

발간등록번호

78-6460077-000071-01

최 종

연구보고서

과립병바이러스 대량생산 및 제형화 연구

Mass production and formulation on
Plutella xylostella granulovirus

연구기관

전라남도농업기술원

전남대학교

(주) 경농

농림부

과립병바이러스 대량생산 및 제형화 연구

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “과립병바이러스 대량생산 및 제형화 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008년 4월 24일

주관연구기관명 : 전라남도농업기술원

총괄연구책임자 : 박 중 대

세부과제책임자 : 박 중 대

세부과제책임자 : 김 선 곤

선 임 연구 원 : 김 도 익

협동연구기관명 : 전 남 대 학 교

협동연구책임자 : 한 연 수

협동연구기관명 : (주) 경 농

협동연구책임자 : 장 철

요 약 문

I. 제목

과립병바이러스 대량생산 및 제형화 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

배추좀나방(*Plutella xylostella*)은 십자화과 채소를 가해하는 주요해충으로 특히 1~2령 시기를 제외하고는 영기가 진행됨에 따라 약제에 대한 감수성이 현저히 낮고 전국적으로 발생하여 심각한 피해를 주고 있다.

최근까지 다른 해충과 마찬가지로 배추좀나방도 화학적 방제가 주를 이루고 있다. 그러나 약제 저항성으로 방제가 어려워 재배작물이 큰 피해를 입을 뿐 아니라 저항성해충의 출현, 인축이나 동식물에 대한 직·간접적인 피해와 잔류독성으로 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 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, 농작물해충 방제에 효과적이다.

우리나라 곤충바이러스 연구는 1974년 뿔나무해충인 흰불나방에서 핵다각체병바이러스를 분리하여 병원성이 매우 높은 것을 확인하면서 화학 살충제의 환경오염 및 저항성문제를 해결하기 위해 대체 방제기술인 친환경적 미생물 이용 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 곤충과립병 바이러스(Granulosis Virus ; GV)은 70여종, 핵다각체병바이러스(Nucleopolyhedro virus ; NPV)은 520여종이 보고되고 있다. 이들 바이러스병은 기주곤충에만 감염하는 기주특이성이 있고 인축과 환경에 무해하고 안정성이 높기 때문에 여러 나라에서 바이러스살충제 개발에 주목하고 있다. 이 Baculovirus 살충제의 효과는 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 배추좀나방의 과립병바이러스(PxGV)의 생화학적 특성, 인공사료, 바이러스의 안정화 물질 선발 및 태양광선의 자외선에 의한 불활성화 조건 등을 구명하고 실제 농가 포장에서 살포 할 적정 농도를 판단하여 이를 제형별로 검정하여 가장 좋은 제형을 선발하여 배추좀나방에 합성농약이 아닌 새로운 미생물 친환경 해충 방제제를 개발하고자 하였다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

최근까지 다른 해충과 마찬가지로 배추좀나방도 화학적 방제가 주를 이루고 있다. 그러나 약제 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 체계확립에 연구의 초점을 집중시키고 있다. 그 중에서도 곤충 질병을 일으키는 세균, 바이러스, 사상균, 원생동물 등 해충의 방제에 큰 비중을 두고 있다. 이중에서 미생물 바이러스는 기주 곤충에 대한 특이성이 높아, 농작물해충 방제에 효과적이다. 그러나 과립병바이러스와 같은 entomopathogenic pathogen이 배추좀나방에 침입하는 과정에서 분자 병리학(Molecular pathogenesis)에 관한 연구는 한국을 포함하여 세계적으로 그 연구가 미약한 수준이다.

본 연구의 최종 목표는 배추좀나방 과립병바이러스의 기주인 배추좀나방의 식물기주를 대체할 인공사료를 개발하고 이 인공사료를 먹이로 기주곤충을 대량 증식시켜 과립병 바이러스의 생화학적 특성을 검정하여 바이러스의 생리, 병원적 특성을 파악하고자 한다. 또한 과립병바이러스의 대량증식 방법을 개발하여 대량 생체증식체계를 갖추고자 한다. 대량증식체계가 갖추어지면 이것을 이용한 제형화로 농약잔류나 인축에 독성이 없는 환경 친화적인 해충방제제 개발에 있으며 이에 대한 세부 목표는 다음과 같다.

1. 기주 곤충의 안정화된 사육법 개발

배추좀나방 과립병바이러스는 기주 곤충의 생체내에서 증식하는 특성 때문에 기주곤충의

대량사육시설과 기술체계 확립이 필요하므로 기초연구에서는 배추좀나방을 사육하는데 필요한 인공사료 개발을 위하여 여러 가지 물질을 첨가하여 지속적으로 개량하고 또한 사육에 적합한 환경조건을 찾기 위하여 온·습도 등 사육 조건을 구명하였다. 또한 인공사료의 효능을 검정하여 여러 가지 물질을 첨가하여 실내검정을 통하여 지속적으로 개량하였다.

2. 과립병바이러스의 세포학적, 조직학적 특성 검정

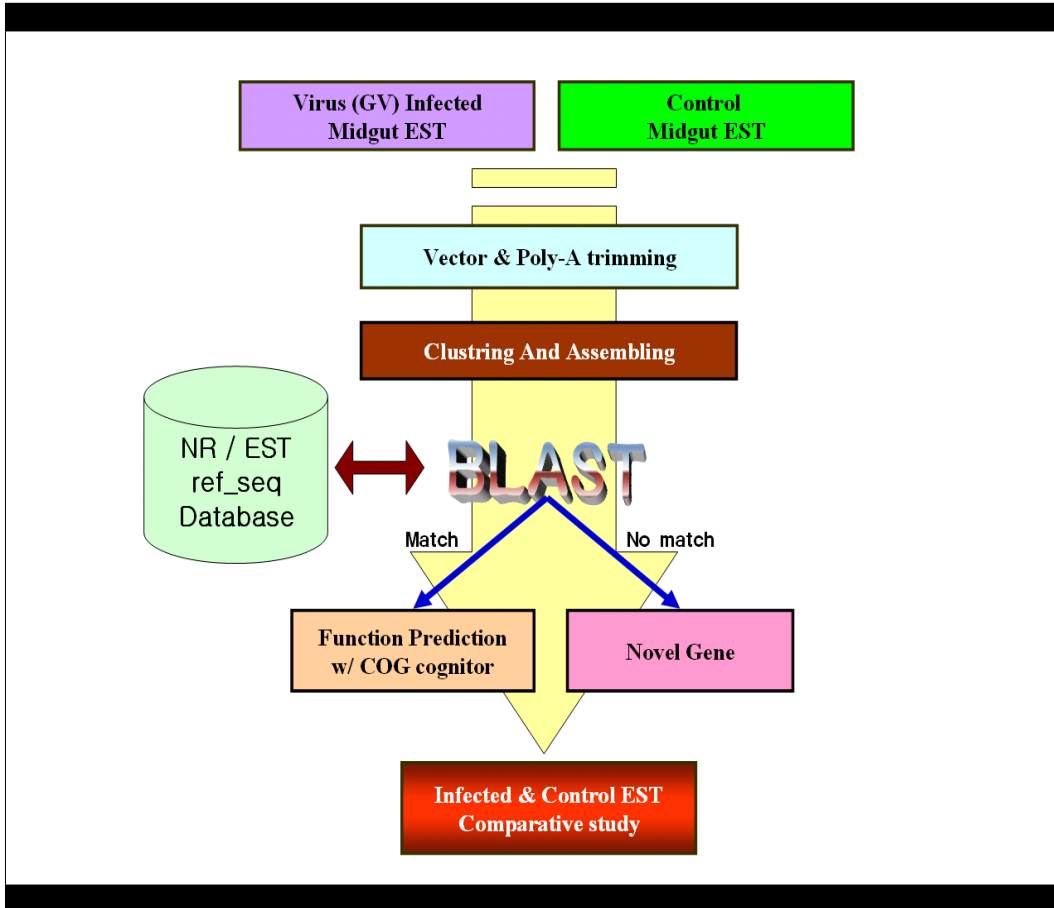
기초연구에서는 바이러스를 수집 분리하고 기본적인 형태, 전자현미경적인 특성 등을 검정하였으며 이 기술을 바탕으로 단백질의 숙주내 세포학적 및 병리학적 패턴을 조사하고 조직화학적 방법을 이용 배추좀나방 조직의 변화양상을 파악하였다. 먼저 과립병바이러스(GV)에 감염된 배추좀나방의 중장과 감염되지 않은 배추좀나방의 중장에서 EST library를 구축한 후 염기서열 해독을 통해 배추좀나방과 GV의 상호작용(interaction)에 관련된 유용 유전자를 탐색하였다. 해독되어진 EST sequence에서 vector 및 poly-A tail sequence를 제거한 후 clustering 및 assembly 한 후 nr, dbEST, ref_seq 등의 database에 비교 검색하였다. 검색이 되어진 유전자는 COG를 이용한 유전자 기능을 예측하고 검색되어지지 않는 유전자는 Novel gene으로 분류하였다. 과립병바이러스에 감염된 *Plutella xylostella*의 midgut 및 control의 EST를 비교하는 작업을 통해 감염 후 증가 또는 감소하는 유전자의 발현상황을 연구하였다.

RT-PCR : GV 감염된 배추좀나방의 중장과 체강내 소기관에서 RNA를 분리한 후 standard protocol을 사용하였다.

상호작용 유전자 클로닝 및 항체생산: pET directional expression vector에 cloning한 후 positive clone을 찾은 후 sequencing을 하여 in-frame된 clone을 얻었다. Expression하기 전에 point mutation 등의 sequence quality를 확인하여 이들 각각을 over-expression시킨 후 Probond purification system (InVitrogen)을 이용하여 순수 정제하였다. 단백질을 순수 정제한 후 standard protocol을 이용하여 토끼나 쥐(Rat)로부터 항체를 제작하였다.

Western blot: 2~3개월 후 얻은 polyclonal ab를 이용하여 western 상에서 ab specificity를 확인 한 후, tissue specificity도 확인한다. 이 때 protein-protein interaction을 보기 위하여 standard immunoprecipitation을 이용하여 protein간의 상호작용을 연구하였다.

Immunostaining과 Image Analysis : Immuno-staining한 slide를 공촛점현미경을 이용하여 imaging data를 얻으며 3 di-image reconstruction을 통하여 단백질의 상호작용 및 cellular location을 확인하였다.



3. 과립병바이러스의 대량 생산체계 구축

배추좀나방 과립병바이러스의 기본적인 농도별, 온도별 병원성 검정하여 최적생산 조건을 구명하였으며 또한 환경에 민감하게 반응하므로 환경, 특히 온도, 습도, 태양광선의 영향을 구명하였다. 조사된 기본 병원성 검정을 바탕으로 배추좀나방 과립병바이러스의 시제품에 대한 배추좀나방 기주식물별 약해여부, 천적에 대한 피해여부 등을 조사하였다.

또한 포장에서의 살충효과를 농도별로 조사하여 적정 살포 농도를 결정하였으며 주요 환경인 온도별 보관조건, 태양광선 등의 바이러스 병원활성에 대한 안정성 구명하였다.

4. 과립병바이러스 제형화

병바이러스는 현재 알려진 바로 태양광선에 의하여 급속도로 불활성화 된다. 이 때문에 유, 무기산 등을 혼합하여 자외선 차단효과 및 병원성을 증식시키며, 또한 이 첨가물로 인해 다른 해충 및 병도 방제 할 수 있을 것이다. 과립병바이러스는 모든 바이러스와 마찬가지로 살아있는 생체 내에서만 번식이 가능하므로 적절한 제형을 만들어 사용하면 해충의 다음 세대에도 효과가 있을 것으로 생각되어 진다. 기초 제형화 연구를 실시한 결과에 따라 병원성을 안정하게 하기 위하여 제형 첨가할 물질들을 선별하고 부자재 종류에 알맞은 제형화, 상품화를 위한 제형별 연구로 병원성을 검정하였다. 이에 따른 환경친화형 제형화 기술 확립으로서 유효성분 분석법 확립, 온도별 학대시험, QC확립을 위한 생물검정을 실시하고 환경안전성 연구로 기초 어독성 시험인 수서생물에 대한 독성(어독성 등), 독성시험으로 경구독성, 경피독성 실시하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 곤충 바이러스의 추가 연구의 필요성

3년으로 계획된 본 연구가 성공적으로 이루어져 곤충 병원성 바이러스에 대한 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. 또한 배추좀나방 과립병바이러스는 생체내에서 증식하고 기주가 작은 해충이기 때문에 바이러스 수거량이 담배 거세미나방이나 과밤나방 보다 훨씬 적다. 이를 해결할 수 있는 방법으로 BT와 같은 다른 미생물과 혼합하여 초기 방제가를 높이고 제품을 만들 때 적은량을 넣는 방법을 개발해야 할 것이다.

2. 포장 및 타 작물로의 확대의 필요성

본 연구에서 얻어진 결과는 주로 일부지역에서 배추 작물만을 대상으로 국한되었으므로 좀더 광범위한 십자화과 작물과 노지재배가 아닌 시설과 같은 고소득 작물에도 확대 적용해야 할 것이다. 따라서 더 많은 작물의 배추좁나방에 대하여 3년 정도의 포장시험을 수행해야 할 것으로 사료된다.

Summary

I . Title

Mass production and formulation on *Plutella xylostella* granulovirus

II . Research content and scope

RESULTS AND DISCUSSION

1. Artificial diet of *Plutella xylostella* for mass rearing.

This study was conducted to improve artificial diet of *Plutella xylostella* for mass rearing. The sizes of *Plutella xylostella* are 0.45mm on egg, 1.29mm on 1st larva, 3.1mm on 2nd, 4.65mm on 3rd, 8.57mm on 4th larva and 7.91mm on pupa and 4.96~4.97 on adults. The duration of oviposition is 2.8 days on preoviposition, 5.1 days on oviposition, and 6.9 days on postoviposition. The number of eggs laid a day was 48.7 and 263 individuals in total. The developmental periods were 8.3~9.9 days which was different by host and sex. The rate of pupation and hatchability were 88% and 84% in chinese cabbage, respectively. Host and oviposition preference was the best on chinese cabbage and feeding preference was 45.2%, 40.3% on chinese cabbage, and kale, respectively.

The 50% oviposition was 1.9 and 1.2 days on 20°C, 30°C days, respectively. The shorter period, the higher temperature. The temperature should maintain below 30°C at least because the number of eggs laid and hatchability decreased abruptly above 30°C. Survival rates of larva were 93, 92% at 20°C and 25°C. There was not alive population at 35°C. The 2nd instar of *Plutella xylostella* was well developed on condition of 60% relative humidity at 25°C. In addition, mortality was also low as

9%. The pupation was over 90% in 10~100 larva container. *Plutella xylostella* could not develop on established artificial diet for *Spodoptera litura* and *S. exigua*. The modified artificial diet could survive 36~45.8%, pupate 27.6~38.6% and emergence all of them. Artificial diet(No. 4) which add chinese cabbage powder 20% survive 63.8% on 3rd larva of *Plutella xylostella*.

2. Pathogenicity of *Plutella xylostella* granulovirus(PxGV) with biological agent

This experiment conducted to investigate pathogenicity of *Plutella xylostella* granulovirus(PxGV) which biological agent to reduce risk of synthetic pesticides. *Plutella xylostella* granulovirus was long oval shape and has a nucleocapsid. The larva begun to died from 3rd days after spray of *Plutella xylostella* granulovirus. The mortality was over 80% in 1st and 2nd instar on 1.0×10^8 OBs/ml concentration of PxGV but in 3rd instar on 1.0×10^9 OBs/ml. The first instar which treated *Plutella xylostella* granulovirus died before third instar and longer development period than control treated. This trend was similar to 2nd and 3rd instar.

Consumption of artificial diet reduced greatly in 4th instar. The total consumption reduced 93, 76, 53, and 47% in 1st, 2nd, 3rd, and 4th instar which fed *Plutella xylostella* granulovirus. Artificial diet treated with PxGV 10 μ l at $10^4 \sim 10^6$ OBs/ml. Virus multiplication concentration was 1.86×10^9 on 2nd, 9.42×10^8 on 3rd, 9.42×10^8 on 4th instar.

3. Screening of the GV-dependent up/down regulated genes from *Plutella xylostella*

The diamondback moth *Plutella xylostella* (DBM) is an important pest of agricultural crops. Furthermore, DBM has become resistant to conventional chemical insecticides. For these reasons our research group has initiated to find alternative control measures using a granulovirus (GV). However, the molecular interactions between PxGV and the midgut cells are largely unknown. Thus, we have attempted to screen and identify various immune genes using GeneFishing approaches from *P.*

xylostella after PxGV infection. It remains to be further investigated for elucidating the potential functions of these genes in GV–midgut interactions in the context of insect immune response against PxGV.

4. Cloning and expression profiles of a caspase from *Plutella xylostella*.

Caspase plays a key role in apoptosis. Here, we cloned a partial fragment of caspase (465 bp) from *Plutella xylostella* using PCR–based gene cloning method. Sequencing and BLAST analysis shows that it has identity to various insects such as *Spodoptera frugiperda* (87%), *Bombyx mori* (81%), *Drosophila melanogaster* (58%), *Mus musculus* (41%) and *Homo sapiens* (32%). Currently, we are in the middle of obtaining the full length cDNA using 5'–RACE and 3'–RACE.

5. Cloning and expression patterns of calreticulin in response to GV infection from the diamondback moth, *Plutella xylostella*

Calreticulin (CRT) plays pivotal roles in Ca(2+) homeostasis, molecular chaperoning, infection, inflammation, and innate immunity. In an attempt to study the involvement of CRT in antiviral immunity, the full length cDNA of calreticulin (PxCRT) was cloned from the diamondback moth, *Plutella xylostella*. It consists of 1708 bp with an open reading frame of 1197 bp, encoding 399 amino acids. The deduced amino acid sequence of PxCRT showed high identity with those of *Galleria mellonella* (87%), *Bombyx mori* (87%), *Anopheles gambiae* (76%) and *Drosophila melanogaster* (71%). RT–PCR analysis during developmental life cycle shows that highest expression of PxCRT mRNA was detected in pupae. Spatial expression pattern analysis indicates that it was highly expressed in silk gland. In addition, expression patterns of PxCRT mRNA in response to various immune elicitors were examined. PxCRT mRNA was slightly induced after 3 h of LPS treatment, whereas it was gradually increased from 3 h to 6 h and then decreased after 9 h of laminarin treatment. Finally, induction pattern analysis of PxCRT in response to PxGV infection during the initial infection periods (3~12 h) shows that it

was induced at 3 h and 9 h in a biphasic manner. Long term analysis of PxCRT expression during the late infection periods (1~5 days) indicates that it was gradually increased from day 3 to day 5. Taken together, PxCRT might play a role in antiviral immunity although it has to be further studied.

6. Cloning and partial characterization of lebocin precursor from *Plutella xylostella*

Lebocin is known to show activity against gram-negative bacteria. In an attempt to clone and partially characterize a lebocin precursor, the full length cDNA of lebocin precursor (Px-lebocin) was cloned from the diamondback moth, *Plutella xylostella*. Using a PCR-based cloning method, we got a partial fragment of Px-lebocin (735 bp). BLAST analysis shows that the deduced amino acid sequence of Px-lebocin has a similarity to *Trichoplusia ni* (42%), *Bombyx mori* (26%), and *Caenorhabditis elegans* (13%). Developmental RT-PCR analysis shows that highest expression of Px-lebocin was detected in both pupae and adult. Spatial expression pattern analysis shows that it was highly expressed in Malpighian tubule. In addition, expression patterns of Px-lebocin mRNA in response to various immune elicitors were examined. Px-lebocin mRNA was induced slightly induced after 3 h of LPS treatment, whereas it was gradually increased from 3 h to 9 h and then decreased after 12 h of laminarin treatment. Finally, induction pattern analysis of Px-lebocin mRNA in response to PxGV infection during the initial infection periods (3~12 h) shows that it was induced at 3 h and 9 h in a biphasic manner. Long term analysis of Px-lebocin precursor expression during the late infection periods (1~5 days) indicates that it was highly induced at 1 day. Based on the data presented above, Px-lebocin might be involved in immune response to LPS, laminarin or granulovirus in *P. xylostella*. Yet, it remains to be further studied whether Px-lebocin has an antiviral activity against PxGv.

7. Cloning and expression patterns of PxCatalase from *Plutella xylostella*.

Catalase(CAT) plays an important role in oxidative stress during host-pathogen

interactions. In order to study the role of *PxCAT* in insect immunity, a partial fragment of *PxCAT* (771 bp) was obtained using PCR-based cloning method from the diamondback moth, *Plutella xylostella*. The deduced amino acid sequence of PxCAT has high identities to *Drosophila melanogaster* (69%), *Anopheles gambiae* (69%), *Homo sapiens* (66%), and *Bombyx mori* (82%), respectively. Temporal expression pattern analysis indicates that highest expression of PxCAT mRNA was detected in adult. Spatial expression pattern analysis shows that PxCAT mRNA was highly expressed in silk gland. In addition, expression patterns of PxCAT mRNA in response to various immune elicitors were examined. PxCAT mRNA was slightly induced after 3 h of LPS treatment, whereas it was highly increased 12 h of laminarin treatment. Finally, induction pattern analysis of PxCAT mRNA in response to PxGV infection during the initial infection periods (3~12 h) shows that it was induced at 3 h and 9 h in a biphasic manner. On the other hand, long term analysis of PxCAT mRNA expression during the late infection periods (1~5 days) indicates that it was not dramatically induced. These data suggest that PxCAT might play a role in innate immunity in *P. xylostella*.

8. Cloning and partial characterization of NOS from *Plutella xylostella*.

Nitric oxide synthase (NOS) is known to play diverse functions in innate immunity in mammals and insects. Thus, we were interested in studying the potential role of NOS during the immune responses from the diamondback moth, *Plutella xylostella*. We have attempted to clone the full length cDNA of NOS (PxNOS) from the diamondback moth, *Plutella xylostella*. Yet, we got a partial fragment of PxNOS (1698 bp). The deduced amino acid sequence of PxNOS showed high identity [*Menduca sexta* (60%), *Apis mellifer* (59%) and *Drosophila melanogaster* (49%)]. Developmental expression study shows that highest expression of PxNOS mRNA was detected in 2nd instar. Spatial expression pattern analysis indicates that it was highly expressed in Malpighian tubule. In addition, expression patterns of PxNOS mRNA in response to various immune elicitors were examined.

Expression of PxNOS mRNA was slightly induced after 24 h of LPS treatment, whereas it was highly increased 24 h of laminarin treatment. The precise role of PxNOS in terms of innate immunity

9. Cloning and partial characterization of thioredoxin peroxidase from *Plutella xylostella*

Thioredoxin peroxidase (Tpx) is known to be involved in oxidative stress defense system after being exposed to a pathogen in both vertebrates and invertebrates. In an attempt to study the involvement of thioredoxin peroxidase in antiviral insect immunity, the full length cDNA of thioredoxin peroxidase (PxTpx) was cloned from the diamondback moth, *Plutella xylostella*. Using a PCR method, we obtained a partial fragment of PxTpx (585 bp). The deduced amino acid sequence of PxTpx has a high identity to *Bombyx mori* (90%), *Apis mellifera* (79%) and *Drosophila melanogaster* (77%), respectively. Developmental expression study shows that highest expression of PxTpx was detected in both pupae and adult. Spatial expression pattern analysis shows that it was highly expressed in Malpighian tubule and silk gland. In addition, expression patterns of PxTpx mRNA in response to various immune elicitors were examined. PxTpx mRNA was slightly induced from 3 h to 12 h of LPS treatment, whereas it was highly expressed at 3 h and then gradually decreased after laminarin injection. Finally, induction pattern analysis of PxTpx in response to PxGV infection during the initial infection periods (3~12 h) shows that it was slightly induced at 9 h post-infection, whereas it was not increased 5 day during the late infection periods (1~5 days). Based on the induction pattern of PxTpx in response to laminarin, PxTpx might play a role in innate immunity in *P. xylostella*.

10. To improve stabilization and control effect

This experiment was conducted to improve control effect use stabilization include

host, temperature, preservation method, and sun light.

The 2nd instar of *Plutella xylostella* inoculated by host crops and sprayed PxGV 1.0×10^8 OBs/ml. Mortality was over 60% in all host crops and mortal periods were about 7 days. The chemical injury did not appear so PxGV stable on host crops.

When heating treated over 5 minute at 60°C on PxGV, the pathogenicity reduced 30%. At over 80°C treatment, the pathogenicity forfeited completely. The activity of PxGV could not affect on below 40°C during 8 hours treatment but the pathogenicity forfeited almost on 60°C during 1 hour treatment.

For long term preservation, the pathogenicity maintained till 6 months on below -20°C and 60 days on 5°C . However, the pathogenicity went down rapidly at 25°C and 15°C after 60 days.

PxGV sprayed on upper, down and all leaf side of kale. The sprayed leaf put on glass house, PVC house and field to take sunshine. The leaf collected and feed to *Plutella xylostella*. The pathogenicity forfeit from 2 days in upper sprayed leaf on glass and PVC house and from 5 days down and all sprayed leaf. The pathogenicity was inactivity from 2 days in field put leaf.

11. Control effect of granulovirus by formulation

Formulation was necessary to enlarge control agent of granulovirus.

The damaged leaves were 45.8% in control treatment, but 25.8% in 1.0×10^6 , 11.8% in 1.0×10^7 , 5.4% in 1.0×10^8 on seedling bioassay. The protection value was 70%, 94.3% at 7 and 21 days on 1.0×10^8 .

PxGV strain between China and Korea was similar pathogenicity, but in Korea strain, mortality higher in all concentration.

The population fluctuation of *Plutella xylostella* decreased 0.6-, 0.2-, and 0.07-fold in 1.0×10^8 , 10^9 , and 10^{10} OBs/ml treatment, respectively, meanwhile those increased 1.9-fold after 21 days in none-treatment.

The damaged leaves were 44.7% in none-treatment plot but 33.3% in 1.0×10^8 OBs/ml application plot.

Plutella xylostella died from 3 days after application of granulovirus. The higher concentration, the higher mortality. The number of dead *Plutella xylostella* was 19 in 1.0×10^8 OBs/ml application plot which 88.9% of protection value after 12 days.

The mortality of Kaolin and Bentonite was 52%, and 47.2%, respectively. The prototype made from Kyoungnong coporation. PxGV-WG had the same effect with suspension, but PxGV-EC decreased mortality. The chemical injury appeared degree 1 on chinese cabbage and leaf mustard in 10-fold dilution, so recommend use at least 100-fold.

The bioassay was conducted for testing toxicity of PxGV formulation to effect of natural enemies. *Phytoseiulus persimilis* effect on PxGV-SC 10- and 20-dilution, but survival rate was 57.8% in 500-dilution at 5 days after application. On PXGV-WG, *Aphidius colemani* and *Orius strigicollis* appeared a little high toxicity, but *Encarsia formosia* and *Eretmocerus eremicus* had no toxicity.

12. Formulation of PxGV

The studies were undertaken to develop the environmentally friendly granulovirus insecticide through the establishment of formulation recipes and the evaluation of mammalian and fish toxicity. Recipes of various formulation types for granulovirus were evaluated by using selected co-formulants which are suitable for granulovirus formulation. Formulation types for the studies were suspension concentrate (SC) as liquid type and water dispersible granule (WG) as solid type and specific inorganic acid was selected as efficacy enhancer. Recipes of SC and WG were established by using selected co-formulants and WG showed better result than SC at efficacy studies. To evaluate the safety of granulovirus technical and WG, tests for mammalian and fish toxicity were conducted. Both granulovirus technical and WG showed low toxicity to mammalian and fish. These results suggest that the granulovirus can be formulated various formulation types and be developed as a product in consequence of the low toxicity to human and environment.

CONTENTS

Chapter 1 Outline of research	25
Section 1 Purpose and aim of research	25
1. Purpose	25
2. Necessity	26
가. Technical	26
나. Economic. Industry	27
다. Society. Culture	27
Section 2 Objective and content	29
1. Objective	29
2. content and range of research	30
3. System of research processing	33
Chapter 2 Current status of related research in Korea and foreign	34
Section 1 Research status in Korea	34
Section 2 Research status in foreign country	34
Section 3 Prospect	35
Chapter 3 Results of research	36
Section 1 Development mass rearing of <i>Plutella xylostella</i>	36
1. Introduction	36
2. Materials and method	37
3. Results and discussion	38
4. Abstracts	47
Section 2 Characteristics and bioassay of PxGV	48
1. Introduction	48
2. Materials and method	48

3. Results and discussion	50
4. Abstracts	55
Section 3 Screening of the GV-dependent up/down regulated genes from <i>Plutella xylostella</i>	56
1. Introduction	56
2. Materials and method	56
3. Results and discussion	57
4. Abstracts	62
Section 4 Cloning and expression profiles of a caspase from DBM	63
1. Introduction	63
2. Materials and method	63
3. Results and discussion	64
4. Abstracts	68
Section 5 Cloning and expression patterns of calreticulin in response to GV infection from DBM	70
1. Introduction	70
2. Materials and method	71
3. Results and discussion	75
4. Abstracts	79
Section 6 Cloning and partial characterization of lebocin precursor from <i>Plutella xylostella</i>	81
1. Introduction	81
2. Materials and method	81
3. Results and discussion	83
4. Abstracts	86
Section 7 Cloning and expression patterns of PxCatalase from DBM	88
1. Introduction	88
2. Materials and method	88
3. Results and discussion	91
4. Abstracts	93

Section 8 Cloning and partial characterization of NOS from DBM	95
1. Introduction	95
2. Materials and method	95
3. Results and discussion	97
4. Abstracts	100
Section 9 Cloning and partial characteriazation of thioredoxin peroxidase from <i>Plutella xylostella</i>	101
1. Introduction	101
2. Materials and method	101
3. Results and discussion	103
4. Abstracts	106
Section 10 Imroving stabilization and control effect	108
1. Introduction	108
2. Materials and method	108
3. Results and discussion	110
4. Abstracts	115
Section 11 Control effect of granulovirus by formulation	116
1. Introduction	116
2. Materials and method	117
3. Results and discussion	119
4. Abstracts	130
Section 12 Formulation of PxGV	132
1. Introduction	132
2. Materials and method	132
3. Results and discussion	150
4. Abstracts	172

Chapter 4	Achivements of aims and contribution to related area	174
Section 1	Achivements of research aims	174
1.	Aims, evaluation score and achivements of the first year research	174
2.	Aims, evaluation score and achivements of the second year research	175
3.	Aims, evaluation score and achivements of the third year research	176
4.	Overall evaluation on achivements of the research	176
Section 2	Contribution to related area	177
1.	Technical aspects	177
2.	Academic aspects	178
3.	Economical and industrial aspects	179
Chapter 5	Application of results	180
Section 1	Necessity of continuing research	180
1.	Necessity of additional research to other pest	180
2.	Necessity of enlargement to other field and crop	180
Section 2	Direction of industrialization	180
Chapter 6	Information collected from abroad during the research	181
Section 1	Visit Bayer crop science headquater, Germany	181
Section 2	Visit Botanical research, Beijing	184
Chapter 7	References	190

목 차

제1장 연구과제의 개요	25
제1절 연구개발의 목적 및 필요성	25
1. 연구개발의 목적	25
2. 연구개발의 필요성	26
가. 기술적 측면	26
나. 경제·산업적 측면	27
다. 사회·문화적 측면	27
제2절 연구개발의 목표 및 내용	29
1. 연구개발 목표	29
2. 연구의 내용 및 범위	30
3. 연구개발 추진 체계	33
제2장 국내외 기술 개발 현황	34
제1절 국내기술 현황	34
제2절 국외기술 현황	34
제3절 앞으로 전망	35
제3장 연구개발 수행 내용 및 결과	36
제1절 배추좀나방의 안정화된 사육법 개발	36
1. 서언	36
2. 재료 및 방법	37
3. 결과 및 고찰	38
4. 결과요약	47
제2절 과립병바이러스의 특성 및 병원활성에 대한 검정	48
1. 서언	48
2. 재료 및 방법	48

3. 결과 및 고찰	50
4. 결과요약	55
제3절 PxGV 감염된 배추좀나방으로부터 면역유전자 탐색에 관한 연구	56
1. 서언	56
2. 재료 및 방법	56
3. 결과 및 고찰	57
4. 결과요약	62
제4절 배추좀나방의 caspase 유전자 클로닝 및 발현양상에 관한 연구	63
1. 서언	63
2. 재료 및 방법	63
3. 결과 및 고찰	64
4. 결과요약	69
제5절 배추좀나방의 calreticulin 유전자 클로닝 및 발현연구	70
1. 서언	70
2. 재료 및 방법	71
3. 결과 및 고찰	75
4. 결과요약	79
제6절 배추좀나방의 lebocin 유전자 클로닝 및 발현연구	81
1. 서언	81
2. 재료 및 방법	81
3. 결과 및 고찰	83
4. 결과요약	86
제7절 배추좀나방의 카타라제유전자의 클로닝 및 발현양상조사	88
1. 서언	88
2. 재료 및 방법	88
3. 결과 및 고찰	91
4. 결과요약	93
제8절 배추좀나방의 NOS 유전자 클로닝 및 발현연구	95
1. 서언	95

2. 재료 및 방법	95
3. 결과 및 고찰	97
4. 결과요약	100
제9절 배추좀나방의 thioredoxin peroxidase 유전자의 클로닝 및 발현양상 조사	101
1. 서언	101
2. 재료 및 방법	101
3. 결과 및 고찰	103
4. 결과요약	106
제10절 환경조건이 배추좀나방 과립병바이러스 병원활성	108
1. 서언	108
2. 재료 및 방법	108
3. 결과 및 고찰	110
4. 결과요약	115
제11절 배추좀나방 과립병바이러스의 제형의 안정성 및 효과검정	116
1. 서언	116
2. 재료 및 방법	117
3. 결과 및 고찰	119
4. 결과요약	130
제12절 배추좀나방 과립병바이러스 제형화	132
1. 서 언	132
2. 재료 및 방법	132
3. 결과 및 고찰	150
4. 결과요약	172
제4장 목표달성도와 관련분야에서의 기여도	174
제1절 목표 달성도	174
1. 제 1 차년도 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도	174
2. 제 2 차년도 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도	175
3. 제 3 차년도 연구개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도	176

4. 최종 평가의 착안점 및 목표 달성도	176
제2절 관련 분야에의 기여도	177
1. 기술적 측면에서의 기여도	177
2. 학문 발전에의 기여도	178
3. 경제, 산업적 측면에의 기여도	179
제5장 연구개발결과의 활용계획	180
제1절 추가연구의 필요성	180
1. 곤충 바이러스의 다른 해충으로 추가 연구의 필요성	180
2. 포장 및 타 작물로의 확대의 필요성	180
제2절 기업화 추진방향	180
제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	181
제1절 독일 바이엘 크롭 사이언스 방문	181
제2절 중국 농업과학원 산하 생물농약 연구기관 방문	184
제7장 참고문헌	190

제1장 연구과제의 개요

제1절 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

배추좀나방은 나비목 집나방과에 속하는 아주 작은 해충으로 배추, 무, 양배추 등 주로 십자화과 작물을 가해하며 일부 농가에서는 낙하산벌레로 부르기도 한다. 이 해충은 필리핀, 태국 등 동남아시아의 열대지방에서부터 캐나다 북부의 고위도 지방까지 광범위하게 분포되어 있는 세계적인 해충이며 어린벌레(유충)가 배추, 양배추, 무 등 기주작물의 잎 뒷면에서 표피를 파고 들어가 표피만 남기고 엽육을 식해 하여 피해를 주고 있다. 특히 작물의 유묘기에 많이 발생하면 어린잎을 갉아먹어 엽맥만 남기기 때문에 배추의 생육을 저해하고 심하면 고사에 이르게 하는 등 초기생육에 현저한 지장을 주고 있다.

