


Fig. 6. Growth of *S. exigua* treated SeNPV with fluorescent brightener on artificial diet

- ¹⁾ N : NPV ²⁾ N + CA : NPV + NEW white CA ³⁾ N + CB : NPV + NEW white CA
⁴⁾ N + CE : NPV + NEW white CA ⁵⁾ N + ERN : NPV + NEW white CA
⁶⁾ N +T : NPV + Tinopal-UNPA-GX ⁷⁾ N + F : NPV + Fluostain I

또한 바이러스와의 혼합에서의 파밤나방 성장량을 보기 위하여 각 처리별로 도포한 결과 Tinopal-UNPA-GX와 Fluostain I 은 바이러스 단독처리보다 생육이 떨어졌으며, New white 계통 중 ERN만 바이러스 단독 비슷하였다. 다른 New white 계통은 바이러스 단독처리보다도 생육이 더 잘되어 바이러스를 억제하는 것으로 생각 되어진다(Table 6)

제11절 SeNPV가 파밤나방(*Spodoptera exigua*)에 감염된 후 과발현된 IAP, Serpin, 과 SOCS 유전자에 관한 연구

1. 서 언

파밤나방은 백합과 작물뿐만 아니라 십자화과, 박과 등 다양한 종류의 채소류, 화훼류, 약초류와 잡초까지 가해하는 광식성 해충으로, 노지에서 연 4-5회 발생한다. 특히 전남, 제주, 부산 그리고 경남지역의 시설채소 및 화훼단지에서는 연중 피해가 많다. 최근까지 파밤나방의 방제는 화학적 방제가 주를 이루고 있으나 약제 저항성으로 방제가 어려워 재배작물이 큰 피해를 입을 뿐 아니라 저항성 해충의 출현 인축이나 동식물에 대한 직, 간접적인 피해와 잔류성으로 인한 환경오염 및 생태계 파괴 등의 심각한 문제를 야기 시키고 있다. 이를 해결하기 위한 방안의 하나로 생물적 방제법을 도입하여 화학적 방제의 보완 또는 대체수단으로서 종합적 해충방제 체계 확립에 연구의 초점을 집중시키고 있다.

그 중에서도 곤충 질병을 일으키는 세균, 바이러스, 사상균, 원생동물 등 해충의 방제에 큰 비중을 두고 있다. 이 중에서 미생물 바이러스는 기주 곤충에 대한 특이성이 높아 농작물 해충 방제에 효과적이다. 하지만 미생물 바이러스의 하나인 NPV(Nucleo polyhedrosis virus)가 숙주 곤충인 파밤나방의 면역 및 방어체제와 어떠한 상호작용을 하는 지, 또한 어떤 기작으로 파밤나방을 죽이는지에 대해서는 아직까지 알려진바 없다. 본 연구에서는 SeNPV가 파밤나방에 침입한 후 과발현되는 IAP, Serpin, 그리고 SOCS을 연구 하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 파밤나방의 SOCS과 Serpin 유전자 클로닝

파밤나방으로부터 SOCS과 Serpin유전자를 cloning하기 위하여 homology가 가장 높은 부분을 이용하여 degenerate primer를 design하였다. PCR기법을 이용하여 cDNA를 증폭시켰으며, 증폭된 PCR product를 TOPO TA cloning vector

(invitrogen) 에 ligation한 후 Top10 cell에 형질 전환을 시켰다. 여기서 나온 positive colony에서 plasmid를 뽑아 sequencing을 하였다. Sequencing 된 cDNA sequence를 blast search를 이용하여 각 유전자를 확인하였다. 또한 clustalX를 이용하여 multiple alignment를 수행하였다.

나. 과밤나방의 SOCS과 Serpin 의 발현 양상 조사

NPV 감염에 의한 유전자의 발현양상을 알아보기 위하여 RT-PCR 을 수행하였다. *S. exigua*에 NPV를 감염시킨 후 4시간, 8시간, 12시간의 sample collection 을 한 것과 면역 유발 물질인 laminarin을 injection하고 4시간, 8시간, 12시간, 24시간의 sample을 collection 하였다. Total RNA를 분리하기 위하여 RNeasy mini kit(Qiagen)을 사용하였으며, RT-Premix(Bioneer)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. Actin 유전자를 이용하여 농도를 맞춘 후 SOCS 및 Serpin 유전자의 양상을 확인하였다.

다. SOCS protein 의 pRSET expression vector에 클로닝

pRSET expression을 하기 위하여 SOCS의 enzyme sites (BglIII & KpnI)를 넣은 expression primers를 design 하였다. PCR을 이용하여 TA vector에 cloning을 한 후 plasmid DNA를 분리하였다. 분리된 plasmid DNA를 pRSET vector와 ligation 시킨 후 'Top10F' cell에 넣어 plasmid DNA를 분리하여 sequencing을 수행하였다. 확인된 sequence를 분석하여 inframe에 mutation이 없는지를 확인하였다. 확인된 plasmid DNA를 BL21 cell에 다시 형질 전환을 시켰으며, 일부를 stock시킨 후 IPTG를 넣어SOCS protein을 과다 발현 시켰다 SOCS Protein induction 시킨 후 2hr, 4hr, 6hr sample 을 모아 12% SDS gel에 확인하고, 이것을 PVDF membrane에 transfer 한 후 5% BSA에 16시간 blocking 시킨 후 primary 항체 (AntiXpress antibody)를 3시간 RT 에서 incubation 시켰다. 3번의washing 후에 alkaline phosphatase-conjugated 2차 항체를 이용하여 RT 에서 1시간 동안 incubation 시켰다. 3번의 washing 후에 BCIP/NBT 용액을 이용하여 반응 시켰다.

3. 결과 및 고찰

가. IAP-2 (Inhibitor of apoptosis-2) 단백질의 재조합 단백질 생산

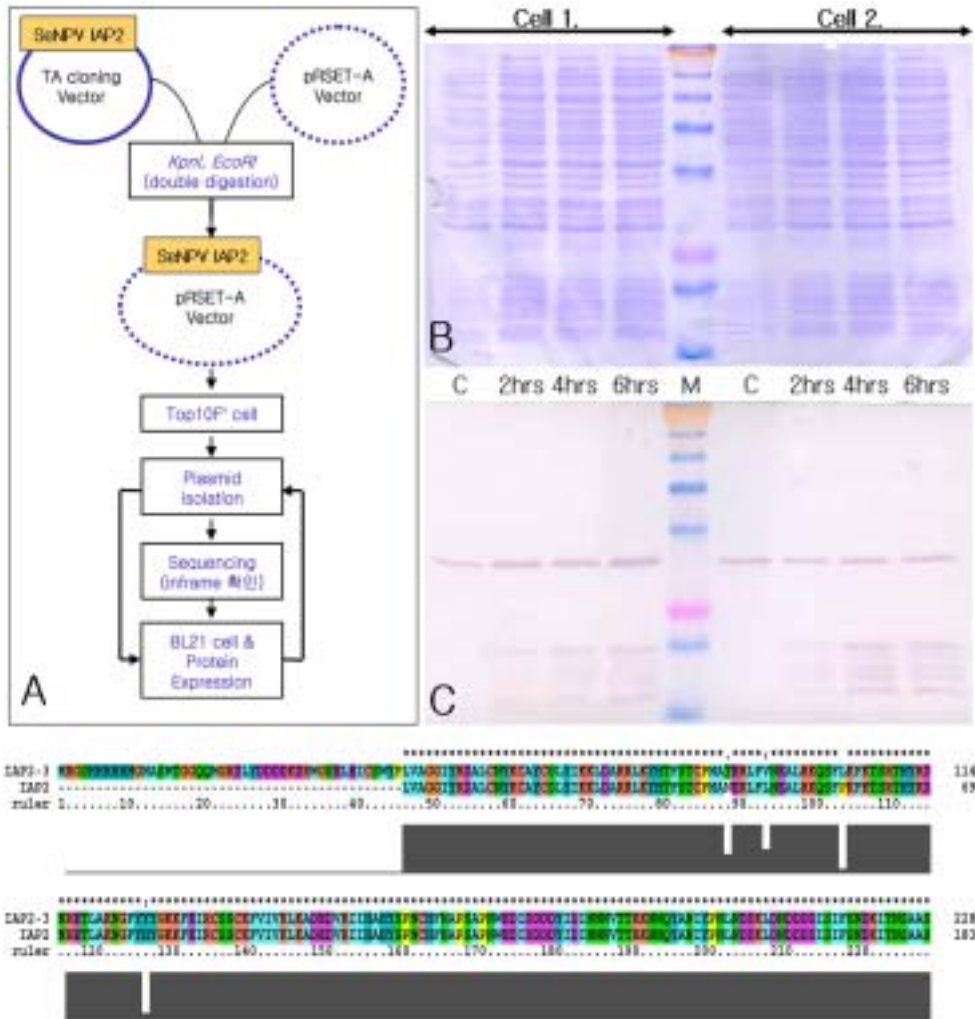


Fig. 1. A. Illustrated view to clone and express the recombinant SeNPV-IAP2 protein in *E. coli*. B. IPTG induction of SeNPV-IAP2 protein in 12% SDS-PAGE. C. Western blot analysis of SeNPV-IAP2 protein. His-tag antibody detected the heterologously expressed protein in *E. coli*, which is 25 kDa.

2차년도 보고서에서 IAP 단백질을 기초하여 만든 Peptide antibody를 갖고 실험한 결과가 좋지 않았다. 이는 Peptide antibody의 항체 특이성에 문제가 있다

고 생각되었다. 이후 본 연구 목표를 완성하기 위한 일환으로 SeNPV의 IAP-2유전자를 TA cloning vector에 cloning하였다. 그 후 재조합 단백질을 만들기 위하여 KpnI과 EcoRI를 이용하여 다시 pRSET expression vector에 클로닝 하였다 (Fig. 1의 A 참조). Fig. 1의 과정을 이용하여 대장균에서 SeNPV-IAP2 단백질을 발현시켰다. 그 후 발현된 단백질 중 재조합단백질을 확인하기 위하여 12% SDS-PAGE 분석과 Western blotting을 하였다. AntiXpress antibody (Invitrogen)을 이용하여 SeNPV-IAP2 단백질을 확인하였다. 현재 Affinity column을 이용하여 정제하고 있으며 정제된 IAP2 단백질을 토끼에 complete adjuvant와 함께 주사하여 항체를 만들고자 한다.

나. SeNPV의 감염에 유도되는 Serpin 단백질에 대한 연구



Fig. 2. Se-Serpin의 partial amino acid sequence

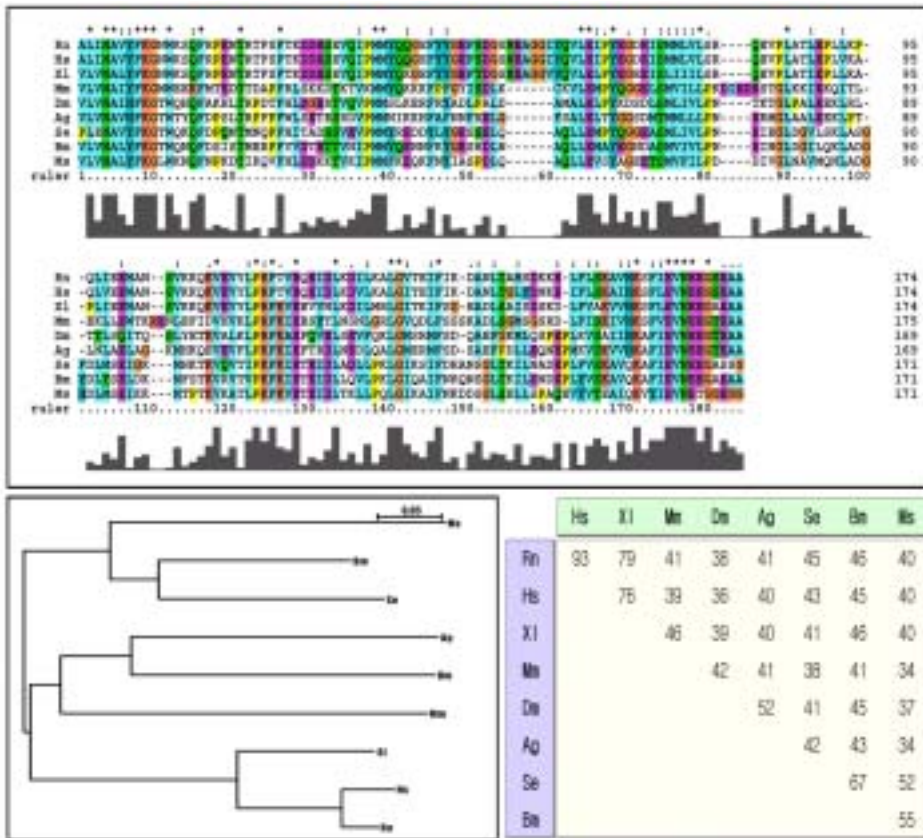


Fig. 3. **A.** An aligned amino acid sequences of Se-serpin and other related serpin. **B.** Dendrogram of serpin protein from several species. **C.** Percentage identity (%) of amino acid sequences among serpins. Ag; *Anopheles gambiae* (42%), Bm; *Bombyx mori* (67%), Dm; *Drosophila melanogaster* (41%), Hs; *Homo sapiens* (43%), Ms; *Manduca sexta* (38%), Mm; *Mus musculus* (38%), Rn; *Rattus norvegicus* (45%), and XI; *Xenopus laevis* (41%).

1) Se-Serpin multiple alignmen

TA Cloning 한 후 plasmid DNA를 뽑아 Sequencing 한 결과 514bp의 cDNA sequence를 얻었다(Fig. 2). Blast search를 통하여 serpin 유전자임을 확인하였다. 다른 종간의 유사도를 확인하기 위하여 amino acid로 전사시켰으며, blastp search를 통하여 다른 종의 amino acid를 얻었다. Multiple alignment결과 *Anopheles gambiae* (42%), *Bombyx mori* (67%), *Drosophila melanogaster*

(41%), *Homo sapiens* (43%), *Manduca sexta* (52%), *Mus musculus* (38%), *Rattus norvegicus* (45%), *Xenopus laevis* (41%)의 유사성을 가지고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 추후 full length의 cDNA를 얻기 위하여 library를 제작하여 screening할 계획이다.

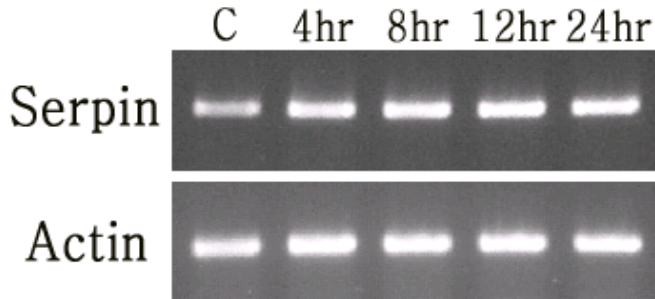


Fig. 4. Induction pattern of Se-serpin after laminarin injection

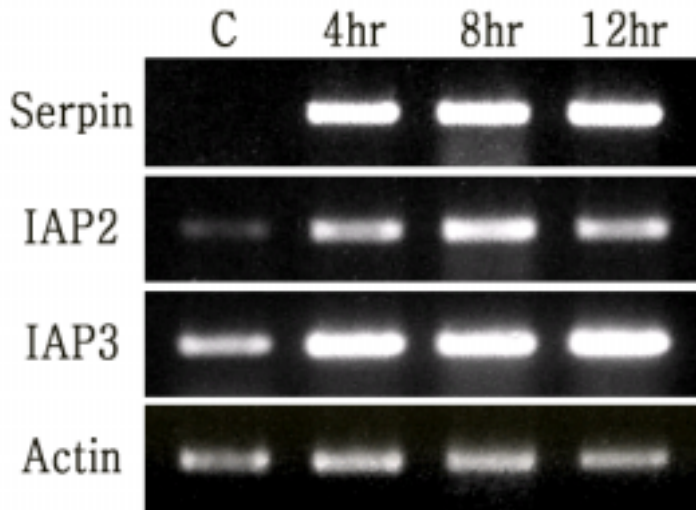


Fig. 5. Up-regulation of Se-serpin, SeNPV-IAP2 and SeNPV-IAP3 after SeNPV infection.

2) RT-PCR analysis

과밤나방 유충에 면역 반응을 일으키는 물질인 laminarin을 injection 시킨 후 serpin 유전자의 발현 양상을 확인한 결과 Control에 비하여 증가하는 것을 확인할 수 있었지만 그 반응 정도는 강하지 않았다 (Fig. 4). 추후 LPS, CpG, LTA와 같은 다양한 면역 유도 물질을 과밤나방 유충에 감염 시킨 후 Serpin 유전자의 발현 패턴을 확인할 계획이다.

과밤나방에만 특이적으로 침입하는 SeNPV를 유충에 감염시킨 후 SeNPV에서 발현되는 IAP(inhibitor of apoptosis) 유전자를 RT-PCR 기법을 이용하여 확인하였다. RT-PCR 결과 IAP와 serpin 모두 시간에 지날수록 증가하는 양상을 띄고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 5). 현재 SOCS 유전자의 antibody를 생산하고 있으며, 이를 이용하여 NPV와 SOCS 유전자의 상호작용을 규명하고자 한다.