우리나라에서 이 해충이 문제되기 시작한 것은 1980년대 중반부터이며 초기에는 일부 도시근교의 채소재배 단지에서 발생하기 시작하였다. 배추좀나방의 발생이 증가하는 주요 원인은 최근 십자화과 주요 채소인 양배추, 배추, 무 등의 재배면적이 늘어나고 있고 비닐 하우스 등 시설재배를 통한 십자화과 채소의 연중재배가 이루어지면서 먹이 조건이 좋아졌을 뿐만 아니라 십자화과 채소류의 재배가 집단화되고 연작되면서 진딧물류 등 채소의 해충방제를 위한 약제의 집중살포로 천적이 감소하였고 세대기간이 짧고 연간 9~12세대로 발생회수가 많아 약제에 대한 저항성이 빠르게 발달되어 약제방제효과가 떨어져서 발생 및 피해가 증가하고 있다.

최근에까지 이 해충의 방제는 유기합성 농약을 위주로 방제가 이루어지고 있으며 이러한 유기합성 농약의 지속적인 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 병원성바이러스

스는 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 과립병바이러스 대량생산에는 기주생체 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 배추좀나방 과립병바이러스(PxGV)의 생화학적 특성, 대량생산을 위한 저렴한 인공사료, 바이러스의 병원성 및 환경에 대한 불활성화 조건 등을 구명하고 실제 농가 포장에서 살포 할 적정 농도를 판단하여 이를 제형화하여 배추좀나방에 합성농약이 아닌 새로운 미생물 친환경 해충 방제제를 개발하고자 하였다.

2. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

곤충병원 바이러스를 이용하여 해충을 방제하는 것을 미생물적 방제라 한다. 해충의 미생물적 방제란 포식자 또는 기생자를 이용하여 해충을 방제하는 생물적 방제에 포함되는데 야외에서 자연적으로 발생하는 곤충병원 바이러스와 해충의 생리 및 생태를 고려하여 그 해충 집단에 병원바이러스를 인위적으로 도입시킴으로써 해충에 병을 유발시켜 방제하거나 밀도를 제어함을 말한다.

우리나라 곤충바이러스 연구는 1974년 뽕나무해충인 흰불나방에서 핵다각체병바이러스를 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. 곤충에 질병을 일으키는 바이러스는 14과(Family) 900여종이 알려져 있으며 이 중 Baculoviridae 속의 곤충핵다각체병바이러스(Nucleopolyhedro virus ; NPV)는 520여종, 과립병 바이러스(Granulosis Virus ; GV)는 70여종이 보고되고 있다. 이들 바이러스병은 기주곤충에만 감염하는 기주특이성이 있고 인축과 환경에 무해하고 방제효과가 높고 안정성이 크기 때문에 여러 나라에서 곤충 바이러스를 이용한 살충제 개발에 주목하고 있다. 특히 개발하고자하는 배추좀나방 과립병바이러스는 종은 다르지만 1956년 캐나다에서 브로콜리의 배추흰나비 방제에 사용하여

9일간에 87~97%가 방제되는 것으로 알려져 있으며, 또한 이것을 살포한 포장에서 상품성이 있는 배추가 무처리한 것 22%에 비해 84%로 수량이 증가되었으며 현재 일본과 중국에서 개발하고자 노력 중에 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 기주생체 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 바이러스의 대량증식 시설이나 바이러스 살충제 제제화 등에 관한 연구가 매우 미진하다. 특히 우리나라는 일본이나 중국의 곤충상과 유사하여 농업해충별 곤충 바이러스 병의 종류도 비슷한 경우가 대부분이다.

나. 경제·산업적 측면

전 세계에 등록된 생물농약은 276여종으로 알려져 있는데(2004년), 이 중에서 살충제가 172종(62%), 살균제가 49종(18%), 살선충제가 4종(1.4%), 제초제가 16종(6%), 식물생장 조절제와 기타가 각각 14종(5%)과 21종(7.6%)이며 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 친환경 농산물들의 재배가 늘어남에 따라 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 1990년부터 2003년까지 우리나라의 ha(약 3,000평)당 농약 사용량은 연평균 12.8kg으로 전 세계 146개국 가운데 대만, 코스타리카, 콜롬비아에 이어 4위를

차지했다. 이는 자유무역협정(FTA) 협상을 벌이고 있는 미국(2.3kg)에 비해서는 5.6배가 많은 것이다. 또 우리나라와 FTA를 체결한 칠레(6.7kg)에 비해서는 1.9배, 한·아세안 FTA 체결로 우리 농산물 수출이 크게 늘 것으로 예상되는 태국(1.10kg)보다는 11.6배가 되어 농약을 과다 사용하고 있는 국가 중의 하나이다. 그러나 곤충병원바이러스를 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 : 배추좀나방 과립병바이러스의 제형화를 통해 농약잔류나 인축에 독성이 없는 환경 친화적인 해충 방제제 개발을 위하여

- 1) 배추좀나방의 사육에 가장 안정된 인공사료 성분을 구명하여 안정화된 사육 체계를 개발하고
- 2) 배추좀나방 과립병바이러스의 최적생산조건, 안정성 등을 구명하여 대량 생산체계 구축하고
- 3) 배추좀나방 과립병바이러스의 세포학적, 조직학적 특성 검정하여
- 4) 배추좀나방 과립병바이러스 어독성, 경피독성 등 안정성을 검정하고 제형별로 살충력을 검정하여 친환경 생물적 방제제로 제품화하고자 한다.

최근까지 다른 해충과 마찬가지로 배추좀나방도 화학적 방제가 주를 이루고 있다. 그러나 약제 저항성으로 방제가 어려워 재배작물이 큰 피해를 입을 뿐 아니라 저항성해충의 출현, 인축이나 동식물에 대한 직·간접적인 피해와 잔류독성으로 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 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, 농작물해충 방제에 효과적이다.

그러나 이 Baculovirus 살충제는 효율적인 면에서 기존의 화학 살충제와 비교하여 살충 범위가 좁고, 살충효과가 늦게 나타나고, 저장중이나 야외 살포 후 태양광선에 의해 바이러스의 병원성이 낮아지는 등 개선할 점이 있다.

이와 같은 단점을 해결하기 위하여 배추좀나방의 과립병바이러스(PxGV)의 생화학적 특성, 인공사료, 바이러스의 안정화 물질 선별 및 태양광선의 자외선에 의한 불활성화 조건 등을 구명하고 실제 농가 포장에서 살포 할 적정 농도를 판단하여 이를 제형방법 별로 검정하여 가장 좋은 제형을 선별하여 배추좀나방에 합성농약이 아닌 새로운 미생물 친환경 해충 방제제를 개발하고자 하였다.

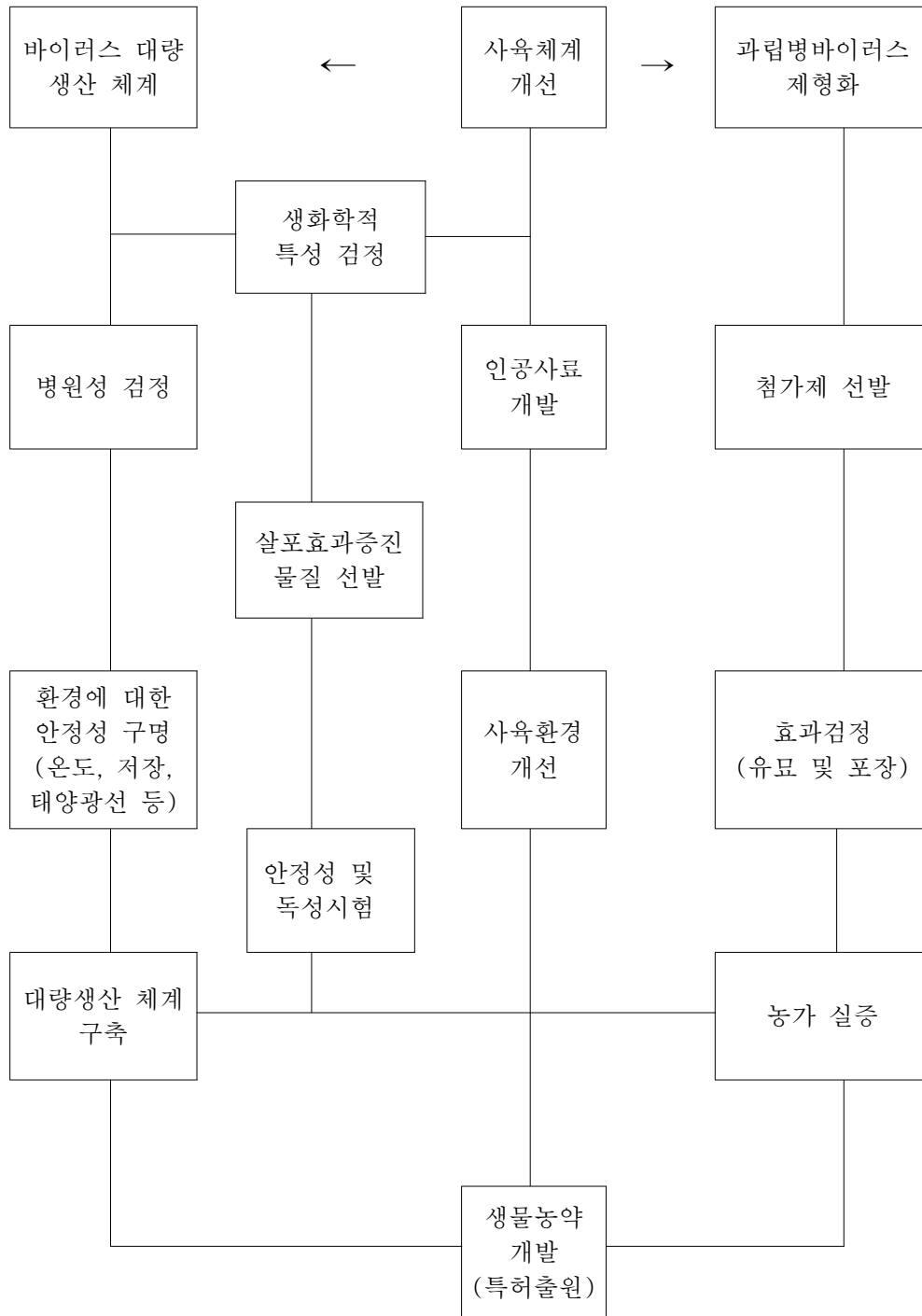
2. 연구의 내용 및 범위

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (2005)	배추좀나방의 안정화된 사육법 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 배추좀나방의 대량 사육법 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 인공사료 개발 <ul style="list-style-type: none"> ·주성분 및 미량성분 선발 ·투입량 조절 - 사육 최적조건 구명 <ul style="list-style-type: none"> ·온도조건 : 20℃ ~ 30℃ ·습도조건 : 40% ~ 70% ·사육용기, 통풍관계 등
	배추좀나방 과립병바이러스의 대량 생산체계 구축	<ul style="list-style-type: none"> ○ 과립병바이러스 대량 생산 <ul style="list-style-type: none"> - 과립병바이러스 병원체 분리 및 접종 - 과립병바이러스 최적 생산조건 구명 <ul style="list-style-type: none"> ·접종농도 : $1.0 \times 10^2 \sim 10^8$ OBs/ml ·유충영기 : 2령 ~ 5령 ·온도 조건 : 20 ~ 32℃ ○ 과립병바이러스 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
	배추좀나방 과립병바이러스 세포학적, 조직학적 특성 검정	<ul style="list-style-type: none"> ○ 나방류 바이러스 수집 및 분리 ○ 세포학적 특성 검정 ○ 조직학적 특성 검정 <ul style="list-style-type: none"> - 다각체 분리 및 비리온 정제, 전자현미경 관찰 ○ 배추좀나방의 증장과 과립병바이러스의 상호 작용에 관련된 유용 유전자를 배추좀나방의 증장에서 탐색 및 작용규명
	배추좀나방 과립병바이러스 제형화	<ul style="list-style-type: none"> ○ 문헌, 특허 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 - 적용작물에 대한 잔류 허용기준 검토

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
2차년도 (2006)	배추좀나방의 안정화된 사육법 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 배추좀나방의 대량 사육법 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 인공사료 개선 : 기존 사료 조성분 변형 ·주성분 및 미량성분 교체 ·투입량 조절 - 사육 최적조건 구명 ·온도조건 : 20℃ ~ 30℃ ·습도조건 : 40% ~ 70 ○ 유묘이용 배추좀나방의 대량 사육법 개발
	배추좀나방 과립병바이러스의 대량 생산체계 구축	<ul style="list-style-type: none"> ○ 과립병바이러스 대량 생산 <ul style="list-style-type: none"> - 과립병바이러스병원체 분리 및 접종 - 과립병바이러스 최적 생산조건 구명 ·접종농도, 유충영기, 온도 조건 등 ○ 과립병바이러스 안정성 구명 <ul style="list-style-type: none"> - 기주식물에서 바이러스 안정성 검정 - 불활성화에 미치는 영향 ·태양광선, 저장조건 등 ○ 바이러스 살포량 및 살포방법 구명 <ul style="list-style-type: none"> - 살포농도, 살포방법 등 ○ 제형시 환경영향 검정 <ul style="list-style-type: none"> - 보조제 및 천적 등
	배추좀나방 과립병바이러스 생화학적 특성 검정	<ul style="list-style-type: none"> ○ 생화학적 특성 검정 <ul style="list-style-type: none"> - 다각체 및 비리온 단백질 전기영동 - 바이러스 DNA의 제한효소 분석 ○ 배추좀나방의 체강내에 존재하는 소기관 (지방체, 표피세포)과 과립병바이러스와의 상호작용시 발현되는 유전자 탐색 및 상호작용규명
	배추좀나방 과립병바이러스 제형화	<ul style="list-style-type: none"> ○ 제형화 연구 <ul style="list-style-type: none"> - 제형화를 위한 첨가제 선발 : 유기산, 무기산 - 약효증진용 부자재 탐색 - 부자재 종류별 제형화 연구 - 상품화를 위한 제형별 연구 : 수화제, 액상 수화제, 과립형 제제 - 환경친화형 제형화 기술 확립 - 유효성분 분석법 확립 - 온도별 확대시험 - QC확립을 위한 생물검정 ○ 환경안전성 연구 <ul style="list-style-type: none"> - 기초 어독성 시험 : 수서생물에 대한 독성(어독성 등) - 독성시험 : 경구독성, 경피독성

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
3차년도 (2007)	배추좀나방의 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 ·미량성분 교체 및 투입량 조절 - 사육 최적조건 구명 ·온도조건 : 20℃ ~ 30℃ ·습도조건 : 40% ~ 70 ·사육용기, 통풍관계 등 ○ 인공사료와 유묘에 의한 배추좀나방의 누대 사육 시스템 개발
	배추좀나방 과립병바이러스의 대량 생산체계 구축	<ul style="list-style-type: none"> ○ 과립병바이러스 안정성 구명 <ul style="list-style-type: none"> - 기주식물에서 바이러스 안정성 검정 - 불활성화에 미치는 영향 ·온도조건, 보관조건, 태양광선 등 ○ 바이러스 살포효과 증진 <ul style="list-style-type: none"> - 살충력 증가 바이러스 혼합물질 선발 ○ 과립병바이러스의 제형 병원성 검정 <ul style="list-style-type: none"> - 농가실증
	배추좀나방 과립병바이러스 생화학적 특성 검정	<ul style="list-style-type: none"> ○ 생화학적 특성 검정 <ul style="list-style-type: none"> - 다각체 및 비리온 단백질 전기영동 - 바이러스 DNA의 제한효소 분석 ○ IAP-2 (Inhibitor of Apoptosis) and IAP-3의 발현 과정 조사. ○ 공초점현미경을 이용하여, 과립병바이러스의 IAP 단백질과 숙주의 증장 및 체강내 세포학적 및 병리학적인 패턴분석 ○ 조직화학적 방법을 이용 배추좀나방 조직의 세포 사멸 과정과 관련하여 변화양상조사
	배추좀나방 과립병바이러스 제형화	<ul style="list-style-type: none"> ○ 제형개발 <ul style="list-style-type: none"> - 과립병바이러스 제형처방 후 생산 가능성 검토 - 가능제형 추가검토(내한, 내열성 검정) - 효과안정성 확보를 위한 제형개발 - 포장시험용 시제품 제제 확보 ○ 생산 가능성 연구 <ul style="list-style-type: none"> - 실험실 규모의 제조방법 확립 - 제품 생산담당자와 공동으로 pilot test 실시 - 포장시험 및 제조허가용 시제품 제조 - 생산공정의 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

우리나라의 곤충바이러스연구는 교육 및 연구기관이 부족하여 외국에서 친환경 미생물 살충제 개발을 위하여 집중적인 노력을 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 체제화 등에 관한 연구가 매우 미진하다. 그리고 생태학적 특성연구도 과립병바이러스가 배추좀나방의 증장에 침입하는 과정에서 GV와 증장세포와의 분자 및 세포생물학적 상호작용에 관한 연구는 전무한 상태이다. 그러나 최근에는 바이러스 살충효과를 높이기 위해 국내에서도 *Bacillus thuringiensis* 내독소와 초록색형광물질인 *Autographa californica* 유전자와 재조합하여 recombinant ColorBtrus의 빠른 살충효과를 확인함으로써 새로운 곤충바이러스 살충제 개발연구에 가능성을 보였으며, 유기산 등을 혼합하여 살포함으로써 살충기간을 단축하고 살충효과를 높이는 연구가 수행되고 있다. 우리나라는 일본이나 중국의 곤충상과 유사하여 농업해충별 곤충 바이러스 병의 종류도 중첩되는 경우가 대부분이다. 앞으로 국내에서도 곤충바이러스뿐만 아니라 세균이나 곤충 기생곰팡이를 이용한 해충의 미생물 방제 연구를 위해 집중투자를 함으로서 국내 미생물 방제자원의 보호 및 부가가치를 높여야 할 것이다.

제2절 국외기술 현황

곤충바이러스를 이용한 최초의 포장시험은 1913년 알팔파에 담배나방류의 병사충을 물에 현탁하여 살포하였고, 그 후 1940년대 후반부터 미국, 캐나다, 프랑스 및 동구권 국가에서 본격적으로 연구 개발되어 현재 약 24종의 바이러스가 상품화되어 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 뿐만 아니라 살충효과도 90배 높일 수 있다는 보고가 있다. 또한 일본에서는 과립병바이러스의 genome sequence를 완료하였으나 Post-Genome시기로서 이미 앞으로 많은 기능 연구가 필요한 상태이다

곤충바이러스 살포효과 증식으로 살포기구, 작물생육, 바이러스 제제형태 및 기후 등 여러 요인이 관여하고 있다. 즉 성충에 의한 병 바이러스의 자동분산방법으로 바이러스 액제나 분제를 유아등이나 먹이에 오염시키거나 페로몬과 조합하여 암컷성충에 감염시키는 방법 등을 포장에서 실용화할 단계에 있다.

제3절 앞으로 전망

미국, 유럽 등 선진국에서는 24종의 곤충바이러스 농약의 상품화가 이루어져 있으며 우리나라와 곤충상이 비슷한 일본과 중국도 일부 해충에 대해 포장시험을 마치고 일부 상품화 단계에 있다. 우리나라에서는 곤충바이러스를 이용한 농업해충 방제이용기술이 초기 단계에 있으나 농업환경의 개선 및 관리 측면과 소비자의 요구에 따라 해충방제는 화학 살충제 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 증식 효율 증대, ④ 바이러스살충제의 쉬운 제제화 및 환경지속성 증대, ⑤ 해충종합관리(IPM)와의 상호관계유지 ⑥ 환경보호 측면의 이점, ⑦ 사용자측의 이해와 수용 등 해결해야 할 점이 많다. 따라서 주요 농업해충의 ① 곤충바이러스 탐색과 방제이용 지속연구 ② 곤충바이러스 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 배추좀나방의 안정화된 사육법 개발

1. 서언

배추좀나방(*Plutella xylostella*)은 열대지방에서 시베리아 한대지방까지 세계적으로 분포하고 있으며, 십자화과 식물을 가해하는 대표적인 해충으로 알려져 있다. 우리나라에서 이 해충이 문제되기 시작한 것은 1980년대 중반부터이며, 초기에는 일부 도시근교의 채소 재배단지에서 발생되기 시작하였다. 이웃나라인 일본과 대만에서는 오래전부터 문제해충으로 지목되어 연구가 진행되어 오고 있다. 이 해충의 발생 초기에는 화학농약의 방제가 잘 되어 별반 문제가 되지 않았으나 현재는 제주도 양배추 재배지에서 강원도 고랭지 채소재배단지에 이르기 까지 전국적으로 발생하고 있다. 특히 배추는 생육 초기부터 수확기까지 계속적으로 피해를 주기 때문에 연간 발생세대수는 남부지방 노지재배에서 10~11세대를 경과한다. 배추좀나방의 발생증가 원인은 십자화과 채소면적의 재배면적이 늘어나고 비닐하우스 등 시설재배를 통한 십자화과 채소의 연중재배가 이루어지면서 먹이 조건이 좋아졌을 뿐만 아니라 십자화과 채소류의 재배가 단지화되고 연작되어 배추좀나방의 발생횟수가 많아 화학농약에 대한 저항성이 빠르게 발달되어 약제방제효과가 떨어져 발생 및 피해가 증가하고 있다.

나비목의 곤충사료는 천연물이 함유된 반합성 형태로 만들어져 왔다. Biever와 Boldt(1971)이 처음 반합성 사료를 제작하여 배추좀나방과 담배나방류의 사육에 이용하였다. 그 후 Hsiao와 Hou(1978)은 leenseed oil, I-inositol과 cholesterol를 첨가시켜 제작하였는데 이들 사료는 맥아를 기본으로 하는 사료로 인식되고 있다. 건조 분말 및 사용은 저온에서 장기보관은 가능하기도 하다. 사료조제 과정은 곤충 영기 및 곤충의 발육과 생육에 있어 중요하므로 사료의 내용물이 잘 섞여야 하며 영양학적으로 모든 영양이 함유되도록 만든 것이 중요하다.

따라서 본 시험은 배추좀나방 과립병바이러스를 이용한 미생물 살충제 개발에 있어서 가장 중요한 바이러스 대량생산의 기초연구로서 배추좀나방 인공사료를 개선하여 대량 사육하기 위하여 실시하였다.

2. 재료 및 방법

가. 배추좀나방 사육

실험용 배추좀나방(*Plutella xylostella*)은 나주시에 위치한 전라남도농업기술원 포장에서 유충을 채집하여 사육하였다. 사육은 아크릴케이지 사육 상자를 이용하였으며, 사육조건은 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, 16L:8D이었고, 배추 유묘를 먹이로 제공하였다. 용은 수거하여 산란케이지 넣고 이곳에서 우화시킨 성충에 10% 설탕물에 제공하면서 산란을 유도하였다.

나. 기주식물에 따른 배추좀나방 발육특성

기주 식물은 케일, 유채, 배추, 무를 이용하였으며, 사육은 소형 사육 케이지에 각 기주 식물을 심은 후 온도 $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, 광주기 16L:18D 조건에서 막 부화된 유충을 1마리씩 개체사육하면서 매일 조사하였다. 번데기로 들어간 후 2일째 무게를 재었으며, 우화 후 성충의 생식기를 관찰하여 암·수 구분을 하였다.

다. 배추좀나방의 산란 및 식이 선호성 조사

배추좀나방의 식이 선호성을 보기 위하여 기주 식물은 케일, 유채, 배추, 무 등을 유묘 상자에 각각 10주씩 교호로 심은 후 1~2령 유충을 100마리씩 접종하여 5반복 실시하였다. 또한 산란 선호성은 아크릴케이지에 소형 유묘상자에 심어진 각 기주를 10주씩 넣고 부화 후 3일된 성충 30마리를 넣고 5반복 조사하였다.

라. 온도별 배추좀나방 생육조사

사육은 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, 50~70% R.H. 및 16L:8D 광주기 조건하에서 하였으며 우화성충을 사용하였다. 우화된 50마리의 암컷과 수컷을 암조건의 사육장에 넣은 후 교미하고 있는 쌍을 신선한 배추 잎과 함께 플라스틱 접시로 옮겼다. 접시와 배추잎에 산란한 알의 수를 조사하였고 부화 할 때까지 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 를 유지하였다. 또한 각각의 온도(15, 20, 25, 30, 35°C)에서 생육을 조사하였다. 유충의 생육조사는 암컷과 수컷을 사육장에서 키우면서 배추 잎에 낳은 알을 수집하였다. 알에서 부화한 10개의 유충들을 각각의 온도별(15, 20, 25, 30, 35°C)로 플라스틱 접시에 놓고 사육하였다.

마. 습도 조건

크기 3×3m으로 나누어진 사육실에서 각방의 온도를 20℃와 25℃로 나누어서 습도를 40~70% 범위에서 10% 간격으로 조절하였으며 습도조절은 온습도계를 설치한 후 습도를 매일 조사하였고 조절이 잘되지 않은 경우는 가습기를 이용하여 습도를 맞추어 주었다. 배추좀나방 2령 유충을 사용하여 매일 생체중과 사충율을 조사하였으며 30마리씩 5반복 실시하였다.

바. 사육용기

배추좀나방 대량 사육을 위하여 용기를 5×5×4cm 플러그 육묘상에 유채를 파종하여 생육을 시킨 후 배추좀나방 2령 유충을 10, 50, 100, 200, 300마리로 나누어서 사육하였다. 용화율, 용 무게 등을 조사하였으며 사육온도는 28℃, 습도는 60%, light 16시간, dark 8시간으로 하였다

사. 배추좀나방 인공사료

인공사료는 국내에서 많이 사용되고 있는 담배거세미나방과 파밤나방 인공사료 조성, 외국에서 쓰고 있는 배추좀나방의 인공사료, 변형시킨 것과 배추 잎으로 사육한 것을 비교하였다. 사육조건은 온도 25℃±1℃, 광주기 16L:18D이었고, 사료별로 부화유충을 각각 1개의 petri dish에 10마리씩 처리하여 30반복하였다.

아. 인공사료 조성별 배추좀나방의 생존과 발육

사료의 조성은 배추잎, 유채잎, 케일잎을 냉동 건조시킨 후 분말화하여 사용하였으며 기존 인공사료에 냉동분말을 식물별로 10%, 20%를 첨가한 변형사료를 만들어 먹이로 제공하였다. 대조구는 배추잎 먹이를 사용하였으며 사육방법은 개체사육은 뚜껑이 있는 10ml 플라스틱 시험관에 사료를 넣은 후 부화유충을 한 마리씩 접종하였다. 집단사육은 아이스크림 컵(직경 8.5mm × 높이 7mm, 250cc)을 이용하였다. 사육조건은 온도 25℃±1℃, 광주기 16L:18D이었다.

3. 결과 및 고찰

배추좀나방은 나비목 집나방과에 속하는 아주 작은 해충으로 배추, 무, 양배추, 유채

등 십자화과 작물을 가해하며 일부 농가에서는 낙하산 벌레라고도 한다. 배추좀나방의 각태별 크기를 조사한 결과 Table 1과 같이 난은 평균 0.45mm, 유충은 1령 평균이 1.29mm, 2령 3.10mm, 3령 4.65mm, 4령이 8.57mm였으며 용 7.91mm, 성충 수컷은 4.96mm, 암컷은 4.97mm 였다.

Table 1. Size of *Plutella xylostella* on each stage

Stage	Length(mm)	
	Mean \pm SE	Range
Egg	0.45 \pm 0.001	0.42 ~ 0.51
Larva		
1st	1.29 \pm 0.033	1.21 ~ 1.35
2nd	3.10 \pm 2.861	2.67 ~ 3.56
3rd	4.65 \pm 0.772	4.01 ~ 5.98
4th	8.57 \pm 0.238	6.70 ~ 9.84
Pupa	7.91 \pm 0.142	4.52 ~ 6.11
Adult		
Male	4.96 \pm 0.032	4.72 ~ 5.20
Female	4.97 \pm 0.034	4.71 ~ 5.23

배추좀나방의 산란습성은 산란전기 2.8일, 산란기는 평균 5.1일 이었으며 산란후기는 6.9일 이었다. 1일당 산란수는 48.7개, 총 산란수는 263개 정도였다(Table 2).

Table 2. Number of eggs laid by *Plutella xylostella*

	Duration(Day)			Number of oviposition	
	Pre-oviposition	Ovipositon	Postoviposition	No. eggs/day	total eggs
Mean	2.8	5.1	6.9	48.7	263
Range	2~4	5~7	5~9	43~65	198~317

배추좀나방의 대량사육을 위한 기주식물을 선발하기 위하여 주요 십자화과 식물을 대상

으로 발육기간을 조사한 결과 알에서 1령까지는 약 2.6~3.5일 소요되었다. 또한 1령에서 4령까지의 유충 기간은 8.3~9.9일로 기주별로, 암수에 따라서 약간의 차이가 있었으나 대체로 무를 제외한 다른 식물은 비슷한 경향이였다. 번데기 발육기간도 암컷은 4.8~5.5, 수컷은 5.4~6.4일 소요되었다(Table 3).

Table 3. Developmental duration of *Plutella xylostella* with different host crops

Host	Sex	larva (day)					Pupa
		1st	2nd	3rd	4th	Total	
Kale	♀	2.9	1.9	1.9	2.6	9.3	5.5
	♂	2.9	1.7	2.0	2.1	8.7	6.4
Rape	♀	3.5	2.0	2.1	2.4	9.9	4.8
	♂	3.3	2.1	2.0	2.3	9.6	5.4
Chinese cabbage	♀	3.5	1.5	2.1	2.4	9.5	5.5
	♂	3.3	1.8	2.0	2.3	9.4	6.2
Radish	♀	2.9	1.7	2.1	2.0	8.7	4.9
	♂	2.6	1.8	1.9	2.0	8.3	5.6

기주식물에 따른 용화율은 배추에서 88%로 가장 높았으며 유채에서는 83%로 상대적으로 낮았으나 기주 간 차이는 없었다. 부화율은 배추에서 84%로 가장 높았으며 케일, 무, 유채에서는 73~77%로 배추좁나방의 기주선호도는 배추가 가장 좋았다(Table 4).

Table 4. Rate of pupation and emergency *Plutella xylostella* with different host crops

Host crops	Kale	Rape	Radish	Chinese cabbage
Pupation(%)	86	83	85	88
Emergency(%)	77	73	76	84

번데기 무게는 평균으로 케일에서는 6.3, 유채 6.0, 무 6.3, 배추 6.1mg이었다. 암수의 번데기 무게는 조사 기주식물에서는 암컷이 수컷보다 보다 큰 경향을 보였다(Table 5).