다. SeNPV의 감염에 유도되는 SOCS단백질에 대한 연구

Spodoptera exigua SOCS Amino acid sequence

1	F	Y	W	G	K	M	D	R	Y	E	A	E	R	L	L	D	N	K	P	E	20
21	G	T	F	L	L	R	D	S	A	Q	E	E	H	L	F	S	V	S	F	R	40
41	K	Y	G	R	S	L	H	A	R	I	E	H	Y	Q	H	R	F	S	F	D	60
61	S	H	D	P	A	V	F	A	A	S	T	Y	T	K	L	I	E	H	Y	K	80
81	D	P	A	C	V	M	F	F	E	P	M	L	T	A	P	L	P	R	S	E	100
101	P	F	S	L	Q	Q	L	A	R	A	V	I	V	S	H	T	S	Y	D	G	120
121	V	E	K	L	P	L	P	P	R	L	R	L	Y	L	K	E	Y	H	Y		140

Fig. 6. Se SOCS 의 patial amino acid sequence

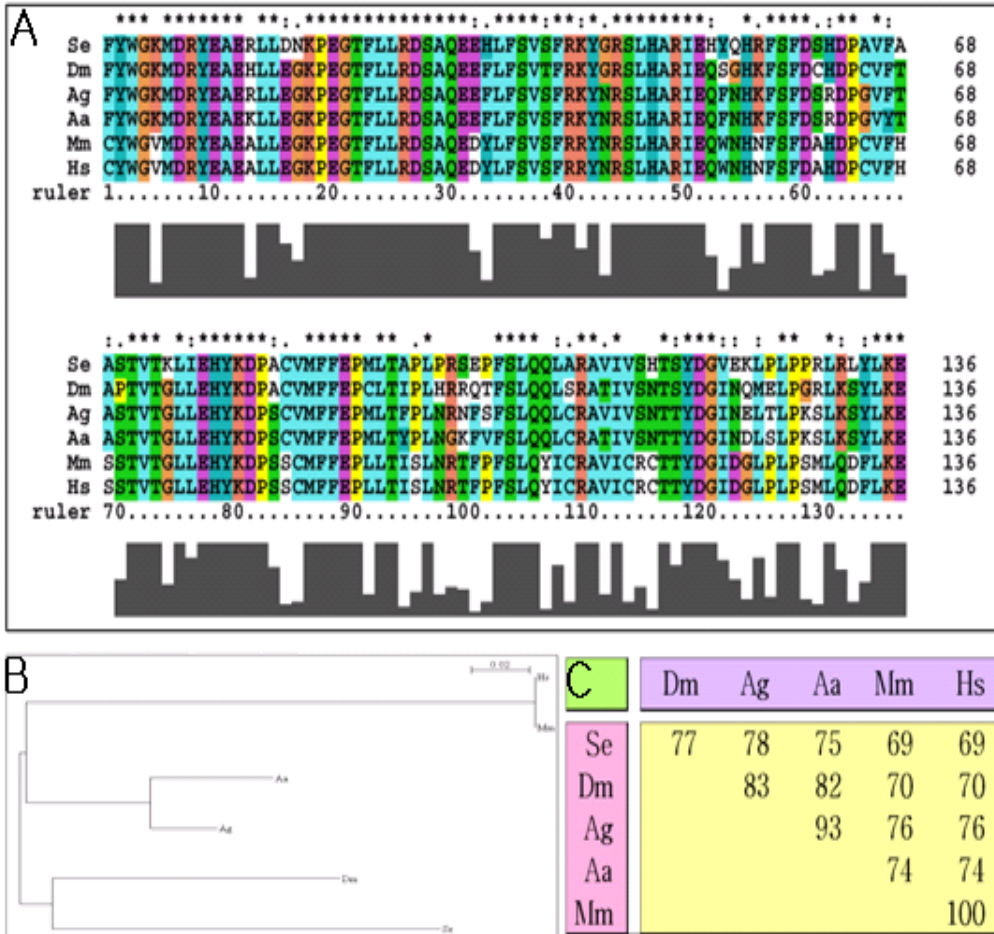


Fig. 7. **A.** An aligned amino acid sequences of Se-SOCS and other related SOCS. **B.** Dendrogram of SOCS protein from several species. **C.** Percentage identity (%) of amino acid sequences among SOCS. Ag: *Anopheles gambiae* (78%), Aa: *Aedes aegypti* (75%), Dm: *Drosophila melanogaster* (77%), Mn: *Mus musculus* (69%), and Hs: *Homo sapiens* (69%)

1) Se-SOCS multiple alignment

TA Cloning 한 후 plasmid DNA를 뽑아 Sequencing 한 결과 416bp의 cDNA sequence를 얻었다(Fig. 6). Blast search를 통하여 SOCS 유전자의 특징 중 하나인 3' 쪽의 높은 유사성을 가진 SOCS box 의 일부분임을 확인하였다. 다른 종간의 유사도를 확인하기 위하여 amino acid로 전사시켰으며, blastp search를 통하여 다른 종의 amino acid를 얻었다. Multiple alignment 결과 *Anopheles*

gambiae (78%), *Ades aegypti* (75%), *Drosophila Melanogaster* (77%), *Mus musculus* (69%), and *Homo sapiens* (69%)는 70% 의 높은 유사성을 가지고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 7). 추후 full length의 cDNA를 얻기 위하여 library를 제작하여 screening할 계획이다.

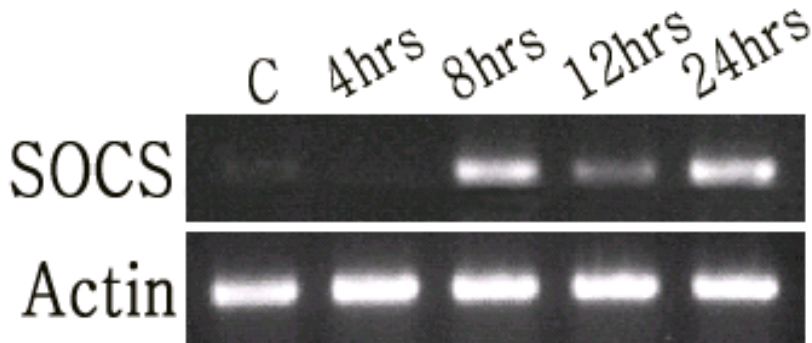


Fig. 8. Temporal induction pattern of SOCS after laminarin injection

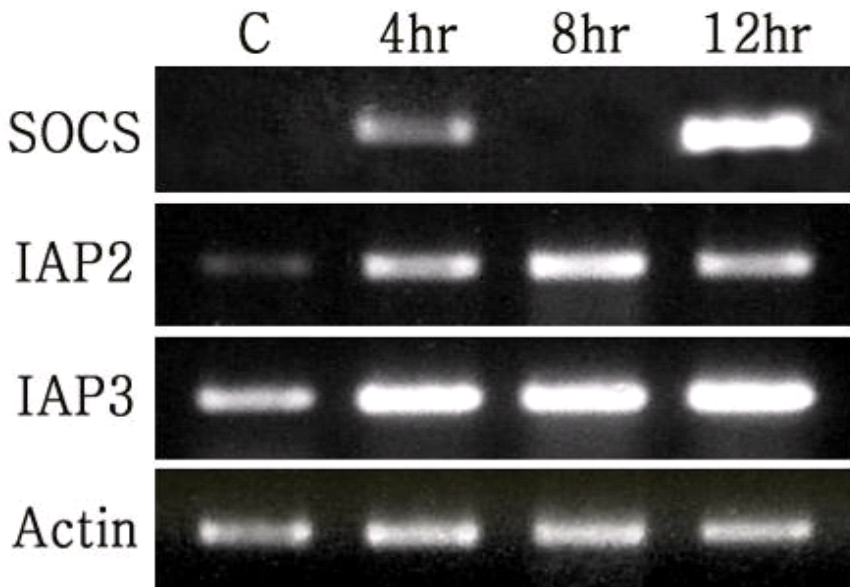


Fig. 9. Up-regulation of SOCS, SeNPV-IAP2 and SeNPV-IAP3 after SeNPV infection.

2) RT-PCR analysis

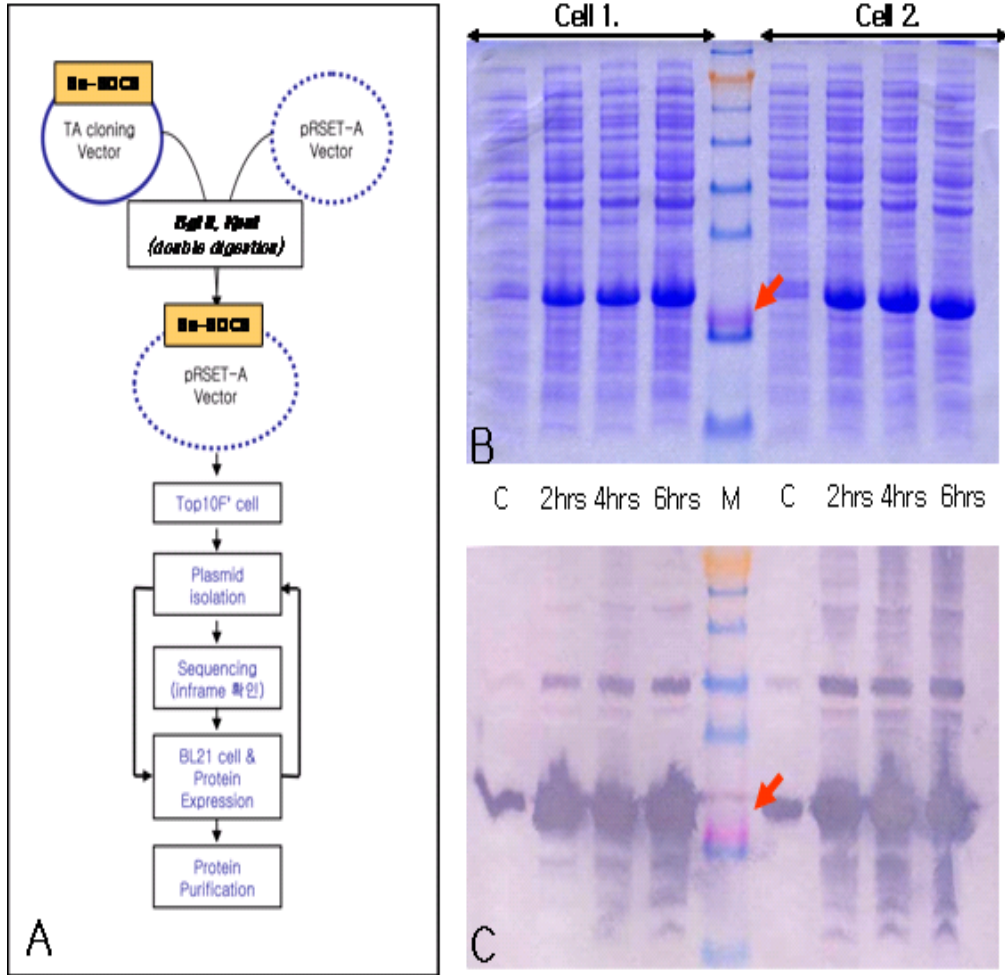


Fig. 10. **A.** Overall view to isolate the recombinant Se-SOCS protein in *E. coli*. **B.** IPTG induction of Se-SOCS protein in 12% SDS-PAGE **C.** Western blot analysis of Se-SOCS protein. His-tag antibody detected the heterologously expressed protein in *E. coli*, which is 20 kDa.

과밤나방 유충에 면역 반응을 일으키는 물질인 Laminarin을 injection 시킨 후 SOCS 유전자의 발현 양상을 확인한 결과 8시간에 급격히 증가하였고, 12시간에는 다소 줄어들다가 24hr에 다시 증가하는 것을 양상을 확인할 수 있었다(Fig.

8). 추후 LPS, CpG, LTA 와 같은 다양한 면역 유도 물질을 파밤나방 유충에 감염 시킨 후 SOCS 유전자의 발현 패턴을 확인할 계획이다.

파밤나방에만 특이적으로 침입하는 SeNPV를 유충에 감염시킨 후 SeNPV에서 발현되는 IAP(inhibitor of apoptosis) 유전자를 RT-PCR 기법을 이용하여 확인하였다. RT-PCR 결과 시간에 지날수록 증가하는 양상을 확인할 수 있었다. 반면에 SOCS 유전자는 4시간째에 증가하였다가 8시간에 감소하였으며 12시간에 다시 급격히 증가 함을 확인하였다(Fig. 9). 현재 SOCS 유전자의 antibody를 생산하고 있으며, 이를 이용하여 NPV 와 SOCS 유전자의 상호작용을 규명하고자 한다.

3) SOCS protein 의 pRSET expression vector에 클로닝

SOCS 유전자를 pRSET A vector에 클로닝 한 후 단백질 발현을 유도 시켜 12% SDS-PAGE에 로딩한 결과 예상사이즈(20kDa)에서 SOCS를 확인하였으며, Western blotting을 통하여 recombinant SOCS protein을 인식하는 polypeptide를 확인할 수 있었다(Fig. 10).

현재 Histag affinity column을 통하여 단백질을 정제한 후 antibody를 생산하고 있으며, 추후 생산된 antibody를 이용하여 SeNPV와 SOCS의 상호작용 관계를 조직학적 방법을 통하여 명확하게 규명하고자 한다.

4. 결과 요약

기주 곤충과 병원균과의 상호관계를 연구하기 위한 일환으로 곤충의 방어체계에 대한 연구가 활발히 연구되어 왔다. 본 연구에서 SeNPV가 파밤나방에 침입한 후 과발현되는 IAP, Serpin 그리고 SOCS5 유전자에 관하여 기초적인 연구를 수행하였다. IAP는 SeNPV가 파밤나방에 침입한 후 초기단계에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. IAP-2와 IAP-3의 mRNA 발현 양상을 RT-PCR방법으로 확인하였다. 그 결과 NPV에 의하여 IAP-2와 IAP-3 전사체가 강력하게 유도 되었다. IAP3 mRNA가 IAP2에 비하여 과다 발현되는 양이 많았다. 최종적으로 IAP2 유전자를 pRSET expression vector에 클로닝하여 대장균에서 과발현 후 항체를 생산하여 IAP와 상호작용하는 단백질을 탐색하고자 한다. 또

한 병원균의 침입에 의하여 선택적으로 과발현되는 Serpin유전자를 클로닝하여 514bp의 partial fragment를 확보하였다. SeSerp인의 아미노산은 누에(67%), 담배나방(52%), 모기(42%), 그리고 초파리(41%)와 유사성을 갖고 있다. Serpin 또한 NPV와 laminarin에 의하여 강력하게 유도되었다. 끝으로 Jak-STAT 신호전달체계에 negative feedback regulator로 작용하는 SOCS유전자를 클로닝하여 분석한 결과 초파리(77%), 말라리아모기(78%), 뇌염모기(75%) 그리고 사람(69%)과 각각 높은 유사성을 보여 주었다. SeNPV의 감염시 4h and 12h에 유도되었고, 반면에 laminarin에 의하여는 8h와 24h에 각각 유도되었다. 각각의 항체가 만들어지면 공초점 현미경을 통하여 세포내 분포를 조사하고자 한다.

제12절 파밤나방 핵다각체병바이러스 제형화

1. 서 언

생물농약의 경우 안정적인 약효를 갖는 화학농약에 비해 살아있는 활성을 유지시켜야 하기 때문에 제형의 중요성은 매우 크다고 할 수 있다. 특히 본 연구의 활성성분인 NPV의 경우 제형에 따라 포장에서 나타나는 활성의 차이가 크게 나타날 수 있으므로 정밀한 제형화시험이 요구되는 분야이다. 하지만 현재까지 화학농약에서처럼 체계적인 제형화 연구가 진행되지 않고 단편적인 연구결과만 발표되고 있다. 그래서 본 연구팀에서는 기존 화학농약에서 정립된 제형을 바탕으로 기초 제형화연구에서 부터 다양한 제형검토를 통하여 본 연구에서 최적의 제형을 선별하게 되었다.

2. 재료 및 방법

가. 기초 제형화

1) 제형화 검토방법

신물질의 제형화 검토를 위해서는 1차적으로 신물질의이화학적 특성에 근거한 검토가능한제형별 이화학적인 특성을 비교 검토하여 선별 가능한 처방을 다양한 계면활성제 및 보조제를 이용하여 연구하고 2차적으로 제형화된 시료들의 약효 및 약해시험 결과와 제형의 특성을 상호 비교하여 처방을 수정 보완하여 최종적인 처방으로 확립하게 된다.

2) 제형화 가능성 검토

주관연구기관으로부터 입수한 SeNPV 원제를 대상으로 일반 화학농약에 준하는 제형화 가능성을 검토하였다. 생물농약의 경우, 원료물질의 특성상 일반제형으로의 제제가 불가능한 경우도 발생할 수 있으므로 이에 대한 사전 검토는 필수적이라고 할 수 있다. SeNPV 원제의 경우, 입수당시 물을 포함하는 액상이었으므로 우선적으로 액상제형을 대상으로 함량 1%로 검토를 실시하였다.

3) 제형화 다양성 검토

1차 검토에서 분양된 액상수화제 시료의 활성시험 결과, 활성이 양호하였고 분쇄에 의하여 활성이 크게 영향을 받지 않는 것으로 나타남에 따라 다양한 제형화 가능성에 대한 정보를 수집하고자 액상수화제와 함께 고상제형에 대한 추가적인 검토를 실시하였다.

나. 제형별 제형화

1) 제형화 검토방법

1차년도의 제형화 검토를 통하여 확인된 처방을 기초로 하여 약효증진을 위한 보조제를 탐색하고자 문헌자료와 자체적으로 축적된 정보를 바탕으로 다양한 보조제를 검토하여 최적의 보조제를 선발하여 처방검토를 실시하였으며 처방검토된 시료는 제형별로 농약관리법상의 검사 및 검토항목을 검사한 다음 생물시험용 시료로 사용하였으며 각 처방의 약효 및 약해시험 결과를 바탕으로 최적의 처방을 선발하였다.

2) 약효증진용 보조제의 탐색

주관연구기관으로부터 입수한 SeNPV 원제를 대상으로 1차년도 제형화 검토를 통하여 확인된 처방을 기초로 하여 제형화 가능성을 검토하였다. 2차년도의 경우, 약효증진을 위한 보조제의 선발이 필수적이었으므로 다양한 보조제를 선발하여 보조제별 이화학적 특성을 검토하고 SeNPV 원제와의 혼용 가능성 및 약효증진 가능성을 체크하여 처방검토에 이용하였다. SeNPV 원제의 경우, 입수당시 물을 포함하는 액상이었으므로 1차년도 제형화 검토를 통하여 확인된 처방을 기초로 하여 우선적으로 액상수화제로 검토하였다. 액상수화제는 농약관리법상 액상 또는 점질액상으로서 물에 희석하였을 때 수화되는 농약을 말하는 것으로 유효 성분, 수화성 그리고 분말도를 이화학적 검사항목으로 하고 있다. 그러므로 제제 검토시 분산제의 선발과 입도관리 그리고 저장안정성의 확보가 매우 중요하다. 이에 따라 액상수화제의 기본처방은 1차년도 시험결과에 기초하여 분산제 및 보조제의 종류와 함량을 결정하였다.

3) 제형화 다양성 검토

다양한 제형화 가능성에 대한 정보를 수집하고자 액상수화제와 함께 고상제형에 대하여 검토한 결과, 환경친화적인 입상수화제의 개발이 가능해짐에 따라 다양한 자료수집을 통하여 얻어진 정보를 활용하여 약효증진이 가능한 보조제를 탐색하고자 추가시험을 실시하였다. 시험에 사용된 물질들은 액상수화제에서 검토되었던 boric acid를 대조로서 사용하였고 형광표백제로는 stilbene disulfonic acid 유도체인 fluorescent brightener 28 (free acid, Sigma-Aldrich 제품 OBA), 같은 stilbene disulfonic acid 유도체이지만 구조가 다른 fluorescent brightener 113 (Bayer 제품 OBB) 그리고 stilbene disulfonic acid의 heterocyclic 유도체인 fluorescent brightener 191 (Bayer 제품 OBC)의 3종이 사용되었다.

다. 최종처방의 확립

SeNPV의 1, 2년차 제제시험을 통하여 선발된 보조제 및 약효 증진제를 이용하여 SeNPV 제품을 제조하였으며, 제조된 시료는 농약관리법상의 검사 및 검토 항목을 검사한 다음 이화학시험, 생물시험 및 독성시험용 시료로 사용하였으며, 시험결과를 바탕으로 최종 처방을 확립하였다.

라. 환경안정성 연구

1) Se NPV의 마우스를 이용한 단회 투여 경구독성시험

(1) 시험계

① 동물종(계통) : Mouse(ICR계)

② 공급원

명 칭 : (주)샘타코

주 소 : 경기도 오산시 서량동 77-1번지

☎ 031 - 372 - 3636

대표이사 : 배 치 남

③ 시험계의 선택사유

농촌진흥청고시 제2005-7호 농약의 독성시험기준과 방법에 마우스를 사

용하도록 되어 있으며 ICR계통은 농약의 경구독성시험에 널리 사용되고 있어 기초 자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과의 해석 및 평가에 이용하는 것이 용이하다.

④ 순화 및 검역

동물을 입수한 후 암·수 각10마리를 검역·부검하고, 나머지 동물은 동물 실험실 사육환경 하에서 7일간 순화시키면서, 피모상태 및 건강을 확인한 후건전한 개체를 선별하여 시험에 이용하였다.

2) 사육환경

① 사육환경

본 실험의 환경은 온도 $21\pm 1^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $55\pm 5\%$, 조명시간 12시간(오전 8시 ~ 오후 8시)의 실험조건에서 사료와 음수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

② 사육상자

순화 및 시험기간 중 폴리카보네이트 사육 상자($270\times 220\times 130\text{mm}$)에 대패 밥 깔집(삼육실험동물, 한국)을 깔아 대형 고압멸균기를 이용하여 멸균, 건조한 후 암·수 각각 5마리씩 사육 유지하였다.

③ 사료 및 음용수

사료 및 음수의 급여방법 : 사료는 실험동물용 고품사료(삼양사료(주), 한국)를, 음수는 상수도수를 대형 고압멸균기를 이용하여 멸균 후 자유 섭식 및 섭취 시켰다.

3) 관찰 및 조사항목

① 일반중독증상 및 치사동물

투여당일은 투여 후 1시간에서 4시간까지 매시간, 익일부터는 매일 1회(오전 9시)씩 일반중독증상을 관찰하였고, 치사된 동물은 발견 즉시 꺼내서 부검을 실시하였다.

② 체중측정

시험에 이용된 모든 동물에 대하여 투여 당일부터 D1, D3, D7, D10, D14

일체 개체별 체중을 측정하고 그 결과를 통계 처리하여 분석하였다.

③ 부검

시험기간 종료 후 살아있는 개체를 이산화탄소(CO₂) 가스로 마취시킨 후 내부 장기의 육안적 이상 유무를 확인하고, 그 결과를 개체별 부검기록용지에 기록하였다.

마. SeNPV의 랫드를 이용한 단회 투여 경피독성시험

1) 시험계

① 동물종(계통) : SPF Rat(SD계)

② 공급원

명 칭 : (주)샘타코

주 소 : 경기도 오산시 서량동 77-1번지

☎ 031 - 372 - 3636

대표이사 : 배 치 남

③ 시험계의 선택사유

농촌진흥청고시 제2005-7호 농약의 독성시험기준과 방법에 랫드를 사용하도록 되어 있으며 SD계통은 농약의 경피 독성시험에 널리 사용되고 있어 기초 자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과의 해석 및 평가에이용하는 것이 용이하다.

④ 순화 및 검역

동물을 입수한 후 암·수 각10마리를 검역·부검하고, 나머지 동물은 동물 실험실 사육환경 하에서 7일간 순화시키면서, 피모상태 및 건강을 확인한 후건전한 개체를 선별하여 시험에 이용하였다.

2) 사육환경

① 사육 환경

본 실험의 환경은 온도 21±1℃, 상대습도 55±5%, 조명시간 12시간(오전 8시 ~ 오후 8시)의 실험조건에서 사료와 음수를 급여하여 순화 및 시험기간 동

안 격리 사육하였다.

② 사육 상자

순화 및 시험기간 중 폴리카보네이트 사육 상자(420×260×180mm)에 대패 밥 깔집(삼육실험동물, 한국)을 깔아 대형 고압멸균기를 이용하여 멸균, 건조한 후 암·수 각각 5마리씩 사육 유지하였다.

③ 사료 및 음용수

사료 및 음수의 급여방법 : 사료는 실험동물용 고품사료(삼양사료(주), 한국)를, 음수는 상수도수를 대형 고압멸균기를 이용하여 멸균 후 자유 섭식 및 섭수 시켰다.

3) 관찰 및 조사항목

① 일반중독증상 및 치사동물

투여당일은 투여 후 1시간에서 4시간까지 매시간, 익일부터는 매일 1회(오전 9시)씩 일반중독증상을 관찰하고, 치사된 동물은 발견 즉시 꺼내서 부검을 실시하였다.

② 체중측정

시험에 이용된 모든 동물에 대하여 투여 당일부터 D1, D3, D7, D10, D14 일째 개체별 체중을 측정하고 그 결과를 통계 처리하여 분석하였다.

③ 부검

시험기간 종료 후 살아있는 개체를 이산화탄소(CO₂) 가스로 마취시킨 후 내부 장기의 육안적 이상 유무를 확인하고, 그 결과를 개체별 부검기록용지에 기록하였다.

바. Se NPV의 잉어를 이용한 단회 투여 급성독성시험

1) 시험계

① 공시어 : 잉어(Cyprinus carpio)

② 공급원

명 칭 : 경상북도 수산자원개발연구소 민물고기연구센터

주 소 : 경상북도 울진군 근남면 행곡리 228번지

☎ 054 - 783 - 9413

기관장 : 한 중 대

③ 시험계의 선택사유

농촌진흥청고시 제 2005 - 7호 농약의 독성시험기준과 방법에 급성어독성 시험의 경우 시험어류는 잉어를 사용하도록 되어 있으며, 농약의 어독성 시험에 널리 사용되고 있어 기초 자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과의 해석 및 평가에 이용하는 것이 용이하다.

④ 순화 및 사육

시험어류는 분양 후 약 2주간 실험실내 환경 하에서 순화 사육시켰다.

2) 사육환경

① 사육환경

본 시험의 환경은 실내에서 물의 순화, 여과를 시킬 수 있는 유리 수조 장치를 이용, 시험용수는 지하수를 이용하여 수온은 22 - 24℃, 조도는 200 - 300Lux의 범위 내에서 사육, 순화시켰다.

② 사료 급여

사료는 잉어용 부상성 고품사료(부산 관상어용 식품, 한국)를 1일 1회 급여 하였다.

3) 관찰 및 검사항목

① 일반중독증상 및 생사율

처리당일은 1시간에서 4시간까지는 매시간, 그 이후에는 24, 48, 72, 96 시간 간격으로 일반중독증상 및 생사수를 관찰 조사하였다.

② 체중측정 및 크기측정

시험 중 치사된 개체는 발견 즉시 꺼내어 체중 및 전장을 측정하였으며, 시험 종료 후 살아남은 개체는 시험 종료 시 체중과 전장을 측정하였다.

사. Se NPV 액상수화제의 마우스를 이용한 단회 투여 경구독성시험

1) 시험계

① 동물종(계통) : SPF Mouse(ICR계)

② 공급원

명 칭 : 삼육실험동물연구소

주 소 : 경기도 오산시 서량동 77-1번지

☎ 031 - 372 - 3636

대표이사 : 배 치 남

③ 시험계의 선택사유

농촌진흥청고시 제2004-4호 농약의 독성시험기준과 방법에 마우스를 사용하도록 되어 있으며 ICR계통은 농약의 경구독성시험에 널리 사용되고 있어 기초 자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과의 해석 및 평가에이용하는 것이 용이하다.

④ 순화 및 검역

동물을 입수한 후 암·수 각10마리를 검역·부검하고, 나머지 동물은 동물 실험실 사육환경 하에서 7일간 순화시키면서, 피모상태 및 건강을 확인한 후건전한 개체를 선별하여 시험에 이용하였다.

2) 사육환경

① 사육환경

본 실험의 환경은 온도 $21\pm 1^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $55\pm 5\%$, 조명시간 12시간(오전 8시 ~ 오후 8시)의 실험조건에서 사료와 음수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

② 사육 상자

순화 및 시험기간 중 폴리카보네이트 사육 상자(270×220×130mm)에 대패 밥 깔집(삼육실험동물, 한국)을 깔아 대형 고압멸균기를 이용하여 멸균, 건조한 후 암·수 각각 5마리씩 사육 유지하였다.

③ 사료 및 음용수

사료 및 음수의 급여방법 : 사료는 실험동물용 고형사료(삼양사료(주), 한

국)를, 음수는 상수도수를 대형 고압멸균기를 이용하여 멸균 후 자유 섭식 및 섭취 시켰다.

3) 관찰 및 조사항목

① 일반중독증상 및 치사동물

투여당일은 투여 후 1시간에서 4시간까지 매시간, 익일부터는 매일 1회 (오전 9시)씩 일반중독증상을 관찰하였고, 치사된 동물은 발견 즉시 꺼내서 부검을 실시하였다.

② 체중측정

시험에 이용된 모든 동물에 대하여 투여 당일부터 D1, D3, D7, D10, D14 일째 개체별 체중을 측정하고 그 결과를 통계 처리하여 분석하였다.

③ 부검

시험기간 종료 후 살아있는 개체를 이산화탄소(CO₂) 가스로 마취시킨 후 내부 장기의 육안적 이상 유무를 확인하고, 그 결과를 개체별 부검기록용지에 기록하였다.

아. SeNPV 액상수화제의 랫드를 이용한 단회 투여 경피독성 시험

1) 시험계

① 동물종(계통) : SPF Rat(SD계)

② 공급원

명 칭 : 삼육실험동물연구소

주 소 : 경기도 오산시 서량동 77-1번지

☎ 031 - 372 - 3636

대표이사 : 배 치 남

③ 시험계의 선택사유

농촌진흥청고시 제2004-4호 농약의 독성시험기준과 방법에 랫드를 사용하도록 되어 있으며 SD계통은 농약의 경피 독성 시험에 널리 사용되고 있어 기초 자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과의 해석 및 평가에이용하는 것이

용이하다.

④ 순화 및 검역

동물을 입수한 후 암·수 각 10마리를 검역·부검하고, 나머지 동물은 동물 실험실 사육환경 하에서 7일간 순화시키면서, 피모상태 및 건강을 확인한 후 견전한 개체를 선별하여 시험에 이용하였다.

2) 사육환경

① 사육환경

본 실험의 환경은 온도 $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $55 \pm 5\%$, 조명시간 12시간 (오전 8시 ~ 오후 8시)의 실험조건에서 사료와 음수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

② 사육 상자

순화 및 시험기간 중 폴리카보네이트 사육 상자(420×260×180mm)에 대패 밥 깔집(삼육실험동물, 한국)을 깔아 대형 고압멸균기를 이용하여 멸균, 건조한 후 암·수 각각 5마리씩 사육 유지하였다.

③ 사료 및 음용수

사료 및 음수의 급여방법 : 사료는 실험동물용 고품사료(삼양사료(주), 한국)를, 음수는 상수도수를 대형 고압멸균기를 이용하여 멸균 후 자유 섭식 및 섭취 시켰다.

3) 관찰 및 조사항목

① 일반중독증상 및 치사동물

투여당일은 투여 후 1시간에서 4시간까지 매시간, 익일부터는 매일 1회 (오전 9시)씩 일반중독증상을 관찰하고, 치사된 동물은 발견 즉시 꺼내서 부검을 실시하였다.

② 체중측정

시험에 이용된 모든 동물에 대하여 투여 당일부터 D1, D3, D7, D10, D14 일째 개체별 체중을 측정하고 그 결과를 통계 처리하여 분석하였다.

③ 부검

시험기간 종료 후 살아있는 개체를 이산화탄소(CO₂) 가스로 마취시킨 후 내부 장기의 육안적 이상 유무를 확인하고, 그 결과를 개체별 부검기록용지에 기록하였다.

자. SeNPV 액상수화제의 잉어를 이용한 단회 투여 급성독성시험

1) 시험계

① 공시어 : 잉어(Cyprinus carpio)

② 공급원

명 칭 : 국립수산진흥원 경북내수면개발시험장

주 소 : 경북 울진군 근남면 행곡리 228번지

☎ 054 - 783 - 9413

장 장 : 이 석 희

③ 시험계의 선택사유

농촌진흥청고시 제 2004 - 4호 농약의 독성시험기준과 방법에 급성 어독성 시험의 경우 시험어류는 잉어를 사용하도록 되어 있으며, 농약의 어독성 시험에 널리 사용되고 있어 기초 자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과와 해석 및 평가에 이용하는 것이 용이하다.

④ 순화 및 사육

시험어류는 분양 후 약 2주간 실험실내 환경 하에서 순화 사육시켰다.

2) 사육환경

① 사육환경

본 시험의 환경은 실내에서 물의 순화, 여과를 시킬 수 있는 유리 수조 장치를 이용, 시험용수는 지하수를 이용하여 수온은 22 - 24℃, 조도는 200 - 300Lux의 범위 내에서 사육, 순화시켰다.

② 사료 급여

사료는 잉어용 부상성 고형사료(부산 관상어용 식품, 한국)를 1일 1회 급

이하였다.

3) 관찰 및 검사항목

① 일반중독증상 및 생사율

처리당일은 1시간에서 4시간까지는 매시간, 그 이후에는 24, 48, 72, 96 시간 간격으로 일반중독증상 및 생사수를 관찰 조사하였다.

② 체중측정 및 크기측정

시험 중 치사된 개체는 발견 즉시 꺼내어 체중 및 전장을 측정하였으며, 시험 종료 후 살아남은 개체는 시험 종료 시 체중과 전장을 측정하였다.

차. SeNPV 입상수화제의 마우스를 이용한 단회 투여 경구독성시험

1) 시험계

① 동물종(계통) : SPF Mouse(ICR계)

② 공급원

명 칭 : (주)샘타코

주 소 : 경기도 오산시 서랑동 77-1번지

☎ 031 - 372 - 3636

대표이사 : 배 치 남

③ 시험계의 선택사유

농촌진흥청고시 제2005-7호 농약의 독성시험기준과 방법에 마우스를 사용하도록 되어 있으며 ICR계통은 농약의 경구독성시험에 널리 사용되고 있어 기초 자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과의 해석 및 평가에이용하는 것이 용이하다.

④ 순화 및 검역

동물을 입수한 후 암·수 각 10마리를 검역·부검하고, 나머지 동물은 동물 실험실 사육환경 하에서 7일간 순화시키면서, 피모상태 및 건강을 확인한 후건전한 개체를 선별하여 시험에 이용하였다.

2) 사육환경

① 사육환경

본 실험의 환경은 온도 $21 \pm 1^\circ\text{C}$, 상대습도 $55 \pm 5\%$, 조명시간 12시간 (오전 8시 ~ 오후 8시)의 실험조건에서 사료와 음수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

② 사육 상자

순화 및 시험기간 중 폴리카보네이트 사육 상자(270×220×130mm)에 대패 밥 깔집(삼육실험동물, 한국)을 깔아 대형 고압멸균기를 이용하여 멸균, 건조한 후 암·수 각각 5마리씩 사육 유지하였다.

③ 사료 및 음용수

사료 및 음수의 급여방법 : 사료는 실험동물용 고품사료(삼양사료(주), 한국)를, 음수는 상수도수를 대형 고압멸균기를 이용하여 멸균 후 자유 섭식 및 섭수 시켰다.

3) 관찰 및 조사항목

① 일반중독증상 및 치사동물

투여당일은 투여 후 1시간에서 4시간까지 매시간, 익일부터는 매일 1회 (오전 9시)씩 일반중독증상을 관찰하였고, 치사된 동물은 발견 즉시 꺼내서 부검을 실시하였다.

② 체중측정

시험에 이용된 모든 동물에 대하여 투여 당일부터 D1, D3, D7, D10, D14 일째 개체별 체중을 측정하고 그 결과를 통계 처리하여 분석하였다.

③ 부검

시험기간 종료 후 살아있는 개체를 이산화탄소(CO_2) 가스로 마취시킨 후 내부 장기의 육안적 이상 유무를 확인하고, 그 결과를 개체별 부검기록용지에 기록하였다.

카. SeNPV 입상수화제의 랫드를 이용한 단회 투여 경피독성 시험

1) 시험계

① 동물종(계통) : SPF Rat(SD계)

② 공급원

명 칭 : (주)샘타코

주 소 : 경기도 오산시 서랑동 77-1번지

☎ 031 - 372 - 3636

대표이사 : 배 치 남

③ 시험계의 선택사유

농촌진흥청고시 제2005-7호 농약의 독성시험기준과 방법에 랫드를 사용하도록 되어 있으며 SD계통은 농약의 경피독성 시험에 널리 사용되고 있어 기초자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과의 해석 및 평가에 이용하는 것이 용이하다.

④ 순화 및 검역

동물을 입수한 후 암·수 각10마리를 검역·부검하고, 나머지 동물은 동물실험실 사육환경 하에서 7일간 순화시키면서, 피모상태 및 건강을 확인한 후 건전한 개체를 선별하여 시험에 이용하였다.

2) 사육환경

① 사육환경

본 실험의 환경은 온도 $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $55 \pm 5\%$, 조명시간 12시간(오전 8시 ~ 오후 8시)의 실험조건에서 사료와 음수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

② 사육 상자

순화 및 시험기간 중 폴리카보네이트 사육 상자(420×260×180mm)에 대패밥 깔집(삼육실험동물, 한국)을 깔아 대형 고압멸균기를 이용하여 멸균, 건조한 후 암·수 각각 5마리씩 사육 유지하였다.