Table 5. Weight of pupa by *Plutella xylostella* with different host crops

Host crops	Kale	Rape	Radish	Chinese cabbage
♀ (mg)	7.2	6.5	6.9	6.9
♂ (mg)	5.4	5.5	5.6	5.2
Mean(mg)	6.3	6.0	6.3	6.1

Table 6. Preference of oviposition and feeding on *Plutella xylostella*

Host crops	Kale	Rape	Radish	Chinese cabbage
Feeding(%)	40.3	5.7	8.8	45.2
Oviposition(%)	36.3	1.3	4.2	58.2

배추좀나방의 기주에 따른 식이선호성은 배추 45.2%, 케일 40.3%로 다른 두 기주보다 식이 선호성이 높았으며, 산란선호성에 있어서도 배추가 58.2%로 가장 높아(Table 6) 국내에서 배추좀나방 인공사육을 위한 적정인공사료가 개발이 되지 않으면 기주식물인 배추를 이용한 대량사육이 가장 현실적인 것으로 사료되나 다른 기주도 배추좀나방 생육에 있어 큰 차이가 나지 않기 때문에 실내에서 사육 할 때는 비용을 감안하여 기주 식물을 선택하는 것이 좋을 것으로 생각된다.

Table 7. Distribution of oviposition site on chinese cabbage leaf by *Plutella xylostella*

Rate of ovipositon/site(%)			Rate of ovipositon/site(%)	
ground	mid	inside	front	back
68.4	30.6	1	29.4	70.6
(30.2)	(22.4)	(1.3)	(13.8)	(21.4)

* () 는 5반복 평균 산란수

배추좀나방의 배추에 대한 산란 분포를 검정한 결과 엽부위별 산란율은 지면 앞에서 68.4%, 산란수도 30.2개로 가장 많았으며 중간잎이 30.6%, 내측잎에는 거의 산란을 하지

않았다. 엽면별 산란율에서는 엽의 앞면 보다는 뒷면이 70.6%로 높았으며 산란수도 많았다(Table 7).

Table 8. Life span of *Plutella xylostella* adults by different temperatures

Temp. (°C)	50% Oviposition (days)	Longevity (days)	No.eggs/female	Emergency (%)
15	5.5±4.0	12.5±5.5	117.8±72.9	88.0±16.9
20	1.9±0.7	3.8±2.0	73.1±49.3	83.9±18.8
25	1.6±0.7	2.7±1.3	56.2±37.5	80.9±18.3
30	1.5±0.7	3.1±1.0	42.2±27.7	78.0±24.6
35	1.2±0.4	1.9±0.4	19.3±13.5	53.5±30.1

배추좀나방의 사육에 있어서 적정 온도를 구명하기 위하여 온도에 따른 성충수명, 산란수, 부화율 등 조사한 결과 50% 산란일은 저온인 15°C에서는 5.5일 이었으나 20°C에서는 1.9일, 30°C에서는 1.2일로 온도가 올라갈수록 짧아졌으며, 암컷수명도 같은 경향이였다. 암컷 당 산란수는 15°C에서 117개, 20°C는 73개, 부화율은 각각 88%, 83%로 온도가 높아질수록 조금씩 떨어졌으나, 35°C에서는 산란 수 19개, 부화율은 53%로 급격히 떨어져 산란을 유도하기 위하여 사육 상의 온도는 최소한 30°C이하로 유지 되어야 하며 20°C~25°C에서 단시간에 산란이 이루어져 채란에 대한 노동력이 절감되고 부화율도 80%이상으로 높은 것으로 나타났다(Table 8).

Table 9. Survival rate and development of larva by *Plutella xylostella* with different temperature

Temp. (°C)	Larva survived(%)	Developmental periods(days)	Rate of female (♀/♀+♂)
15	83.9±17.2	36.2±2.4	0.52±0.16
20	93.9±12.0	23.5±0.8	0.55±0.09
25	92.2±14.0	15.5±0.4	0.54±0.13
30	85.6±16.9	12.7±0.5	0.53±0.11
35	0.0±0.0	-	-

온도별 배추좀나방의 유충생존율은 20℃와 25℃에서 93, 92%로 가장 좋았으며 이 온도보다 낮거나 높으면 떨어졌고 35℃에서는 생존하는 개체가 없었다. 발육기간은 온도가 높아갈수록 짧아졌으며 암컷성충의 비율은 35℃를 제외하고는 비슷한 경향이었다 (Table 9).

Table 10. Changes of larval weight of *Plutella xylostella* with different humidity at 25℃

Humidity (%)	Larval weight(mg)					Mortality (%)
	Pre-treatment.	3d	5d	7d	9d	
40	0.28	0.45	0.92	2.97	5.14	18
50	0.29	0.46	0.95	3.08	5.42	12
60	0.30	0.41	0.97	3.14	5.51	9
70	0.28	0.40	0.91	2.98	5.24	15

온도 25℃에서 습도조건을 다르게 했을 때 배추좀나방 2령 유충의 생육 조사한 결과는 Table 10과 같다. 7일째에 40%에서는 2.97mg, 50%는 3.08mg, 60%는 3.14mg, 70%에서는 2.98mg으로 습도조건 60%에서 배추좀나방의 생육이 가장 좋았다. 사충율에 있어서도 40%에서 18%인데 반하여 습도 60%에서는 사충율 9%로 가장 낮았다. 20℃ 조건에서도 25℃와 생육이 비슷하였으나 사충율은 약간 떨어졌다(Table 11).

Table 11. Changes of larval weight of *Plutella xylostella* with different humidity at 20℃

Humidity (%)	Larval weight(mg)					Mortality (%)
	Pre-treatment.	3d	5d	7d	9d	
40	0.28	0.42	0.91	2.94	5.12	16
50	0.29	0.45	0.95	3.07	5.39	10
60	0.30	0.39	0.99	3.14	5.45	8
70	0.28	0.42	0.92	2.97	5.21	13

배추좀나방의 유충을 10~100마리 정도를 한 용기에 넣고 사육하였을 때 90% 이상의 용화율을 보이지만 유충을 200~300마리 넣을 경우 용화율은 급격히 떨어지게 된다 (Table 12). 또한 용 무게도 200마리 이상이 될 때 적어지는 경향이였다. 따라서 5×5×4cm 플러그 육묘 상에 100마리 투입하면 한판에 25구가 있기 때문에 이 용기에서 2,000개의 이상의 번데기를 얻을 수 있다. Hou(1979)는 배추좀나방의 유충을 50~100마리 정도를 한 용기에 넣고 사육하였을 때 90% 이상의 용화율을 보이지만 유충을 200~300마리 넣을 경우 용화율은 급격히 떨어지게 된다고 하여 본 시험과 일치하였으며 Yamada와 Koshihara(1978)도 이런 방법으로 2년 동안 인공사육을 하였는데, 유전적으로 연관 개체군의 교미를 피하기 위해 1년에 1~2회 정도 야생 성충을 투입해 주어야 한다고 하였다. 이들 방법으로 30세대까지 사육하는데 아무런 문제가 없었으며 22세대까지는 비정상적인 번데기를 발견할 수 없었다고 하였다.

Table 12. Pupation and pupal weight of DBM fed on rape seedlings

No. of second larvae	Pupation(%)	Pupal weight(mg)	
		Female	Male
10	98.6	6.3	5.6
50	95.4	6.6	5.6
100	92.8	6.7	5.7
200	72.6	6.1	5.1
300	68.4	5.8	4.9

배추좀나방 유충에 대한 기존 인공사료에 대한 선호도를 조사한 결과 담배거세미나방과 파밤나방 인공사료에서는 정상적인 발육이 거의 이루어지지 않았다(Table 13). 배추좀나방 인공사료로 국외에서 보고되어 있는 인공사료1과 2로 국내에서 수집한 배추좀나방 개체군에 대한 유충발육정도를 비교하여 보았을 때 유충 생존율이 12~18% 밖에 되지 않았으나 그것을 변형한 인공사료에서는 36~45.8% 정도 유충이 생존하고 정상적인 번데기도 27.6~38.6%가 되어 그중 대부분이 성충으로 우화하였다. 그러나 3세대 경과 후에는 영양 결핍 증세로 죽는 개체가 많아 배추좀나방의 생육이 더욱 안정화 될 수 있도록 미량 요소의 작용과 효율에 대한 지속적인 검증과 개량이 요구되고 있다.

Table 13. Development of *Plutella xylostella* by different artificial diet

Artificial diet	Larva survived(%)	Pupation(%)	Adult(%)
<i>S. litula</i>	0	0	0
<i>S. exigua</i>	0	0	0
Artificial diet 1	12.2	10.8	10.8
Artificial diet 2	18.4	12.1	12.1
Artificial diet 3	36.5	27.6	26.8
Artificial diet 4	45.8	38.6	36.9
Chanise cabbage leaf	85.4	85.4	85.4



Fig. 1. Artificial diet for *Plutella xylostella*

Table 14. Development of *Plutella xylostella* by artificial diet component

Artificial diet	Larva survived(%)	Pupation (%)	Adult(%)
Ch. cabbage powder 10%	54.2	46.7	52.6
Ch. cabbage powder 20%	63.8	52.4	62.9
Rape powder 10%	38.4	36.4	34.7
Rape powder 20%	42.3	40.1	39.6
Kale powder 10%	50.1	39.4	46.2
Kale powder 20%	56.2	44.9	51.8
Chinese cabbage	89.2	87.4	87.0

인공사료를 개선하기 위하여 급속 냉동시킨 식물을 분말로 만들어 인공사료 4에 분말 가루를 10%, 20%씩 첨가하여 3령 유충을 가지고 검정하였다(Table 14). 유충생존율은 분말 20%에서 분말 10%를 넣은 것보다 효과가 좋았지만 배추잎 분말 20%를 첨가한 사료에서 배추좁나방 유충의 생존율이 63.8%로 인공사료 4의 45.8%보다 약 20% 생존율이 높아졌다. 또한 용화율과 성충 출현율에서도 가장 좋았다.

하지만 인공사료로 배추좁나방을 사육하기 위해서는 유충 생존율이 80% 이상을 유지하여야 하기 때문에 지속적으로 연구가 되어야 할 것이다.

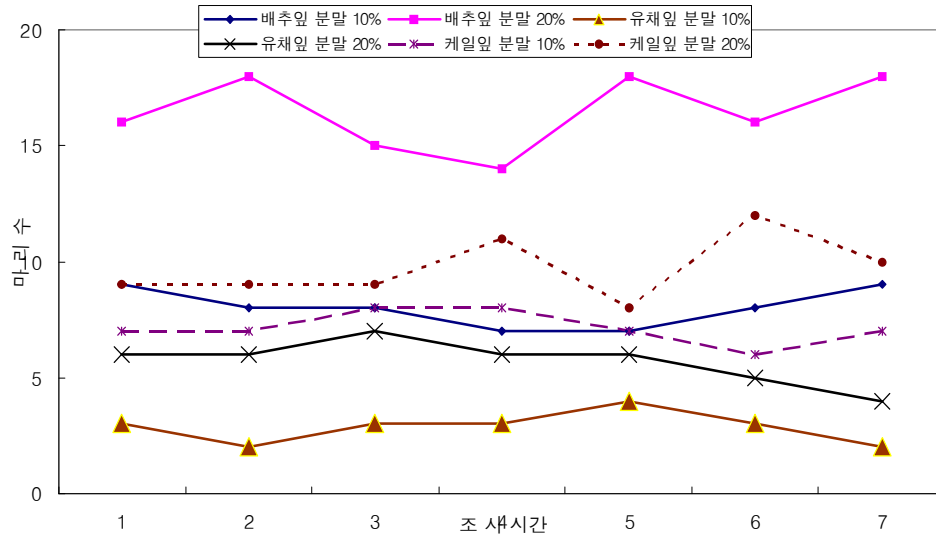


Fig. 2. Attractant effect of various host crop powder by *Plutella xylostella*

식물체 분말을 첨가하여 인공사료를 조제한 후 먹이에 대한 부화유충의 유인력을 검정한 결과 Fig. 2와 같이 배추잎 분말 20%에 시간대별로 유인수가 지속적으로 높았으며 다른 식물에서는 20% 분말에서도 효과가 떨어지는 경향이였다. 또한 기주식물 성분의 분말 첨가량이 많을수록 유인력이 높은 경향 이었는데 이러한 경향은 기주성분을 포함한 사료가 우수한 사육효과를 나타낸다는 보고와 일치하였다. 그러나 인공사료의 조제 방법 이나 배추좁나방의 지역적 특성에 따라 인공사료로 사육하였을 경우 유충 생존율이나 용화율, 우화율 등이 달라진다. Biever와 Boldt(1971)이 만든 사료의 경우 알에서 성충 까지 19일이 소요되는데 알 3일, 유충 11일, 용 5일 소요되는데 이때의 온도는 23℃, 상대 습도는 60% 인 경우이다. 이와 비슷한 결과는 대만의 Wu(1968)에서도 나타났으며, 캐나다

에서는(Harcourt, 1975) 부화율 90%, 유충 생존율 90%, 용 생존율 86%로 나타났었다. 그러나 Hsiao와 Hou는 유충 생존율 62%, 용화율 59% 밖에 나오지 않아, 이 사료를 변형 시킴으로써 용화율을 83%까지 올릴 수 있었다고 하였다. 이 결과로 보아 현재 유충생존율이 68.3%였으나 지속적으로 인공사료 개선은 요구되었다.

4. 결과요약

배추좀나방의 인공사료를 개선하여 대량 사육하기 위하여 실시한 시험 결과는 다음과 같다. 배추좀나방 난은 평균 0.45mm, 유충은 1령 1.29mm, 2령 3.10mm, 3령 4.65mm, 4령이 8.57mm 였으며 용 7.91mm, 성충 수컷은 4.96mm, 암컷은 4.97mm 였다. 배추좀나방의 산란습성은 산란전기 2.8일, 산란기는 평균 5.1일 이었으며 산란후기는 6.9일이였다. 1일당 산란수는 48.7개, 총 산란수는 263개 정도였다. 1령에서 4령까지의 유충 기간은 8.3~9.9일로 기주별로, 암수에 따라서 약간의 차이가 있었으나 기주식물에 따른 용화율은 배추에서 88%로 가장 좋았다. 부화율은 배추에서 84%로 가장 높았으며 기주 선호도는 배추가 가장 좋았다. 기주에 따른 식이선호성은 배추 45.2%, 케일 40.3%로 다른 두 기주보다 식이 선호성이 높았으며, 산란선호성에 있어서도 배추가 58.2%로 높았다.

온도에 따른 성충수명, 산란수, 부화율 등을 조사한 결과 50% 산란일은 20℃에서 1.9일, 30℃에서는 1.2일로 온도가 올라갈수록 짧아졌다. 암컷 산란수와 부화율은 온도가 높아 질수록 떨어지므로 최소한 30℃이하로 유지 되어야 하였다.

온도별 배추좀나방의 유충생존율은 20℃와 25℃에서 93, 92%로 가장 높았으며 35℃에서는 생존하는 개체가 없었다.

온도 25℃에서 습도조건을 다르게 했을 때 배추좀나방 2령 유충은 상대습도 60%에서 생육이 가장 좋았으며 사충율 역시 9%로 가장 낮았다. 배추좀나방의 유충을 10~100마리 정도를 한 용기에 넣고 사육하였을 때 90% 이상의 용화율을 보였다. 배추좀나방 유충에 대한 기존 인공사료에 대한 선호도를 조사한 결과 담배거세미나방과 과밤나방 인공사료에서는 정상적인 발육이 거의 이루어지지 않았다. 기존 인공사료를 변형한 경우 36~45.8% 정도 유충이 생존하고 정상적인 번데기도 27.6~38.6%가 되어 그중 대부분이 성충으로 우화하였다. 인공사료를 개선하기 위하여 급속 냉동시킨 식물을 분말로 만들어 인공사료 4에 배추잎 분말가루를 20% 첨가하여 3령 유충을 사육하였을 때 유충의 생존율이 63.8%로 가장 높았다.

제2절 과립병바이러스의 특성 및 병원활성에 대한 검토

1. 서언

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.

이와 같이 유기합성 살충제에 저항성을 나타내고 있는 배추좀나방에는 바이러스 등 미생물을 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 왔다.

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

2. 재료 및 방법

가. 배추좀나방 사육

실험용 배추좀나방(*Plutella xylostella*)은 나주시에 위치한 전라남도농업기술원 포장에서 유충을 채집하여 사육하였다. 사육은 아크릴케이지 사육 상자를 이용하였으며, 사육 조건은 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, 16L:8D이었고, 배추 유묘를 먹이로 제공하였다. 우화시킨 성충에 10%

설탕물에 제공하면서 산란을 유도하였다. 산란된 난은 매일 수거하여 작은 사육케이지로 옮겨 각 태별 크기와 산란 습성을 조사하였다.

나. 과립병바이러스 증식

배추좀나방 과립병바이러스는 농업과학기술원 농업해충과 곤충병리연구실에서 분양 받아 배추잎 표면에 1ml의 바이러스 현탁액을 처리한 후 20분 정도 음건시켜 petridish (9×1cm)에 3령 유충 5마리와 함께 넣고 완전히 섭식하게 하면서 사망 직전의 유충을 수확하였다.

바이러스의 정제는 Su(1987)의 방법에 따랐다. 수확한 이병충의 10배(v/w)에 달하는 0.05M Tris-HCl buffer(pH 7.2)에 넣고 마쇄한 후 이중 거즈로 여과한 부유액을 3,000rpm에서 10분간 원심 분리하여 유충의 찌꺼기를 제거한 후 12,000rpm에서 다시 40분간 원심 분리하였다.

원심 분리된 침전물을 취하여 Tris-HCl buffer(pH 7.2)으로 부유시켜 40~60% 설탕 밀도구배에 증충하여 초원심분리기 Swing Rotor를 사용하여 25,000xg, 4℃, 40분간 원심 분리하여 바이러스를 순화하였다. 이 바이러스 용액을 -20℃ 냉동고에 보관하면서 사용하였다.

다. 과립병바이러스 형태적 특성

봉입체의 전자현미경적 관찰은 formvar를 입힌 grid에 봉입체 부유액을 떨어뜨려 말린 후, 2% phosphotungstic acid로 negative염색하여 투과전자현미경으로 관찰하였다.

라. 과립병바이러스 병원성 검정

농도를 정확히 알고 있는 Latex beads(sigma, LB-3, particle diameter 0.33 μ m \pm 0.018) 현탁액과 정제된 봉입체를 혼합한 후, 투과전자현미경으로 검정하여 latex bead 입자 수와 과립병바이러스의 개수의 비율을 계산하여 바이러스 현탁액의 농도를 추정하였다. 정제된 과립병바이러스는 전착제인 Triton X-100(0.05%)과 함께 배추잎 표면에 도포하고 크린벤치 안에서 20분 정도 음건한 다음, 2령, 3령, 4령을 처리 당 30마리씩 식물생장상에 온도조건을 25℃로 조절하여 접종하였다. 매일 신선한 배추 잎을 급여하면서 25℃에서 사육하면서 병사충수를 조사하였다.

마. 과립병바이러스를 섭취한 배추좀나방 유충의 먹이소비와 생육기간

배추좀나방 각령 유충은 과립병바이러스 현탁액을 처리한 배추잎을 24시간 동안 섭취시킨 후 페트리디쉬에 옮겼다. 령당 40마리씩 깨끗한 잎 절편을 공급하고 파라필름으로 밀봉한후 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, 16L:8D 처리하였다. 각 유충의 먹이소비는 매 12시간마다 조사하였고 번데기가 될 때까지 엽 면적 소비와 발육을 단계를 측정하였다.

바. 배추좀나방 바이러스의 증식량

누대 사육중인 배추좀나방 2~4령 유충을 대상으로 $10^4\sim 10^6$ OBs/ml 각각 접종하였다. 바이러스 접종은 아이스크림 컵에 10cc 사료를 부은 후 바이러스를 각 농도별로 10 μ l를 분주 후 사료표면의 수분이 마른 후 배추좀나방 유충을 접종하였다. 바이러스 증식량은 감염유충을 10마리를 수거하여 증류수 10ml를 가하여 분쇄 후 바이러스 분리법에 준하여 농도를 계산하였다.

3. 결과 및 고찰

정제된 과립병바이러스의 크기와 형태를 조사하기 위해서 투과전자현미경으로 각각 관찰한 결과, 바이러스입자의 형태는 일반적으로 장타원형으로서, 크기는 길이는 315.9 ± 22.7 , 폭은 $170.8\pm 13.4\text{nm}$ 이었다(Table 1). 배추흰나비(*Pieris rapae*) GV의 크기는 길이는 $396\pm 38\text{nm}$, 폭은 $238\pm 25\text{nm}$ 로 배추좀나방 과립병바이러스는 배추흰나비의 것보다 작고, 형태도 보다 긴타원형이다. 국내에서 수집된 담배거세미나방 핵다각체바이러스는 길이가 $1.3\sim 2.3\mu\text{m}$ 이고 여러개의 nucleocapsid를 가진 보통구형에 가깝다고 보고(임 1990)하였는데, 배추좀나방 과립병바이러스는 핵다각체바이러스에 비하여 원통형으로 1개의 뉴클레오캡시드가 포매된 전형적인 과립병바이러스 형태를 보였다.



Fig. 1. Symptom

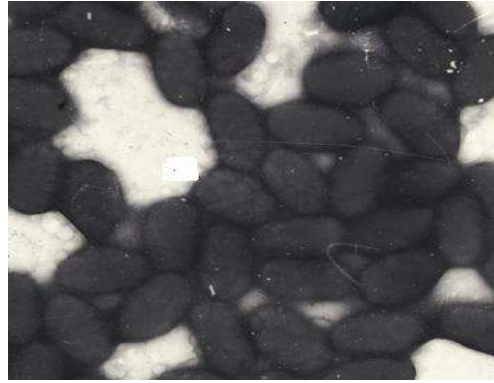


Fig. 2. Polyhedra outershape(SEM)

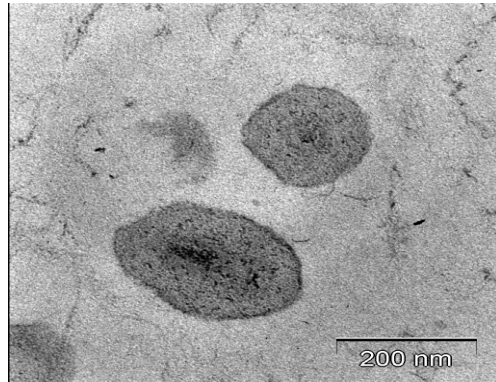


Fig. 3. polyhedra inner shape (TEM)



Fig. 4. PxGV shape

Table 1. Length and shape of ganulovirus of *Plutella xylostella*(PxGV)

Shape	Size(nm)	
	length	width
long oval	315.9±22.7	170.8±13.4

또한 Fig. 4처럼 정제된 바이러스 현탁액에서 가끔 기형봉입체가 관찰되었는데, 류 (1990)도 정상적인 배추흰나비 과립병바이러스 외에 이와 비슷한 바나나 형태를 가진 기형 형태를 관찰하였다고 보고하였다.

Table 2. Mortality of *Plutella xylostella* with different concentration of PxGV

Instar	Concentration (OBs/ml)	Mortality(%)					Total mortality (%)
		2DAT	3DAT	4DAT	5DAT	6DAT	
1st	1.0×10^5	0	4.4	10.7	14.3	3.4	32.8
	1.0×10^6	0	7.3	12.4	13.4	4.1	37.2
	1.0×10^7	0	8.9	24.2	22.4	9.4	64.9
	1.0×10^8	0	10.4	34.8	28.3	10.1	83.6
	1.0×10^9	0	10.8	41.4	31.8	8.6	92.6
2nd	1.0×10^5	0	5.1	12.4	14.8	4.2	36.5
	1.0×10^6	0	6.4	14.8	12.9	5.4	39.5
	1.0×10^7	0	7.8	28.4	24.2	10.1	70.5
	1.0×10^8	0	8.4	35.4	31.4	9.2	84.4
	1.0×10^9	0	8.8	38.4	36.5	9.4	93.1
3rd	1.0×10^5	0	3.2	12.4	15.4	4.5	35.5
	1.0×10^6	0	4.6	14.8	16.4	5.8	41.6
	1.0×10^7	0	5.1	23.2	28.9	10.6	67.8
	1.0×10^8	0	5.4	28.6	29.6	10.5	74.1
	1.0×10^9	0	5.5	28.4	34.9	12.4	81.2
4th	1.0×10^5	0	1.8	9.8	12.8	2.1	26.5
	1.0×10^6	0	2.1	10.2	16.7	3.8	32.8
	1.0×10^7	0	2.4	12.8	18.9	8.4	42.5
	1.0×10^8	0	2.2	14.9	24.9	9.2	51.2
	1.0×10^9	0	2.9	21.4	32.4	10.4	67.1

과립병바이러스를 령기별로 처리하여 일자별로 사충율을 조사한 결과 모두 유충이 처리 후 3일째부터 사충이 일어나기 시작하였으며 1.0×10^8 OBs/ml 농도 이상에서 1령과 2령에서는 80% 이상의 사충율이 일어났으나 3령 유충은 1.0×10^9 OBs/ml에서 나타났다. 4령에서는 농도가 낮은 처리에서는 대부분이 용화되었다. 과립병바이러스의 농도가 높고 유충 영기가 어릴수록 사망률이 증가되었다(Table 2).

Table 3. Developmental periods of *Plutella xylostella* larva treated by of PxGV

Treatment	periods (day)				Total
	1st	2nd	3rd	4th	
1st	2.45±1.21	2.34±0.42	—	—	—
2nd		1.20±0.48	3.86±1.25	—	—
3rd			2.14±0.46	4.54±1.42	9.86
4th				3.94±0.86	8.98
Control	2.42±0.75	1.67±0.50	2.05±0.65	2.22±0.75	8.36

유충 단계별로 바이러스 처리에서 1령 유충은 3령이 되기 전에 죽었고 생육기간은 처리 안 된 1, 2령의 유충보다 훨씬 길었다. 2령에 처리된 유충은 3령 발육기간이 연장되었고 4령이 되기 전에 죽었다. 3, 4령에 처리된 유충은 무처리보다 생육기간이 훨씬 더 길어졌다(Table 3).

Table 4. Amount of feeding consumption of *Plutella xylostella* larva treated by PxGV

Treat.	Consumption				Total (mm ² /유충)	consump. rate (%)
	1st	2nd	3rd	4th		
1st	0.020±0.01	0.092±0.04	—	—	0.112	93.2
2nd		0.038±0.02	0.354±0.15	—	0.392	76.8
3rd			0.121±0.04	0.448±0.43	0.757	53.2
4th				0.636±0.32	0.872	46.7
Control	0.021±0.01	0.060±0.02	0.174±0.10	1.339±0.73	1.636	—

배추좀나방 유충의 초기 먹이 소비의 큰 감소는 바이러스를 먹인 4령 유충에만 나타났다. 하지만 총 먹이소비는 바이러스를 섭식한 1, 2, 3, 4령 각각 93, 76, 53, 47%로 감소하였다(Table 4). 이것은 바이러스에 감염된 유충의 수명 감소를 의미한다. 3, 4령 유충에 대한 바이러스 접종에 의한 감수성은 없어서 먹이 소비가 1, 2령 유충보다는 높은 것이지만 무처리 유충보다는 적었다.

Table 5. Amount of consumption of artificial diet on *Plutella xylostella* larva after feeding of PxGV

Treatment	Amount of Feeding(mm ² /d)			
	1st	2nd	3rd	4th
1st	0.0087±0.001	0.0367±0.019	—	—
2nd		0.0313±0.011	0.0832±0.030	—
3rd			0.0568±0.022	0.1048±0.1041
4th				0.173±0.1008
Control	0.0398±0.179	0.0355±0.015	0.1283±0.086	0.4981±0.3096

바이러스 처리 후 모든 유충 단계에서 섭식율은 무처리에 비하여 크게 낮아졌는데 (Table 5), 이는 시간이 지남에 따라 각 유충 단계에서 전 감염이 일어남을 의미한다. 유충의 먹이 소비는 섭식율과 기간에 의해 결정된다. 2, 4령에서의 감염된 유충의 초기 생육은 대조구와 같은 비율로 보인다. 하지만 일 소비율은 감소하였다. 3령에서의 섭식 시간은 무처리에 비해 2.6일 많다. 3, 4령에 감염된 유충의 섭식 면적은 무처리보다 적어 일의 총소비량도 줄어들었다.

인공사료 표면에 PxGV를 10⁴~10⁶ OBS/ml으로 10µl 바른 후 2~4령 유충을 접종하여 사충된 충을 수거하여 생산량을 조사한 결과 증식량은 2령에 10⁴을 접종하였을 때 1.86 × 10⁹, 3령은 9.42 × 10⁸, 4령은 증식기간이 짧기 때문에 조금 낮은 농도인 9.42 × 10⁸ 이었다. 더 높은 농도인 10⁵~10⁶ 도 10⁴ 에서와 같은 경향이였다(Table 6).

Table 6. Virus multiplication of *Plutella xylostella* reared on artificial diet

Stage inoculated (instar)	Conc. (OBS/ml)	Amount of inoculated	Virus conc. multiplied (OBS/ml)
second			1.86 × 10 ⁹
Third	10 ⁴		9.42 × 10 ⁸
Fourth			9.42 × 10 ⁸
second			3.84 × 10 ⁹
Third	10 ⁵	10µl	1.06 × 10 ⁹
Fourth			2.41 × 10 ⁸
second			4.01 × 10 ⁹
Third	10 ⁶		1.24 × 10 ⁹
Fourth			4.26 × 10 ⁸

4. 결과요약

곤충바이러스를 생물적 방제 인자로 이용할 경우 유기합성 농약의 획일적인 대량사용으로 인한 문제의 심각성을 경감시키기 위하여 과립병바이러스의 병원에 따른 배추좀나방의 생육 및 바이러스 감염충의 생장을 보기 위하여 시험한 결과는 다음과 같다.

배추좀나방 과립병바이러스는 핵다각체바이러스에 비하여 원통형으로 1개의 뉴클레오캡시드가 포매된 전형적인 과립병바이러스 형태를 보였다. 과립병바이러스를 령기별로 처리한 결과 유충이 처리 후 3일째부터 사충이 일어나기 시작하였으며 1.0×10^8 OBs/ml 농도 이상에서 1령과 2령에서는 80% 이상의 사충율이 일어났으나 3령 유충은 1.0×10^9 OBs/ml에서 나타났다. 4령에서는 농도가 낮은 처리에서는 대부분이 용화되었다.

유충 단계별로 바이러스 처리에서 1령 유충은 3령이 되기 전에 죽었고 생육기간은 처리 안 된 1, 2령의 유충보다 훨씬 길었다. 2령에 처리된 유충은 3령 발육기간이 연장되었고 4령이 되기 전에 죽었다. 3, 4령에 처리된 유충은 무처리보다 생육기간이 훨씬 더 길어졌다.

배추좀나방 유충의 초기 먹이 소비의 큰 감소는 바이러스를 먹인 4령 유충에만 나타났다. 하지만 총 먹이소비는 바이러스를 섭식한 1, 2, 3, 4령 각각 93, 76, 53, 47%로 감소하였다.

인공사료 표면에 PxGV를 $10^4 \sim 10^6$ OBs/ml 으로 10 μ l 바른 후 2~4령 유충을 접종하여 사충된 충을 수거하여 생산량을 조사한 결과 증식량은 2령에 10^4 을 접종하였을 때 1.86×10^9 , 3령은 9.42×10^8 , 4령은 증식기간이 짧기 때문에 조금 낮은 농도인 9.42×10^8 이었다. 더 높은 농도인 $10^5 \sim 10^6$ 도 10^4 에서와 같은 경향이였다.

제3절 PxGV 감염된 배추좀나방으로부터 면역유전자 탐색에 관한 연구

1. 서언

곤충은 미생물의 침입이 일어날 경우 대하여 체액성 및 세포성 방어기작을 갖고 있다. 현재 까지 항미생물 면역반응(antibacterial innate immunity)에 대한 연구가 주로 이루어져 왔으나, 상대적으로 곤충의 면역기능중 항바이러스성 면역기작(antiviral insect immunity)에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 최근 10여년동안에 걸쳐 국내외적으로 곤충병원성 바이러스(NPV or GV)를 이용하여, 농해충을 방제하고자 한다. 이러한 관점에서 배추좀나방 과립 병바이러스인 PxGV를 이용하여 바이러스유래 biopesticide를 개발하고자 한다. PxGV-Px의 상호작용구명에 관심을 갖고, PxGV와 숙주인 배추좀나방의 중장과 기타 조직(지방체, 난소, 정소, 기문 등)과의 molecular pathogenesis에 관한 연구는 매우 미흡한 상태이다. 이를 위하여 배추좀나방으로부터 GeneFishing방법을 이용하여 GV-related immune gene을 탐색하고자 하였다. 본 연구의 최종적인 목표는 PxGV와 Px 단백질과의 상호작용을 구명하는데 있으며, 단기목표는 GV에 감염된 배추좀나방에서 항바이러스성 유전자를 탐색하는데 있다.

2. 재료 및 방법

가. 과립병바이러스(GV)에 감염된 배추좀나방으로부터 GV-dependent 유전자의 탐색 방법 및 PCR-based gene discovery(SeeGene) 방법을 이용하여 추진하였다. GV에 감염된 배추좀나방과 감염되지 않은 배추좀나방으로부터 RNA 정제 후 GV-dependent 유전자를 탐색하였다.

나. Fig. 1의 결과가 보여 주는 바와 같이 배추좀나방에서 정제한 mRNA양은 GV-uninfected control과 GV-infected sample모두에서 매우 유사한 결과를 확보하였다. 1 ul에 대략 0.7 ug의 mRNA를 얻어 이를 이용하여 GV-감염과 GV-비감염 cDNA를 합성한 후 각각 PCR template로 사용하여 다음과 같은 결과를 얻었다 (Fig. 2 참조)

Optimization of the mRNA for RT-PCR

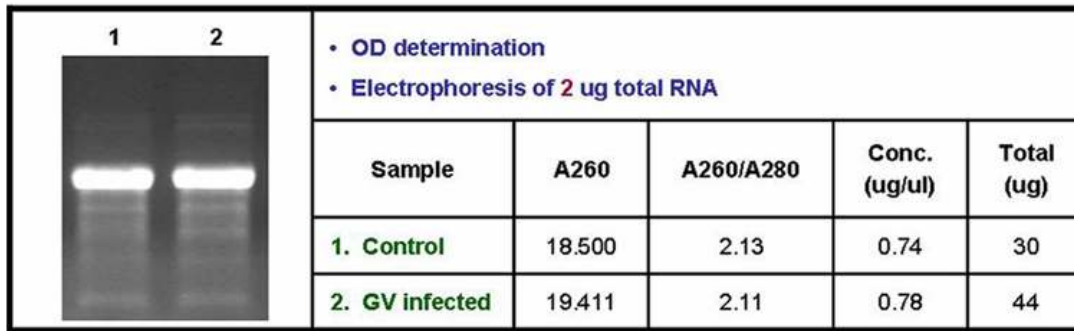
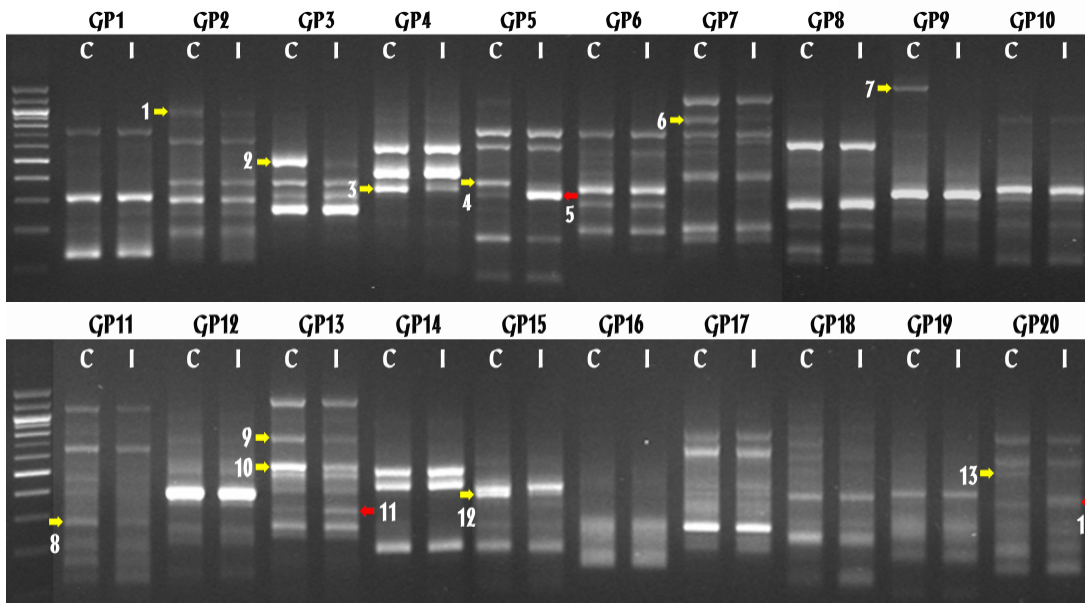
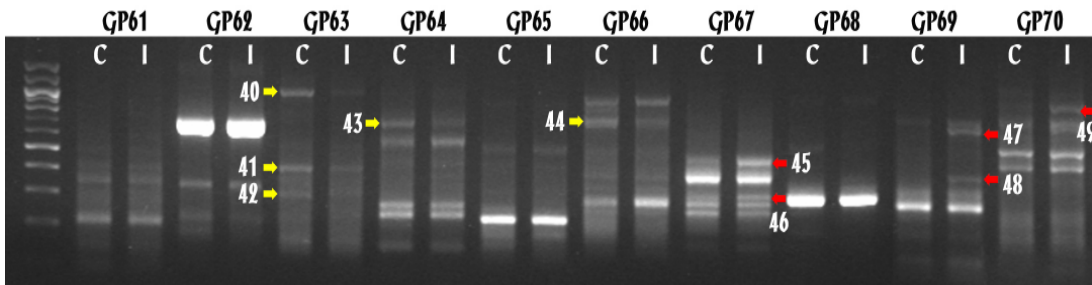
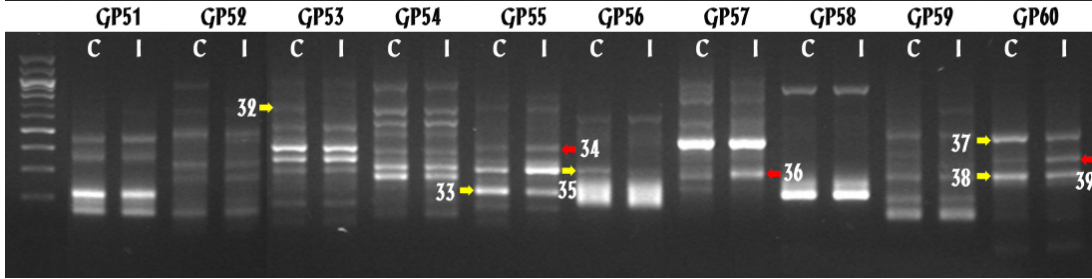
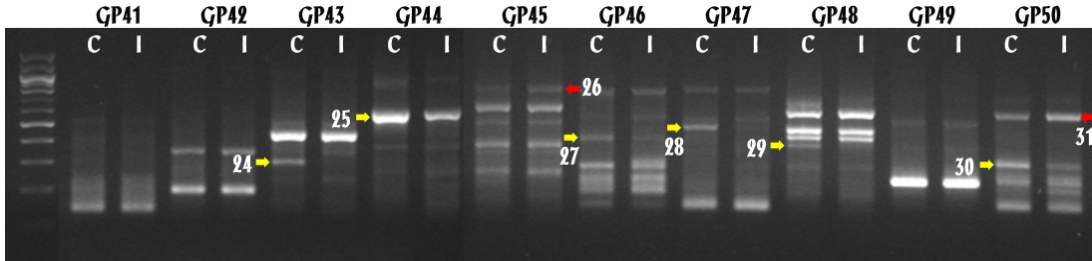
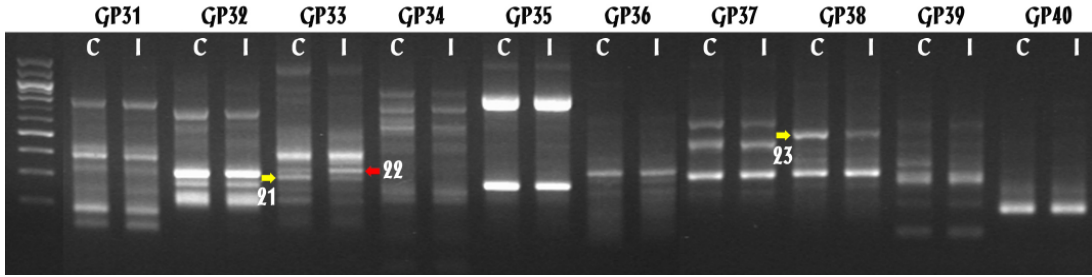
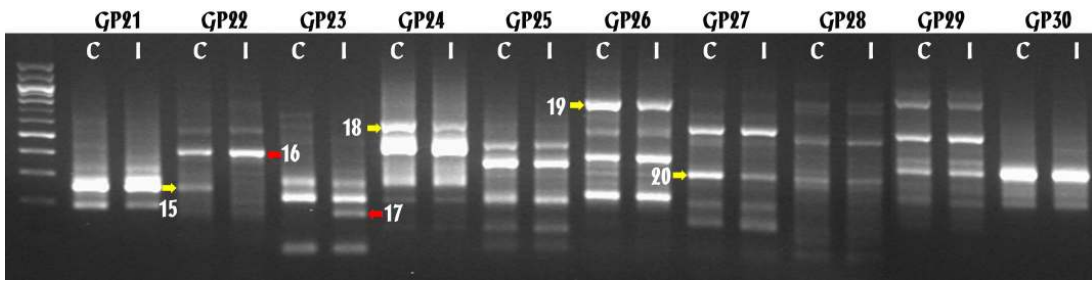


Fig. 1. Estimation of mRNA from both GV-uninfected *P. xylostella* and GV-infected *P. xylostella*

3. 결과 및 고찰

동일량의 mRNA를 이용하여 만든 cDNA를 template로 이용하여 120개의 Primer set (GP1-GP120)으로 얻은 PCR product를 DNA gel에서 분석한 결과.





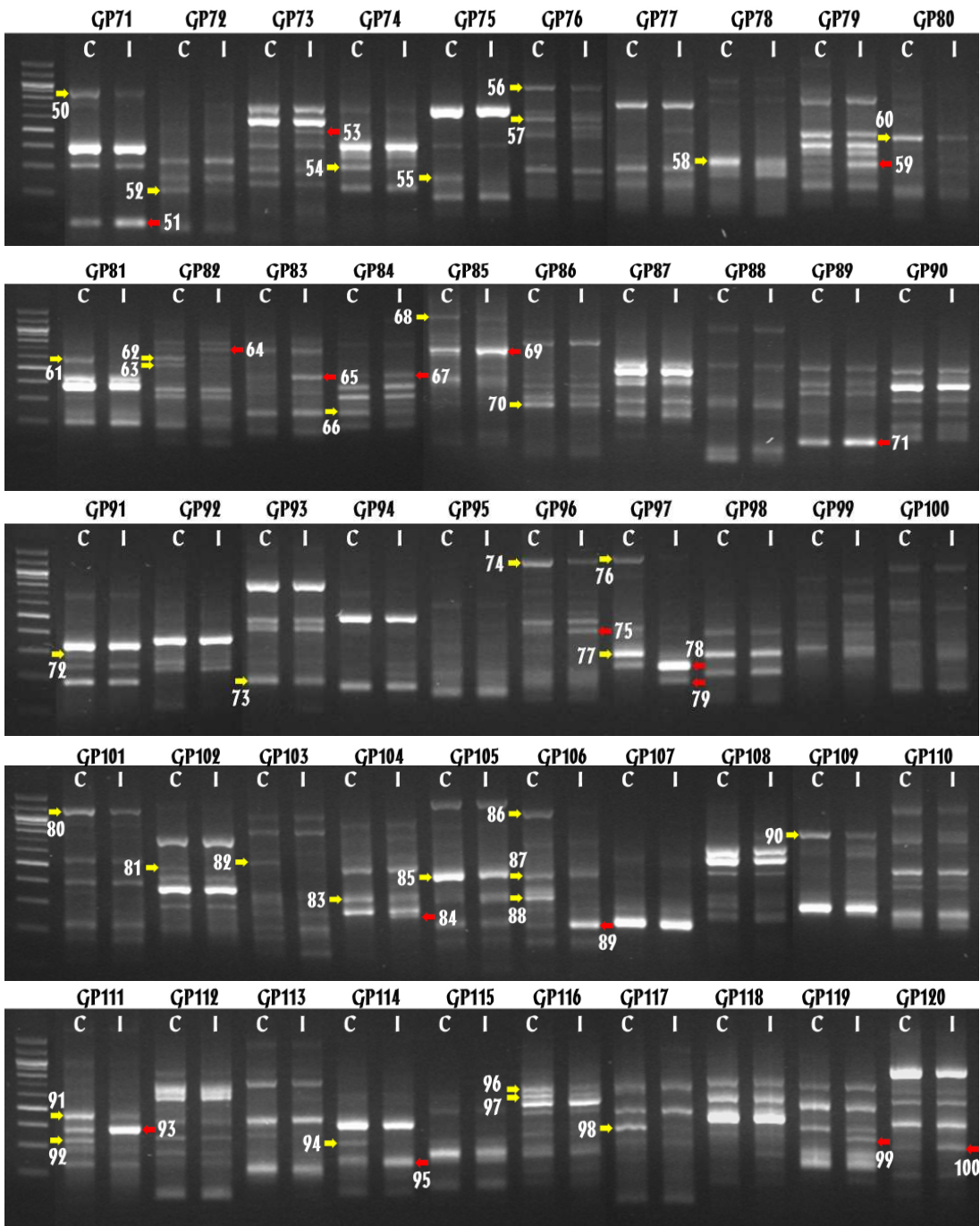


Fig. 2. Analysis of PCR products using GeneFishing primer sets (GP1–GP120). Arrows indicates the potentially up/down–regulated candiate genes which might be involved in virus–host interactions. C, control; I, infected.

Table 1. List of the potentially up/down-regulated candidate genes based on the results shown in Fig. 2.

표 1	Gene #	Up	Down	Length	Primer Set No.	Gene #	Up	Down	Length	Primer Set No.
DEG 분석 요약	1		○	1,000 bp	GP2	51	○		100 bp	GP71
	2		○	500 bp	GP3	52		○	200 bp	GP72
	3		○	350 bp	GP4	53	○		500 bp	GP73
	4		○	400 bp	GP5	54		○	300 bp	GP74
	5	○		300 bp	GP5	55		○	250 bp	GP75
	6		○	900 bp	GP7	56		○	950 bp	GP76
	7		○	1,250 bp	GP9	57		○	550 bp	GP76
	8		○	300 bp	GP11	58		○	320 bp	GP78
	9		○	750 bp	GP13	59	○		300 bp	GP79
	10		○	520 bp	GP13	60		○	450 bp	GP80
	11	○		330 bp	GP13	61		○	580 bp	GP81
	12		○	400 bp	GP15	62		○	600 bp	GP82
	13		○	500 bp	GP20	63		○	520 bp	GP82
	14	○		380 bp	GP20	64	○		700 bp	GP82
	15		○	250 bp	GP22	65	○		420 bp	GP83
	16	○		400 bp	GP22	66		○	240 bp	GP84
	17	○		180 bp	GP23	67	○		450 bp	GP84
	18		○	550 bp	GP24	68		○	1,150 bp	GP85
	19		○	750 bp	GP26	69	○		650 bp	GP85
	20		○	300 bp	GP27	70		○	280 bp	GP86
	21		○	280 bp	GP33	71	○		100 bp	GP89
	22	○		300 bp	GP33	72		○	280 bp	GP91
	23		○	500 bp	GP38	73		○	200 bp	GP93
	24		○	300 bp	GP43	74		○	1,100 bp	GP96
	25		○	550 bp	GP44	75	○		400 bp	GP96
	26	○		850 bp	GP45	76		○	1,150 bp	GP97
	27		○	420 bp	GP46	77		○	300 bp	GP97
	28		○	500 bp	GP47	78	○		250 bp	GP97
	29		○	400 bp	GP48	79	○		200 bp	GP97
	30		○	300 bp	GP50	80		○	1,100 bp	GP101
	31	○		550 bp	GP50	81		○	480 bp	GP102
	32		○	700 bp	GP53	82		○	500 bp	GP103
	33		○	230 bp	GP55	83		○	300 bp	GP104
	34	○		400 bp	GP55	84	○		250 bp	GP104
	35		○	300 bp	GP56	85		○	420 bp	GP105
	36	○		300 bp	GP57	86		○	1,050 bp	GP106
	37		○	450 bp	GP60	87		○	420 bp	GP106
	38		○	280 bp	GP60	88		○	300 bp	GP106
	39	○		350 bp	GP60	89	○		200 bp	GP106
	40		○	1,000 bp	GP63	90		○	700 bp	GP109
	41		○	400 bp	GP63	91		○	450 bp	GP111
	42		○	300 bp	GP63	92		○	330 bp	GP111
	43		○	650 bp	GP64	93	○		380 bp	GP111
	44		○	700 bp	GP66	94		○	300 bp	GP114
	45	○		400 bp	GP67	95	○		230 bp	GP114
	46	○		300 bp	GP67	96		○	650 bp	GP116
	47	○		600 bp	GP69	97		○	600 bp	GP116
	48	○		350 bp	GP69	98		○	400 bp	GP117
	49	○		800 bp	GP70	99	○		330 bp	GP119
	50		○	850 bp	GP71	100	○		300 bp	GP120

위에 제시된(Fig. 2) DNA gel 결과는 GV-dependent up/down regulated gene을 탐색하기 위하여 120개의 Random primer set (SeeGene회사제품)을 이용하여 얻은 PCR product를 DNA gel에 분석한 결과이다. 사용한 PCR 조건은 다음과 같다(94°C 5min, 50°C 3min, 72°C 1min, 94°C 40sec, 65°C 40sec, 72°C 40sec, goto 4 40cycle, 72°C 5min).

Fig. 2에서 보는 바와 같이, 총 100개의 PCR product가 감소하거나 혹은 증가함을 확인하였다. 그 결과를 Table1에 도표로 제시하였다. 아래 Table1에 변화된 유전자로 확인된 총 100개의 유전자중 33개의 유전자가 과립병바이러스의 감염으로 인하여 증가하는 잠재적 후보 유전자(up-regulated gene candidate)로 추정된다. 반면 67개의 PCR product가 감소하는 잠재적 후보 유전자(down-regulated gene candidate)로 확인되었다 (Table 1 참조).

Table 2. Sequencing and BLAST analysis of part of the candiated genes derived from GeneFishing method.

Genebank Database	% Identity	Up/Down of gene	Length (bp)	Accession No.
<i>Plutella xylostella</i> mRNA for receptor for activated protein kinase C homolog, complete cds	100%	Down	511bp	AB189027
<i>Toxoptera citricida</i> probable transport protein Sec61 alpha subunit mRNA, complete CDS	95%	Down	357bp	AY737549
<i>Bombyx mori</i> mRNA for Promoting Protein, complete cds	49%	Down	386bp	AB030701
<i>Aedes aegypti</i> ASAP translational inhibitor mRNA	56%	Down	939bp	AY431275
<i>Apis mellifera</i> similar to Ribonuclease UK114	56%	Down	426bp	XM_623713
<i>Manduca sexta</i> arylphorin beta subunit mRNA	50%	Down	587bp	MOTARYBB
<i>Helicoverpa zea</i> HzC20 chymotrypsinogen mRNA, complete cds	65%	Up	260bp	AF233732
<i>Bombyx mori</i> ribosomal protein L14 (RpL14) mRNA, complete cds	96%	Down	292bp	AY769284
<i>Culex pipiens</i> pallens deltamethrin resistance-associated NYD-GBE mRNA, complete CDs	70%	Down	1021bp	DQ102393
<i>Gallus gallus</i> similar to KIAA1161 protein	46%	Down	851bp	XM_424975
<i>Culex pipiens</i> pallens deltamethrin resistance-associated NYD-GBE mRNA, complete cds	70%	Down	588bp	DQ102393
<i>Drosophila melanogaster</i> voltage dependent anion-selective channel mRNA, complete cds	63%	Down	885bp	DMU70314
<i>Bombyx mori</i> ADP/ATP translocase (ANT) mRNA, complete cds	60%	Down	392bp	AY227000

본 결과는 Table 1에서 분석결과를 통하여 얻어진 100개의 유전자를 현재 TA vector에 cloning하여 유전자분석을 수행 중에 있다. 그 중 현재 일부 얻어진 결과를 간단히 요약한 것이다. 46~100%에 달하는 비교적 높은 유사성을 갖고 있다. 유전자의 크기는 260 bp의 작은 유전자에서 1021bp size의 다양한 유전자를 확인하였다. 향후 계획은 본 연구를 통하여 얻은 대부분 유전자가 partial fragment이어서 배추좀나방 cDNA library를 screening하거나 혹은 5'-RACE/3'-RACE방법을 통하여 full length cDNA를 확보할 예정이다.

4. 결과요약

배추좀나방(DBM)은 중요한 농해충이다. 또한 DBM은 전통적으로 사용되고 있는 살충제에 대한 내성을 갖고 있다. 이러한 이유로 본 연구팀은 배추좀나방 병원성 과립병 바이러스(PxGV)를 이용한 대체 방제법을 연구하고자 하였다. 그러나 PxGV와 중장세포와의 상호작용기작에 관한 연구는 매우 미흡한 실정이다. 이러한 배경하에서 본 연구팀은 GV와 관련된 유전자를 탐색하고자 GeneFishing 방법을 사용하였다. 이들 유전자들이 배추좀나방의 항바이러스 면역기능 대한 정확한 기능 구명을 위한 연구가 필요하다.

제4절 배추좀나방의 caspase 유전자 클로닝 및 발현양상에 관한 연구

1. 서언

곤충바이러스가 숙주 세포에 침입하면 숙주 세포가 세포사멸(apoptosis)을 하는 것으로 알려져 있다. 이러한 세포사멸과정에서 중요한 기능을 갖고 있는 Caspase를 클로닝하고 기능 구명을 위한 연구가 활발하게 진행되어왔다. Caspase가 apoptosis와 관련이 있다는 증거가, 1993년 예쁜꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*)에서 처음 밝혀졌다. 그 후 세포사멸과 관련된 기작이 초파리와 포유동물에서도 밝혀졌다. Caspase의 activation은 caspase에게 sequence specific proteolytic activity를 가지게 해서 세포의 DNA 복제 및 유전자 발현과 관련된 단백질 및 핵의 구조유지, 세포의 항상성유지 등과 관련된 단백질들을 파괴시키거나, 관련된 단백질을 활성화시켜 apoptosis를 유도하게 된다. 이렇게 caspase를 활성화시키는 신호는 크게 막단백질을 통한 신호, mitochondria를 통한 신호, endoplasmic reticulum을 통한 신호로 크게 세 가지로 나뉘질 수 있다. 면역세포의 granule속의 효소 및 단백질에 의한 caspase의 activation기작도 존재한다. 세포사멸과 관련된 caspase는 initiator caspase와 effector caspase 두 가지 그룹이 있다. 세포사멸을 일으키는 자극이 오면 initiator caspases가 활성화되고 이로 인해 effector caspase가 활성화 되면서 세포사멸이 일어나게 된다. 이와 같이 활성화된 caspase는 inhibitor of apoptosis (IAP) family인 단백질에 의해서 억제된다. 위와 같은 배경을 갖고, 본 연구는 배추좀나방 (*Plutella xylostella*)의 caspase를 클로닝 하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. PCR 방법론을 이용한 caspase 유전자 클로닝 전략

배추좀나방의 caspase 유전자를 cloning하기 위하여, Lepidoptera에서 알려진 caspase를 alignment한 후 highly conserved region을 택하여 degenerate primer를 다음과 같이 설계하였다. Degenrate caspase primer의 sequenc는 다음과 같다 (Fw 1-D: TGR MGA YGA AGG CGA CGC; Rev2 : TG GCA AGC YTG AAT AAA). 다음과 같은

PCR reaction (MJ PCR) 조건하여 DNA 증폭을 수행하였다. 이때 사용한 template는 배추좀나방에서 total RNA를 분리하고, cDNA를 합성하여 사용하였다. PCR 조건은 다음과 같다 (1 Step, 94°C, 3 min) (2 Step, 94°C, 40 sec; 51°C, 40 sec; 72°C, 40 sec, 36 cycle), (3 Step, 72°C, 10 min), (4 Step, 10°C, 10 min), 그리고 (5 Step, 4°C). 기타 분자생물학과 관련된 방법은 standard method를 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 배추좀나방에서 세포사멸에 중요한 Caspase유전자의 클로닝 및 비교 연구

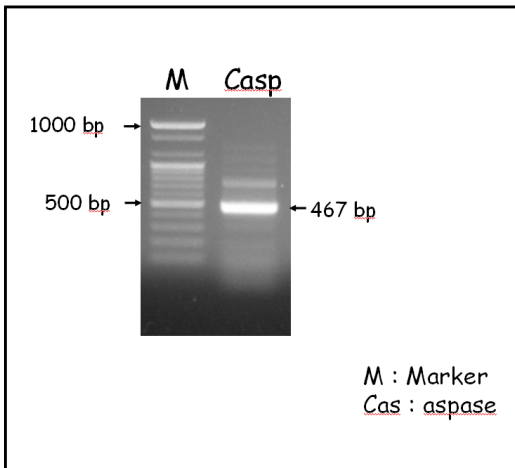


Fig. 1. PCR amplification of putative Px-Caspase gene. M, standard marker for estimating the molecular weight (M) of PCR product. The arrows in lane M indicate 500 bp and 1000bp standard, respectively. Casp shows PCR product of Px-Casp.



Fig. 2. Images of blue and white colonies after PCR cloning. The white colonies indicate the potential positive colonies containing putative Px-caspase gene.

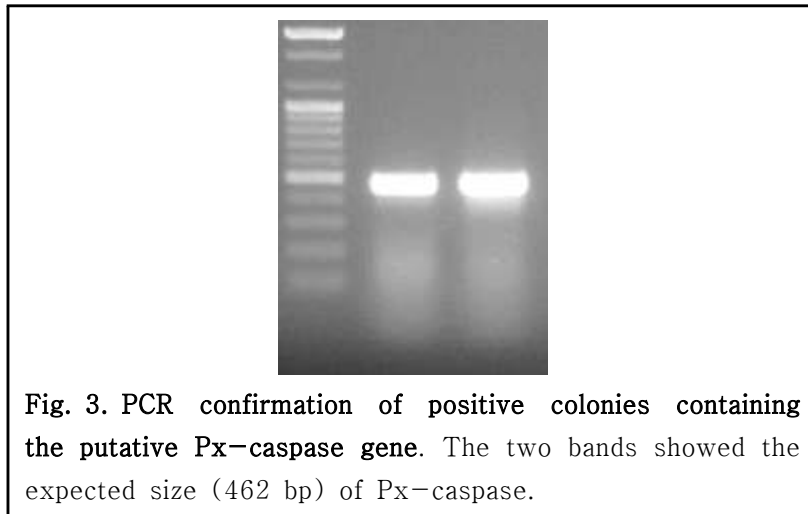


Fig. 1.에서 보는 바와 같이 PCR 결과가 나왔다. PCR 결과 예상 분자량을 갖고 있는 467 bp의 PCR product를 1% DNA gel에 Standard molecular weight marker와 함께 전기영동함으로써 분석한 결과 다양한 PCR band가 나왔으나, 화살표가 가리키는 Major PCR band가 확인됐다. Fig. 1에 보여준 467 bp PCR product를 정제하기 위하여, 467 bp가 있는 지역을 UV상에서 gel slice하여 gel extraction kit (General Biology)에 제시하는 protocol을 이용하여 정제하였다. 정제된 467 bp band를 다시 1% gel에 전기영동하여 purity를 확인한 후 gene cloning을 수행하였다.

정제된 Putative Px-caspase가 들어있는 PCR band를 TA cloning vector에 ligation한 후 transformation하여 plating한 후 37 °C incubator에 18시간 배양 한 후 결과이다. 보는 바와 같이 white colony와 blue colony가 잘 나타났고, 이중 putative Px-caspase가 포함된 white colony를 16시간 배양하였다(Fig. 2).

Putative Px-caspase가 들어있는 White colony 2개를 선택하여 하여 LB media에 overnight culture한 후 1ul의 cell을 template로 사용하고 Caspase를 cloning하기 위하여 설계된 primer를 이용하여 PCR로 재확인 한 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 동일 size의 PCR band가 확인 되었다. 이를 기초하여 남아 있는 3ml의 cell에서 plasmid isolation kit (General biology)을 이용하여 plasmid를 정제하였다. 그 후 plasmid를 spectrophotometer를 이용하여 정량한 후, 2ug의 plasmid를 sequencing service 회사에 보내어 sequencing을 하였다.

나. Identification and confirmation of *Plutella xylostella* Caspase

1	GGA GAT GAA GGC GNN GCT NGG GGC AGC GAC GAG GCC TCC GCG CCG CGG CCC TCT GCC AAG	60
1	G D E G X A X G S H E A S A P R P S A K	20
61	ATG CCT GTC GAC AGG AAC GCT CCT TAC TAC AAC ATG AAC CAC AAG AAG CGC GGA ATG GCG	120
21	M P V D R N A P Y Y N M N H K K R G M A	40
121	ATA ATT TTC AAC CAC GAA CAC TTT GAT ATT CAC AGC CTG AAG TCG CAC AGT GGT ACT AAT	180
41	I I F N H E H F D I H S L K S R S G T N	60
181	GTT GAT AGT GAC AAC TTG TCA AGA GTG TTA AAG GGA CTG GGC TTC CAA GTC TCT GTG ATG	240
61	V D S D N L S R V L K G L G F Q V S V M	80
241	AAC AAC TTG AAA TCT GCA GAT GTC AAC AGA TAC ATT CAA CAA ACT GCT GAA ATG GAC CAC	300
81	N N L K S A D V N R Y I Q Q T A E M D H	100
301	TCT GAC TTC GAC TGC TTG TTG ATT GCA GTG CTG ACC CAC GGG GAA ATG GGC CTG CTG TAT	360
101	S D F D C L L I A V L T H G E M G L L Y	120
361	GCC AAG GAC ACC CAC TAC AAG CCT GAC AAC CTC TGG TAT TAC TTC ACA GCT GAT AAA TGC	420
121	A K D T H Y K P D N L W Y Y F T A D K C	140
421	CCC ACA TTG GCA GGT AAA CCT AAA CTG TTC TTT ATT CAA GCT TGC CA	480
141	P T L A G K P K L F F I Q A C	160

Fig. 4. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the partial caspase gene fragment from *P. xylostella*.

Fig. 4에 보는 바와 같이, Sequencing 이후 확보된 462 bp DNA sequence를 putative amino acid 서열로 전환하였다. 보는 바와 같이 Px-caspase gene size가 partial fragment이어서 현재 5'-RACE(Rapid Amplification cDNA end)와 3'-RACE 방법을 이용하여 full length를 확보하기 위하여 실험 중에 있다. 현재 까지 Pubmed상에서 조사하여본 결과 배추좀나방에서 caspase gene에 대한 보고가 없어서 후속연구가 진행 중이다. 이후 확보된 sequence가 caspase gene인지 확인하기 위하여 BLAST search 등을 통하여 이미 알려진 다양한 caspase의 단백질 서열과 유사성 분석을 수행하였고 그 결과는 다음과 같다 (Fig. 5 참고).

다. Comparative analysis of Px-caspase with several known caspases

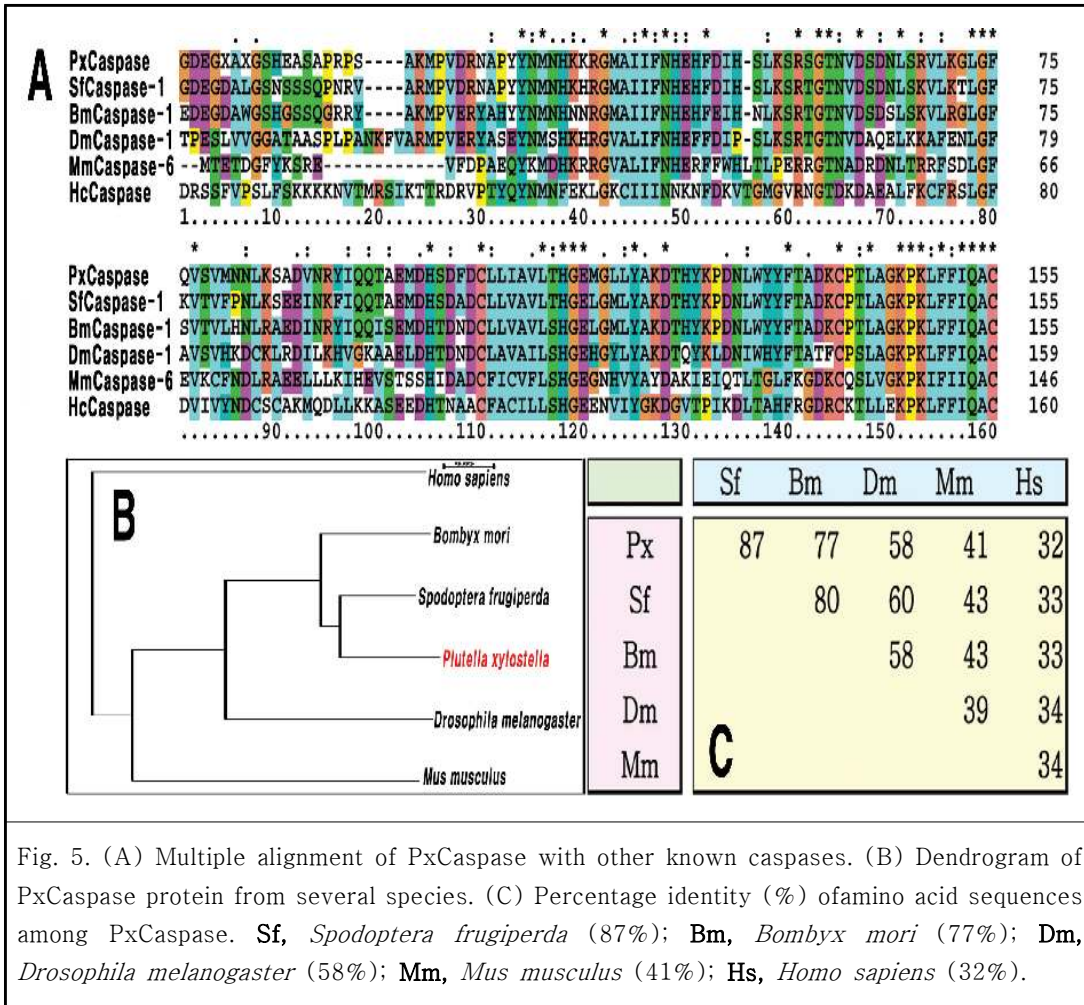


Fig. 5. (A) Multiple alignment of PxCaspase with other known caspases. (B) Dendrogram of PxCaspase protein from several species. (C) Percentage identity (%) of amino acid sequences among PxCaspase. **Sf**, *Spodoptera frugiperda* (87%); **Bm**, *Bombyx mori* (77%); **Dm**, *Drosophila melanogaster* (58%); **Mm**, *Mus musculus* (41%); **Hs**, *Homo sapiens* (32%).