③ 사료 및 음용수

사료 및 음수의 급여방법 : 사료는 실험동물용 고품사료(삼양사료(주), 한국)를, 음수는 상수도수를 대형 고압멸균기를 이용하여 멸균 후 자유 섭식 및 섭수 시켰다.

3) 관찰 및 조사항목

① 일반중독증상 및 치사동물

투여당일은 투여 후 1시간에서 4시간까지 매시간, 익일부터는 매일 1회 (오전 9시)씩 일반중독증상을 관찰하고, 치사된 동물은 발견 즉시 꺼내서 부검을 실시하였다.

② 체중측정

시험에 이용된 모든 동물에 대하여 투여 당일부터 D1, D3, D7, D10, D14 일째 개체별 체중을 측정하고 그 결과를 통계 처리하여 분석하였다.

③ 부검

시험기간 종료 후 살아있는 개체를 이산화탄소(CO₂) 가스로 마취시킨 후 내부 장기의 육안적 이상 유무를 확인하고, 그 결과를 개체별 부검기록용지에 기록하였다.

타. SeNPV 입상수화제의 잉어를 이용한 단회 투여 급성독성시험

1) 시험계

① 공시어 : 잉어(Cyprinus carpio)

② 공급원

명 칭 : 경상북도 수산자원개발연구소 민물고기연구센터

주 소 : 경상북도 울진군 근남면 행곡리 228번지

☎ 054 - 783 - 9413

기관장 : 한 중 대

③ 시험계의 선택사유

농촌진흥청고시 제 2005 - 7호 농약의 독성시험기준과 방법에 급성어독

성 시험의 경우 시험어류는 잉어를 사용하도록 되어 있으며, 농약의 어독성 시험에 널리 사용되고 있어 기초 자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과의 해석 및 평가에 이용하는 것이 용이하다.

④ 순화 및 사육

시험어류는 분양 후 약 2주간 실험실내 환경 하에서 순화 사육시켰다.

2) 사육환경

① 사육환경

본 시험의 환경은 실내에서 물의 순화, 여과를 시킬 수 있는 유리 수조 장치를 이용, 시험용수는 지하수를 이용하여 수온은 22 - 24℃, 조도는 200 - 300Lux의 범위 내에서 사육, 순화시켰다.

② 사료 급이

사료는 잉어용 부상성 고품사료(부산 관상어용 식품, 한국)를 1일 1회 급이 하였다.

3) 관찰 및 검사항목

① 일반중독증상 및 생사율

처리당일은 1시간에서 4시간까지는 매시간, 그 이후에는 24, 48, 72, 96 시간 간격으로 일반중독증상 및 생사수를 관찰 조사하였다.

② 체중측정 및 크기측정

시험 중 치사된 개체는 발견 즉시 꺼내어 체중 및 전장을 측정하였으며, 시험 종료 후 살아남은 개체는 시험 종료 시 체중과 전장을 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 기초 제형화

1) 제형화 가능성 검토

원제는 물에 불용성인 관계로 액제는 검토가 불가하였고 액상수화제로 검토하였다. 액상수화제는 농약관리법상 액상 또는 점질액상으로서 물에 희석하였을 때

수화되는 농약을 말하는 것으로 제제 검토시 분산제의 선발과 입도관리 그리고 저장안정성의 확보가 중요하다. 먼저 분산제의 경우 다양한 선택이 가능하지만 기초적인 제형화 가능성에 대한 정보를 얻고자 일반 액상수화제의 범용적 처방에 사용되는 것을 이용하였고 입도문제는 기본적인 액상수화제의 자체 관리규격에 준하여 검토하였다. 저장안정성은 주로 경시적인 층 분리와 입도성장과 관련된 것으로 10% 미만의 함량을 가지는 액상수화제의 경우, 처방 검토 시 저장안정성을 확보하기 위하여 증점제 및 보조제에 대한 고려가 필수적이므로 여러가지 실험을 통하여 적절한 조합과 요구되는 함량을 결정하였다(Table 1).

Table 1. Recipes of SeNPV suspension concentrate for stability test by milling

Formulation recipe	Material	Content(%)		Remarks
		Treat 1	Treat 2	
	NPV tech	1	1	2×10^8 PIBs/ml
	Dispersant	5	5	
	Antifreeze	10	10	
	Inert ingredient	3	3	
	Stabilizer	1	1	
	Thickner	0.2	0.2	
	Antiseptic substance	0.1	0.1	
	Antifoamer	0.2	0.2	
	Carrier	Rest	Rest	Water
	Total	100	100	
Process	Equipment	Dynomil	Stirrer	
	Grinding	O	X	
Physics and chemistry	Item	Result		Remarks
	Formulation	SC(Suspension Concentrate)		
	Appearance	gray, sticky liquid		
	Hydration	good	good	
	Fineness	good	bad	325mesh 98% up
	Storage stability	good	bad	50°C, 4weeks

또한 액상수화제 제조 시 거치게 되는 Dynomill에 의한 분쇄작업의 영향을 검토하고자 동일한 처방으로 미분쇄 액상수화제도 제조하였다. 원제특성상 분쇄작업에 의한 활성변화에 대한 정보가 필요하며 분쇄공정은 실제 공장생산에서도 시간과 비용이 많이 소요되는 생산 공정이므로 필요성 여부에 대한 검토는 원가 절감이라는 측면에서도 매우 중요하기 때문이다.

2) 제형화 다양성 검토

액상수화제의 경우, 1차 검토결과를 근거로 1차 검토처방을 기본으로 하고 약 효증진제의 탐색을 목적으로 다양한 보조제를 검토하였다.

Table 2. Recipes of SeNPV suspension concentrate for selection of additives

Formulation recipe	Material	Content(%)		Remarks
		Treat1	Treat2	
	NPV tech	1	1	2×10^8 PIBs/ml
	Dispersant	5	5	
	Antifreeze	10	10	
	Inert ingredient1	3	3	
	Inert ingredient2	1	1	
	Stabilizer	1	1	
	Thickner	0.2	0.2	
	Antiseptic substance	0.1	0.1	
	Antifoamer	0.2	0.2	
	Carrier	Rest	Rest	Water
	Total	100	100	
Physics and chemistry	Item	Result		Remarks
	Formulation	SC(Suspension Concentrate)		
	Appearance	gray, sticky liquid		
	Hydration	good		
	Fineness	good		325mesh 98% up
	Storage stability	good		50°C, 4weeks

적절한 보조제의 선발은 제제의 안정성과 약효를 향상시킬 수 있으므로 농약제제에 있어 매우 중요하다. Table 2는 이렇게 하여 선발된 보조제에 의한 처방과 물성 검토결과이다.

Table 3. Recipes of SeNPV water-dispersible granule for stability test by drying temperature

Formulation recipe	Material	Contest(%)		Remarks
		Treat1	Treat2	
	NPV tech	1	1	2×10^8 PIBs/ml
	Dispersant1	2	2	
	Dispersant2	5	5	
	Wetting agent	3	3	
	Inert ingredient	5	5	
	Carrier	Rest	Rest	CaCO ₃
	Total	100	100	
Process	Equipment	Dynomil	Stirrer	
	Grinding	O	X	
Physics and chemistry	Item	Result		비 고
	Formulation	SC(Suspension Concentrate)		
	Appearance	gray, sticky liquid		
	Hydration	good	good	
	Fineness	good	bad	325mesh 98% up
	Storage stability	good	bad	50℃, 4주보관

고상제형의 경우는 세계적인 추세가 환경친화적이고 생력적인 제형을 선호함에 따라 기존의 수화제를 개선한 입상수화제로 검토를 실시하였다. 입상수화제는 농약관리법상 입상으로서 물에 희석하여 사용하는 농약을 말하는 것으로 제제 검토 시 계면활성제의 선발과 입도관리 그리고 저장안정성의 확보가 중요하다.

먼저 계면활성제의 경우 증량제의 종류에 따라 다양한 종류가 사용되고 있지만 원가 및 제제상의 선호도 등을 고려하여 습윤제와 분산제를 복합적으로 선발하여 이용하였고 입도는 기본적인 입상수화제의 자체 관리규격에 준하여 검토하였다. 입상수화제의 저장안정성은 액상수화제와는 달리 주로 경시적인 분말도의 약화현상과 입도성장 문제로 원제가 액상일 경우 더욱 큰 문제가 된다. 하지만 NPV 원제의 경우 외관은 액상이지만 주성분은 고상이었으므로 증량제와 계면활성제 그리고 보조제의 적절한 조합을 선발하여 이러한 문제를 극복하였다. 1% 이하의 저함량 입상수화제의 경우 원제보다는 기타부재에 의한 영향이 크므로 적절한 부재의 선발은 매우 중요하다. 이와 함께 입상수화제의 경우 건조온도에 따라 이화학성이 변화되며 생물농약의 경우는 온도에 대한 활성의 영향정도를 검토하여야만 하므로 본 실험에서도 입상수화제를 제조 후 건조기기와 건조온도를 달리하여 입상수화제를 제조하였다(Table 3).

건조작업은 실지생산에서도 시간과 비용이 많이 소요되는 공정이므로 필요성 여부에 대한 검토는 원가절감이라는 측면에서도 매우 중요하다고 할 수 있다. 이상의 결과로 확립된 처방은 농약의 검사 및 검토항목에 해당되는 이화학적 검토결과도 우수하였다.

나. 제형별 제형화

1) 약효증진용 보조제의 탐색

생물농약에 있어서 적절한 보조제의 선발은 유효성분의 안정성 및 활성에 미치는 영향이 크므로 처방검토에 필수적인 과정이라고 할 수 있다.

문헌자료 검토결과, 다양한 보조제에 대하여 핵다각체병바이러스의 약효증진 효과시험을 수행한 것으로 나타났으나 대부분 그 효과가 미미하였다. 그러나 boric acid의 경우, 실제적인 효과가 인정된 경우가 있었으므로 이것을 선발하여 제형화 연구에 사용하였다. 선발된 보조제에 대한 제형화 검토결과, 적정함량으로 제제하는데 어려움이 없었으므로 기존의 액상수화제의 처방에 포함시켜 처방을 확립하였다(Table 4).

Table 4. Final recipe of SeNPV suspension concentrate for efficacy test

Formulation recipe	Material	Content(%)	Remarks
	SeNPV	1	2.6×10^{12}
	Dispersant	5	DAN
	Antifreeze	10	AFG
	Inert ingredient 1	3	ASA
	Promotion agent	1	
	Thickner	0.2	
	Antiseptic substance	0.1	
	Antifoamer	0.2	
	Carrier	Rest	
	Total	100	
Physics and chemistry	Item	Result	Remarks
	Appearance	gray, sticky liquid	
	Hydration	good	
	Fineness	good	325mesh 98% up
	Storage stability	5% layer separation	50°C, 4weeks

이상의 결과로 확립된 처방에 따라 원부원료를 배합한 다음, 습식 분쇄기인 Dynamill을 이용하여 액상수화제를 제조하였다. 제조된 시료는 농약관리법상 검사항목에 해당하는 수화성과 분말도를 측정된 결과, 검사기준에 부합하여 생물활성 시험용 시료로 분양하였으며, 액상수화제는 우수한 생물활성을 보였다.

2) 제형화 다양성 검토

핵다각체병바이러스의 상품화를 위한 다양한 제형검토를 위하여 1차적으로 검

토된 액상수화제 이외에 고상제형에 대한 검토를 실시하였다. 고상제형의 경우, 세계적인 추세가 환경친화적이고 생력적인 제형을 선호함에 따라 기존의 수화제를 개선한 입상수화제를 대상으로 1차년도 제형화 검토를 통하여 확인된 처방을 기초로 하여 검토를 실시하였다.

주관연구기관으로부터 입수한 SeNPV 원제의 경우, 물을 포함하는 액상이었으므로 입상수화제 검토를 위하여 건조과정에 대한 안정성 검토가 필요하였다. 이에 따라 원제를 동결 건조한 다음, 활성을 검정하였으나 활성에는 변화가 없었다. 그러므로 이후의 시험은 동결 건조된 원제를 입상수화제 처방검토에 사용하였다. 입상수화제는 농약관리법상 입상으로서 물에 희석하여 사용하는 농약을 말하는 것으로 유효성분, 수화성 그리고 분말도를 이화학적 검사항목으로 하고 있다. 그러므로 제제 검토 시 계면활성제의 선발과 입도관리 그리고 저장안정성의 확보가 중요하다. 이에 따라 1차년도 제형화 검토를 통하여 확인된 처방을 기초로 하여 약효증진 효과가 기대되는 다양한 보조제를 탐색하여 처방검토를 실시하였다.

핵각각체병바이러스의 경우, 광에 의하여 쉽게 분해되는 문제점과 효과가 다소 느리다는 단점으로 인하여 상업화에 어려움이 있으나 형광표백제를 사용할 경우, 이러한 단점들을 극복할 수 있는 것으로 많은 논문들은 보고하고 있다. 정확한 작용기작은 아직까지 밝혀지지 않았으나 형광표백제 처리구에서 약효상승효과와 함께 효과 발현속도도 증가하는 결과를 보였다. 이에 따라 약효상승효과가 기대되는 물질 중에서 국내에서 수배 가능한 다양한 구조의 형광표백제를 구입하여 시험에 사용하였다.

입상수화제의 시험처방은 1차년도 제형화 검토를 통하여 확인된 처방을 기초로 하고 상기 3종의 보조제들은 적정량을 포함시켜 4가지 처방을 확립하였다 (Table 5). 제조방법은 먼저 동결 건조된 원분과 부원료들을 건식 분쇄기로 분쇄하고 여기에 일정량의 수분을 이용하여 반죽한 다음, 압출 조립기를 이용하여 조립하고 유동층 건조기에서 건조하여 시험용 입상수화제 시료를 제조하였다. 제조된 시료는 농약의 검사 및 검토항목에 해당되는 이화학적 검토를 거쳐 생물활성 시험용 시료로 분양하였다.

생물활성 시험결과, boric acid에 의한 효과보다는 형광표백제에 의한 약효상승 효과가 우수하였고 형광표백제들 간에는 유의한 차이를 보이지는 않았으나 구조적으로 차이를 보여 stilbene disulfonic acid 유도체인 fluorescent brightener 28 (free acid, Sigma-Aldrich 제품 OBA)가 가장 우수한 효과를 보였다.

Table 5. Recipes of SeNPV water-dispersible granule for selection of adjuvants

	Material	Content(%)				비고
		Treat1	Treat2	Treat3	Treat4	
Formulation recipe	NPV tech	5	5	5	5	2.6×10^{11}
	Dispersant1	2	2	2	2	DAS
	Dispersant2	5	5	5	5	DAP
	Wetting agent	3	3	3	3	WAS
	Inert ingredient 1	5	5	5	5	DCA
	Promotion agent1	1	-	-	-	BA
	Promotion agent2	-	1	-	-	OBA
	Promotion agent3	-	-	1	-	OBB
	Promotion agent4	-	-	-	1	OBC
	Carrier	Rest	Rest	Rest	Rest	CaCO ₃
	Total	100	100	100	100	
Physics and chemistry	Item	Result				Remarks
	Appearance	granule				
	Hydration	good				
	Fineness	good				325mesh 98% up
	Storage stability	good				50°C, 4weeks

이상의 결과로부터 핵다각체병바이러스인 SeNPV는 액상 제형의 경우는 액상수화제로, 고상 제형의 경우는 입상수화제로 제제가 가능하여 다양한 제품 개발이 가능할 것으로 판단되었고, 적절한 보조제를 선발한다면 이에 따른 약효상승 효과를 통하여 핵다각체병바이러스가 가지는 단점들을 극복할 수 있을 것으로 기대되었다.

다. 최종처방의 확립

SeNPV의 1, 2년차 제제시험을 통하여 검토된 다양한 처방의 검토결과를 바탕으로 SeNPV의 최종처방을 확립하고자 실시하였다.

Table 6. Final recipe of SeNPV water-dispersible granule for efficacy test

Formulation recipe	Material	Content(%)	Remarks
	NPV tech	1	5×10^{11}
	Dispersant1	2	DAS
	Dispersant2	5	DAP
	Inert ingredient	5	DCA
	Wetting agent	3	WAS
	Promotion agent1	1	BA
	Promotion agent2	1	OBB
	Carrier	Rest	CaCO ₃
	Total	100	
Physics and chemistry	Item	Result	Remarks
	Appearance	granule	
	Hydration	good	
	Fineness	good	325mesh, 98% up
	Storage stability	good	50°C, 4weeks

액상 제형인 액상수화제와 고상 제형인 입상수화제에 대하여 저장 안정성을 비교 시험한 결과, 입상수화제가 이화학적 특성과 함께 보관 및 수송적인 측면에서 보다 안정적이고 효과적인 특성을 보임에 따라 입상수화제를 개발제형으로 정하여 SeNPV 입상수화제 최종처방을 선발하여 제품을 제조하였다(Table 6).

최종검토를 위하여 SeNPV (5.0×10^{11} PIBs/g) 원료를 수급하여 처방검토에 활용하였으며, 최종처방에는 SeNPV의 약효증진을 위하여 처방검토를 통하여 선발된 서로 다른 계통의 약효 증진제 두 가지를 모두 포함시켰으며, 제조된 시료는 농약관리법상의 검사 및 검토항목을 검사하였다. 검토결과, 농약관리법상에 정한 관리규격에 합당한 우수한 이화학적 특성을 보임에 따라 이후의 시험인 이화학 시험, 생물시험 및 독성시험용 시료로 사용하였다. 시험결과, 최종제품은 안정적인 이화학적 특성과 우수한 생물활성 그리고 인축 및 환경에 낮은 독성을 보임에 따라 SeNPV 개발을 위한 최종처방을 확립할 수 있었다.

라. 환경안정성 연구

1) SeNPV의 마우스를 이용한 단회 투여 경구독성시험

SeNPV(5.0×10^{11} PIBs/g)에 대한 급성경구독성을 마우스(ICR계통)를 이용하여 1회 경구처리한 후 2주간 치사수, 일반중독증상, 체중 변화 및 부검소견을 관찰 조사한 결과는 다음과 같다.

(1) 투여약량 수준설정 및 약제조제

① 투여약량 설정

기초시험 투여약량인 5,000 mg/kg에서 암·수 공히 시험을 수행하였다.

② 투여약량 수준별 실험 동물수

실험 동물수는 농약의 등록시험기준과 방법(농촌진흥청고시 제2005-7호)에서와 같이 암·수 각 5마리를 이용하였고, 개체식별은 등부에 Picric acid를 이용하여 일련번호로 표시하였다.

③ 대조구의 설정

시험물질이 액상으로 투여약제 조제시 증류수에 잘 현탁되므로 용매 대

조군을 제외한 증류수 대조군만을 두었다.

④ 용매의 선택 및 시험물질의 조제

시험물질이 증류수에 잘 현탁되는 관계로 용매는 증류수로 하였으며, 시험물질의 조제는 20ml의 Teflon Cap Vial을 이용하여 칭량한 후 증류수를 가하여 용해 및 현탁시켜 조제하였다.

⑤ 투여액량의 설정

투여액량은 시험에 이용되는 마우스의 체중과 약액 투여량을 고려하여 투여액량 수준별 공히 10 ml/kg(체중)으로 설정하였다.

(2) 시험물질의 투여

① 사료의 절식

투여개시 3 - 4시간 전부터 절식을 시킨 후 투여 3 - 4시간 후 사료 급이를 재개하였다.

② 투여경로 및 투여방법

마우스용 경구 주사침(Zonde)을 이용하여 체중측정치를 기준으로 10 mg/kg 용량을 경구로 위내에 삽입, 1회에 한하여 강제투여 하였다.

(3) 결과 및 고찰

① 치사동물 및 LD₅₀값

이상의 시험결과로 본 시험의 시험물질인 SeNPV(5.0×10^{11} PIBs/g)는 기초시험 약량인 5,000 mg/kg에서 시험기간(14일)동안 암수 모두 치사개체가 발견되지 않았다. 따라서 본 시험물질의 반수치사약량(LD₅₀)은 > 5,000 mg/kg으로 독성분류상 저독성을 나타내었다.

② 일반중독증상

전 개체에서 시험기간(14일)동안 특이증상이 관찰되지 않았다.

③ 체중변화

시험에 이용된 동물의 시험개시 D0, D1, D3, D7, D10, D14일째의 개체별 체중기록 결과로 보아 약제투여군은 무처리 대조군과 비교하여 유의차가 없었다.

④ 부검소견

육안적 부검소견으로 전 개체에서 특이한 이상소견은 관찰되지 않았다.

(4) 요약

- ① 시험물질을 암·수 모두 기초시험 투여약량인 5,000 mg/kg를 투여하여 관찰한 결과 시험기간(14일)중 치사개체가 발견되지 않았다.
- ② 일반중독 증상은 전 개체에서 시험기간(14일)동안 특이증상이 관찰되지 않았다.
- ③ 체중변화의 통계처리에 있어 체중측정 전 기간에 걸쳐 유의차가 인정되지 않았다.
- ④ 약제투여와 관련한 내부 장기에 대한 영향은 없었다.

이상의 결과 본 시험물질의 반수치사약량(LD₅₀)은 > 5,000 mg/kg으로 독성분류상 저독성으로 확인되었다.

2) SeNPV의 랫드를 이용한 단회 투여 경피독성시험

SeNPV(5×10^{11} PIBs/g)에 대한 급성경피독성을 SPF 랫드(SD계통)를 이용하여 1회 경피 처리한 후 2주간 치사수, 일반중독증상, 체중 변화 및 부검소견을 관찰 조사한 결과는 다음과 같다.

(1) 투여약량 수준설정 및 약제조제

① 투여약량 설정

기초시험 투여약량인 4,000 mg/kg에서 암·수 공히 시험을 수행하였다.

② 투여약량 수준별 실험 동물수

실험 동물수는 농약의 등록시험기준과 방법(농촌진흥청고시 제2005-7호)에서와 같이 암·수 각5마리를 이용하였고, 개체식별은 미부에 유성 매직을 이용하여 일련번호로 표시하였다.

③ 대조구의 설정

시험물질이 액상으로 투여약제 조제시 증류수에 잘 현탁되므로 용매 대

조군을 제외한 증류수 대조군만을 두었다.

④ 용매의 선택 및 시험물질의 조제

시험물질이 증류수에 잘 현탁되는 관계로 용매는 증류수로 하였으며, 시험물질의 조제는 20 ml의 Teflon Cap Vial을 이용하여 칭량한 후 증류수를 가하여 용해 및 현탁 시켜 조제하였다.

⑤ 투여액량의 설정

투여액량은 시험에 이용되는 랫드의 체중과 약액 투여량을 고려하여 투여액량 수준별 공히 5 ml/kg(체중)으로 설정하였다.

(2) 시험물질의 투여

① 사료의 절식

경피독성 시험의 투여 경로상 절식시간은 따로 두지 않았다

② 투여경로 및 투여방법

시험개시 전 약제처리를 위한 공시동물의 등부위를 동물용 제모기를 이용하여 체표면적의약 10%를 제모하고, 조제된 공시약제를 체표에 골고루 바른 후 약제유실을 방지하기 위하여 임상용 거어즈로 고르게 감고 비자극성 테이프로 고정시켜 주었다. 약제처리 24시간이 경과한 후 도포물을 제거하고, 한편 피부에 남아 있는 공시약제를 증류수를 이용하여 잘 닦아주었다.

(3) 결과 및 고찰

① 치사동물 및 LD₅₀값

이상의 시험결과로 본 시험의 시험물질인 SeNPV(5×10^{11} PIBs/g)는 기초 시험 약량인 4,000 mg/kg에서 시험기간(14일)동안 암수모두 치사개체가 발견되지 않았다. 따라서 본 시험물질의 반수치사약량(LD₅₀)은 > 4,000 mg/kg으로 독성분류상 저독성을 나타내었다.

② 일반중독증상

전 개체에서 시험기간(14일)동안 특이증상이 관찰되지 않았다.

③ 체중변화

시험에 이용된 동물의 시험개시 D0, D1, D3, D7, D10, D14일째의 개체별

체중기록결과로 보아 약제투여군은 무처리 대조군과 비교하여 유의차가 없었다.

④ 부검조건

육안적 부검조건으로 전 개체에서 특이한 이상소견은 관찰되지 않았다.

(4) 요 약

① 시험물질을 암·수 모두 기초시험 투여약량인 4,000 mg/kg를 투여하여 관찰한 결과 시험기간(14일)중 치사개체가 발견되지 않았다.

② 일반중독증상은 전 개체에서 시험기간(14일)동안 특이증상이 관찰되지 않았다.

③ 체중변화의 통계처리에 있어 체중측정 전 기간에 걸쳐 유의차가 인정되지 않았다.

④ 약제투여와 관련한 내부 장기에 대한 영향은 없었다.

이상의 결과 본 시험물질의 반수치사약량(LD₅₀)은 > 4,000 mg/kg으로 독성분 류상 저독성으로 확인되었다.

3) SeNPV의 잉어를 이용한 단회 투여 급성독성시험

SeNPV(5.0×10^{11} PIBs/g)에 대한 급성어독성을 잉어를 이용하여 96시간 동안 생사수, 일반중독증상을 관찰하고 체중 및 전장을 조사한 결과는 다음과 같다.

(1) 시험농도 수준설정 및 약제조제

① 시험농도 설정

기초시험 투여농도인 10 ppm에서 시험을 수행하였다.

② 시험용 수조

원통형의 유리제품 10ℓ (Φ24×30cm)용기를 사용하였다.

③ 시험어류의 크기 및 시험어류 수

잉어의 크기는 전장 5cm정도의 것으로 선별하였으며, 수조 당 시험 어류수는 5마리를 수용하고, 시험농도 수준 당 2개의 수조를 사용하였다.

④ 시험용수 및 수온

시험용수는 지하수를 72시간 이상 정체시켰다가 사용하였으며, 수온의

조절은 항온 수조 내에 시험용 유리 수조를 담귀서 23±1℃로 시험기간 동안 유지시켰다.

⑤ 산소공급

시험 기간 중 시험 중인 수조 내에 인위적인 산소공급은 시키지 않았다.

⑥ 사료 급여

시험개시 48시간 전부터 시험 종료 시까지 사료 급여를 중단하였다.

⑦ 대조구 설정

시험물질 무처리를 음성대조구로 하고, PCP-Na염(90%, Aldrich, USA)을 양성대조구로 하였다.

⑧ 약제 조제

시험물질이 액상이므로 칭량 후 증류수를 이용하여 현탁 후 처리하였다.

(2) 결과 및 고찰

① 생사어류 및 LC₅₀값(48h, 96h)

이상의 시험결과로 본 시험의 시험물질인 SeNPV(5.0×10^{11} PIBs/g)는 기초시험 투여농도인 10 ppm으로 10마리의 잉어에 투여한 결과 시험기간(96h) 중 치사개체가 발견되지 않았다. 따라서 본 약제의 반수치사약량(LC₅₀)은 48시간에서 > 10 ppm, 96시간에서 > 10 ppm으로 판명되었으며, 독성분류상 어독성 III급으로 사료된다.

② 일반중독증상

처리군에서 시험물질 투여 후 96시간동안 관찰되지 않았다.

(3) 요약

① 일반중독증상은 처리군에서 시험물질 투여 후 48시간 경과 시 수면 부상하는 개체가 관찰되었다.

② 체중은 평균 $1.01 \pm 0.21g$, 전장은 평균 $4.08 \pm 0.26cm$ 이었다.

③ pH는 평균 7.03(최저 6.60 - 최고 7.31)이었고, DO는 평균 6.81(최저 5.55 - 최고 8.47)였다.

④ 시험기간의 평균수온은 22.8℃(최저 22.0℃ - 최고 23.0℃)였다.

⑤ Total Hardness는 82.4(Moderately Hard), Alkalinity는 70.1(Moderately Hard)였다.

이상의 결과 본 시험물질의 LC₅₀(48hrs)은 > 10 ppm이었으며, 독성분류상 어독성 III급으로 확인되었다.

4) SeNPV 액상수화제의 마우스를 이용한 단회 투여 경구독성시험
SeNPV 1% 액상수화제에 대한 급성경구독성을 SPF마우스(ICR계통)를 이용하여 1회 경구 처리한 후 2주간 치사수, 일반중독증상, 체중 변화 및 부검소견을 관찰 조사한 결과는 다음과 같다.

(1) 투여약량 수준설정 및 약제조제

① 투여약량 설정

기초시험 투여약량인 5,000 mg/kg에서 암·수 공히 시험을 수행하였다.

② 투여약량 수준별 실험 동물수

실험 동물수는 농약의 등록시험기준과 방법(농촌진흥청고시 제2004-4호)에서와 같이 암·수 각 5마리를 이용하였고, 개체식별은 등부에 Picric acid를 이용하여 일련번호로 표시하였다.

③ 대조구의 설정

시험물질이 액상으로 투여약제 조제 시 증류수에 잘 현탁되므로 용매 대조군을 제외한 증류수 대조군만을 두었다.

④ 용매의 선택 및 시험물질의 조제

시험물질이 증류수에 잘 현탁되는 관계로 용매는 증류수로 하였으며, 시험물질의 조제는 20 ml의 Teflon Cap Vial을 이용하여 칭량한 후 증류수를 가하여 용해 및 현탁 시켜 조제하였다.

⑤ 투여액량의 설정

투여액량은 시험에 이용되는 마우스의 체중과 약액 투여량을 고려하여 투여액량 수준별 공히 10 ml/kg(체중)으로 설정하였다.

(2) 시험물질의 투여

① 사료의 절식

투여개시 3 - 4시간 전부터 절식을 시킨 후 투여 3 - 4시간 후 사료 급이를 재개하였다.

② 투여경로 및 투여방법

마우스용 경구 주사침(Zonde)을 이용하여 체중측정치를 기준으로 10 mg/kg 용량을 경구로 위내에 삽입, 1회에 한하여 강제투여 하였다.

(3) 결과 및 고찰

① 치사동물 및 LD₅₀값

이상의 시험결과로 본 시험의 시험물질인 SeNPV 1% 액상수화제는 기초시험 약량인 5,000 mg/kg에서 시험기간(14일)동안 암수모두 치사개체가 발견되지 않았다. 따라서 본 시험물질의 반수치사약량(LD₅₀)은 > 5,000 mg/kg으로 독성분류상 저독성을 나타내었다.

② 일반중독증상

전 개체에서 시험기간(14일)동안 특이증상이 관찰되지 않았다.

③ 체중변화

시험에 이용된 동물의 시험개시 D0, D1, D3, D7, D10, D14일째의 개체별 체중기록 결과로 보아 약제투여군은 무처리 대조군과 비교하여 유의차가 없었다.

④ 부검소견

육안적 부검소견으로 전 개체에서 특이한 이상소견은 관찰되지 않았다.

(4) 요약

① 시험물질을 암·수 모두 기초시험 투여약량인 5,000 mg/kg를 투여하여 관찰한 결과 시험기간(14일)중 치사개체가 발견되지 않았다.

② 일반중독증상은 전 개체에서 시험기간(14일)동안 특이증상이 관찰되지 않았다.

③ 체중변화의 통계처리에 있어 체중측정 전 기간에 걸쳐 유의차가 인정되지 않았다.

④ 약제투여와 관련한 내부 장기에 대한 영향은 없었다.

이상의 결과 본 시험물질의 반수치사약량(LD₅₀)은 > 5,000 mg/kg으로 독성분류상 저독성으로 확인되었다.

5) SeNPV 입상수화제의 랫드를 이용한 단회 투여 경피독성시험

SeNPV 1% 액상수화제에 대한 급성경피독성을 SPF 랫드(SD계통)를 이용하여 1회 경피 처리한 후 2주간 치사수, 일반중독증상, 체중 변화 및 부검소견을 관찰 조사한 결과는 다음과 같다.

(1) 투여약량 수준설정 및 약제조제

① 투여약량 설정

기초시험 투여약량인 4,000 mg/kg에서 암·수 공히 시험을 수행하였다.

② 투여약량 수준별 실험 동물수

실험 동물수는 농약의 등록시험기준과 방법(농촌진흥청고시 제2004-4호)에서와 같이 암·수 각 5마리를 이용하였고, 개체식별은 미부에 유성 매직를 이용하여 일련번호로 표시하였다.

③ 대조구의 설정

시험물질이 액상으로 투여약제 조제시 증류수에 잘 현탁되므로 용매 대조군을 제외한 증류수 대조군만을 두었다.

④ 용매의 선택 및 시험물질의 조제

시험물질이 증류수에 잘 현탁되는 관계로 용매는 증류수로 하였으며, 시험물질의 조제는 20 ml의 Teflon Cap Vial을 이용하여 칭량한 후 증류수를 가하여 용해 및 현탁시켜 조제하였다.

⑤ 투여액량의 설정

투여액량은 시험에 이용되는 랫드의 체중과 약액 투여량을 고려하여 투여액량 수준별 공히 5 ml/kg(체중)으로 설정하였다.

(2) 시험물질의 투여

① 사료의 절식

경피독성 시험의 투여 경로상 절식시간은 따로 두지 않았다

② 투여경로 및 투여방법

시험개시 전 약제처리를 위한 공시동물의 등부위를 동물용 제모기를 이용하여 체표면적의약 10%를 제모하고, 조제된 공시약제를 체표에 골고루 바른 후 약제유실을 방지하기 위하여 임상용 거어즈로 고르게 감고 비자극성 테이프로 고정시켜 주었다. 약제처리 24시간이경과한 후 도포물을 제거하고, 한편 피부에 남아 있는 공시약제를 증류수를 이용하여 잘 닦아주었다.

(3) 결과 및 고찰

① 치사동물 및 LD₅₀값

이상의 시험결과로 본 시험의 시험물질인 SeNPV 1% 액상수화제는 기초시험 약량인 4,000 mg/kg에서 시험기간(14일)동안 암수모두 치사개체가 발견되지 않았다. 따라서 본 시험물질의 반수치사약량(LD₅₀)은 > 4,000 mg/kg으로 독성분류상 저독성을 나타내었다.

② 일반중독증상

전 개체에서 시험기간(14일)동안 특이증상이 관찰되지 않았다.

③ 체중변화

시험에 이용된 동물의 시험개시 D0, D1, D3, D7, D10, D14일째의 개체별 체중기록 결과로 보아 약제투여군은 무처리 대조군과 비교하여 유의차가 없었다.

④ 부검소견

육안적 부검소견으로 전 개체에서 특이한 이상소견은 관찰되지 않았다.

(4) 요약

① 시험물질을 암·수 모두 기초시험 투여약량인 4,000 mg/kg를 투여하여 관찰한 결과 시험기간(14일)중 치사개체가 발견되지 않았다.

② 일반중독증상은 전 개체에서 시험기간(14일)동안 특이증상이 관찰되지 않았다.

- ③ 체중변화의 통계처리에 있어 체중측정 전 기간에 걸쳐 유의차가 인정되지 않았다.
- ④ 약제투여와 관련한 내부 장기에 대한 영향은 없었다.

이상의 결과 본 시험물질의 반수치사약량(LD₅₀)은 > 4,000 mg/kg으로 독성분류상 저독성으로 확인되었다.

6) SeNPV 액상수화제의 잉어를 이용한 단회 투여 급성독성시험

(1) 시험농도 수준설정 및 약제조제

① 시험농도 설정

기초시험 투여농도인 10 ppm에서 시험을 수행하였다.

② 시험용 수조

원통형의 유리제품 10ℓ (φ24×30cm)용기를 사용하였다.

③ 시험어류의 크기 및 시험어류 수

잉어의 크기는 전장 5cm정도의 것으로 선별하였으며, 수조 당 시험 어류수는 5마리를 수용하고, 시험농도 수준 당 2개의 수조를 사용하였다.

④ 시험용수 및 수온

시험용수는 지하수를 72시간 이상 정체시켰다가 사용하였으며, 수온의 조절은 항온 수조 내에 시험용 유리 수조를 담귀서 23±1℃로 시험기간 동안 유지시켰다.

⑤ 산소공급

시험 기간 중 시험 중인 수조 내에 인위적인 산소공급은 시키지 않았다.

⑥ 사료 급여

시험개시 48시간 전부터 시험 종료 시까지 사료 급여를 중단하였다.

⑦ 대조구 설정

시험물질 무처리를 음성대조구로 하고, PCP-Na염(90%, Aldrich, USA)을 양성대조구로 하였다.