Fig. 5에서 보는 바와 같이, Px-Caspase는 다양한 곤충(밤나방, 누에, 초파리, 쥐, 및 사람)과 32~87%에 해당하는 높은 유사성이 있음을 확인하였다. Fig. 5A 및 B의 결과는 PxCaspase는 *Spodoptera frugiperda*, *Bombyx mori*와 *Drosophila melanogaster*의 caspase 1과 각각 87%, 77%, 그리고 58%의 높은 유사성을 갖고 있다. 이를 기초로 볼때, 본 연구를 통하여 확보한 PxCaspase는 type 1인 것으로 생각된다. 이러한 PxCaspase mRNA가 다양한 immune elicitors에 의하여 transcriptional level에서 induction이 되는지 다음과 같이 조사하였다. 사용되어진 immune elicitors는 Px granulovirus, laminarin, lipopolysaccharide (LPS), 그리고 lipoteichoic acid(LTA)이며 그 결과는 다음과 같다.

라. 다양한 Immune elicitor에 의한 배추좀나방 Px-Caspase의 발현 양상

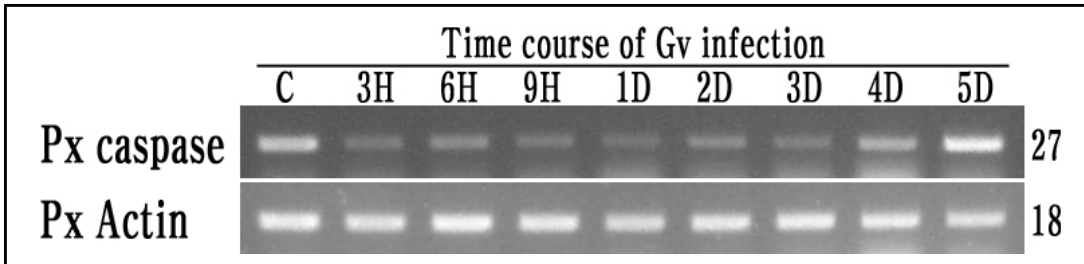


Fig. 6. (A) Induction pattern of PxCaspase after GV infection. C, Uninfected control; H, hour; D, day. It indicates that PxCaspase was induced at 5 D post-infection.

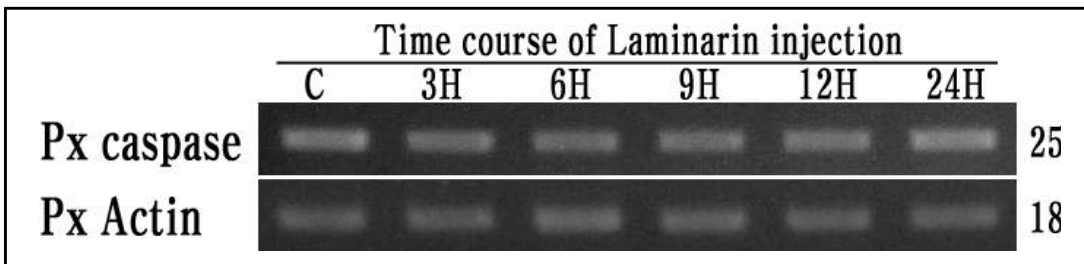


Fig. 7. (A) Induction pattern of PxCaspase after laminarin injection. C, Uninfected control; H, hour; D, day after GV infection. PxCaspase was not induced by laminarin.

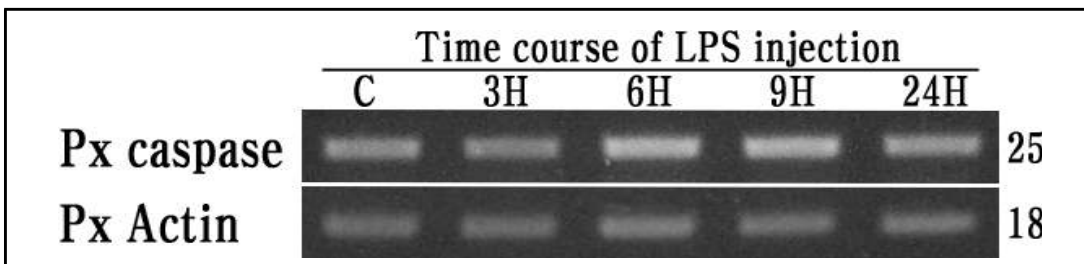
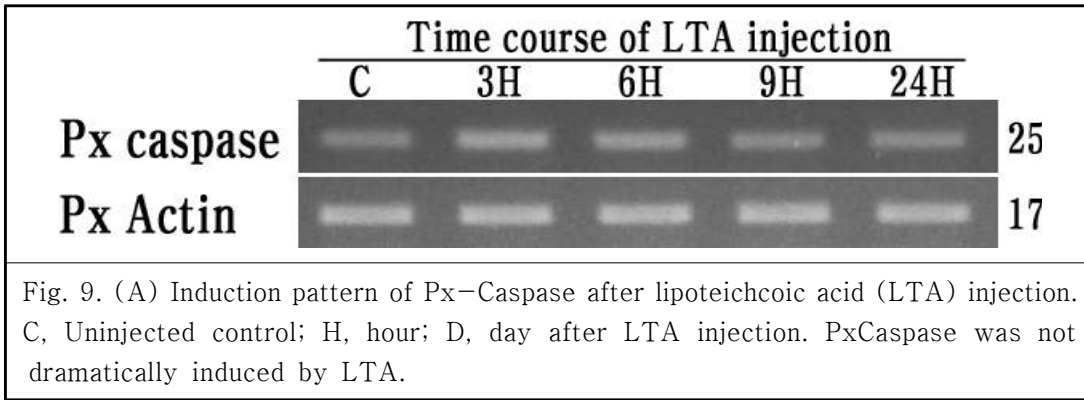


Fig. 8. (A) Induction pattern of PxCaspase after GV infection. C, Uninfected control; H, hour; D, day after GV infection. PxCaspase was slightly induced at 6 h post-injection.

보는 바와 같이 그람 음성균의 세포벽 구성성분인 lipopolysaccharide인 LPS에 의하여 세포사멸이 유도되어 Px-Caspase가 injection후 6~9시간이 경과한 후 증가하는 양상을 보여 주었다.



그람 양성균의 세포벽 구성성분중 하나인 LTA에 의해서는 커다란 변화가 없다. 향후 Full length cDNA 확보, 재조합 PxCapase 단백질합성, His-affinity 방법을 이용한 정제, 항체생산 등의 추가적 연구와 면역학적 방법을 통한 연구를 통하여 완료하고자 한다.

4. 결과요약

Caspase는 세포사멸에 중요한 역할을 한다. 본 연구를 통하여 배추좀나방의 caspase fragment를 PCR방법을 이용하여 클로닝하였다. 시퀀싱과 BLAST분석결과에 따르면 PxCaspase는 다음과 같은 유사성을 갖고 있다[*Spodoptera frugiperda* (87%), *Bombyx mori* (81%), *Drosophila melanogaster* (58%), *Mus musculus* (41%) and *Homo sapiens* (32%)]. 현재 RACE 방법을 통하여 PxCaspase의 full length cDNA를 확보하고 있으며 추가적인 연구를 수행하고 있다.

제5절 배추좀나방의 calreticulin 유전자 클로닝 및 발현패턴에 관한 연구

1. 서언

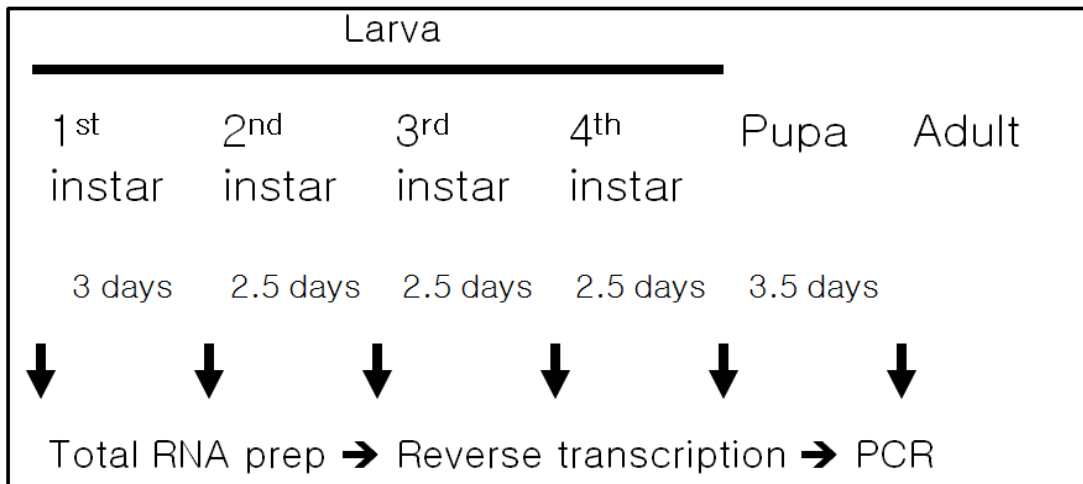
CRT는 endoplasmic reticulum (ER)에 존재하는 매우 중요한 단백질이다. CRT는 chaperon으로 작용하며, Ca^{2+} level을 조절하는 기능을 갖고 있다. 현재까지 포유류, 곤충, 선충, 그리고 식물 등 다양한 생물에서 CRT cDNA가 보고되었다. CRT는 거의 모든 진핵 생물에서 구조적 및 기능적으로 잘 보존되어 있는 단백질이다. 예를 들면, CRT는 3개의 domain (N-domain, P-domain and C-domain)을 갖고 있다. P-and C-domain은 Ca^{2+} 에 대해 높은 친화력과 결합할 수 있다. C-domain은 Ca^{2+} 저장능력을 결정하는 것으로 알려졌다. CRT는 ER과 세포표면에도 존재한다. CRT를 과발현하면, Ca^{2+} 저장능력증가, 세포의 부착능력조절, 세포사멸증가, CRT의 세포표면으로 이동을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 반면 CRT의 세포내 발현을 억제하면 배발생 과정 중 치사율증가, 심장발육이상, 세포 부착력에 변화, 세포사멸 저항성증가, misfolded protein양의 증가하는 등 다양한 변화를 준다.

무엇보다 CRT는 척추동물의 inflammation과 병원체의 감염에 관여하는 것으로 보고되었다. 최근 곤충에서 CRT와 곤충면역과의 관계를 언급한 논문에 의하면, 곤충에서 CRT는 세포성면역 반응과정에서 곤충병원성균과 같은 non-self recognition 과정에서 non-self를 encapsulation하는 과정에 중요한 기능을 하는 것으로 보고되어 있다. 또한 초파리 CRT는 apoptotic cell의 phagocytosis marker로 보고되었다. 한편 중국새우 (*Fenneropenaeus chinensis*)에서 white spot syndrome virus (WSSV)의 감염이후 6 h 경과 후 증가하는 것으로 보아 새우의 CRT가 anti-virus immune system에서 중요한 역할을 하는 것으로 추정되고 있다. 현재 까지 곤충모델에서 곤충 CRT와 곤충면역관점에서 많은 연구가 수행되지 않았다. 이러한 관점에서, 본 연구과정에서 배추좀나방의 EST 과정을 통하여 확보된 배추좀나방 Calreticulin 유전자(PxCalreticulin)를 확보하였고, 이를 기초로 배추좀나방의 CRT를 곤충면역관점에서 연구하고자 기초적인 연구조사를 하였다.

2. 재료 및 방법

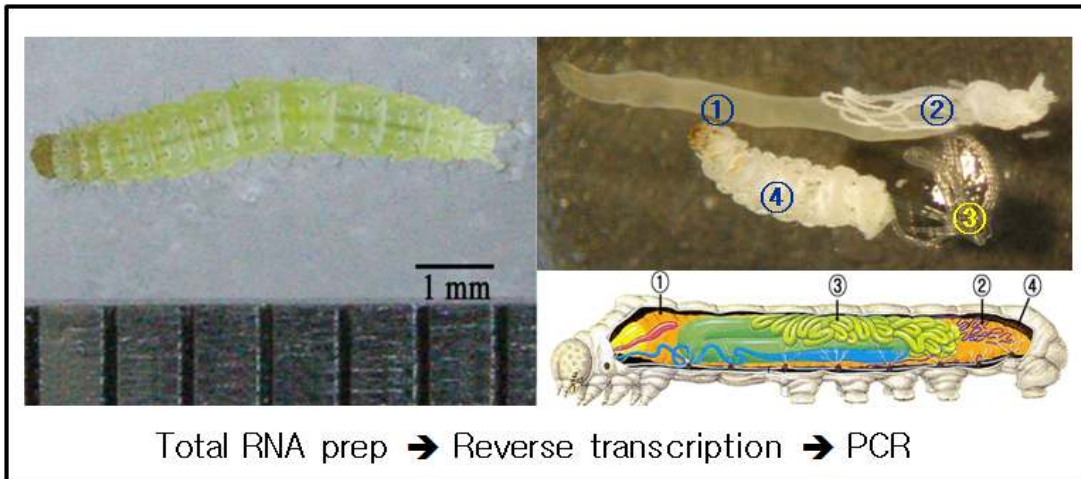
가. 곤충사육 및 조직 시료준비

배추좀나방의 사육은 습도 60%, 온도 25~26℃의 곤충사육실에서 이루어졌으며 배추 잎을 먹이로 하였다. 발달과정 중 PxCRT mRNA의 발현양상을 알아보기 위해서 1령 유충, 2령 유충, 3령 유충, 4령 유충, 번데기, 성충까지의 RNA 샘플을 모았다. 조직 특이성 연구를 위하여, fat body, gut, Malpighian tubule, silk gland를 phosphate buffered saline (PBS)안에서 해부를 하여 조직을 모았다. 면역 반응을 보기 위해서 buffer, lipopolysaccharide (LPS), laminarin을 10ug/ml 농도하에서 1ul씩 4령 유충에 주사 하여 시간별 개체의 샘플을 모았다. Granulovirus에 감염된 샘플을 모으기 위해 바이러스가 처리된 배추 잎을 섭식시킨 후, 시간별 개체를 모았다.



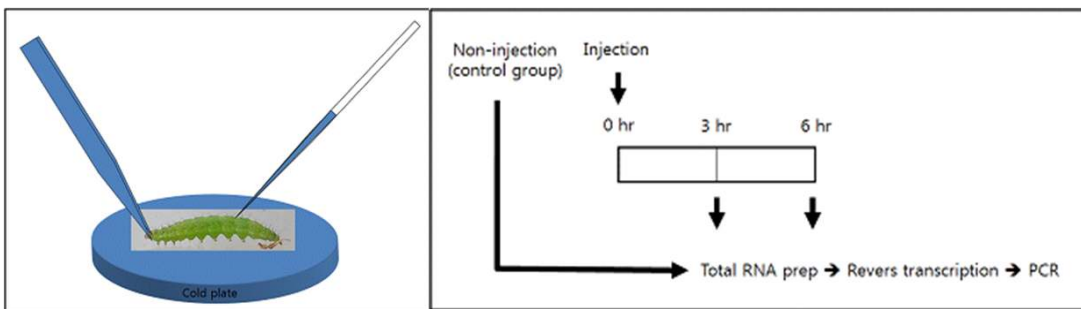
모식도 1. 배추좀나방의 발달과정 중 calreticulin의 발현을 보기 위한 샘플 수집.

배추좀나방의 발달 과정 중 calreticulin의 발현 양상을 관찰하기 위해 1령 유충, 2령 유충, 3령 유충, 4령 유충, 번데기, 성충의 샘플을 수집하였다. Total RNA를 뽑은 다음, PCR을 수행하여 발현 패턴을 조사하였다.



모식도 2. 배추좀나방의 조직 내의 calreticulin의 발현 양상을 보기 위한 샘플 수집.

배추좀나방의 4령 유충을 phosphate buffered saline (PBS) 용액에서 포셉을 이용하여 fat body, gut, Malpighian tubule, silk gland 조직들을 모았다. 그리고 RNA를 분리한 calreticulin specific primer를 이용하여 PCR을 수행하였다.



모식도 3. 배추좀나방의 calreticulin의 면역반응에 대한 발현을 보기 위한 샘플 수집.

배추좀나방의 종령 유충을 이용하여, Buffer, Lipopolysaccharide (LPS), laminarin을 10ug/ml을 1 ul씩 주사하였다. 그리고 3 h, 6 h, 9 h, 12 h 각각의 시간별로 살아 있는 유충을 모았으며, 이때 주사하지 않은 유충을 control 시료로 같이 수집하였다. 이들을 모아서 각각의 RNA를 순수 분리하여 배추좀나방 calreticulin의 specific primer를 사용하여 PCR을 수행하여 시간별 유전자의 발현 양상을 조사하였다.

나. RNA 추출

Total RNA를 뽑기 위해 Total RNA purification kit (QIAGEN)를 이용하였다. 샘플이 들어있는 튜브에 beta-mercaptoethanol(β -ME)이 포함된 RLT buffer 600 μ l를 넣고 homogenizer로 조직을 분쇄하였다. 그리고 5분간 14,000 rpm으로 원심분리하였다. 새 1.5 ml 튜브에 상층액을 옮겨 담고, 동일 볼륨의 70% 에탄올을 넣었다. RNeasy mini column에 sample을 600 μ l씩 나눠 담고, 2 ml collection tube를 꽂아 주었다. 10,000 rpm으로 1분간 원심분리한 후, collection tube에 담겨진 액은 비워내고 다시 장착했다. 남은 양이 있으면 동일한 방법으로 반복했다. RW1 buffer 700 μ l를 RNeasy mini column에 넣고 10,000 rpm으로 1분간 원심분리기를 했다. RDD buffer와 DNase을 70 μ l와 10 μ l를 섞어서 column에 정확히 넣어주고 상온에서 15분간 반응시켰다. RW1 buffer 350 μ l를 RNeasy mini column에 넣고 10,000 rpm으로 1분간 원심분리기를 하였다. RNeasy mini column을 새 2 ml collection tube에 옮겨서 RPE buffer 700 μ l를 넣고 10,000 rpm으로 1분간 원심분리기를 했다. 새 1.5 ml tube에 옮겨서 10,000 rpm으로 2분간 원심분리기를 하였다. RNase-free water로 샘플 양에 따라서 30 μ l를 RNeasy mini column에 맞춰서 넣어주고 2분간 기다린 후, 10,000 rpm으로 1분간 원심분리를 하였다. PxRNA를 분리하여 저장한 후, cDNA 합성에 사용하였다.

다. cDNA 합성

Invitrogen에서 제공한 protocol에 따라 수행하였으며, total RNA 2 μ g와 Oligo(dT)₁₂₋₁₈ primer (Invitrogen)를 이용하여 70°C에서 5분간 반응했다. 이후 RT Premix(Bioneer)를 이용하여 순서에 따라 42°C에 1시간, 94°C에 5분간을 반응한 후 모든 단계를 거친 후 -70°C에 보관하여 필요할 때 마다 사용하였다.

라. 5' Rapid amplification of cDNA ends (5'RACE)

P. xylostella calreticulin (Pxcalreticulin)의 full length을 얻기 위해, 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE), Version 2.0 (Invitrogen)을 이용하였다. 이때 이용하기 위해서 3종류의 gene specific primer (GSP1)을 제작하였다. GSP1 (5'-CTTCTTAGCGGCAGGAAGT-3'), GSP2 (5'-ATCACGTGCACCTTCTTGGT-3'), nested-GSP3 (5'-GAACGGCTTGAA CTTCTTCG-3')을 이용하였다. *P. xylostella* total RNA (2 μ g)를 이용하여 GSP1 (2.5 pmoles)와 70°C에 10분 반응시킨 후 1분간 얼음에

둔다. 10x PCR buffer, 25mM MgCl₂, 10mM dNTP mix 0.1M DDT를 각각 첨가 하여 42°C에서 1분간 반응시켰다. SuperScript™ II RT 1 ul 첨가하여 42°C에 50분, 70°C에 15분간 반응시켰다. 그리고 RNase mix를 1 ul 첨가하여 37°C에 30분 반응 후 얼음에 두었다. 이로써 first stand cDNA synthesis (RT)가 된다. S.N.A.P column을 이용하여 cDNA을 분리해내어 TdT tailing을 하였다. 생성된 cDNA을 template로 하여 GSP2을 이용하여 94°C에 3분하고, 94°C에 1분, 55°C에 1분, 72°C에 2분을 35cycle 한 다음, 72°C에 10분으로 PCR을 했다. 그리고 PCR product를 1/100으로 희석하여 nested-GSP3을 이용하여 PCR을 수행하였다. 5'RACE product를 pCR2.1-TOPO vector (Invitrogen)에 클로닝을 하였다.

클로닝을 통해서 얻은 cDNA fragment를 vector specific primer인 M13R-pUC와 T7 promoter (Invitrogen)를 이용하여 마크로젠 회사에 sequencing을 의뢰하였다. Sequence 분석은 software package (DNASTAR, Madison, WI, USA)를 이용하였고, GenBank의 BLAST를 통해서 calreticulin을 확인을 하여, calreticulin cDNA full length을 cloning 하기 위해 Px calreticulin *Bam*H1 forward primer (5'-CGGGATCCCCGGATGAAGTTGTTAGCGTTTAC-3'), Px calreticulin *Bgl*2 Reverse primer (5'-GAAGATCTTCTTAGAGTTCGTCGTGCTCATC-3')를 제작하였다. 94°C에 3분하고, 94°C에 1분, 53°C에 1분, 72°C에 1분 20초를 35cycle 한 다음, 72°C에 10분으로 PCR을 수행하였다. 예상 size 1.2kb인 Px calreticulin full length PCR product을 pCR2.1-TOPO에 클로닝을 수행하였다. 5'-RACE product와 같은 방법으로 분석을 진행을 하였다.

마. Phylogenetic analysis

Sequncing으로 얻어진 *P. xylostella* calreticulin amino acid를 GenBank에 이미 보고된 다른 생물의 calreticulin 아미노산서열과 비교분석을 위해서 CLUST ALW program을 이용하였다.

바. PCR conditions for expression pattern study

Px-calreticulin의 발현양상을 보기 위해서 Px-calreticulin specific forward primer (5'-CACCCCGGCAAGGAGTTCG-3'), Px-calreticulin specific reverse primer (5'-CAGCGTGTAGAGATGGGTGTAGAC-3')을 제작을 하였다. Development의 양상을 보기 위해 94°C에 3분하고, 94°C에 1분, 55°C에 1분, 72°C에 1분 20초를 28cycle 한 다음,

72°C에 10분으로 PCR을 수행하였다. Immunity의 양상을 보기 위해 94°C에 3분하고, 94°C에 1분, 55°C에 1분, 72°C에 1분 20초를 28cycle 한 다음, 72°C에 10분으로 PCR을 수행하였다. 그리고 tissue specific의 양상을 보기 위해서 94°C에 3분하고, 94°C에 1분, 55°C에 1분, 72°C에 1분 20초를 27cycle 한 다음, 72°C에 10분으로 PCR을 수행하였다. 마지막으로 GV infection의 양상을 보기 위해 94°C에 3분하고, 94°C에 1분, 55°C에 1분, 72°C에 1분 20초를 20cycle 한 다음, 72°C에 10분으로 PCR을 수행하였다.

사. Preparation of recombinant *P. xylostella* calreticulin

Recombinant protein을 만들기 위해 Px-calreticulin expression forward primer (5'-GCTCGAGCTGAAGTTGTTAGCGTTT-3'), Px-calreticulin expression reverse primer (5'-GGAATTCTTAGAGTTCGTCGTGCTC-3')을 제작하였다. *P. xylostella*의 silk gland cDNA을 template로 하여 full length fragment를 얻기 위해 TLA Premix (Bioneer)을 이용하여 94°C에 3분하고, 94°C에 1분, 55°C에 1분, 72°C에 1분 10초를 30cycle 한 다음, 72°C에 10분으로 PCR을 수행하였다. 얻어진 fragment를 T-easy vector (Promega)에 클로닝을 한 다음, *Xho*1와 *Eco*R1으로 효소처리를 하였다. pRSAET-A vector (Invitrogen)도 역시 *Xho*1와 *Eco*R1으로 효소처리를 하였다. Vector와 Insert DNA를 T4 DNA ligase (ELPIS)을 이용하여 ligation을 16°C에서 16시간 반응시켰다. Top10F' competent cell (Invitrogen)로 transformation을 통해 cell culture 하여 인프레임을 확인하였다. *E. coil* 형질 중, BL21(DE3)로 다시 transformation을 하여 expression을 시켰다.

3. 결과 및 고찰

본 연구를 통하여 배추좀나방의 Careticulin 유전자를 확보하였다. 초기에 확보한 partial fragment였던 PxCalreticulin유전자는 5'- 및 3'-RACE PCR 방법을 이용하여 완전한 full length cDNA를 확보하였다. 비교분석을 통하여 꿀벌부채명나방과 누에와 매우 높은 유사성을 보여 주었다. 이는 생물체간에 잘 보존된 유전자임을 시사하여 준다. 이후 발생과정, 조직특이성별로 발현패턴을 분석하였다. PxCRT mRNA의 발현이 발달과정 중 번데기에서 가장 높이 발현한 반면, 말피기 소관과 견사선에서 가장 많은 조직 특이적 발현 양상을 보였다. LPS를 처리하였을 때 3시간에서 약하게 발현이 되었으며,

laminarin을 처리하였을 때는 점진적으로 3시간과 6시간에서 발현이 증가되다가 9시간에서 감소되었다. 무엇보다 흥미로웠던 결과는 PxGV에 감염된 이후 3시간과 9시간에 각각 유도발현으로 증가하였다. 감염후기(1~5일)의 발현패턴은 3일째부터 5일까지 점차 증가되었다. 이상의 결과를 기초로 볼 때, PxCRT는 배추좀나방의 항바이러스 내재면역반응에 관여 하는 것으로 추정된다. 현재 PxCalreticulin을 만들고 있으며, 항체가 만들어진 이후 ER에 존재하는 Calreticulin의 기능보다, 특정 조건하에서 PxCRT가 ER에서 cell surface로 이동한 이후 calreticulin이 곤충면역에 어떠한 역할을 하는지 구명하는 일이 남아 있는 숙제이다. 또한 바이러스에 의하여 inducible한지 다양한 실험을 통하여 재 증명 하는 것이 절대적으로 필요한 상태이다.

가. *P. xylostella*의 calreticulin의 full sequence

Fig. 1.은 5'-RACE를 통하여 얻어낸 *P. xylostella*의 calreticulin의 full sequence 결과이다. 5'-RACE를 하기 위해 제작한 primer은 GSP1, GSP2, Nested GSP3이며, 이들은 각각 188 bp, 187 bp 차이가 난다. 5'-RACE를 통해 얻어진 PCR product를 cloning 하였다. Sequence service를 통하여 알게 된 partial calreticulin sequence를 기존에 확보한 calreticulin sequence와 contig를 만들어 *P. xylostella*의 calreticulin의 full sequence를 알아내었다. Open reading frame (ORF)은 1197 bp이며, amino acid는 399 aa 이다. 그리고 5'-untranslated region (5'-UTR)은 62 bp이며, 3'-UTR은 448 bp 이다.

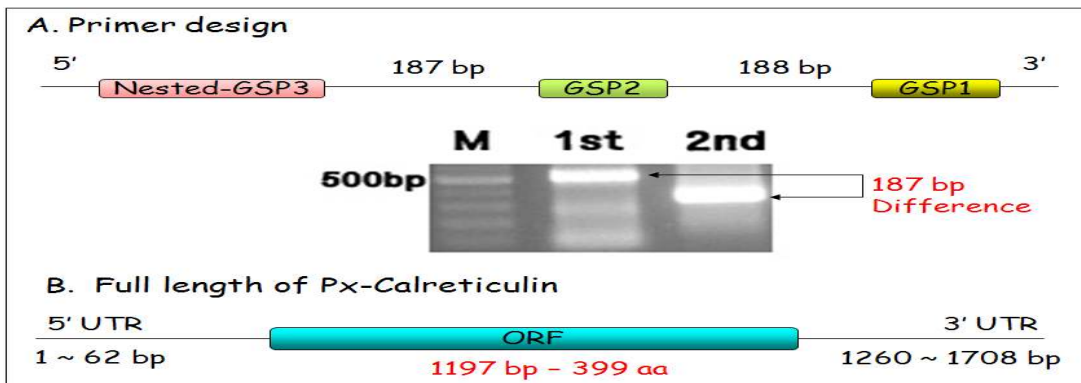


Fig. 1. 5'-RACE to get the full length cDNA of *P. xylostella* calreticulin.

(A) M, molecular weight standard marker; 1st, PCR product of Px calreticulin after 5' RACE using the GSP2; 2nd, PCR product of Px calreticulin after 5' RACE using the Nested GSP3 primer. The arrow indicates 187 bp difference. (B) 5'-RACE을 통하여 얻어낸 sequence 분석.

나. PxCalreticulin ORF와 비교분석

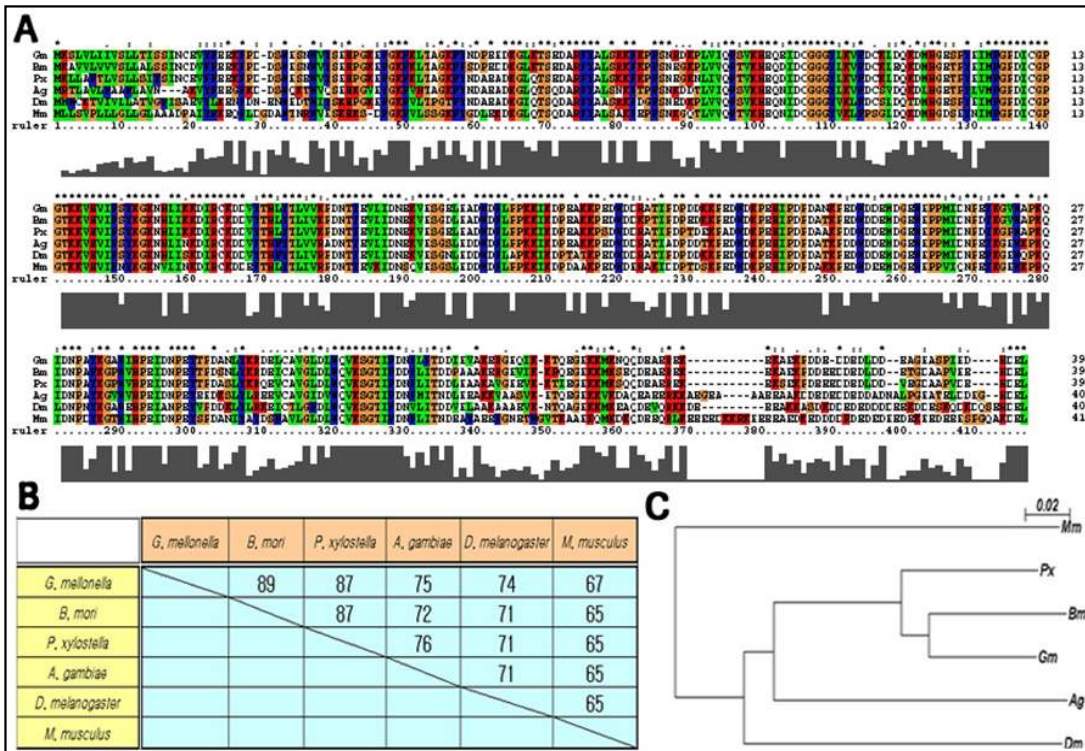


Fig. 2. Comparative analysis of PxCalreticulin ORF with known calreticulins. (A) *PxCRT*의 multiple alignment. Gm, *Galleria mellonella*; Bm, *Bombyx mori*; Px, *Plutella xylostella*; Ag, *Anopheles gambiae*; Dm, *Drosophila melanogaster*; Mm, *Mus musculus*, (B) *P. xylostella*의 종간 identity. (C) Phylogenetic analysis of calreticulin cDNAs.