⑧ 약제 조제

시험물질이 액상이므로 칭량 후 증류수를 이용하여 현탁 후 처리하였다.

(2) 관찰 및 검사항목

① 일반중독증상 및 생사율

처리당일은 1시간에서 4시간까지는 매시간, 그 이후에는 24, 48, 72, 96 시간 간격으로 일반중독증상 및 생사수를 관찰 조사하였다.

② 체중측정 및 크기측정

시험 중 치사된 개체는 발견 즉시 꺼내어 체중 및 전장을 측정하였으며, 시험 종료 후 살아남은 개체는 시험 종료 시 체중과 전장을 측정하였다.

(3) 결과 및 고찰

① 생사어류 및 LC₅₀값(48h, 96h)

이상의 시험결과로 본 시험의 시험물질인 SeNPV 1% 액상수화제는 기초시험 투여농도인 10 ppm으로 10마리의 잉어에 투여한 결과 시험기간(96h) 중 치사 개체가 발견되지 않았다. 따라서, 본 약제의 반수치사약량(LC₅₀)은 48시간에서 > 10ppm, 96시간에서 > 10 ppm으로 판명되었으며, 독성분류상 어독성 III급으로 사료된다.

② 일반중독증상

처리군에서 시험물질 투여 후 96시간동안 관찰되지 않았다.

(4) 요약

① 일반중독증상은 처리군에서 시험물질 투여 후 48시간 경과 시 수면 부상하는 개체가 관찰되었다.

② 체중은 평균 $0.94 \pm 0.211\text{g}$, 전장은 평균 $4.58 \pm 0.223\text{cm}$ 이었다.

③ pH는 평균 7.04(최저 6.61 - 최고 7.30)이었고, DO는 평균 6.98(최저 6.05 - 최고 8.78)였다.

④ 시험기간의 평균수온은 22.5°C (최저 22.0°C - 최고 23.0°C)였다.

⑤ Total Hardness는 84.3(Moderately Hard), Alkalinity는 72.0(Moderately Hard)였다.

이상의 결과 본 시험물질의 LC₅₀(48hrs)은 > 10ppm이었으며, 독성분류상 어독성 III급으로 확인되었다.

7) SeNPV 입상수화제의 마우스를 이용한 단회 투여 경구독성시험

SeNPV 입상수화제(5×10^9 PIBs/g)에 대한 급성경구독성을 SPF마우스(ICR계통)를 이용하여 1회 경구 처리한 후 2주간 치사수, 일반중독증상, 체중 변화 및 부검소견을 관찰 조사한 결과는 다음과 같다.

(1) 투여약량 수준설정 및 약제조제

① 투여약량 설정

기초시험 투여약량인 2,500 mg/kg에서 암·수 공히 시험을 수행하였다.

② 투여약량 수준별 실험 동물수

실험 동물수는 농약의 등록시험기준과 방법(농촌진흥청고시 제2005-7호)에서와 같이 암·수 각 5마리를 이용하였고, 개체식별은 등부에 Picric acid를 이용하여 일련번호로 표시하였다.

③ 대조구의 설정

시험물질이 고상으로 투여약제 조제시 증류수에 잘 현탁되므로 용매 대조군을 제외한 증류수 대조군만을 두었다.

④ 용매의 선택 및 시험물질의 조제

시험물질이 증류수에 잘 현탁되는 관계로 용매는 증류수로 하였으며, 시험물질의 조제는 20 ml의 Teflon Cap Vial을 이용하여 칭량한 후 증류수를 가하여 용해 및 현탁시켜 조제하였다.

⑤ 투여액량의 설정

투여액량은 시험에 이용되는 마우스의 체중과 약액 투여량을 고려하여 투여액량 수준별 공히 10 ml/kg(체중)으로 설정하였다.

(2) 시험물질의 투여

① 사료의 절식

투여개시 3 - 4시간 전부터 절식을 시킨 후 투여 3 - 4시간 후 사료 급이를 재개하였다.

② 투여경로 및 투여방법

마우스용 경구 주사침(Zonde)을 이용하여 체중측정치를 기준으로 10 mg/kg 용량을 경구로 위내에 삽입, 1회에 한하여 강제투여 하였다.

(3) 결과 및 고찰

① 치사동물 및 LD50값

이상의 시험결과로 본 시험의 시험물질인 SeNPV 입상수화제(5×10^9 PIBs/g)는 기초시험 약량인 2,500 mg/kg에서 시험기간(14일)동안 암수모두 치사개체가 발견되지 않았다. 따라서 본 시험물질의 반수치사약량(LD₅₀)은 > 2,500 mg/kg으로 독성분류상 저독성을 나타내었다.

② 일반중독증상

전 개체에서 시험기간(14일)동안 특이증상이 관찰되지 않았다.

③ 체중변화

시험에 이용된 동물의 시험개시 D0, D1, D3, D7, D10, D14일째의 개체별 체중기록결과로 보아 약제투여군은 무처리 대조군과 비교하여 유의차가 없었다.

④ 부검소견

육안적 부검소견으로 전 개체에서 특이한 이상소견은 관찰되지 않았다.

(4) 요 약

① 시험물질을 암·수 모두 기초시험 투여약량인 2,500 mg/kg를 투여하여 관찰한 결과 시험기간(14일)중 치사개체가 발견되지 않았다.

② 일반중독증상은 전 개체에서 시험기간(14일)동안 특이증상이 관찰되지 않았다.

③ 체중변화의 통계처리에 있어 체중측정 전 기간에 걸쳐 유의차가 인정되지 않았다.

④ 약제투여와 관련한 내부 장기에 대한 영향은 없었다.

이상의 결과 본 시험물질의 반수치사약량(LD₅₀)은 > 2,500 mg/kg으로 독성분류상 저독성으로 확인되었다.

8) SeNPV 입상수화제의 랫드를 이용한 단회 투여 경피독성시험

SeNPV 입상수화제(5×10^9 PIBs/g)에 대한 급성경피독성을 SPF 랫드(SD계통)를 이용하여 1회 경피 처리한 후 2주간 치사수, 일반중독증상, 체중 변화 및 부검소견을 관찰 조사한 결과는 다음과 같다.

(1) 투여약량 수준설정 및 약제조제

① 투여약량 설정

기초시험 투여약량인 2,000 mg/kg에서 암·수 공히 시험을 수행하였다.

② 투여약량 수준별 실험 동물수

실험 동물수는 농약의 등록시험기준과 방법(농촌진흥청고시 제2005-7호)에 서와 같이 암·수 각 5마리를 이용하였고, 개체식별은 미부에 유성 매직을 이용하여 일련번호로 표시하였다.

③ 대조구의 설정

시험물질이 액상으로 투여약제 조제시 증류수에 잘 현탁되므로 용매 대조군을 제외한 증류수 대조군만을 두었다.

④ 용매의 선택 및 시험물질의 조제

시험물질이 증류수에 잘 현탁되는 관계로 용매는 증류수로 하였으며, 시험물질의 조제는 20 ml의 Teflon Cap Vial을 이용하여 칭량한 후 증류수를 가하여 용해 및 현탁시켜 조제하였다.

⑤ 투여액량의 설정

투여액량은 시험에 이용되는 랫드의 체중과 약액 투여량을 고려하여 투여액량 수준별 공히 5 ml/kg(체중)으로 설정하였다.

(2) 시험물질의 투여

① 사료의 절식

경피독성 시험의 투여 경로상 절식시간은 따로 두지 않았다

② 투여경로 및 투여방법

시험개시 전 약제처리를 위한 공시동물의 등부위를 동물용 제모기를 이용하여 체표면적의약 10%를 제모하고, 조제된 공시약제를 체표에 골고루 바른 후

약제유실을 방지하기 위하여 임상용 거어즈로 고르게 감고 비자극성 테이프로 고정시켜 주었다. 약제처리 24시간이경과한 후 도포물을 제거하고, 한편 피부에 남아 있는 공시약제를 증류수를 이용하여 잘 닦아주었다.

(3) 결과 및 고찰

① 치사동물 및 LD50값

이상의 시험결과로 본 시험의 시험물질인 Se NPV 입상수화제(5×10^9 PIBs/g)는 기초시험 약량인 2,000 mg/kg에서 시험기간(14일)동안 암수모두 치사 개체가 발견되지 않았다. 따라서 본 시험물질의 반수치사약량(LD₅₀)은 > 2,000mg/kg으로 독성분류상 저독성을 나타내었다.

② 일반중독증상

전 개체에서 시험기간(14일)동안 특이증상이 관찰되지 않았다.

③ 체중변화

시험에 이용된 동물의 시험개시 D0, D1, D3, D7, D10, D14일째의 개체별 체중기록결과로 보아 약제투여군은 무처리 대조군과 비교하여 유의차가 없었다.

④ 부검소견

육안적 부검소견으로 전 개체에서 특이한 이상소견은 관찰되지 않았다.

(4) 요 약

① 시험물질을 암·수 모두 기초시험 투여약량인 2,000 mg/kg를 투여하여 관찰한 결과 시험기간(14일)중 치사개체가 발견되지 않았다.

② 일반중독증상은 전 개체에서 시험기간(14일)동안 특이증상이 관찰되지 않았다.

③ 체중변화의 통계처리에 있어 체중측정 전 기간에 걸쳐 유의차가 인정되지 않았다.

④ 약제투여와 관련한 내부 장기에 대한 영향은 없었다.

이상의 결과 본 시험물질의 반수치사약량(LD₅₀)은 > 2,000mg/kg으로 독성분류상 저독성으로 확인되었다.

9) SeNPV 입상수화제의 잉어를 이용한 단회 투여 급성독성시험

(1) 시험농도 수준설정 및 약제조제

① 시험농도 설정

기초시험 투여농도인 10ppm에서 시험을 수행하였다.

② 시험용 수조

원통형의 유리제품 10ℓ (φ24×30cm)용기를 사용하였다.

③ 시험어류의 크기 및 시험어류 수

잉어의 크기는 전장 5cm정도의 것으로 선별하였으며, 수조 당 시험 어류수는 5마리를 수용하고, 시험농도 수준 당 2개의 수조를 사용하였다.

④ 시험용수 및 수온

시험용수는 지하수를 72시간 이상 정체시켰다가 사용하였으며, 수온의 조절은 항온 수조내에 시험용 유리 수조를 담귀서 23±1℃로 시험기간 동안 유지시켰다.

⑤ 산소공급

시험 기간 중 시험 중인 수조 내에 인위적인 산소공급은 시키지 않았다.

⑥ 사료 급여

시험개시 48시간 전부터 시험 종료 시까지 사료 급여를 중단하였다.

⑦ 대조구 설정

시험물질 무처리를 음성대조구로 하고, PCP-Na염(90%, Aldrich, USA)을 양성대조구로 하였다.

⑧ 약제 조제

시험물질이 고상이므로 칭량 후 증류수를 이용하여 현탁 후 처리하였다.

(2) 결과 및 고찰

① 생사어류 및 LC50값(48h, 96h)

이상의 시험결과로 본 시험의 시험물질인 SeNPV 입상수화제(5×10⁹PIBs/g)는 기초시험 투여농도인 10ppm으로 10마리의 잉어에 투여한 결과 시험기간(96h) 중 치사개체가 발견되지 않았다. 따라서, 본 약제의 반수치사약량(LC50)은 48시간에

서 > 10ppm, 96시간에서 > 10ppm으로 판명되었으며, 독성분류상 어독성 III급으로 사료된다.

② 일반중독증상

처리군에서 시험물질 투여 후 96시간동안 관찰되지 않았다.

(3) 요 약

① 일반중독증상은 처리군에서 시험물질 투여 후 48시간 경과 시 수면 부상하는 개체가 관찰되었다.

② 체중은 평균 $0.97 \pm 0.23g$, 전장은 평균 $4.60 \pm 0.21cm$ 이었다.

③ pH는 평균 7.08(최저 6.67 - 최고 7.28)이었고, DO는 평균 6.92(최저 6.14 - 최고 8.94)였다.

④ 시험기간의 평균수온은 $22.5^{\circ}C$ (최저 $22.0^{\circ}C$ - 최고 $23.0^{\circ}C$)였다.

⑤ Total Hardness는 82.4(Moderately Hard), Alkalinity는 70.1(Moderately Hard)였다.

이상의 결과 본 시험물질의 LC50(48hrs)은 > 10ppm이었으며, 독성분류상 어독성 III급으로 확인되었다.

4. 결과 요약

(가) 핵다각체병바이러스(SeNPV)의 제제화를 위하여 처방을 검토한 결과, 액상으로는 액상수화제가 고상으로는 입상수화제의 제제가 가능함에 따라 다양한 제품 개발이 가능할 것으로 판단되었다.

(나) 약효증진을 위하여 적절한 보조제와 함께 약효 증진제를 선발하였으며, 이를 제형간 비교를 통하여 선발된 입상수화제에 적용하여 최적화된 핵다각체병바이러스(SeNPV) 제제처방을 확립할 수 있었다.

(다) 핵다각체병바이러스(SeNPV)의 환경안정성 평가를 위하여 원분과 이를 이용한 액상수화제 및 입상수화제 제품에 대하여 인축독성 및 환경생태독성 시험을

실시한 결과, 원분과 제품 모두 인축독성에서는 저독성인 것으로 환경생태독성에서는 어독성 Ⅲ급에 해당하는 것으로 나타나 제품개발에 문제가 없을 것으로 판단되었다.

제4장 목표달성도와 관련분야에서의 기여도

제1절 목표 달성도

연차별 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 목표 달성도를 아래의 1항, 2항, 3항에 나타냈다. 연차별 연구개발 목표들은 대체적으로 연구 계획서의 진도를 일치하여 달성되었으며, 연구의 최종 목표 달성도 역시 3항에 나타낸 바와 같이 계획서의 최종 목표를 충분히 달성하였다고 생각된다.

1. 제 1 차년도의 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도

연구개발 목표	평 가		목표 달성도 (%)	참조부문 (제 2 장)
	평가의 착안점	평가의 척도(%)		
1. 기주곤충의 대량사육법 개발	1. 인공사료 개선 2. 온, 습도 등 사육조건 구명	40	100	제 1 절 제 1, 2절
2. 핵다각체병바이러스 대량생산	1. 핵다각체병바이러스 최적생산 조건 구명 2. 주요환경에 대한 안정성 구명	30	100	제 3, 4 절 제 5 절
3. 핵다각체병바이러스 생화학적 특성검정	1. 나방류 바이러스 수집 및 분리 2. 생화학적 특성 및 병원성 검정	20	100	제 8 절 제 8. 11 절
4. 핵다각체병바이러스의 제형화	1. 기초 제형화 연구 : 문헌 등의 분석 2. 핵다각체병바이러스 제제의 특성 연구	10	100	제 12 절 제 12절

2. 제 2 차년도 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도

연구개발 목표	평 가		목표 달성도 (%)	참조부문 (제 2 장)
	평가의 착안점	평가의 척도(%)		
1. 기주곤충의 대량사육법 개발	1. 인공사료 개선 2. 온, 습도 등 사육조건 구명	20	100	제 1 절 제 1, 2절
2. 핵다각체병바이러스 대량생산	1. 핵다각체병바이러스 최적생산 조건 구명 2. 주요환경에 대한 안정성 구명 3. 바이러스 살포량 및 살포방법 구명	30	100	제 3, 4 절 제 5 절 제 6 절
3. 핵다각체병바이러스 생화학적 특성검정	1. 나방류 바이러스 수집 및 분리 2. 생화학적 특성 및 병원성 검정 3. 유묘 및 포장 병원성 검정	20	100	제 8 절 제 8. 11 절 제 9, 10 절
4. 핵다각체병바이러스의 제형화	1. 제형화를 위한 첨가제 선발 2. 상품화를 위한 제형화 3. 안정성 및 독성시험	30	100	제 7 절 제 7 절 제 12절

3. 제 3 차년도 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도

연구개발 목표	평 가		목표 달성도 (%)	참조부문 (제 2 장)
	평가의 착안점	평가의 척도(%)		
1. 기주곤충의 대량사육법 개발	1. 인공사료 개선 2. 온, 습도 등 사육조건 구명	10	100	제 1 절 제 1, 2 절
2. 핵다각체병바이러스 대량생산	1. 핵다각체병바이러스 최적생산 조건 구명 2. 주요환경에 대한 안정성 구명 3. 바이러스 살포량 및 살포방법 구명	30	100	제 3, 4 절 제 5 절 제 6 절
3. 핵다각체병바이러스 생화학적 특성검정	1. 나방류 바이러스 수집 및 분리 2. 생화학적 특성 및 병원성 검정 3. 병원성 농가 실증	10	100	제 8 절 제 8. 11 절 제 10 절
4. 핵다각체병바이러스의 제형화	1. 제형화를 위한 첨가제 선발 2. 상품화를 위한 제형화 3. 안정성 및 독성시험	50	100	제 7 절 제 7 절 제 12 절

4. 최종 평가의 착안점 및 목표 달성도

연구개발 목표	평 가		목표 달성도 (%)	참조부문 (제 2 장)
	평가의 착안점	평가의 척도(%)		
1. 기주곤충의 대량사육법 개발		20	100	제 1, 2 절
2. 핵다각체병바이러스 대량생산		30	100	제 3, 4, 5, 6 절
3. 핵다각체병바이러스 생화학적 특성검정		20	100	제 8, 9, 10, 11 절
4. 핵다각체병바이러스 제형화		30	100	제 7, 12 절

제2절 관련 분야에의 기여도

환경에 서식하고 있는 일부 미생물을 친환경 해충 방제에 있어서 중요한 자원으로 활용할 수 있는 자원이다. 최근 새로운 해충 방제 기술로 널리 연구되고 있는 생물적 방제는 곤충바이러스, 병원균, 기생성 및 포식성 천적 등을 이용하는 방법이다. 또한 최근에는 식물에서 추출한 물질을 이용한 식물성 농약의 상용화가 이루어지고 있는 추세이다. 이 중에서 미생물 바이러스는 기주곤충에 대한 특이성이 높고 목적해충만을 방제할 수 있다는 장점을 가지고 있어 원예해충을 중심으로 한 농작물이나 산림해충 방제에 효과적이며 현재 세계적으로 환경과 인류건강 문제에 대한 관심이 높아져 일부 선진국에서는 미생물살충제가 상품화되어 시판되기 시작했다. 그러나 핵다각체병바이러스의 증식은 기주곤충과 배양 세포계에서 가능하지만 세포배양액이 비싸서 살충제용 바이러스 생산에는 기주곤충의 대량사육법이 이용되고 있어 값이 싸고 실용적인 인공사료 개발 등이 선행되어야 하며 효율적인 면에서 기존의 화학 살충제와 비교하여 살충범위가 좁고, 살충효과가 늦게 나타나고, 저장중이나 야외 살포 후 태양광선에 의해 바이러스의 병원성이 낮아지는 등 문제점이 대두되었다. 본 연구에서는 1) 생물적 방제 능력이 우수한 과밤나방 핵다각체병바이러스를 사용하기 위하여 그 숙주 곤충인 과밤나방을 대량 사육할 수 있는 인공사료를 개발하였으며, 바이러스를 대량 증식하기 위한 사육용기별 적정 사육량을 결정하였다. 2) 우리나라에 분포하는 과밤나방 핵다각체병바이러스의 병원성이 동일한지를 파악하기 위하여 전자현미경과 당밀도 구배법 등의 기술을 이용 생화학적 특성을 검정하였다. 3) 전라남도 농업기술원에서 자체 생산한 과밤나방 핵다각체병바이러스를 이용해서 과밤나방을 대상으로 유묘와 포장에서 이용 가능성을 검정하여 노지와 비닐하우스에서 살충 효과가 뛰어난을 확인하였다. 4) 이를 바탕으로 바이러스의 환경내의 안정성과 보관 온도, 포장에서의 살포농도 및 기구 등을 확립하여 제형화를 위한 기초 자료를 제공하였다. 5) 이 바이러스를 제형을 위하여 제형화 다양성 검토하여 입상수화제가 가장 우수함을 밝혀냈고 어독성, 동물독성, 경피독성 등 여러 가지 안정성 검사를 하여 안정성을 확보하였다.