다. *P. xylostella*의 발달 과정에서 calreticulin 유전자의 발현 양상

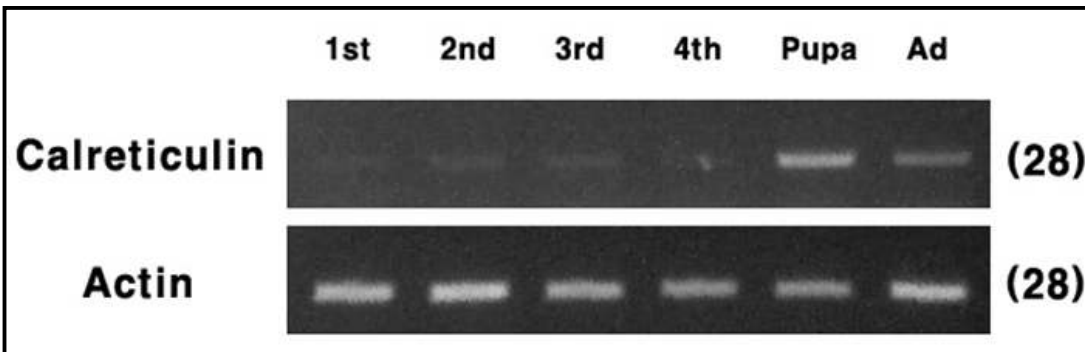


Fig. 3. Expression patterns of PxCalreticulin mRNA during developmental stages.

1st, 1령 유충; 2nd, 2령 유충; 3rd, 3령 유충; 4th, 4령 유충; Pupa, 번데기; Ad, 성충. Calreticulin은 pupa시기에 가장 많이 발현이 되었으며, 성충에서도 발현이 되었다. Actin은 loading control 이다

라. *P. xylostella*의 조직들에서 나타나는 PxCalreticulin 유전자의 발현 양상

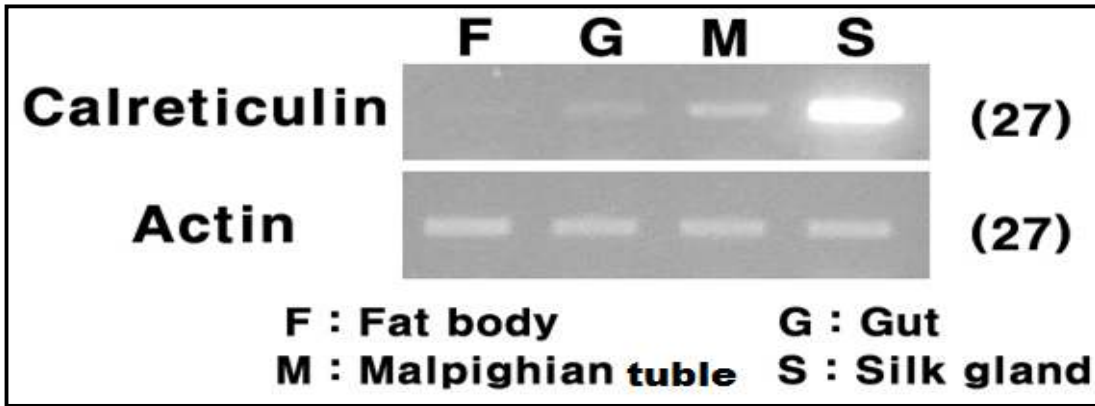


Fig. 4. Spatial expression patterns of PxCalreticulin mRNA in various tissues

F, fat body; G, gut; M, Malpighian tubule; S, silk gland이다. Calreticulin 유전자는 silk gland에서 가장 많이 발현하는 양상을 보였다. Actin은 loading control 이다.

마. LPS-induced or laminarin-induced expression patterns of PxCalreticulin

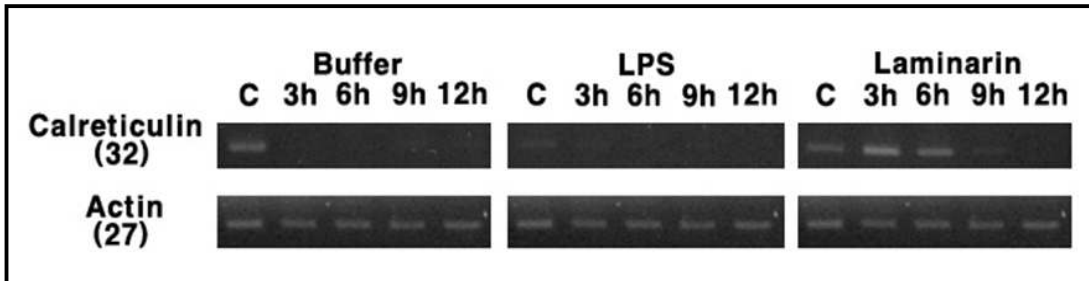


Fig. 5. Expression pattern of PxCalreticulin in response to LPS or Laminarin in *P. xylostella*

C, control; 3 h, 3시간; 6 h, 6시간; 9 h, 9시간; 12 h, 12시간이다. Actin은 loading control임.

바. *P. xylostella*의 GV에 감염되었을 때 나타나는 calreticulin 유전자의 발현 패턴

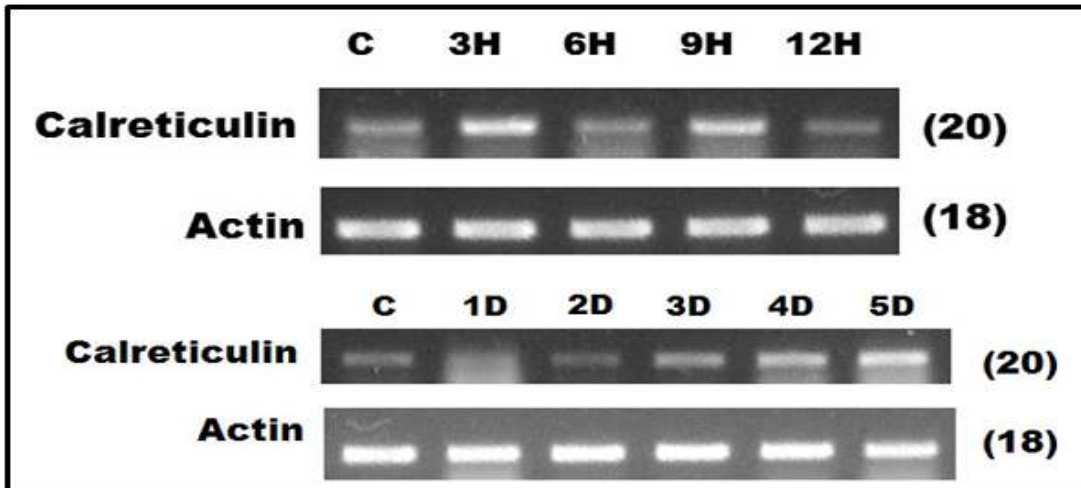


Fig. 6. Expression patterns of PxCalreticulin during the early phase (0~12 h) and late phase(1~5 D) after GV infection.

GV에 감염된 배추좀나방을 시간별 short term과 long term으로 나누어 조사를 하였다. 각각의 lane은 C, control; 3 h, 3시간; 6 h, 6시간; 9 h, 9시간; 12 h, 12시간; 1 D, 1일; 2 D, 2일; 3 D, 3일; 4 D, 4일; 5 D, 5일 이다. 먼저 short term은 3시간째 가장 많이 발현이 되고 9시간까지 발현이 지속된다. Long term에서 2일째부터 발현이 시작되어 5일째 가장 많이 발현이 되었다.

4. 결과요약

Calreticulin(CRT)은 칼슘 이온의 항상성, 분자 샤페로닝, 감염, inflammation과 내재면 역과정에 중요한 역할을 한다. 본 연구는 배추좀나방(*Plutella xylostella*)의 CRT cDNA의 full length를 클로닝 하여 항바이러스의 곤충면역을 연구하고자 하였다. PxCRT cDNA의 총 길이는 1708bp이며, open reading frame (ORF)은 1197bp이며, 아미노산은 총 399개의 아미노산으로 이루어져 있다. PxCRT 단백질은 다음과 같이 다른 곤충의 CRT와 비교적 높은 동일성을 갖고 있다 [*Galleria mellonella* (87%), *Bombyx mori* (87%), *Anopheles gambiae* (76%), *Drosophila melanogaster* (71%)]. 배추좀나방의 발생과정중 PxCRT의 발현양상을 조사하기위하여, RT-PCR을 이용한 분석결과는 PxCRT mRNA의 발현이

발달과정 중 번데기에서 가장 높이 발현되었다. 배추좀나방의 조직별로 PxCRT의 발현 패턴을 조사하기 위하여 RT-PCR을 수행한 결과, 말피기 소관과 견사선에서 가장 많은 발현 양상을 보였다. 그리고 배추좀나방에 다양한 면역유도물질을 처리한 후 PxCRT의 mRNA의 발현양상을 조사하였다. LPS를 처리하였을 때 3시간에서 약하게 발현이 되었으며, laminarin을 처리하였을 때는 점진적으로 3시간과 6시간에서 발현이 증가되다가 9시간에서 감소되었다. 마지막으로 배추좀나방에 배추좀나방 병원성 과립병바이러스 (PxGV)를 감염 한 후 PxCRT가 유도되는 양상을 조사하였다. 감염초기(3~12시간)의 발현패턴은 감염 후 3시간에 증가하였다 감소하였으며, 9시간에 다시 증가되었다 감소되는 biphasic pattern을 보였다. 감염후기(1~5일)의 발현패턴은 3일째부터 5일까지 점차 증가되었다. 이상의 결과를 기초로 볼 때, PxCRT는 배추좀나방의 항바이러스 내재 면역반응에 관여 하는 것으로 추정된다.

제6절 배추좀나방의 lebocin 유전자 클로닝 및 발현연구

1. 서언

곤충의 방어체제는 세포성면역과 체액성면역으로 나누어진다. 체액성면역의 대표적인 예는 그람음성균 혹은 그람양성균이 곤충의 피부나, 먹이를 통하여 장내에 침입하게 될 경우 곤충의 방어체제는 활성화되는 것으로 알려져 있다. 이러한 외부유래 non-self에 대한 곤충체액성 면역의 중심에는 곤충이 다양한 antibacterial peptides (cecropin, attacin, lebocin etc.)를 생산한다는 것이다. Lebocin은 *Bombyx mori*에서 1995년 처음으로 유전자가 클로닝되어 보고된바 있고 주로 누에모델에 지속적인 연구가 되어왔으며, 2000년에도 *Trichoplusi ni*에서도 lebocin에 분자생물학적연구가 수행되었다. 다른 antibacterial peptides에 비하여 상대적으로 많은 연구가 수행되지 않았다. 본 연구에서도 배추좀나방에서 처음으로 보고되고 있으며, 특별히 배추좀나방병원성 바이러스인 PxGV에 감염된 이후 발현패턴에 초점을 두고 연구를 하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. Insect rearing conditions

배추좀나방을 습도 60%, 온도 25~26°C에서 사육하였으며 배추 잎을 먹이로 하였다.

나. 배추좀나방의 발달과정의 유전자의 발현을 보기 위한 샘플 수집

배추좀나방의 발달 과정 중 유전자의 발현 양상을 관찰하기 위해 1령 유충, 2령 유충, 3령 유충, 4령 유충, 번데기, 성충의 샘플을 수집하였다. Total RNA을 뽑은 다음, PCR을 수행하여 발현 패턴을 조사하였다.

다. 배추좀나방의 조직 내의 발현 양상을 보기 위한 샘플 수집

배추좀나방의 4령 유충을 phosphate buffered saline (PBS) 용액에서 포셉을 이용하여 fat body, gut, Malphigian tube, silk gland 조직들을 모았다. 그리고 RNA을 분리한 gene specific primer을 이용하여 PCR을 하였다.

라. 배추좀나방의 면역반응에 대한 발현을 보기 위한 샘플 수집

배추좀나방의 종령 유충을 이용하여, buffer, Lipopolysaccharide (LPS), laminarin을 10 ug/ml을 1 ul씩 주사하였다. 그리고 3 h, 6 h, 9 h, 12 h 각각의 시간별로 살아 있는 유충을 모았으며, 이때 주사하지 않은 유충도 같이 수집하였다. 이들을 모아서 각각의 RNA을 순수 분리하여 배추좀나방의 gene specific primer을 사용하여 PCR을 수행하여 시간별 유전자의 발현 양상을 조사하였다.

마. RNA isolation

Total RNA를 뽑기 위해 Total RNA purification kit (QIAGEN)를 이용하였다. 샘플이 들어있는 튜브에 beta-Mercaptoethanol (β -ME)이 포함된 RLT buffer 600 ul를 넣고 homogenizer로 조직을 분쇄하였다. 그리고 5분간 14,000 rpm으로 원심분리를 하였다. 새 1.5 ml 튜브에 상층액을 옮겨 담고, 동일 볼륨의 70% 에탄올을 넣었다. RNeasy mini column에 sample을 600 ul씩 나눠 담고 2 ml collection tube를 꽂아 주었다. 10,000 rpm으로 1분간 원심분리한 후, collection tube에 담겨진 액은 비워내고 다시 장착했다. 남은 양이 있으면 동일한 방법으로 반복했다. RW1 buffer 700 ul를 RNeasy mini column에 넣고 10,000 rpm으로 1분간 원심분리를 했다. RDD buffer와 DNase을 70 ul와 10 ul를 섞어서 column에 잘 넣어주고 상온에서 15분간 반응시켰다. RW1 buffer 350 ul를 RNeasy mini column에 넣고 10,000 rpm으로 1분간 원심분리를 하였다. RNeasy mini column을 새 2 ml collection tube에 옮겨서 RPE buffer 700 ul를 넣고 10,000 rpm으로 1분간 원심분리를 했다. 새 1.5 ml tube에 옮겨서 10,000 rpm으로 2분간 원심분리 하였다. RNase-free water로 샘플 양에 따라서 30 ul를 RNeasy mini column에 맞춰서 넣어주고 2분간 기다린 후, 10,000 rpm으로 1분간 원심분리를 하였다. PxRNA를 분리하여 저장한 후, cDNA 합성에 사용하였다.

바. cDNA synthesis for PCR

Total RNA 2ug와 Oligo(dT)₁₂₋₁₈ primer (Invitrogen)를 이용하여 70°C에서 5분간 반응했다. 그런 다음 RT Premix (Bioneer)에 더하여 42°C에 1시간, 94°C에 5분간을 반응했다.

사. DNA Sequencing analysis of the *P. xylostella* gene EST

EST을 통해서 얻은 sequence 정보를 토대로 sequence 분석을 software package (DNASTAR, Madison, WI, USA)를 이용하였다. GenBank의 BLAST를 통해서 lebecine precursor을 확인하였다.

아. Phylogenetic analysis

EST로 얻어진 각각의 *P. xylostella* gene amino acid를 GenBank에서 다른 종의 amino acid와 비교를 위해서 CLUSTALW program을 이용하였다.

자. Gene specific primer design of *P. xylostella* genes, respectively

Lebocin specific Fw primer (5'-TGCCGAACCAAACAGAAGGAT-3')

Lebocin specific Rev primer (5'-TGGGGTTGAGGTATGGGAAAGAAT-3')

차. PCR conditions

*P. xylostella*의 각각의 gene specific primer을 토대로 development, immunity, tissue specific 그리고 GV infection의 양상을 보기 위해 PCR을 수행하였다. Development의 양상을 보기 위해 94℃에 3분하고, 94℃에 1분, 55℃에 1분, 72℃에 1분을 28cycle 한 다음, 72℃에 10분으로 PCR을 수행하였다. Immunity의 양상을 보기 위해 94℃에 3분하고, 94℃에 1분, 55℃에 1분, 72℃에 1분을 30cycle 한 다음, 72℃에 10분으로 PCR을 수행하였다. 그리고 tissue specific의 양상을 보기 위해서 94℃에 3분하고, 94℃에 1분, 55℃에서, 1분, 72℃에 1분을 27cycle 하였다. 다음, 72℃에 10분으로 PCR을 수행하였다. 마지막으로 GV infection의 양상을 보기 위해 94℃에 3분하고, 94℃에 1분, 55℃에 1분, 72℃에 1분을 20cycle 한 다음, 72℃에 10분으로 PCR을 수행하였다.

3. 결과 및 고찰

가. Px-lebocin의 비교분석

PCR방법을 통하여 확보된 Px-lebocin은 735 bp이었다. BLAST 분석결과 Px-lebocin 단백질은 다른 곤충과 13~42%의 유사성을 보여주었다 [*Trichoplusia ni* (42%), *Bombyx mori* (26%), and *Caenorhabditis elegans* (13%)].

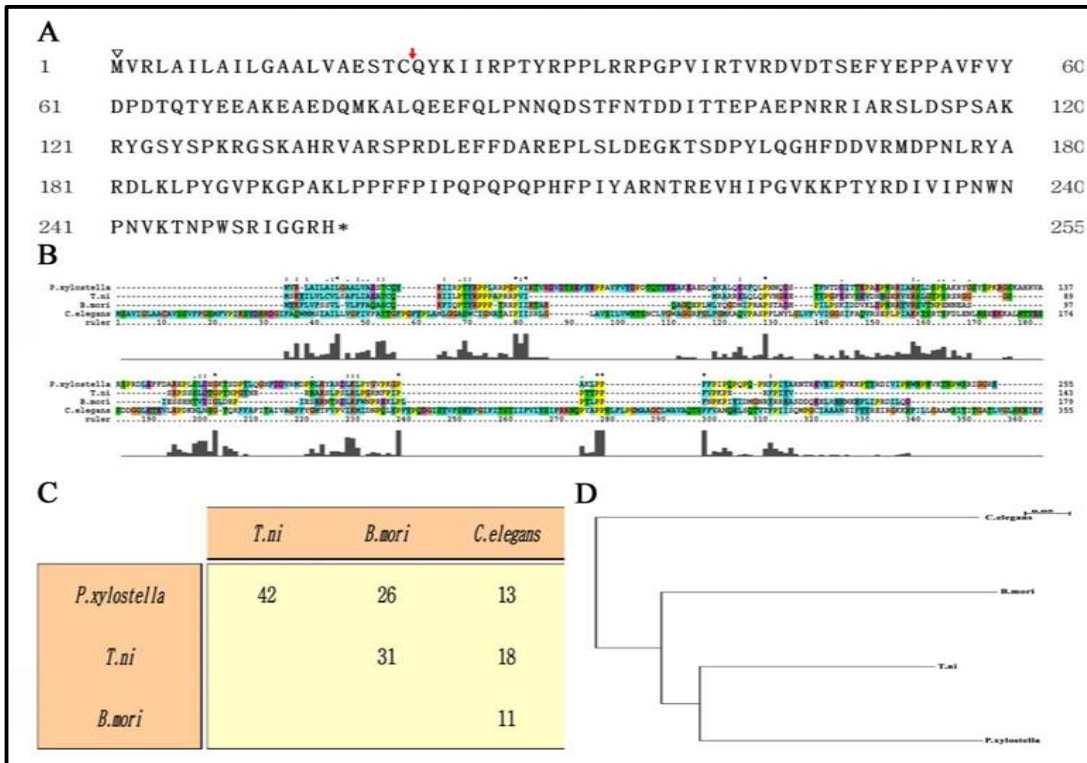


Fig. 1. Sequence homology of Px-lebocin with several known lebecin. (A) Sequence of Px-lebocin amino acid, (B) Alignment of Px-lebocin with known lebecins. *B. mori*, *Bombyx mori*; *P. xylostella*, *Plutella xylostella*; *T. ni*, *Trichoplusia ni*; *C. elegans*, *Caenorhabditis elegans*, (C) Percentage identity of Px-lebocin, (D) Phylogenetic analysis of lebecine cDNAs.

나. *P. xylostella*의 발달 과정에서 lebecin 유전자의 발현 양상.

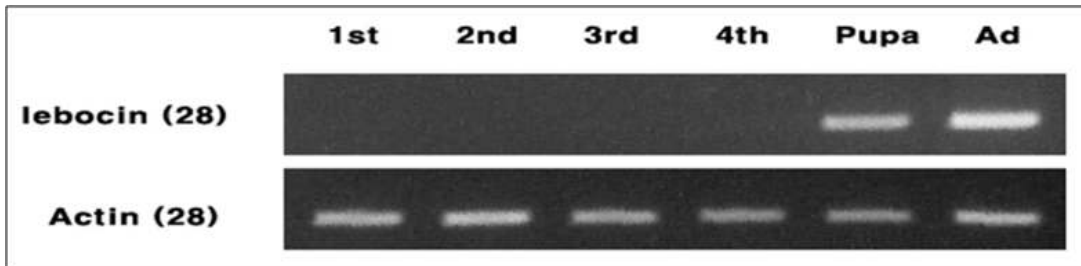


Fig. 2. Expression patterns of Px-lebocin during the developmental stages 1st, 1령 유충; 2nd, 2령 유충; 3rd, 3령 유충; 4th, 4령 유충; Pupa, 번데기; Ad, 성충. Actin은 loading control.

배추좀나방의 생활사중 Px-lebocin은 발현양상은 용(pupae)시기와 성충시기에 주로 발현되었다.

다. Px-lebocin의 조직특이적 발현양상

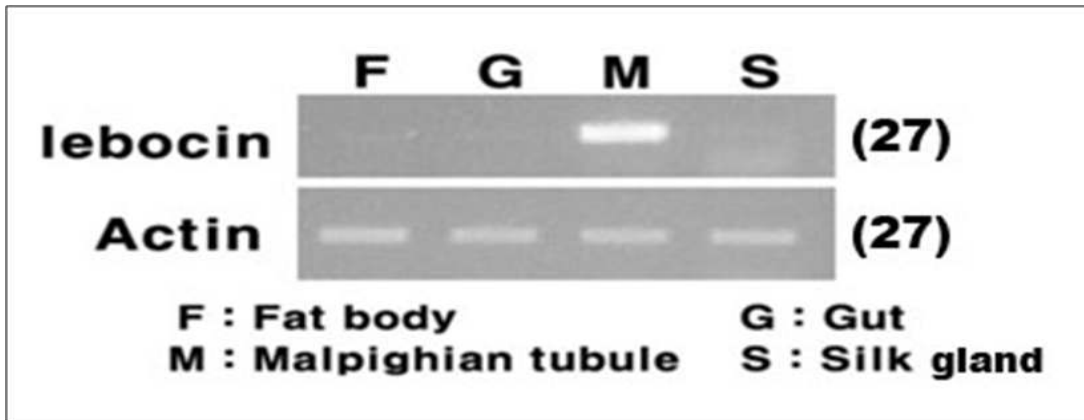


Fig. 3. Spatial expression pattern of Px-lebocin. F, fat body; G, gut; M, Malpighian tubule; S, silk gland. Actin은 loading control.

조직특이적 발현양상을 조사한 결과 흥미롭게도 말피기씨관에 높게 발현되었다.

라. LPS와 Laminarin에 대한 면역반응에서 나타나는 Px-lebocin 유전자의 발현 양상

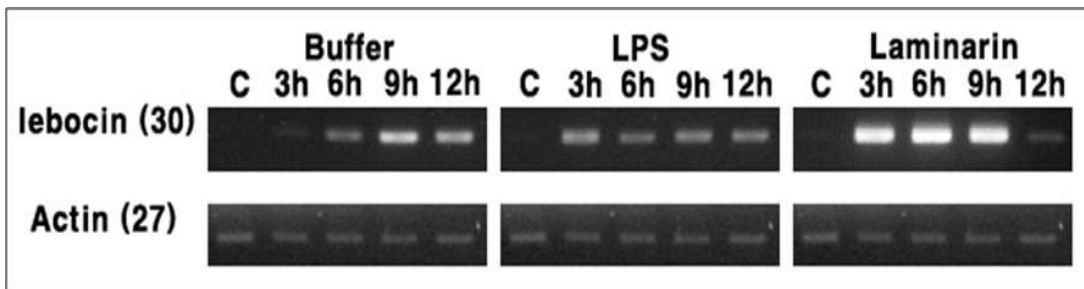


Fig. 4. Expression patterns of Px-lebocin in response to LPS and laminarin. C, control; 3 h, 3시간; 6 h, 6시간; 9 h, 9시간; 12 h, 12시간. Actin은 loading control.

또한 다양한 면역유도물질에 대한 면역반응을 조사하였다. Px-lebocin은 그람 음성균의 세포벽 성분인 LPS 주사 후 3시간이 경과 한 후 유도됨을 확인하였다. 한편 laminarin이 투입된 이후 3~9시간 동안 증가하다가, 12시간 이후 감소하는 패턴을 보였다.

마. PxGV에 감염되었을 때 나타나는 lebocin 유전자의 발현 패턴

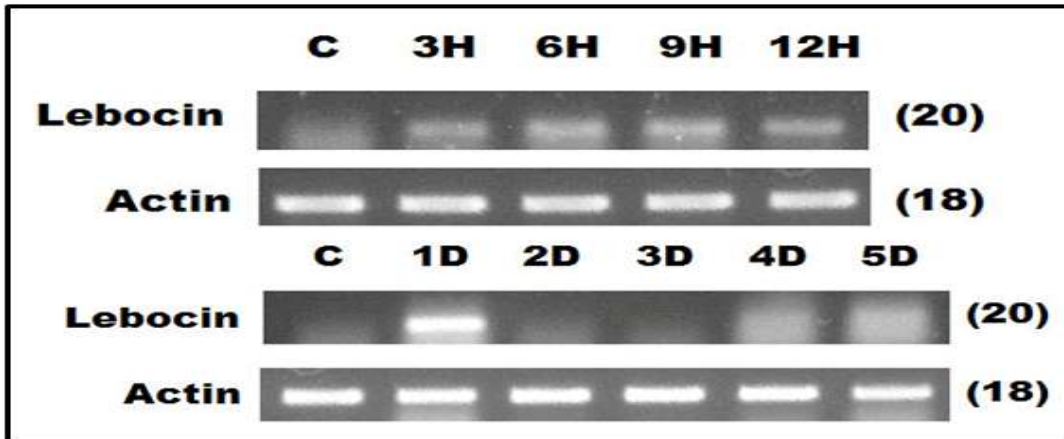


Fig. 5. Expression pattern of Px-lebocin in response to PxGV infection.

GV에 감염된 배추좀나방을 시간별 short term과 long term으로 나누어 조사함. C, Control; 3 h, 3시간; 6 h, 6시간; 9 h, 9시간; 12 h, 12시간; 1 D, 1일; 2 D, 2일; 3 D, 3일; 4 D, 4일; 5 D, 5일.

끝으로 PxGV 감염이후 초기면역반응시기(3~12 h)동안, PxGV에 감염된 이후 3시간과 9시간에 각각 증가하였다 감소하는 biphasic pattern을 보여주었다. PxGV 감염 후기(1~5일) 동안, Px-lebocin의 발현양상을 조사한 RT-PCR결과는 감염후 유독 24시간에 높은 발현양상을 보여주었다. 상기에 기술한 모든 결과를 볼 때, Px-lebocin은 배추좀나방의 면역에 관여하는 것으로 생각된다. Px-lebocin의 항바이러스 활성도가 있는지 더욱더 많은 연구가 요구된다. 향후 Px-lebocin peptide에 대한 항체를 생산하여, 단백질수준에서 발현양상과 기타 면역학적 연구를 완성하고자 한다.

4. 결과요약

Lebocin은 그람음성균에 활성을 갖고 있는 것으로 보고되어있다. 본 연구는 배추좀나방 (*Plutella xylostella*)의 Px-lebocin cDNA를 클로닝 하여 곤충면역관점에서 연구하고자 하였다. PCR방법을 통하여 확보된 Px-lebocin은 735 bp이었다. BLAST 분석결과 Px-lebocin 단백질은 다른 곤충과 13~42%의 유사성을 보여주었다 [*Trichoplusia ni* (42%), *Bombyx mori* (26%), and *Caenorhabditis elegans* (13%)]. 배추좀나방의 생활

사중 Px-lebocin은 발현양상은 용(pupae)시기와 성충시기에 주로 발현되었다. 조직특이적 발현양상을 조사한 결과 흥미롭게도 말피기씨관에 높게 발현되었다. 또한 다양한 면역 유도물질에 대한 면역반응을 조사하였다. Px-lebocin은 그람음성균의 세포벽 성분인 LPS주사 후 3시간이 경과 한 후 유도됨을 확인하였다. 한편 laminarin이 투입된 이후 3~9시간 동안 증가하다가, 12시간 이후 감소하는 패턴을 보였다. 끝으로 PxGV 감염이 후 초기면역반응시기(3~12 h)동안, PxGV에 감염된 이후 3시간과 9시간에 각각 증가하였다 감소하는 biphasic pattern을 보여주었다. PxGV 감염 후기(1~5일) 동안, Px-lebocin의 발현양상을 조사한 RT-PCR결과는 감염후 유독 24시간에 높은 발현양상을 보여주었다. 상기에 기술한 모든 결과를 볼 때, Px-lebocin은 배추좀나방의 면역에 관여하는 것으로 생각된다. Px-lebocin의 항바이러스 활성도가 있는지 더욱더 많은 연구가 요구된다.

제7절 배추좀나방의 카타라제유전자의 클로닝 및 발현양상조사

1. 서언

Catalase는 동물, 식물 그리고 곤충 등의 실험모델에서 많은 연구가 이루어졌다. 척추동물의 경우 바이러스에 감염된 이후 발생하는 oxidative stress와 세포사멸에 관한 연구는 활발히 진행되어 왔다. 쥐에 influenza virus를 감염시키면 superoxide radical (O_2^-)과 protein oxidation 그리고 lipid peroxidation의 증가가하는 것으로 알려졌다. HIV에 감염된 경우에도 유사한 패턴을 보여주었다.

반면에 곤충에 곤충바이러스가 감염된 이후 oxidative stress에 관한 연구는 상대적으로 미흡한 실정이다. Sf-9 and Tn-5B1-4 cell line은 antioxidant enzymes을 갖고 있는 것으로 알려져 있다. 예를 들어 Manganese superoxide(MnSOD, Copper-Zinc superoxide dismutase (CuZnSOD), ascorbate peroxidase (APOX) 그리고 catalase를 갖고 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 배경에서, 본 연구에서는 배추좀나방에 PxGV를 감염한 이후 oxidative stress에 관여하는 Px-catalase의 발현패턴을 연구하기위하여 Px-catalase를 클로닝하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. Insect rearing conditions

배추좀나방을 습도 60%, 온도 25~26℃에서 사육하였으며 배추 잎을 먹이로 하였다.

나. 배추좀나방의 발달과정의 유전자의 발현을 보기 위한 샘플 수집

배추좀나방의 발달 과정 중 유전자의 발현 양상을 관찰하기 위해 1령 유충, 2령 유충, 3령 유충, 4령 유충, 번데기, 성충의 샘플을 수집하였다. Total RNA을 뽑은 다음, PCR을 수행하여 발현 패턴을 조사하였다.

다. 배추좀나방의 조직 내의 발현 양상을 보기 위한 샘플 수집

배추좀나방의 4령 유충을 phosphate buffered saline (PBS) 용액에서 포셉을 이용하여 fat body, gut, Malphigian tube, silk gland 조직들을 모았다. 그리고 RNA을 분리한

gene specific primer을 이용하여 PCR을 하였다.

라. 배추좀나방의 면역반응에 대한 발현을 보기 위한 샘플 수집

배추좀나방의 종령 유충을 이용하여, buffer, Lipopolysaccharide (LPS), laminarin을 10 ug/ml을 1 ul씩 주사하였다. 그리고 3 h, 6 h, 9 h, 12 h 각각의 시간별로 살아 있는 유충을 모았으며, 이때 주사하지 않은 유충도 같이 수집하였다. 이들을 모아서 각각의 RNA을 순수 분리하여 배추좀나방의 gene specific primer을 사용하여 PCR을 수행하여 시간별 유전자의 발현 양상을 조사하였다.

마. RNA isolation

Total RNA를 뽑기 위해 Total RNA purification kit (QIAGEN)를 이용하였다. 샘플이 들어있는 튜브에 beta-Mercaptoethanol (β -ME)이 포함된 RLT buffer 600 ul를 넣고 homogenizer로 조직을 분쇄하였다. 그리고 5분간 14,000 rpm으로 원심분리하였다. 새 1.5 ml 튜브에 상층액을 옮겨 담고, 동일 볼륨의 70% 에탄올을 넣었다. RNeasy mini column에 sample을 600 ul씩 나눠 담고 2 ml collection tube를 꽂아 주었다. 10,000 rpm으로 1분간 원심분리한 후, collection tube에 담겨진 액은 비워내고 다시 장착했다. 남은 양이 있으면 동일한 방법으로 반복했다. RW1 buffer 700 ul를 RNeasy mini column에 넣고 10,000 rpm으로 1분간 원심분리기를 했다. RDD buffer와 DNase을 70 ul와 10 ul를 섞어서 column에 잘 넣어주고 상온에서 15분간 반응시켰다. RW1 buffer 350 ul를 RNeasy mini column에 넣고 10,000 rpm으로 1분간 원심분리기를 하였다. RNeasy mini column을 새 2 ml collection tube에 옮겨서 RPE buffer 700 ul를 넣고 10,000 rpm으로 1분간 원심분리기를 했다. 새 1.5 ml tube에 옮겨서 10,000 rpm으로 2분간 원심분리기를 하였다. RNase-free water로 샘플 양에 따라서 30 ul를 RNeasy mini column에 맞춰서 넣어주고 2분간 기다린 후, 10,000 rpm으로 1분간 원심분리를 하였다. PxRNA를 분리하여 저장한 후, cDNA 합성에 사용하였다.

바. cDNA synthesis for PCR

Total RNA 2 ug와 Oligo(dT)₁₂₋₁₈ primer (Invitrogen)를 이용하여 70°C에서 5분간 반응했다. 그런 다음 RT Premix (Bioneer)에 더하여 42°C에 1시간, 94°C에 5분간을 반응했다.

사. DNA Sequencing analysis of the *P. xylostella* gene EST

EST을 통해서 얻은 sequence 정보를 토대로 sequence 분석을 software package (DNASTAR, Madison, WI, USA)를 이용하였다. GenBank의 BLAST를 통해서 catalase을 확인하였다.

아. Phylogenetic analysis

EST로 얻어진 각각의 *P. xylostella* gene amino acid를 GenBank에서 다른 종의 amino acid와 비교를 위해서 CLUSTALW program을 이용하였다.

자. Gene specific primer design of *P. xylostella* genes, respectively

다음과 같은 primer를 이용하여 PxCatalase를 클로닝하였다.

Catalase specific Fw primer (5'-ACCCGACCCCTGCACTACTGAC-3')

Catalase specific Rev primer (5'-GCCTTTGCCGGTGACTGGATAC-3')

차. PCR conditions

*P. xylostella*의 각각의 gene specific primer을 토대로 development, immunity, tissue specific 그리고 GV infection의 양상을 보기 위해 PCR을 수행하였다. Development의 양상을 보기 위해 94°C에 3분하고, 94°C에 1분, 55°C에 1분, 72°C에 1분을 32cycle 한 다음, 72°C에 10분으로 PCR을 수행하였다. Immunity의 양상을 보기 위해 94°C에 3분하고, 94°C에 1분, 55°C에 1분, 72°C에 1분을 35cycle 한 다음, 72°C에 10분으로 PCR을 수행하였다. 그리고 tissue specific의 양상을 보기 위해서 94°C에 3분하고, 94°C에 1분, 55°C에 1분, 72°C에 1분을 27cycle 하였다. 다음, 72°C에 10분으로 PCR을 수행하였다. 마지막으로 GV infection의 양상을 보기 위해 94°C에 3분하고, 94°C에 1분, 55°C에 1분, 72°C에 1분을 20cycle 한 다음, 72°C에 10분으로 PCR을 수행하였다.

3. 결과 및 고찰

가. *P. xylostella*의 catalase amino acid sequence을 분석

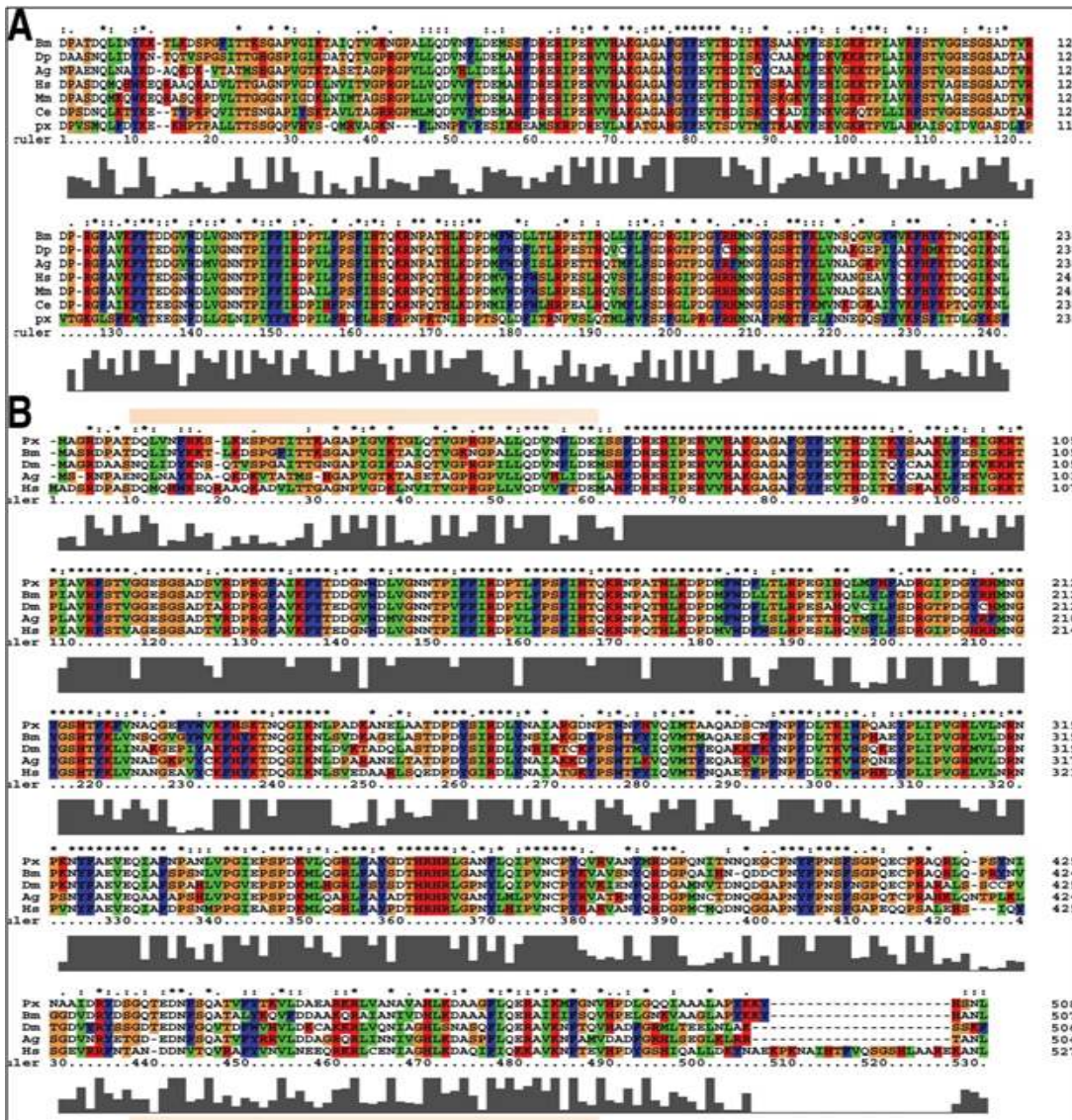


Fig. 1. Sequence homology of Px-catalase with several known catalases. (A) Multiple alignment of Px-catalase1, (B) Multiple alignment of Px-catalase2. *H. sapiens*, *Homo sapiens*; *A. gambiae*, *Anopheles gambiae*; *D. melanogaster*, *Drosorhila melanogaster*; *B. mori*, *Bombyx mori*; *P. xylostella*, *Plutella xylostell* (C) Phylogenetic tree of Px-catalase with known catalases. (D) Percentage identity of Px-catalase

본 실험은 Fig. 1. (A)의 partial catalase로 수행되었다. 그리고 (B)의 full sequence는 본 실험 시행이후 밝혀진 또 다른 catalase 이다. *P. xylostella*의 catalase gene을 다른 종과 비교를 해보았다. 82%으로 *B. mori*와 homology가 가장 높았다.

나. *P. xylostella*의 발달 과정에서 catalase 유전자의 발현 양상

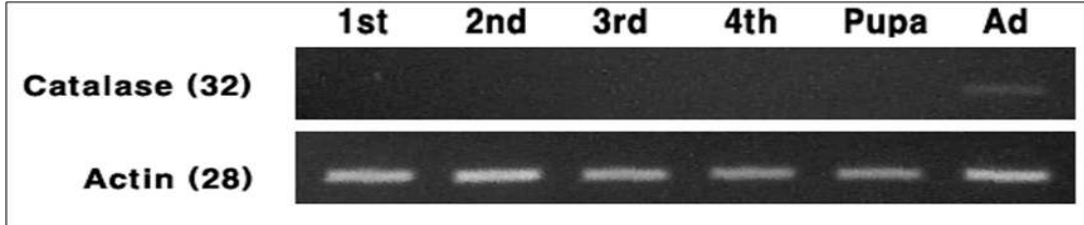


Fig. 2. Temporal expression pattern of *Px-catalase*.

1st, 1령 유충; 2nd, 2령 유충; 3rd, 3령 유충; 4th, 4령 유충; Pupa, 번데기; Ad, 성충이다. Catalase은 성충 시기에 가장 많이 발현 되었다. Actin은 loading control 이다.

다. *P. xylostella*의 조직들에서 나타나는 catalase 유전자의 발현 양상

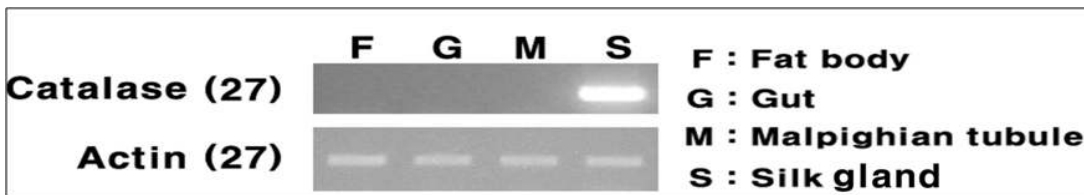


Fig. 3. Tissue specific expression pattern of *Px-catalase*.

Catalase는 silk gland에서 가장 많이 발현 양상을 보였다. Actin은 loading control이다.

라. *P. xylostella*의 면역반응에서 나타나는 catalase 유전자의 발현 양상

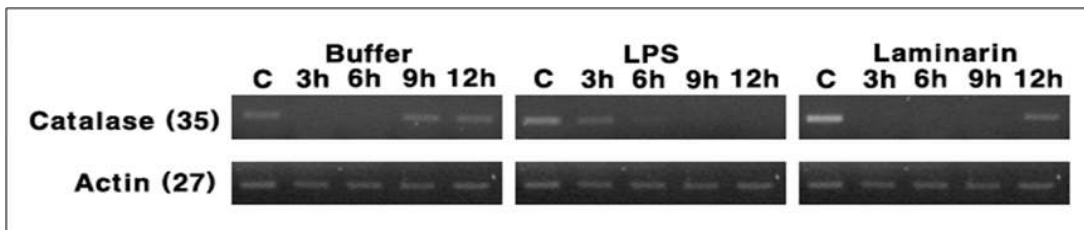


Fig. 4. Expression patterns of *Px-catalase* in response to LPS and laminarin.

4령 유충에 buffer, LPS, laminarin을 injection 하였다. C, control; 3 h, 3시간; 6 h, 6시간; 9 h, 9시간; 12 h, 12시간 이다. Buffer는 9 h, 12 h에서 발현 양상이 관찰되었고, LPS는 3 h에서 보였다. 그리고 laminarin은 12 h에서 발현 되었다. Actin은 loading control 이다.

마. *P. xylostella*의 GV에 감염되었을 때 나타나는 catalase 유전자의 발현 패턴

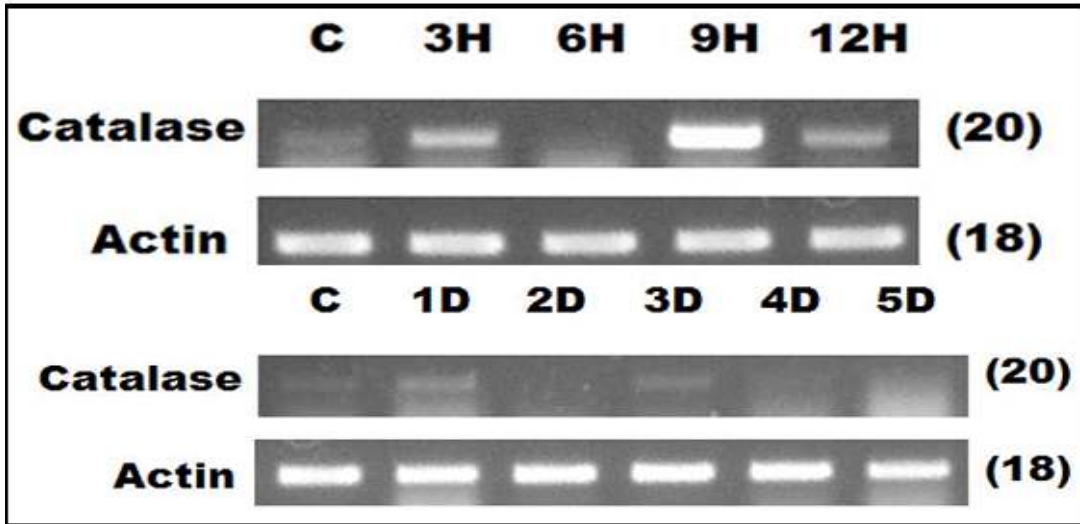


Fig. 5. Expression pattern of Px-catalase in response to PxGV infection.

GV에 감염된 배추좀나방을 시간별 short term과 long term으로 나누어 조사를 하였다. C, control; 3 H, 3시간; 6 H, 6시간; 9 H, 9시간; 12 H, 12시간; 1 D, 1일; 2 D, 2일; 3 D, 3일; 4 D, 4일; 5 D, 5일이다. 먼저 short term은 3 h 발현이 되다가 12 h에 가장 많이 발현되었다. Long term에서 1일째 약간 발현이 되었고 감소되었다.

4. 결과요약

Catalase(CAT)는 다양한 병원체와 기주와의 상호작용과정에서 유발되는 산화적 스트레스를 조절하는데 중요한 역할을 한다. 배추좀나방의 곤충면역을 연구하기 위하여, 771 bp catalase를 PCR 방법을 이용하여 클로닝 하였다. 배추좀나방의 catalase를 아미노산 염기 서열상에서 다른 종과 함께 비교한 결과, PxCAT는 다음과 같이 높은 동일성을 보였다

[*Drosophila melanogaster* (69%), *Anopheles gambiae* (69%), *Homo sapiens* (66%), *Bombyx mori* (82%)]. 배추좀나방의 성장과정 중에서 성충에서의 catalase mRNA가 주로 발현이 나타났다. 조직 특이적인 발현연구결과, PxCAT는 견사선에서 아주 높은 발현 양상을 보였다. 또한 배추좀나방의 4령 유충에 여러가지 면역유도물질을 처리하여 catalase mRNA의 발현 패턴을 조사하였다. Lipopolysaccharide (LPS)를 처리 후, 3 시간 때 높은 발현 양상을 보였으나, laminarin을 처리한 경우 12 시간 시점에 높은 발현을 보였다. 그리고 배추좀나방에 granulovirus를 감염시켜 시간별 조사를 시행 하였다. 3 시간과 9 시간에서 발현이 높게 발현되다가 감소되었으며, 장시간(1일~5일)을 관찰하였을 때 눈에 띄는 발현 양상은 관찰되지 않았다. 전체적인 실험을 종합해 보았을 때, 배추좀나방은 내재적인 면역반응 역할을 하는 것으로 추론된다.

제8절 배추좀나방의 NOS 유전자 클로닝 및 발현연구

1. 서언

내재면역(innate immunity)관점에서 NO signalling pathway에 대한 연구가 활발히 진행되어 왔다. 최근 논문에 의하면 NOS에서 유래한 nitric oxide(NO)는 매우 중요한 역할을 하는데 특별히, NO는 초파리 유충과 곤충혈구에서 antibacterial peptide의 발현을 촉진한다고 보고되었다. 또한 사람의 신장에 해당되는 곤충의 Malpighian tubules(MT)에서 NOS 발현과 이에 따른 NO의 역할에 초점을 두고 연구가 진행되고 있다. 전통적으로 MT는 단지 곤충의 삼투압과 해독에 중요한 기능을 갖고 있다고 알려져 있으나, 신개념의 살충제를 개발하는데 주요한 pesticide target 조직으로 생각되어 많은 연구자들이 새로운 관심을 갖고 연구하는 곤충 체강내에 새로운 면역기관으로 부상되고 있는 실정이다. 예를 들어 2003년 최근 말피기씨관이 cell-autonomous 면역능력을 갖고 있는 기관으로 보고되었다. 이러한 배경에서 본 연구에서 배추좀나방의 NOS 유전자를 클로닝한 후 말피기씨관에 관심을 갖고 연구하였다.

2. 재료 및 방법

가. 배추좀나방의 발달과정의 유전자의 발현을 보기 위한 샘플 수집

배추좀나방의 발달 과정 중 유전자의 발현 양상을 관찰하기 위해 1령 유충, 2령 유충, 3령 유충, 4령 유충, 번데기, 성충의 샘플을 수집하였다. Total RNA를 뽑은 다음, PCR을 수행하여 발현 패턴을 조사하였다.

나. 배추좀나방의 조직 내의 발현 양상을 보기 위한 샘플 수집

배추좀나방의 4령 유충을 phosphate buffered saline (PBS) 용액에서 포셉을 이용하여 fat body, gut, Malpighian tube, silk gland 조직들을 모았다. 그리고 RNA를 분리한 gene specific primer을 이용하여 PCR을 하였다.

다. 배추좀나방의 면역반응에 대한 발현을 보기 위한 샘플 수집

배추좀나방의 종령 유충을 이용하여, buffer, lipopolysaccharide (LPS), laminarin을

10 ug/ml을 1 ul씩 주사하였다. 그리고 3 h, 6 h, 9 h, 12 h 각각의 시간별로 살아 있는 유충을 모았으며, 이때 주사하지 않은 유충도 같이 수집하였다. 이들을 모아서 각각의 RNA를 순수 분리하여 배추좀나방의 gene specific primer을 사용하여 PCR을 수행하여 시간별 유전자의 발현 양상을 조사하였다.

라. RNA isolation

Total RNA를 뽑기 위해 Total RNA purification kit (QIAGEN)를 이용하였다. 샘플이 들어있는 튜브에 beta-Mercaptoethanol (β -ME)이 포함된 RLT buffer 600 ul를 넣고 homogenizer로 조직을 분쇄하였다. 그리고 5분간 14,000 rpm으로 원심분리를 하였다. 새 1.5 ml 튜브에 상층액을 옮겨 담고, 동일 볼륨의 70% 에탄올을 넣었다. RNeasy mini column에 sample을 600 ul씩 나눠 담고 2 ml collection tube를 꽂아 주었다. 10,000 rpm으로 1분간 원심분리한 후, collection tube에 담겨진 액은 비워내고 다시 장착했다. 남은 양이 있으면 동일한 방법으로 반복했다. RW1 buffer 700 ul를 RNeasy mini column에 넣고 10,000 rpm으로 1분간 원심분리기를 했다. RDD buffer와 DNase을 70 ul와 10 ul를 섞어서 column에 잘 넣어주고 상온에서 15분간 반응시켰다. RW1 buffer 350 ul를 RNeasy mini column에 넣고 10,000 rpm으로 1분간 원심분리기를 하였다. RNeasy mini column을 새 2 ml collection tube에 옮겨서 RPE buffer 700 ul를 넣고 10,000 rpm으로 1분간 원심분리기를 했다. 새 1.5 ml tube에 옮겨서 10,000 rpm으로 2분간 원심분리기를 하였다. RNase-free water로 샘플 양에 따라서 30 ul를 RNeasy mini column에 맞춰서 넣어주고 2분간 기다린 후, 10,000 rpm으로 1분간 원심분리를 하였다. PxRNA를 분리하여 저장한 후, cDNA 합성에 사용하였다.

마. cDNA synthesis for PCR

Total RNA 2 ug와 Oligo(dT)₁₂₋₁₈ primer (Invitrogen)를 이용하여 70°C에서 5분간 반응했다. 그런 다음 RT Premix (Bioneer)에 더하여 42°C에 1시간, 94°C에 5분간을 반응했다.

바. DNA Sequencing analysis of the *P. xylostella* gene EST

EST을 통해서 얻은 sequence 정보를 토대로 sequence 분석을 software package (DNASTAR, Madison, WI, USA)를 이용하였다. GenBank의 BLAST를 통해서 nitro oxidase synthesis (NOS)을 확인하였다.

사. Phylogenetic analysis

EST로 얻어진 각각의 *P. xylostella* gene amino acid를 GenBank에서 다른 종의 amino acid와 비교를 위해서 CLUSTALW program을 이용하였다.

아. Gene specific primer design of *P. xylostella* genes, respectively

NOS specific Fw primer (5'-CGGTCTTCGCTCTCGGCTCCA-3')

NOS specific Rev primer (5'-GCAGGGTTCGGCGGGTAGGTCTC-3')

자. PCR conditions

*P. xylostella*의 각각의 gene specific primer를 토대로 development, immunity, tissue specific 그리고 GV infection의 양상을 보기 위해 PCR을 수행하였다. Development의 양상을 보기 위해 94°C에 3분하고, 94°C에 1분, 55°C에 1분, 72°C에 1분을 32cycle 한 다음, 72°C에 10분으로 PCR을 수행하였다. Immunity의 양상을 보기 위해 94°C에 3분하고, 94°C에 1분, 55°C에 1분, 72°C에 1분을 25cycle 한 다음, 72°C에 10분으로 PCR을 수행하였다. 그리고 tissue specific의 양상을 보기 위해서 94°C에 3분하고, 94°C에 1분, 55°C에서, 1분, 72°C에 1분을 35cycle 하였다. 다음, 72°C에 10분으로 PCR을 수행하였다.

3. 결과 및 고찰

가. *P. xylostella*의 NOS amino acid sequence를 분석

A	1	MEFQKYTVTNPQLSRLES�KSGTETASIDSFGPLSNVRFVAVFALGSSAYPNFCNFGKY	60
	61	VDKLLGDLGGERIHDLATGDEMCGQDQAFRWASGVFNACETFCLDDDETLQEAKRALG	120
	121	TVALSEETVRFSDPETYPPTLPVALQSAVNRQLVSCVVRANKDLGDESAERSTIFIDLEP	180
	181	KESIKYDPGDHVGMLACNRQELVEGLLGRLLKDVDDYDEPLQLQMKETHHTSSGPVKSWEPE	240
	241	HERLPAVSVRDLFTRFLDITTPPTTILLQYLATTCENDEQRRQLNLLANDPAAYEDWRLY	300
	301	NFPTLLEVLQFPSARPSGSLLAALLSPLQPRFYSISSSPLAHPKRLHLTVAVVSYKTQD	360
	361	GVGPLHYGVCSNYLMDRKPGEVYLFIRSAPNFHLPQDPAVPLILIGPGTGIPFRGFWH	420
	421	HRRAMI SPRNRANAGPVWLFFGCRTTRTMDLYREEKEQAKKDGVL SKVFLALSREKGVPKM	480
	481	YVQELAETVGSDIHDLNKGAFYVCGDCKMAEDVHQKLGIIKKYGEMTDEQAQNI MY	540
	541	MLKEENRYHEDI FGI TLRTAEVHSAS*	566

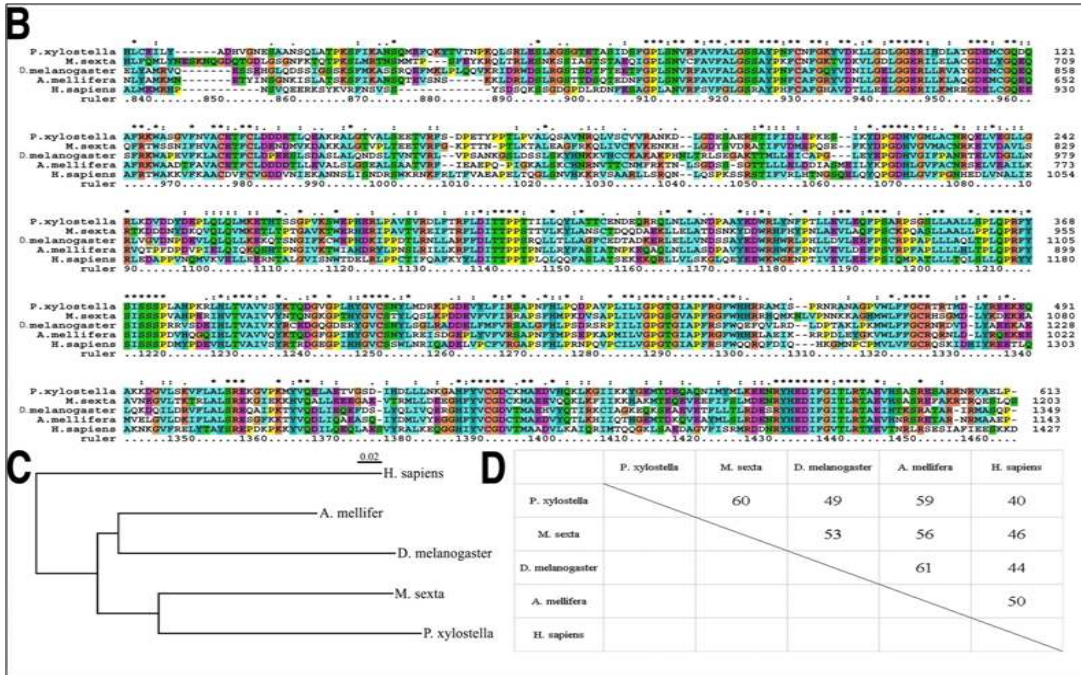


Fig. 1. Sequence homology of PxnOS with several known NOSs. (A) NOS의 amino acid alignment (B) 다른 NOS의 full amino acid alignment. *H. sapiens*, *Homo sapiens*; *A. mellifera*, *Apis mellifera*; *D. melanogaster*, *Drosophila melanogaster*; *M. sexta*, *Menduca sexta*; *P. xylostella*, *Plutella xylostella*. (C) Phylogenetic tree of PxnOS with known NOS cDNAs (D) Percentage identity of PxnOS

본 실험은 Fig. 1은 EST를 통해서 얻어진 NOS sequence를 통해서 amino acid로 다른 종과의 비교를 수행되었다. 그리고 결과로 phylogenetic analysis를 보았을 때 같은 나비목인 *M. sexta*와 60%로 가장 높은 homology를 보였다.

나. Development expression patterns of *PxnOS*

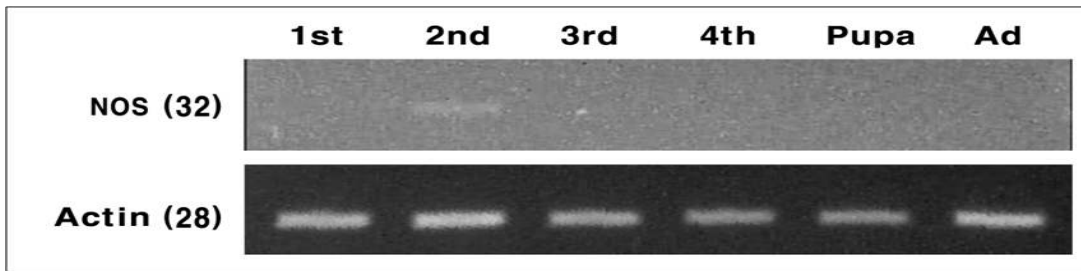


Fig. 2. *P. xylostella*의 발달 과정에서 NOS 유전자의 발현 양상.

1st, 1령 유충; 2nd, 2령 유충; 3rd, 3령 유충; 4th, 4령 유충; Pupa, 번데기; Ad, 성충이다. NOS는 2령 유충 시기에 발현 되었다. Actin은 loading control.

다. *P. xylostella*의 조직들에서 나타나는 NOS 유전자의 발현 양상

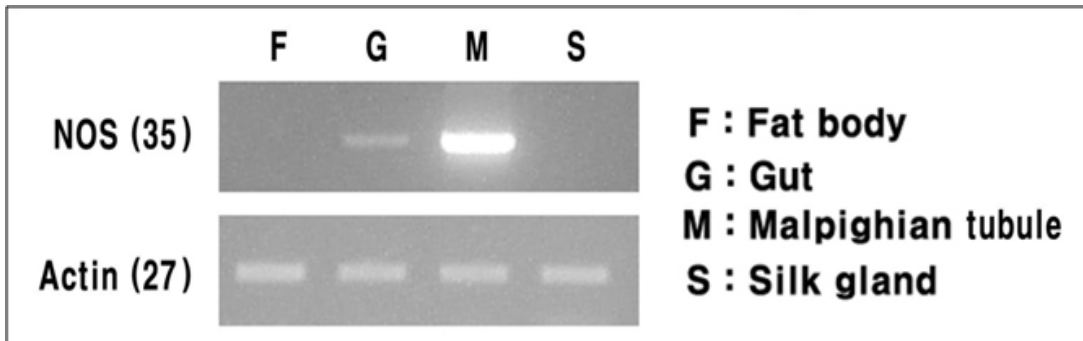


Fig. 3. Tissue specific expression patterns of *PxNOS*.

NOS는 Malpighian tubule에서 가장 많이 발현이 되었고 gut에서도 발현이 약하게 되었다. Actin은 loading control이다.

라. *P. xylostella*의 면역반응에서 나타나는 NOS 유전자의 발현 양상

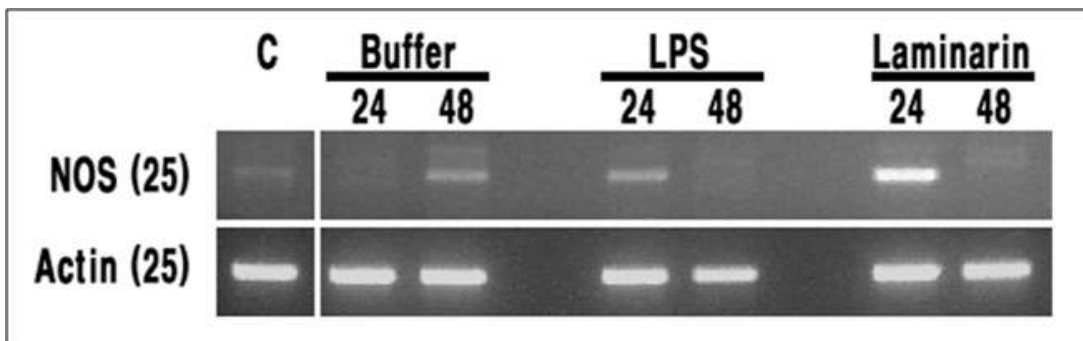


Fig. 4. Expression patterns of *PxNOS* in response to LPS and laminarin.

4령 유충에 buffer, LPS, laminarin을 injection 하였다. 각각의 lane은 C, control; 24 h, 24시간; 48, 48시간 이다. Buffer는 48 h에서 발현이 관찰되었고, LPS는 24 h에 증가 되었다. 그리고 laminarin은 24 h에서 강하게 발현 되었다. Actin은 loading control 이다.

4. 결과요약

Nitric oxide synthase (NOS)는 포유동물과 곤충의 내재면역에 다양한 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 그래서 우리는 배추좀나방에서 면역반응이 일어나는 동안에 NOS의 잠재적인 역할에 대해 연구를 수행하였다. PxNOS의 cDNA를 클로닝을 한 결과, PxNOS의 1698 bp를 가진 partial fragment를 확보하였다. 아미노산 서열상에서 다른 종과 비교를 하여 다음과 같은 동일성을 보였다[*Menduca sexta* (60%), *Apis mellifer* (59%), *Drosophila melanogaster* (49%)]. 배추좀나방의 발달 과정 중에서 NOS의 발현은 2령 유충에서 가장 높았다. 또한 조직 특이성을 조사한 결과, 말피기소관에서 매우 높은 발현 양상을 보였다. 그리고 다양한 면역유도물질을 배추좀나방에 처리하여 면역반응 발현 패턴을 알아보았다. 각각의 lipopolysaccharide (LPS)와 laminarin을 처리하여 24시간 경과된 시점에서 가장 많은 발현을 보였다. 본 결과를 기초하여 볼 때, PxNOS가 곤충면역에 관여하는 것으로 생각된다.

제9절 배추좀나방의 thioredoxin peroxidase 유전자의 클로닝 및 발현양상 조사

1. 서언

다른 생물체와 같이 곤충도 대사과정, 감염 등 다양한 조건하에서 활성산소(reactive oxygen species)를 생산한다. 그리고 이와 같이 생성된 ROS가 외부에서 침입한 non-self인 바이러스와 같은 병원균을 사멸시키는데 사용될 수 있다. 그러나 이러한 장점을 갖고 있지만 일정한 수준으로 조절하지 못하여 세포내에 과도하게 축적이 되면 결국 세포자신의 DNA, lipid, 그리고 단백질에 피해를 주게 된다. 이러한 유해산소를 제거하기 위하여 곤충을 포함한 대부분의 생명체는 superoxide dismutase, catalase 그리고 peroxidases를 갖고 있다. 곤충에서 Peroxidase는 유전자는 초파리, 모기, 벌, 누에, 귀뚜라미 등 다양한 곤충에서 cloning되어 oxidative stress관점에서 연구되었다. 흥미롭게도 귀뚜라미와 누에에서, Prx유전자는 바이러스에 감염된 후 증가된다고 보고되었다. 이러한 관점에서 본 연구에서도 배추좀나방의 peroxidase를 클로닝하여 곤충면역관점에서 연구하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 배추좀나방의 발달과정의 유전자의 발현을 보기 위한 샘플 수집

배추좀나방의 발달 과정 중 유전자의 발현 양상을 관찰하기 위해 1령 유충, 2령 유충, 3령 유충, 4령 유충, 번데기, 성충의 샘플을 수집하였다. Total RNA를 뽑은 다음, PCR을 수행하여 발현 패턴을 조사하였다.