1. 기술적 측면에서의 기여도

본 연구를 통하여 개발된 과밤나방 핵다각체병바이러스는 제 10절에서 기술한 바와 같이 온실, 비닐하우스, 노지포장에서 과밤나방을 방제 효과가 탁월한 미생물이다. 이 바이러스는 현재 알려진 바로 태양광선에 의하여 급속도로 불활성화된다. 이 때문에 여러 물질 등을 혼합하여 자외선 차단효과 및 병원성을 증식시키며, 또한 이 첨가물로 인해 다른 해충 및 병도 방제 할 수 있을 것이다.

본 연구에 의하여 정립된 과밤나방 핵다각체병바이러스의 제형방법을 이용하면 다른 곤충병원 미생물 농약 개발에 이용할 수 있을 것이다. 또한 이 연구 내용을 국내 농약 제조회사에 대량 생산 기술 전수로 자체 생산 추진할 수 있으며 외국 원료 수입 농약 대체용으로 활용할 수 있을 것이다.

2. 학문 발전에의 기여도

본 연구는 국내에서 미개척 분야인 미생물 곤충 바이러스에 의한 과밤나방 방제제 개발에 관한 연구로 핵다각체병바이러스에 대한 많은 정보를 제공하였다. 따라서 본 연구는 해충학, 병리곤충학, 곤충 미생물 바이러스 분야의 발전에 기여했다고 판단된다. 본연구의 결과는 다음과 같이 학술지나 학술대회에 발표되었다.

가. 학술지

1) Seon Gon Kim, Jong Dae Park, Do Ik Kim, Hyeong Gug Choi, Sang Soo Kim and Hwang-In Cheon. 2004. Effects of different temperatures on pathogenicity of *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus(SeNPV). Korean J. Appl. Entomol. 43(4):329~332

2) Seon Gon Kim, Jong Dae Park, Do Ik Kim, Jing Young Park and Hyeong Gug Choi. 2004. Enhanced Effectiveness of *Spodoptera litura* Nucleopolyhedrovirus with Organic Acids and Functional Matters. Korean J.

Appl. Entomol. 43(1): 55~60

3) Seon Gon Kim, Do Ik Kim, Jong Dae Park, Hyeong Gug Choi and Yong Man Yoo. 2003. Pathogenicity of *Spodoptera litura* Nucleopolyhedrovirus with Different Temperatures. Korean J. Appl. Entomol. 42(2):159~163.

4) Seon Gon Kim, Jong Dae Park, Do Ik Kim, Dae Joon Im, Kyu Chin Kim and Yong Man Yoo. 2003. Effects of field application of *Spodoptera litura* Nucleopolyhedrovirus to control *Spodoptera litura* in Chrysanthemim. Korean J. Appl. Entomol. 42(2):153~157

나. 학술발표

1) Jong Dae Park, Seon Gon Kim, Do Ik kim and Yeon Soo Han. 2005. *In vivo* mass production of nucleopolyhedrovirus in *Spodoptera exigua*. 5th Asia-Pacific Congress of Entomology. p56

2) Seon Gon Kim, Jong Dae Park, Do Ik kim, Cheol Jang and kyong ju Choi. 2005. Production of *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus(SeNPV) with different temperatures and developmental stages. Korean J. Appl. Entomol. 2005 춘계학술발표 초록집.

3) Seon Gon Kim, Jong Dae Park, Do Ik kim and Hyeong Gug Choi. 2004. The Effect of Temperature, Storage and Sunlight on the Pathogenicity of the *S. exigua* nucleopolyhedrovirus Korean J. Appl. Entomol. 2004 추계학술발표 초록집.

4) 김선곤, 박종대, 김도익, 최형국, 김상수. 2004. 국화 포장에서 과밤나방 방제를 위한 핵다각체병바이러스 살포효과. 한국응용곤충학회, 2004 추계학술발

표 초록집

5) Mi Young Noh, Seon Gon Kim, Sun Am Kim, Ju Young Noh, Do Ik kim, Jong Dae Park, Chi Young Yoon, Kyu Chin Kim and Yeon Soo Han. 2004. Toward a molecular cloning of NOS from a beat armyworm, *Spodoptera exigua*. The Entomological society of korea. 2004 추계학술발표 초록집 p75.

3. 경제, 산업적 측면에의 기여도

본 연구는 산업적 효용가치를 고려하여 특허출원 준비 중에 있으며 팜가드라는 상표명으로 주식회사 경농에서 2005년 동작물 딸기에 과밤나방 방제용으로 미생물농약 등록 시험 중에 있으며 영농기술 자료로 활용중이다. 또한 친환경재배 농가에서 과프리카, 딸기, 칼라피망, 쌈채에서 효과를 농업들로부터 확인하였다. 또한 전라남도에서 주최한 전남식품산업 전시회(AT센타)와 제 4회 대한민국 농업박람회에 시제품을 전시하였다. 그리고 전남농업기술원 부설 전남농업생명대학에서 곤충병원 미생물을 이용한 해방방제 교육 자료로 활용 중에 있다..



【전시 장면】



【미생물농약 시제품】

제5장 연구개발결과의 활용계획

제1절 추가연구의 필요성

1. 곤충 바이러스의 다른 해충으로 추가 연구의 필요성

3년으로 계획된 본 연구가 성공적으로 이루어져 많은 곤충 병원성 바이러스들이 확보되었다. 지금까지 연구 결과로 볼 때 핵다각체병바이러스를 제형화에 성공하여 좋은 결과를 도출하였다. 그러나 이 바이러스의 특성상 해충 한가지에만 작용하는 단점이 있기 때문에 여러 바이러스를 조합하여 여러 종의 해충을 방제할 수 있는 제품을 개발하여 요즘 문제가 되는 농업인의 인력난을 해소하고 작물 재배 시 문제가 되는 해충을 동시에 방제할 수 있는 제형을 만들려고 시도하고 싶다. 실제로 담배거세미나방과 과밤나방 핵다각체병바이러스를 혼합하여 농가에서 실증한 결과 두 가지 해충의 방제가 가능하였다.

2. 포장 및 타 작물로의 확대의 필요성

본 연구에서 얻어진 결과는 주로 하우스와 온실 위주의 고소득 작물에서 이루어진 작물이고 또한 제형화된 팜가드는 일부지역에서 한 작물만을 대상으로 국한되었으므로 좀더 광범위한 작물과 시설이 아닌 노지재배 작물에도 확대 적용해야 할 것이다. 따라서 팜가드는 더 많은 작물의 과밤나방에 대하여 3년 정도의 포장시험을 수행해야 할 것으로 사료된다.

제2절 기업화 추진방향

과밤나방 핵다각체병바이러스를 주식회사 경농으로 기술 이전하여 기업화할 예정이고 이미 미생물 농약 등록을 올해는 딸기에만 한정했지만 앞으로 지속적 많은 작물에 대한 포장시험을 통하여 팜가드의 미생물 농약 사용 범위를 확대할 예정이다. 또한 지금까지 수집된 다른 핵다각체병바이러스와 혼합제를 만들어 주식회사 경농과 연계하여 계속적으로 기업화할 예정이다.

제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제1절 미국 농무성 곤충 생물적 방제연구소

1. 출장개요

가. 목 적

농업의 국제화, 개방화에 부응한 친환경 살충제인 곤충병원성 미생물연구의 선진국인 미국의 곤충바이러스의 대량증식, Pilot 제작기술 및 연구 동향을 파악하여 금후 곤충병원성 바이러스의 신제품 개발과 미생물 살충제 연구의 발전에 기여할 수 있는 계기를 마련하고자 함

나. 주요내용

- 미농무성 곤충 생물적 방제연구소 방문
 - 곤충 미생물 바이러스 대량증식 체계
 - 곤충 포식성 및 기생성 천적 사육 및 이용
 - 곤충병원성 바이러스 Pilot 제작과정
- 미조리 주립대학교 농과대학 방문
 - 식물 과학부 곤충학과 방문 및 포장 견학

다. 기대효과

- 곤충병원성 바이러스 Pilot 제작기술 습득
- 곤충 천적 및 미생물 대량사육 기술 이용
- 농업기술 정보 및 각종 기초자료 수집 이용

2. 출장수행 사항

▷ BCIRL : Biological Control of Insect Research Laboratory



생물적 방제연구소



전경사진

▷ 설립목적

- 생물적 방제 전략을 통하여 곤충과 잡초의 피해를 최소화
- 농업과 자연생태계 해충에 대한 포식성 및 기생성 천적, 병원미생물 사용 방법과 방제법 개발

▷ 설립년도 : 1966년

▷ 연구소 면적 : 40,468m²(10acre)

▷ 위치 : 미조리 주립대학 연구단지(Research ParK)

▷ 연구진 : 총 26명

- 연구원(Scientists) : 5명(연구소장 포함)
- 보조연구원(Support Scientists) : 5명
- 보조원(Support Staff) : 16명

▷ 현재 추진사업

- 해충 생물적 방제를 위한 곤충 병원미생물 인자의 활성화 증진
 - 콜로라도 감자벌레 용의 cell line 수립
 - 배추좀나방 베쿨로바이러스 재조합
 - 배추좀나방에서 분리한 새로운 베쿨로바이러스 기주범위 연구
 - DNA Andmnpv와 Snpv의 태양광선 Uv-B 불활성 연구

- 해충의 생물적 방제용 천적 사육기술 개선
 - 곤충과 잡초해충의 인공사료 최적화
 - 휴면유도 및 정지에 대한 방법 개선
 - 살충제 저항성에 대한 감수성과 잠재성 검정
 - 생식, 휴면, 살충제 저항성, 스트레스에 대한 진단기술 개발

▷ 곤충 사육실

- 현재 사육 해충 : *Plutella xylostella*, *Trichoplusia ni*, *Heliothis species*
- N.R. Spencer and P.K. Peters 개발한 인공 사료 개량 사용



인공사료 제조기



인공사료 주입기



곤충 난 소독시설



사육 용기



대량사육



천적 검정용 온실

▷ 포식성 및 기생성 천적실



포식성 천적 실험실



포식성 천적 개체사육



포식성 천적 포식량 조사



포식성 천적 대량사육



기생성 천적 사육상자



기생성 천적 대량사육



기생성 천적 사육 장면

▷ 곤충 바이러스 연구실



천적실 기자재



곤충 바이러스 병원성 검정



바이러스 초저온 냉동고 보관



베칼로바이러스 세포배양 용기



베칼로바이러스 배양액



자외선 방사 장치



곤충바이러스 상품

3. 만남 사람들

- Thomas A. Coudron : Research Chemist coudront@missouri.edu
- Arthur H. McIntosh : Research Microbiologist mcintosh@missouri.edu
- Kent S. Shelby : Research Entomologist shelbyk@missouri.edu
- Cynthia L. Goodman : Insectary Manager/Entomologist goodmanc@missouri.edu
- James J. Grasele : Entomologist graselajj@missouri.edu
- Carlo M. Ignoffo : Collaborator ignoffoc@missouri.edu
- Maureen Wright-Osment : Entomologist mmwa9b@mizzou.edu
- Larry D. Brown : Insect Production Worker brownl@missouri.edu
- Bradley V. Vickers : Insect Production Worker vickersb@missouri.edu

제7장 참고문헌

- Abul-Nasr, S., 1956. Polyhedrosis virus disease on cotton leaf-worm, *Prodenia litura* F. Bull. Entom. Egypte., XI: 321~332
- Ahuja D.B. and A. Noor. 1991. Effect of different host plants on the development of *Spodoptera litura* (Fab.). J. Insect Sci. 4(2): 176~177.
- Argauer, R. and M. Shapiro. 1997. Fluorescence and relative activities of stilbene optical brighteners as enhancers for the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) baculovirus. J. Econ. Entomol. 90(2): 416-420
- Asayama T., and N. Osaki, 1970. A cytoplasmic polyhedrosis virus of the cottonleaf-worm, *Prodenia litura*. J. Invertebr. Pathol., 16: 292~294
- Bae S.D. and H.J. Cho. 1998. Study on the physio-biology and control of *Spodoptera litura* Fabricius. Pl. Environ. Res. Rept. Nat. Yeongnam Agric. Expt. Sta. RDA. pp. 877~907
- Bae S.D. and K.B. Park, 1999. Effects of Temperature and Food Source on Pupal Development, Adult Longevity and Oviposition of the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* Fabricius. Korean J. Appl. Entomol. 38(1): 23~28
- Bae S.D., K.B. Park and Y.J. Oh 1997. Effects of Temperature and Food Source on the egg and larval Development of tobacco cutworm, *Spodoptera litura* Fabricius. Korean J. Appl. Entomol. 36(1): 48~54
- Balasubramanian, G., S. Chelliah and M. Balasubramanian. 1984. Effects of host plants on the biology of *Spodoptera litura* Fabricius. Indian J. Agric. Sci. 54(12): 1075~1080.
- Battu G.S. 1987. Propagation of nuclear polyhedrosis virus of the lucerne caterpillar, *Spodoptera exigua*(Hubner). Indian J. of Ecology 14(1): 16

1~163

- Behle, R.W., P. Tamez-Guerra and M. R. McGuire. 2003. Field activity and storage stability of *Anagrapha falcifera* nucleopolyhedrovirus (AfMNPV) in spray-dried lignin-based formulations. *J. Econ. Entomol.* 96(4): 1066-1075
- Bergold G.H., and B. Flaschentrager, 1975. The polyhedral virus of *Prodenia litura*(Fabr.) (Lepidoptera : Noctuidae). *Nature*, Vol. 180: 1046~1047
- Birnbaum MJ, Clean RJ, Miller LK. An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. *J Virol.* 1994 Apr;68(4):2521-8.
- Burges, H. D. and K. A. Jones. 1998. Formulation of bacteria, viruses and protozoa to control insects. pp. 33-128, In *Formulation of Microbial Biopesticides beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments* (ed. H. D. Burges), Kluwer Academic Publishers, UK
- Choi J.Y., H.S. Kim, B.R. Jin, K.Y. Seol, H.Y. Park and S.K. Kang. 1996. Pathogenicity and Production of *Spodoptera exiqua* Nuclear Polyhedrosis Virus. *Korean J. Appl. Etomol.* 35(3): 228~231
- Choo H.Y., K.S. Woo, P.J. Shea and Y.D. Park. 1992. Phytophagous Insects Associated with Compositae(Campanulales: Dicotyledonear). *Korean J. Appl. Etomol.* 31(4): 509~515
- Cisneros J., J.A. Perez, D.I. Penagos, R.V. Jaime, D. Goulson, P.Caballero, R.D. Cave and T. Williams. 2002. Formulation of a Nucleopolyhedrosis with Boric Acid for Control of *Spodoptera Frugiperda*(Lepidoptera: Noctuidae) in Maize. *Bio. Con.* 23: 87~95
- Cisneros, J., J.A. Perez, D.I. Penagos, R.V. Jaime, D. Goulson, P. Caballero, R.D. Cave and T. Williams. 2002. Formulation of a

- nucleopolyhedrovirus with boric acid for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in maize. *Biol. Contr.* 23: 87-95
- Cook S.P., R.E. Webb and K.W. Thorpe. 1996. Potential enhancement of the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus with the triterpene azadirachin. *Environ. Entomol.* 25(5): 1209~1214
- Dandurand, L.M., M. J. Morra, M. H. Chaverra and C. S. Orser. 1994. Survival of *Pseudomonas* spp in air-dried mineral powders. *Soil Biol. Biochem.* 26: 1423-1430
- Danielli A, Kafatos FC, Loukeris TG. Cloning and characterization of four *Anopheles gambiae* serpin isoforms, differentially induced in the midgut by *Plasmodium berghei* invasion. *J Biol Chem.* 2003 Feb 7;278(6):4184-93. Epub 2002 Nov 26.
- Dhandapani N., S. Jayaraj, R.J. Rabindra. 1993. Cannibalism on nuclear polyhedrosis virus infected larva by *Heliothis armigera*(Hubn) and its effect on viral infection. *Ins. Sci. and its App.* 14(4) : 427~430
- Dougherty E.M., K.P. Guthrie and M. Shapiro. 1996. Optical brighteners provide baculovirus activity enhancement and UV radiation protection. *Bio. con.* 7(1): 71~74
- Ekesi, S., N. K. Maniania, S. A. Mohamed and S. A. Lux. 2005. Effect of soil application of different formulations of *Metarhizium anisopliae* on African tephritid fruit flies and their associated endoparasitoids. *Biol. Contr.* 35: 83-91
- El-Saadany. G.B., G.M. Moaward, M.A. Rizk and S. Tantawy. 1992. The complex interaction between temperature and bioactivity of nuclear polyhedrosis virus infecting *Spodoptera littoralis*(Boisd.) larva. *Egy. J. of Agri. Res.* 70(1): 117~127

- Fujiie, A. and K. Miyashita. 1973. Further studies on the reiterative mating ability in males of *Spodoptera litura* F.(Lepidoptera: Noctuidae). Appl. Ent. Zool. 8(3): 131~137
- Fuxa J.R. and A.R. Richter. 1996. Effect of agricultural operations and precipitation on vertical distribution of a nuclear polyhedrosis virus in soil. Biological control 6(3): 324~329 Galande S. M. and D. S. Ajri. 1997. Consumption, digestion and utilization of sunflower leaves by *Helicoverpa armigera*(Hubner) treated with nuclear polyhedrosis virus. J. of Bio. Con. 11(1): 11~16
- Ganguli R.N. and V.K. Dubey. 1998. Management of tomato fruit borer, *Helicoverpa armigera* Hubner in Chhattisgarh region of Madhya Pradesh. Insect Environ. 4(1): 25
- Geissler K. 1995. Application and importance of entomopathogenic viruses with respect to integrated pest management. Archives of Phytopathology and Plant Protection 29(6): 479~483
- Green MC, Monser KP, Clean RJ. Ubiquitin protein ligase activity of the anti-apoptotic baculovirus protein Op-IAP3. Virus Res. 2004 Sep 15;105(1):89-96.
- Hamm, J. J., L. D. Chandler and H. R. Summer. 1994. Field tests with a fluorescent brightener to enhance infectivity of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus. Florida Entomologist 77(4): 425-437
- Hashida N., T. Koyama, M. Uemori and H. Kono. 1974. Studies on the seasonal prevalence of the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* F. II. Effects of PH and oxalic acid content on the host selection. Proc. Assoc. Pl. Prot. Sikoku 9: 25~30

- Hedlund R.C. and W.G. Yendol. 1974. Gypsy moth nuclear polyhedrosis virus production as related to inoculating time, dosage, and larval weight. J. Econ. Entomol. 67(1): 61~63
- Herve Agaisse, Norbert Perrimon. The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses Immunological Reviews 2004 198:72-82
- Horigiri M. 1964. Bionomics and control of Tobacco cutworm, *Spodoptera litura* Fabricius. Plant Quarantine 18: 269~274
- Hugar P., K.A. Kulkarni and S. Lingappa. 1995. Persistence of the nuclear polyhedrosis virus of sorghum armyworm, *Mythimna separata*(Walker) in soil. Karnataka. J. of Agri. Sci. 8(1): 5~9
- Ignoffo C.M. 1966. Effects of age on mortality of *Heliothis zea* and *Heliothis virescens* larva exposed to a nuclear polyhedrosis virus production as related to inoculating time, dosage, and larval weight. J. Econ. Entomol. 6: 279~282
- Ignoffo C.M. 1973. Development of a viral insecticides:Concept to commercialization. Experimental Parasitology, 33: 380~406
- Ignoffo C.M. and M. Shapiro. 1978. Characteristics of baculovirus preparations processes from living and dead larva. J. Econ. Entomol. 71: 186~188
- Im D.J., B.R. Jin, K.M. Choi, and S.K. Kong. 1990. Microbial control of the tobacco cutworm, *Spodoptera litura*(Fab.), using *S. litura* nuclear polyhedrosis virus. III. Field evaluation of the viral insecticides. Korean J. of Appl. Entomol. 29(4): 252~256
- Im D.J., B.S. Park, K.M. Choi, S.K. Kang and David K. Reed. 1989. Purification and Morphological Observation of a Nuclear Polyhedrosis

- Virus from the Tobacco Cutworm, *Spodoptera Litura*(Fab.). Korean J. of Entomol. 19(1): 69~77
- Im D.J., K.M. Choi, M.H. Lee, B.R. Jin and S.K. Kang. 1989. *In vitro* Mass Production of *Spodoptera litura* nuclear polyhedrosis virus. Korean J. Appl. Entomol. 28(2): 82~87
- Im, D.J., B. S. Park, B. R. Jin K. M. Choi and S.K. Kang. 1988. Pathogenicity of nuclear polyhedrosis virus isolated from the tobacco cutworm, *Spodoptera litura*. Korean. J. Appl. Entomol. 27(4): 219 ~ 224.
- Jaques, R. P. 1977. Stability of entomopathogenic viruses. Misc. Publ. Entomol. Soc. Am. 10:99~116.
- Jiang JieXian, GuangWen Liang, Z.X. Jiang, and G.W. Liang. 1999. Efficacy of a nuclear polyhedrosis virus for control of an experimental population of *Spodoptera litura*. Natural Enemies of insects. 21(1): 13~17
- Kelly D.C., D.A. Brown, M.D. Ayres, C.J. Allen, and L.O. Walker, 1983. Properties of major nucleocapsid proteins of *Heliothis zea* singly enveloped nuclear polyhedrosis virus. J. Gen. Virol., 64: 339~348
- Kim, D.I., C.H. Paik, J.D. Park, S.S. Kim and S.G. Kim. 2000. Relative toxicity of NeemAzal-T/S to predacious mite, *Amblyseius womersleyi*(Acari: Phytoseiidae) and the twospotted spider mite, *Tetranychus urticae*(Acari: Tetranychidae). Kor. J. Appl. Entomol. 39: 53~58
- Kim, S.G., D.I. Kim, J.D. Park, H.G. Choi and Y.M. Yu. 2003. Pathogenicity of *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus with different temperatures. Korean. J. Appl. Entomol. 42: 159~163.
- Knowles, D. A. 1998. Formulation of agrochemicals. pp. 44-45, In Chemistry

and Technology of Agrochemical Formulations (ed. D. A. Knowles), Kluwer Academic Publishers, UK.

- Kulkarni G.G. S.S.R. Kumar, P.S. Hugar and K.A. Kulkarni. 1999. Persistence of NPV against *Spodoptera litura* Fab. on strawberry in transitional tract of Karnataka. Annals of Agri. Bio. Res. 4(1): 45~47
- Kunimi Y. 1987. The use of nuclear polyhedrosis virus for the control of the mulberry tiger moth, *Spilosoma imparilis*. Exten. Bull. ASPAC Food and Ferti. Tech. center for the Asian and Pacific Region, Taiwan. No. 257, 35~36
- Kurstak E. 1982. In Microbial and Viral pesticides. pp. 335~507. Dekker. New York.
- Li S.Y. and I.S. Otvos. 1999. Comparison of the activity enhancement of a baculovirus by optical brighteners against laboratory and field strains of *Choristoneura occidentalis*(Lepidoptera: Tortricidae). J. of Eco. Entomol. 92(3): 534~538
- Li S.Y. and I.S. Otvos. 1999. Optical brighteners enhance activity of a nuclear polyhedrosis virus against western spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae). J. of Eco. Entomol. 92(2): 335~339
- Li, S. Y. and I. S. Otvos. 1999a. Optical brighteners enhance activity of a nuclear polyhedrosis virus against western spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae). J. Econ. Entomol. 92: 335-339
- Li, S. Y. and I. S. Otvos. 1999b. Comparison of the activity enhancement of a baculovirus by optical brighteners laboratory and field strains of *Choristoneura occidentalis* (Lepidoptera: Tortricidae). J. Econ. Entomol. 92: 534-538
- Martignoni M.E. and P.C. Iawi. 1986. A catalog of viral diseases of insects,

- mites, ticks. 4th ed. Gen Tech. Rep. PNW-195. Portland. 51p.
- Martinez, AM., O. Simon, T. Williams and P. Caballero. 2003. Effect of optical brighteners on the insecticidal activity of a nucleopolyhedrovirus in three instars of *Spodoptera frugiperda*. Entomol. Exp. Appl. 109(2): 139-146
- McGuire, M. R., P. Tamez-Guerra, R.W. Behle and D. A. Streett. 2001. Comparative field stability of selected entomopathogenic virus formulations. J. Econ. Entomol. 94(5): 1037-1044
- McLeod, P.J., W.C. Yearian & S.Y. Young. 1977. Inactivation of Baculovirus heliothis by ultraviolet irradiation, dew and temperature. J. Invertebr. Pathol. 30: 237~241
- Moawad G.M., G.B. El-Saadany and S. Tantawy. 1992. Transmission of nuclear polyhedrosis virus to larval instars of the cotton leafworm *Spodoptera littoralis* Boisd. Egyptian J. of Agri. Res. 70(1): 87~96
- Mochida O. and T. Okada. 1974. A bibliography of *Spodoptera* spp.(Lepidoptera: Noctuidae). Misc. Bull. Kyushu Nat. Agr. Expt. Sta. 49: 1~110
- Mohan K.S., R. Asokan and C. Gopalakrishnan. 1996. Isolation and field application of a nuclear polyhedrosis virus for the control of the fruit borer, *Helicoverpa armigera*(Hubner) on tomato. Pest management in Horti. Ecosy. 2(1): 1~8
- Monobrullah, Md. 2003. Optical brighteners pathogenicity enhancers of entomopathogenic viruses. Current Science 84(5): 640-645
- Murry D.A.H., C.J. Monsour, R.E. Teakle, K.P. Rynne and J.A. Bean. 1995. Interactions between nuclear polyhedrosis virus and three larval

- parasitoids of *Helicoverpa armigera* (Hubner)(Lepidoptera : Noctuidae). J. of the Australian Entomol. Soc. 34(4): 319~322
- Murugan K. and D. Jeyabalan. 1998. Neem enhances the activity of microbial pesticides. Insect Environ. 4(1): 3~4
- Nasr E.S., M.A. Moussa and A.S. Hassan. 1960. Soil moisture in relation to pupation and moth emergence of the cotton leaf worm, *Prodenia litura* Fabricius. Bull. Soc. Entom. Egypte. XLIV: 377~382
- OECD. 1996. OECD Guidelines for Testing of Chemicals, No. 203, Fish, Acute Toxicity Test
- Okamoto D. and S. Okada. 1968. Study on the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* Fabricius, as pasture insect. Chugoku Agr. Expt. Sta. E2: 111~144
- Oliver A.D. 1964. Studies on the biological control of the fall webworm, *Hyphantria cunea*, in Louisiana. J. Econ. Entomol. 57: 314~318
- Omino, T., S. Yokoi and H. Tsuji. 1973. Experimental studies on the daytime behaviour of noctuid larva, the cabbage armyworm, *Mamestra brassicae*, the tobacco cutworm, *Spodoptera litura*, and black cutworm, *Agrotis ipsilon*. Jap. J. Appl. Ent. Zool. 17(4): 215~220
- Peng F., J.R. Fuxa, A.R. Richter, and S.J. Johnson. 1999. Effects of heat-sensitive agents, soil type, moisture, and leaf surface on persistence of *Anticarsia gemmatalis*(Lepidoptera : Noctuidae) nucleopolyhedrosis. Environ. Entomol. 28(2): 330~338
- Rabindra R.J., B. Rajasekaran and S. Jayaraj. 1997. Combined action of nuclear polyhedrosis virus and neem bitter against *Spodoptera litura* (Fabricius) larva. J. of Bio. Con. 11(1): 5~9

- Rao G.V. Ranga., J.A. Wightman and D.V. Ranga Rao. 1989. Threshold temperatures and thermal requirements for the development of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). Environ. Entomol. 18(4): 548~551
- Santharam G. and S. Jayaraj. 1987. Effect of host plants and site of application on the infectivity of nuclear polyhedrosis virus to *Spodoptera litura* larva. J. of Bio.Con. 1(1): 39~43
- Santharam G. and S. Jayaraj. 1989. Studies on the transmission of nuclear polyhedrosis virus of *Spodoptera litura* (Fabricius) to its progenies. J. of Bio. Con. 3(1): 40~43
- Sarode S.V., P.P. Patil and S.L. Borkar. 1995. Evaluation of neem seed kernel extract in combinations with *Heliothis* nuclear polyhedrosis virus against cotton bollworms. J. of Entomol. Res. 19(3): 219~222
- Sarode S.V., Y.S. Jumade and S.L. Borkar. 1997. Efficacy of *Heliothis* nuclear polyhedrosis virus and neem seed kernel extract combinations against *Helicoverpa armigera* (Hb) on pigeonpea. PKV Res. J. 21(2): 227~229.
- Schmutterer H. 1997. Side-Effects of neem (*Azadirachta indica*) products on insect pathogens and natural enemies of spider mites and insects. J. Appl. Entomol. 121: 121~128
- Shapiro M. 1980. In [The Gypsy Moth : Research towards integrated pest management] ed by Doane. C.C. USDA Tech. Bull. Chap. 6.6.
- Shapiro M., L. Jacqueline, Robertson and R.E. Webb. 1994. Effect of Neem Seed Extract upon the Gypsy Moth(Lepidoptera: Lymantriidae) and Its Nuclear Polyhedrosis Virus. Biological and Microbial Control. 87(2): 356~360

- Shapiro, M., and R.A. Bell. 1982. Enhanced Effectiveness of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) Nucleopolyhedrosis Virus Formulated with Boric Acid. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 75: 346~349
- Shin H.Y., C.H. Kim, C.G. Park and Y.S. Lee. 1987. Biology of Tobacco Cutworm, *Spodoptera litura*(F.), (Lepidoptera: Noctuidae), 1. Seasonal Occurrence of Tobacco Cutworm in Southern Korea and Larval Development, Pupal Period, Adult Longevity and Oviposition on the Different Food Sources. *Res. Rept. RDA(D · M&U)*. 29(1): 301~307
- Singh. G. and V. C. Hoi. 1972. Effects of host plants on the biology of *Spodoptera litura* Fabricius. *Mal. Agric. Res.* 1:14~23.
- Slininger, P. J., R. W. Behle, M. K. Jackson and D. A. Schisler. 2003. Discovery and development of biological agents to control crop pests. *Neotropical Entomology* 183-195
- Smith R.P., S.P. Wraight, M.F. Tardif, M.J. Hasenstab and J.B. Simoon. 1976. Mass rearing of *Porthethia dispar* (L)(Lepidoptera: Lymantriidae) for in host production of nuclear polyhedrosis virus. *N.Y. Entomol. Soc.* 84: 212~213
- Smith, K.M. 1958. Virus inclusions in insect cells. *Protoplasmatologia*, 4(4): 1~25
- Sonalkar V.U., S.D. Deshmukh and U.S. Satpute. 1997. Influence of feeding stimulants on incubation period of nuclear polyhedrosis virus of *Helicoverpa armigera* (Hubner). *J. of Bio. Con.* 11(1): 85~87
- Sonalkar V.U., S.D. Deshmukh, U.S. Satpute and S.T. Ingle. 1998. Efficacy of nuclear polyhedrosis virus in combination with adjuvants against *Helicoverpa armigera* (HBN). *J. of Soils and Crops.* 8(1): 67~69

- Starr R, Hilton DJ SOCS. suppressors of cytokine signalling. *Int J Biochem Cell Biol.* 1998 Oct;30(10):1081-5.
- Sudhakar S., R. Varatharajan, and S. Mathavan. 1997. Simple method to purify polyheral inclusion bodies from Nosema(Microspora: Nosematidae) contamination. *Entomon.* 22(2): 89~93
- Tamez-Guerra, P., M. R. McGuire, R.W. Behle, B. S. Shasha and R. L. Pingel. 2002. Storage stability of *Anagrapha falcifera* nucleopolyhedrovirus in spray-dried formulations. *J. Invertebr. Pathol.* 79: 7-16
- Tamez-Guerra, P., M. R. McGuire, R.W. Behle, J. J. Hamm, H. R. Sumner and B. S. Shasha. 2000. Sunlight persistence and rainfastness of spray-dried formulations of baculovirus isolated from *Anagrapha falcifera* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 93(2): 210-4218
- Tong Y, Kanost MR. *Manduca sexta* serpin-4 and serpin-5 inhibit the prophenol oxidase activation pathway: cDNA cloning, protein expression, and characterization. *J Biol Chem.* 2005 Apr 15;280(15):14923-31. Epub 2005 Jan 28.
- Vasconcelos S.D., J.S. Cory, K.R. Wilson, S.M. Sait and R.S. Hails. 1996. Modified behavior in baculovirus infected lepidopteran larva and its impact on the spatial distribution of inoculum. *Bio. Con.* 7(3): 299~306
- Vilaplana L, O'Reilly DR. Functional interaction between *Cydia pomonella* granulovirus IAP proteins. *Virus Res.* 2003 Mar;92(1):107-11.
- Willink E., M.Y. Romero, V.M. Osoro, J.C. Ramallo and M.Y. De-Romero. 1995. Baculovirus for the biological control of the maize worm. *Avance-Agroindustrial.* 16(63): 18~23
- Young S.Y. and W.C. Yearian. 1987. *Nabis roseipennis* adults(Hemiptera : Nabidae) as disseminators of nuclear polyhedrosis virus to *Anticarsia*

- gemmatalis*(Lepidoptera: Noctuidae) larva. Environ. Entomol. 16(6): 1330~1333
- Zhang G.Y., Z.X. Zhang, XiuLian Sun, G.Y. Zhang Z.X. Zhang and X.L. Sun. 1996. Evaluation of the application effectiveness of a new formulation of *Helicoverpa* NPV insecticide - an emulsifiable suspension. Chinese J. of Bio. con. 12(1): 24~28
- 岡田忠處, 1968. ハスモンヨトウの核多角體病 について. 九州病害蟲研究會報, 14: 34~37
- 南川仁傳. 1937. ハスモンヨトウに關する調査. 臺灣中央研究所農業部報告 70: 1~66
- 농업과학기술원(1996) 농약의 검사방법. pp. 3-7, 농업과학기술원고시 제 1996-2호.
- 농촌진흥청. 2003. 농촌진흥청고시 제2003-7호, 농약의 등록시험 기준과 방법
- 동양물산. 2002. 미생물 고정화용 다공성 세라믹 담체. 한국공개특허출원 10-2002-0013184
- 尾崎章三郎. 1975. ハスモンヨトウのとネキンムシの生態の防除. 農林省農林水産技術事務局編 pp95.
- 이정열. 2002. 미생물 및 그 배양액을 용해성이 뛰어나고, 통양에서의 생존률이 높은 단일 및 복합 미생물 제제로 입상의 형태로 담체화하는 방법. 한국 공개특허출원 10-2002-0008354
- 岡本大二郎, 岡田齊夫. 1968. 牧草害蟲としてのハスモンヨトウに關する研究. 中國農業試驗場報告 E2: 111~144

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서의 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 한다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용을 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.