나. 배추좀나방의 조직 내의 발현 양상을 보기 위한 샘플 수집

배추좀나방의 4령 유충을 phosphate buffered saline (PBS) 용액에서 포셉을 이용하여 fat body, gut, Malpighian tube, silk gland 조직들을 모았다. 그리고 RNA를 분리한 gene specific primer을 이용하여 PCR을 하였다.

다. 배추좀나방의 면역반응에 대한 발현을 보기 위한 샘플 수집

배추좀나방의 종령 유충을 이용하여, buffer, lipopolysaccharide (LPS), laminarin을 10 ug/ml을 1 ul씩 주사하였다. 그리고 3 h, 6 h, 9 h, 12 h 각각의 시간별로 살아 있는 유충을 모았으며, 이때 주사하지 않은 유충도 같이 수집하였다. 이들을 모아서 각각의 RNA을 순수 분리하여 배추좀나방의 gene specific primer을 사용하여 PCR을 수행하여 시간별 유전자의 발현 양상을 조사하였다.

라. RNA isolation

Total RNA를 뽑기 위해 Total RNA purification kit (QIAGEN)를 이용하였다. 샘플이 들어있는 튜브에 beta-Mercaptoethanol (β -ME)이 포함된 RLT buffer 600 ul를 넣고 homogenizer로 조직을 분쇄하였다. 그리고 5분간 14,000 rpm으로 원심분리를 하였다. 새 1.5 ml 튜브에 상층액을 옮겨 담고, 동일 볼륨의 70% 에탄올을 넣었다. RNeasy mini column에 sample을 600 ul씩 나눠 담고 2 ml collection tube를 꽂아 주었다. 10,000 rpm으로 1분간 원심분리한 후, collection tube에 담겨진 액은 비워내고 다시 장착했다. 남은 양이 있으면 동일한 방법으로 반복했다. RW1 buffer 700 ul를 RNeasy mini column에 넣고 10,000 rpm으로 1분간 원심분리기를 했다. RDD buffer와 DNase을 70 ul와 10 ul를 섞어서 column에 잘 넣어주고 상온에서 15분간 반응시켰다. RW1 buffer 350 ul를 RNeasy mini column에 넣고 10,000 rpm으로 1분간 원심분리기를 하였다. RNeasy mini column을 새 2 ml collection tube에 옮겨서 RPE buffer 700 ul를 넣고 10,000 rpm으로 1분간 원심분리기를 했다. 새 1.5 ml tube에 옮겨서 10,000 rpm으로 2분간 원심분리기를 하였다. RNase-free water로 샘플 양에 따라서 30 ul를 RNeasy mini column에 맞춰서 넣어주고 2분간 기다린 후, 10,000 rpm으로 1분간 원심분리를 하였다. PxRNA를 분리하여 저장한 후, cDNA 합성에 사용하였다.

마. cDNA synthesis for PCR

Total RNA 2 ug와 Oligo(dT)₁₂₋₁₈ primer (Invitrogen)를 이용하여 70°C에서 5분간 반응했다. 그런 다음 RT Premix (Bioneer)에 더하여 42°C에 1시간, 94°C에 5분간을 반응했다.

바. DNA Sequencing analysis of the *P. xylostella* gene EST

EST을 통해서 얻은 sequence 정보를 토대로 sequence 분석을 software package

(DNASTAR, Madison, WI, USA)를 이용하였다. GenBank의 BLAST를 통해서 thioredoxin peroxidase을 확인하였다.

사. Phylogenetic analysis

EST로 얻어진 각각의 *P. xylostella* gene amino acid를 GenBank에서 다른 종의 amino acid와 비교를 위해서 CLUSTALW program을 이용하였다.

아. Gene specific primer design of *P. xylostella* genes, respectively

Thioredoxin peroxidase specific Fw primer (5'-ACGAAGCCCGCGCCCCAGTG-3')

Thioredoxin peroxidase specific Rev primer (5'-TGCTTGCCGTCGATGATGAACAGG-3')

자. PCR conditions

*P. xylostella*의 각각의 gene specific primer를 토대로 development, immunity, tissue specific 그리고 GV infection의 양상을 보기 위해 PCR을 수행하였다. Development의 양상을 보기 위해 94°C에 3분하고, 94°C에 1분, 55°C에 1분, 72°C에 1분을 35cycle 한 다음, 72°C에 10분으로 PCR을 수행하였다. Immunity의 양상을 보기 위해 94°C에 3분하고, 94°C에 1분, 55°C에 1분, 72°C에 1분을 32cycle 한 다음, 72°C에 10분으로 PCR을 수행하였다. 그리고 tissue specific의 양상을 보기 위해서 94°C에 3분하고, 94°C에 1분, 55°C에 1분, 72°C에 1분을 32cycle 하였다. 다음, 72°C에 10분으로 PCR을 수행하였다. 마지막으로 GV infection의 양상을 보기 위해 94°C에 3분하고, 94°C에 1분, 55°C에 1분, 72°C에 1분을 20cycle 한 다음, 72°C에 10분으로 PCR을 수행하였다.

3. 결과 및 고찰

가. *P. xylostella*의 thioredoxin peroxidase amino acid sequence을 분석

A	1	MPLQLTKPAPQWKTTAVVNGEFKD SLSDYKGYVWVFFYPLDFTFVCPTE IAFSEAAD	60
	61	DFRK GCEV AASTDSHFTHLAWVNTPRKQGG LGPMN P IADKSHRI ARDYGV LDEESG	120
	121	VPFRGLF I DGKQNL RQ TVNDLPVGRSVEETLRLVQAFKFTDEHGEVCPANWRPGSKT	180
	181	KPDSKAAQEYFVDAN*	195

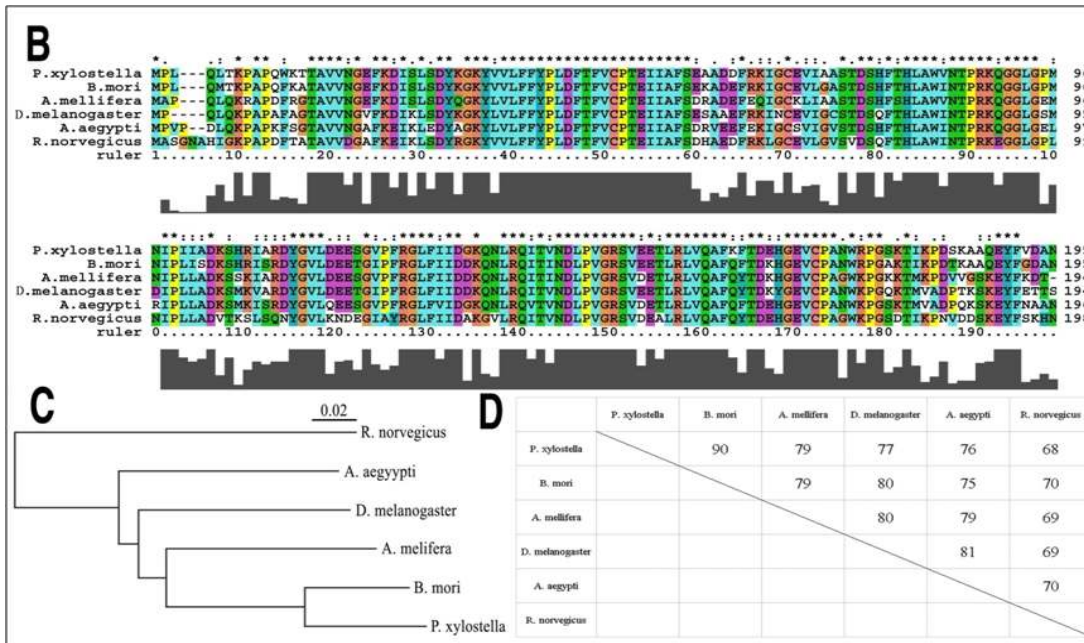


Fig. 1. Sequence homology of Px thioredoxin peroxidase with several known thioredoxin peroxidases.

(A) Thioredoxin peroxidase의 amino acid (B) Thioredoxin peroxidase의 amino acid alignment. *R. norvegicus*, *Rattus norvegicus*; *H. sapiens*, *Homo sapiens*; *A. melifera*, *Apis melifera*; *D. melanogaster*, *Drosophila melanogaster*; *B. mori*, *Bombyx mori*; *P. xylostella*, *Plutella xylostella*. (C) Phylogenetic analysis of thioredoxin peroxidase cDNAs. (D) Percentage identity of PxTpx

본 실험은 Fig. 1. thioredoxin peroxidase로 수행되었다. *P. xylostella*의 thioredoxin peroxidase gene을 다른 종과 비교를 해보았다. 90%으로 *B. mori*와 homology가 가장 높았다.

나. *P. xylostella*의 발달과정에서 thioredoxin peroxidase 유전자의 발현 양상

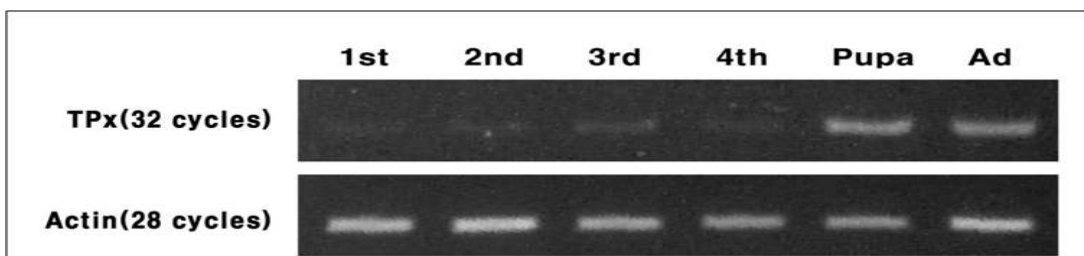


Fig. 2. Development expression patterns of *PxTpx*.

1st, 1령 유충; 2nd, 2령 유충; 3rd, 3령 유충; 4th, 4령 유충; Pupa, 번데기; Ad, 성충이다. Thioredoxin peroxidase은 번데기 시기에 가장 많이 발현되었으며 성충시기에도 발현이 지속되었다. Actin은 loading control 이다.

다. *P. xylostella*의 조직들에서 나타나는 thioredoxin peroxidase 유전자의 발현 양상

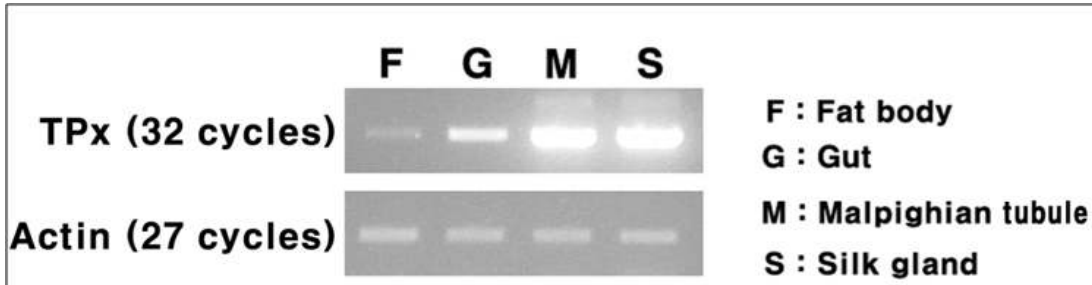


Fig. 3. Tissue specific expression patterns of *PxBpx*.

Thioredoxin peroxidase는 silk gland, Malpighian tubule에서 가장 많이 발현 양상을 보였다. Actin은 loading control 이다.

라. *P. xylostella*의 면역반응에서 나타나는 thioredoxin peroxidase 유전자의 발현 양상

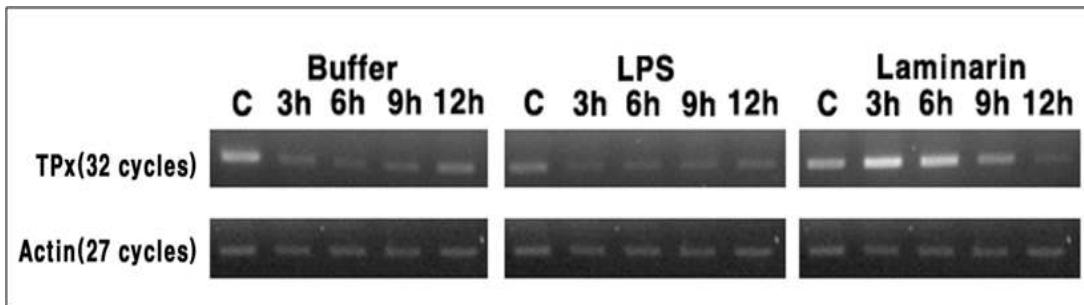


Fig. 4. Expression patterns of *PxBpx* in response to LPS and laminarin.

4령 유충에 buffer, LPS, laminarin을 injection 하였다. C, Control; 3 h, 3시간; 6 h, 6시간; 9 h, 9시간; 12 h, 12시간 이다. Buffer는 점점 12 h에서 발현 양상이 관찰되었고, LPS는 변화가 없었다. 그리고 laminarin은 3 h, 6 h에 발현이 증가되다가 9 h부터 감소되었다. Actin은 loading control 이다.

마. *P. xylostella*의 GV에 감염되었을 때 나타나는 thioredoxin peroxidase 유전자의 발현 패턴

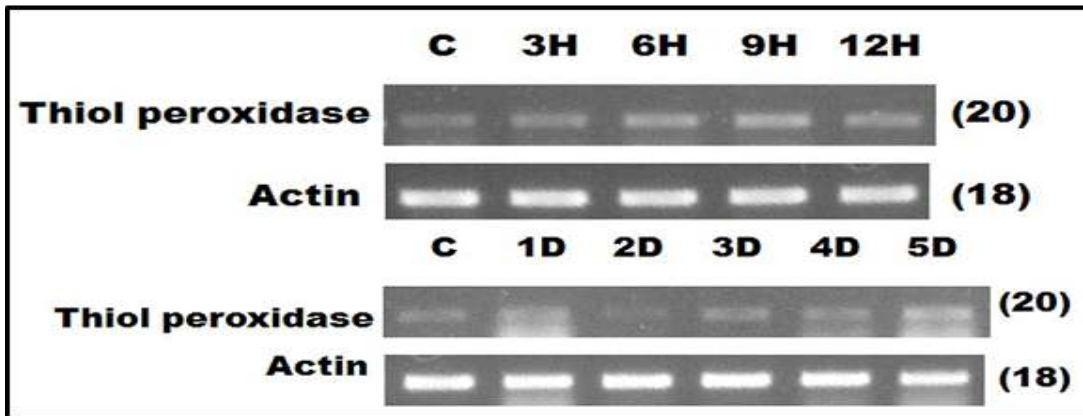


Fig. 5. Expression pattern of *PxTpx* in response to PxGV infection.

GV에 감염된 배추좀나방을 시간별 short term과 long term으로 나누어 조사를 하였다. C, Control; 3 h, 3시간; 6 h, 6시간; 9 h, 9시간; 12 h, 12시간; 1 D, 1일; 2 D, 2일; 3 D, 3일; 4 D, 4일; 5 D, 5일 이다. 먼저 short term은 6 h, 9 h에 강하게 발현이 되고 지속되었다. Long term에서 1일째 약간 발현이 되었으며 5일째 많이 발현이 되었다.

4. 결과요약

thioredoxin peroxidase(Tpx)는 척추동물과 무척추동물에서 병원균에 노출되면 산화적 스트레스방어 시스템에 관여하는 것으로 알려져 있다. 배추좀나방의 항바이러스 곤충 면역관점에서 Tpx의 기능을 구명하기 위하여 본 연구를 시도하였다. PCR방법을 이용하여 PxTpx을 클로닝을 한 결과, 585 bp를 갖고 있는 partial fragment를 확보하였다. PxTpx의 아미노산 서열상에서 다른 종과 비교를 하여 다음과 같은 동일성을 보였다 [*Bombyx mori* (90%), *Apis mellifera* (79%) and *Drosophila melanogaster* (77%)]. 배추좀나방의 발달 과정에서 PxTpx의 발현은 번데기와 성충에서 높았다. 또한 조직상에서는 말피기 소관과 견사선에서 높은 발현 패턴을 보였다. 그리고 여러 가지 면역유도물질을 배추좀나방의 4령 유충에 주사하여 면역적 발현 양상을 관찰하였다. Lipopolysaccharide (LPS) 처리하여 시간별 발현양상을 보았을 때, 3시간에서 12시간까지 눈에 띄는 패턴이 관찰되지

않았다. Laminarin 처리 후, 3시간 경과하였을 때 높은 발현 패턴을 보였으나 그 후, 차츰 감소하였다. 4령 유충에 granulovirus를 감염시켜 발현 양상을 분석하였다. 감염초기 3시간과 6시간에 다소 발현이 되었으나 전반적으로 커다란 과발현은 유도되지 않았다. Laminarin에 의해 PxTpx가 유도되는 것으로 보아, PxTpx는 배추좀나방에서 산화적 스트레스 방어 시스템에 관여하는 것으로 추정된다.

제10절 환경조건이 배추좀나방 과립병바이러스 병원활성에 미치는 영향

1. 서언

곤충에 질병을 일으키는 바이러스는 900여종에 14과(Family)가 알려져 있으며 이 중 Baculoviridae 속의 곤충핵다각체병바이러스(NPV)은 520여종, 과립병바이러스(GV)은 70여종이 보고되고 있다. 현재 등록된 바이러스 농약은 Baculoviridae 종으로부터 유래된 바이러스로 제한되고 있는데 이러한 것들은 바이러스의 미생물농약으로 잠재력은 매우 크다. 유럽에서는 매우 적은 수의 곤충바이러스가 상업적으로 이용되고 있다. 과수원에서 쓰이는 *Cydia pomonella*로부터 나온 GV는 인시목 곤충에서 사용되어 시장의 대부분을 차지하고 있다. 곤충바이러스는 인축과 환경에 무해하고 안정성이 높으며, 숙주곤충에 대한 특이성이 높고 누에나 꿀벌과 같은 익충에는 피해를 주지 않으면서 목적해충을 방제할 수 있다는 장점을 지니고 있다. 하지만 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.

바이러스를 살충제화 하여 해충방제에 널리 이용하고 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 안전하게 사용하여 살충효과를 증진시킬 수 있다. 특히 태양광선에서 나오는 자외선은 과립병바이러스를 둘러싸고 있는 결정성 단백질을 불활화 시키기 때문에 이를 방지하기 위한 연구가 중요하다. 따라서 과립병바이러스의 기주식물, 온도에 의한 영향, 보관조건 및 태양광선에 대한 불활화에 대한 안정성을 밝힘으로서 본 바이러스에 대한 방제효과를 높이고자 실시하였다.

2. 재료 및 방법

가. 배추좀나방 사육

시험용 배추좀나방(*Plutella xylostella*)은 나주시에 위치한 전라남도농업기술원 포장에서 유충을 채집하여 사육하였다. 사육은 아크릴케이지 사육상자를 이용하였으며, 사육조건은

25±1℃, 16L:8D이었고, 배추 유묘를 먹이로 제공하였다. 우화시킨 성충에 10% 설탕물에 제공하면서 산란을 유도하였다. 산란된 난은 매일 수거하여 작은 사육케이지로 옮겨 각 태별 크기와 산란 습성을 조사하였다.

나. 과립병바이러스 증식

배추좀나방 과립병바이러스는 농업과학기술원 농업해충과 곤충병리연구실에서 분양받아 배추잎 표면에 1ml의 바이러스 현탁액을 처리한 후 20분 정도 음건시켜 petridish (9×1cm)에 3령 유충 5마리와 함께 넣고 완전히 섭식하게 하면서 사망 직전의 유충을 수확하였다. 바이러스의 정제는 Su(1987)의 방법에 따랐다. 수확한 이병충의 10배(v/w)에 달하는 0.05M Tris-HCl buffer(pH 7.2)에 넣고 마쇄한 후 이중 거즈로 여과한 부유액을 3,000rpm에서 10분간 원심 분리하여 유충의 찌꺼기를 제거한 후 12,000rpm에서 다시 40분간 원심 분리하였다. 원심 분리된 침전물을 취하여 Tris-HCl buffer(pH 7.2)으로 부유시켜 40~60% 설탕 밀도구배에 중층하여 초원심분리기 Swing Rotor를 사용하여 25,000xg, 4℃, 40분간 원심 분리하여 바이러스를 순화하였다. 이 바이러스 용액을 -20℃ 냉동고에 보관하면서 사용하였다.

다. 기주식물에서 바이러스 안정성 및 병원성

기주 식물인 배추, 케일, 유채에 2령 유충을 접종한 후 바이러스를 1.0×10^9 OBs/ml를 살포하여 살충율을 조사하였으며 기주의 약해 유무를 관찰하였다.

라. 온도 조건이 불활성화에 미치는 영향

배추좀나방 2령유충 30마리에 PxGV를 1.0×10^9 OBs/ml의 농도로 처리하였다. 처리시간은 30℃, 40℃, 50℃, 60℃에서는 각각 1시간, 3시간, 5시간, 8시간을, 60℃, 70℃, 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 PxGV 불활성화에 미치는 영향

보관 조건이 PxGV 불활성화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 보관온도 조건을 -20℃, -5℃, 5℃, 15℃, 25℃, 상온으로 처리하였으며 접종 농도는 1.0×10^7 OBs/ml이며 매월 10일경

각 보관 온도별 바이러스를 10배 희석하여 인공 사료에 접종한 후 유충에게 섭식시켜 매일 사충수를 조사하였다.

바. 태양 광선이 PxGV의 불활성화에 미치는 영향

식물체상의 PxGV가 태양 광선에 의해 불활성화 되는 시기를 알아보기 위하여 케일을 기주로 하여 바이러스를 1.0×10^8 OBs/ml의 농도로 각각 잎의 앞면, 뒷면, 전면의 3가지 방법으로 살포한 뒤 태양광선에 노출시켰다. 바이러스를 처리한 기주는 노지, 하우스, 유리 온실의 3장소에 분산시켰으며 처리 후 48시간이 경과한 시점부터 2일에 한번씩 기주의 잎을 채집하여 2령 유충 20마리에 섭식 시켰으며 2반복하였다. 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 배추좀나방 2령 유충을 접종한 후 바이러스를 1.0×10^8 OBs/ml를 살포한 결과 모든 작물에서 60% 이상의 살충율을 보였으며, 평균 살충기간도 7일 정도였다. 그리고 약해 증상도 보이지 않아 기주 식물에 안정하였다(Table 1).

Table 1. Pathogenicity and phytotoxicity of PxGV on different host crops

Concentration (OBs/ml)	Chinese cabbage		Kale		Rape	
	mortality	period	mortality	period	mortality	period
1.0×10^8	56.4%	6.9d	60.3%	6.8d	58.4%	7.1d
Phytotoxicity	None		None		None	

온도가 배추좀나방 과립병바이러스 불활성화에 미치는 영향을 보기 위하여 온도별, 처리 시간별로 1×10^9 OBs/ml 처리하였을 때 고온에 대한 바이러스의 안정성은 60°C에서는 5분 이상을 가열했을 때 약 30% 정도의 병원성이 감소하였다. 70°C 이상의 고온에서는 1분 이상 가열했을 때 병원성이 70% 이상 감소하였으며 80°C 이상에서는 병원성을 완전히

상실하여 과립병바이러스는 60℃ 이상에서 5분 이상 가열시 병원성이 떨어지는 것을 알 수 있었다(Fig. 1).

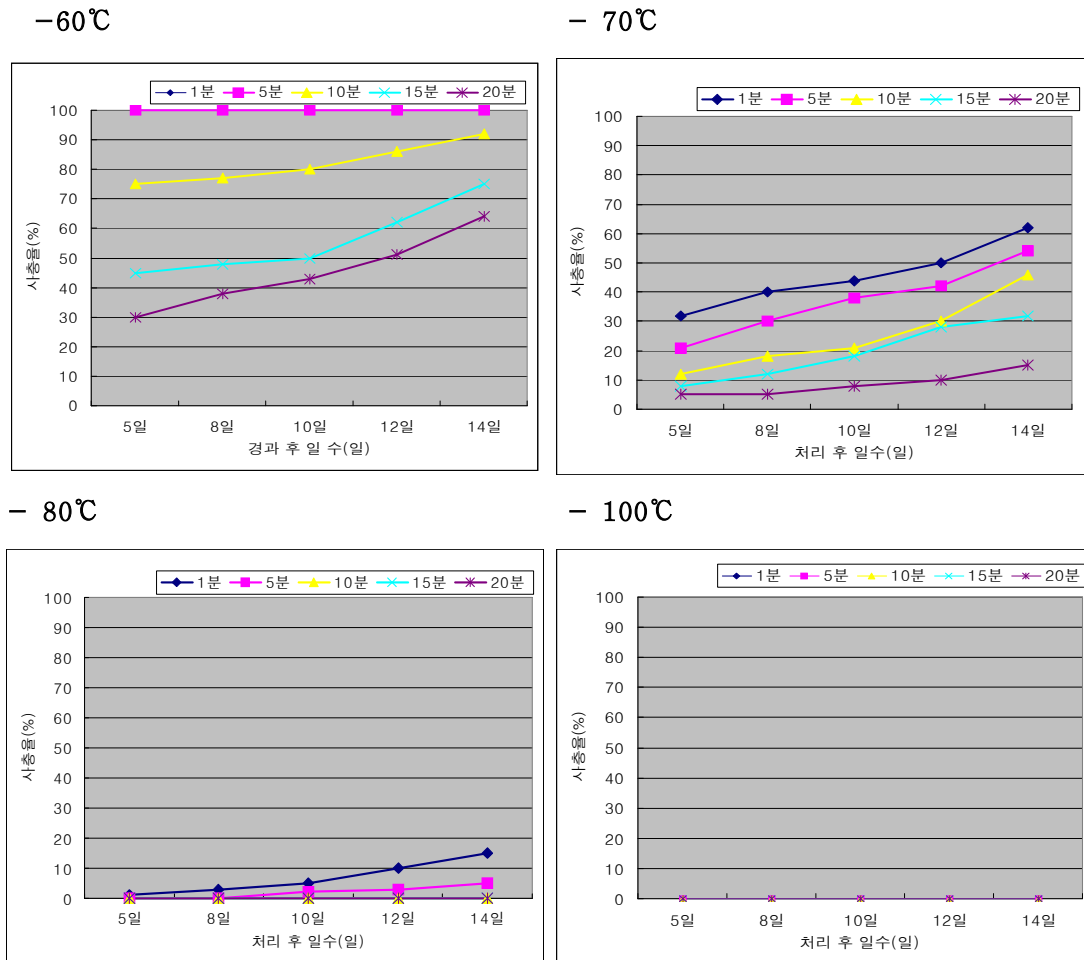


Fig. 1. Inactivity of PXGV on relative high temperature

배추좀나방 과립병바이러스는 40℃ 이하의 저온에서는 8시간 동안 장시간 처리했을 때도 바이러스 활동에는 크게 영향을 미치지 않았으나 50℃에서는 3시간 이상 처리 했을 때부터 병원성이 낮아졌으며 시간이 길어짐에 따라 병원성이 급격히 떨어졌다. 특히 60℃에서는 1시간 이상 경과할수록 병원성을 거의 상실하였다(Fig. 2).

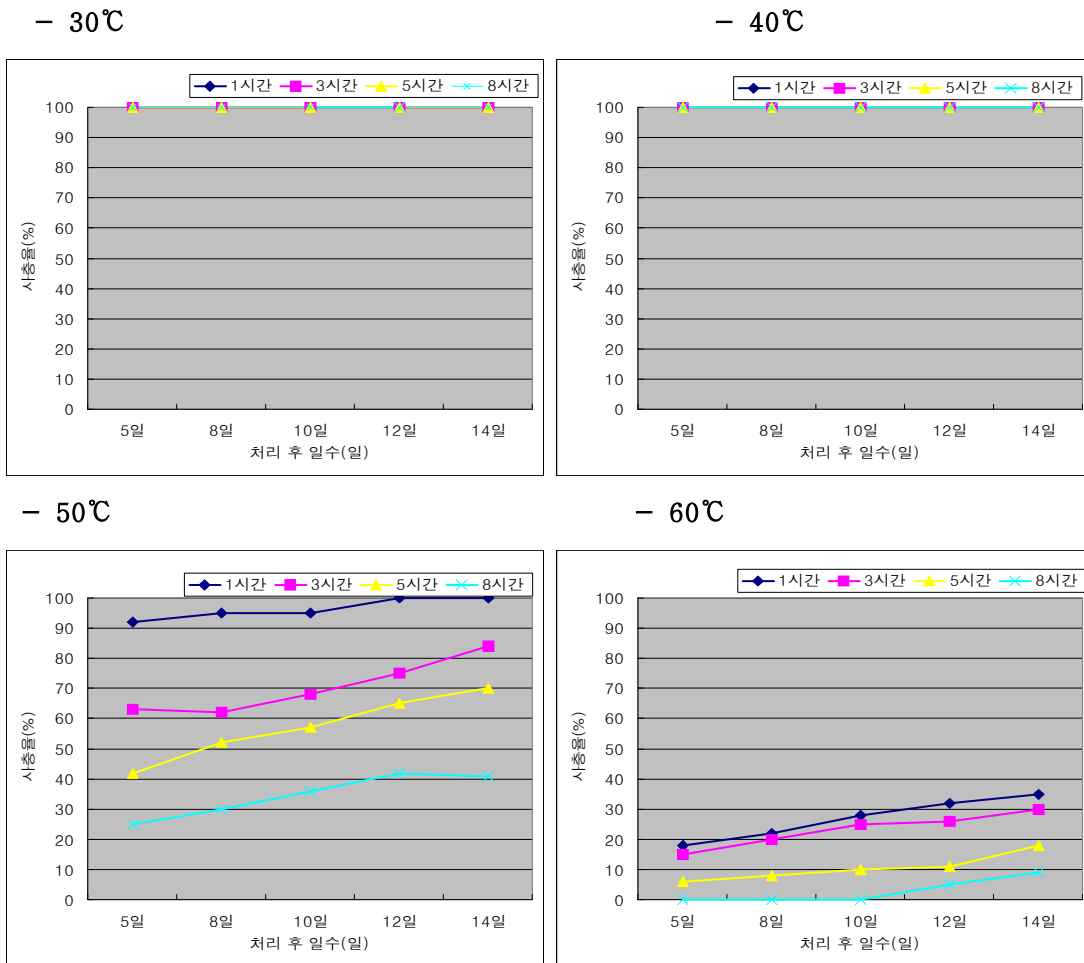


Fig. 2. Inactivity of PxGV on relative low temperature

배추좀나방 과립병바이러스를 장기간 사용하기 위하여 보관조건을 검정한 결과 -20°C 이하의 저온에 동결 보관하는 것이 6개월까지 병원성의 활력을 유지하였으며, 5°C 에서는 60일 정도까지는 병원성의 상실이 없었다. 그러나 상온이나 25°C , 15°C 는 60일 이후부터 병원성이 급격히 떨어지기 시작하였다. 배추좀나방 과립병바이러스를 안전하게 장기적으로 사용하기 위해서는 최소 0°C 이하에 보관하는 것이 안전하다고 판단된다(Fig. 3).

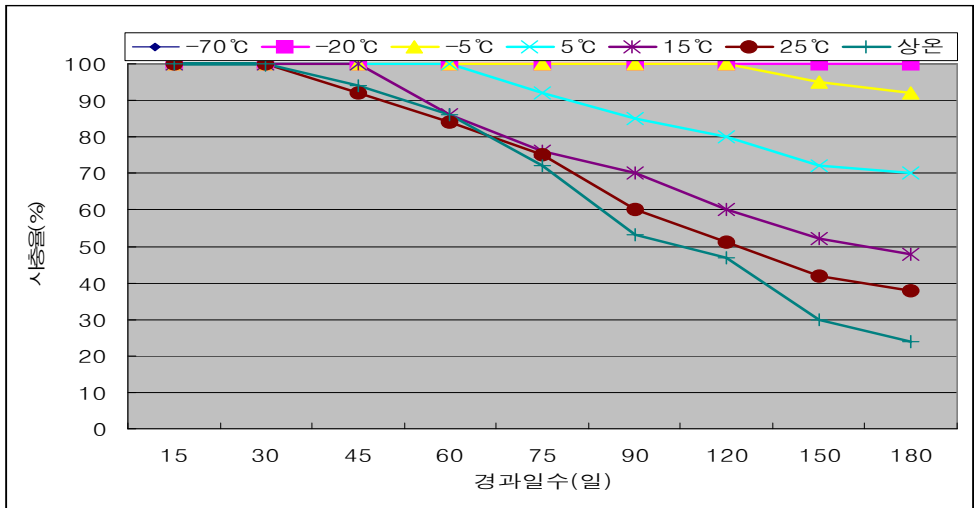


Fig. 3. Inactivity PxBV by storage temperature

태양 광선이 배추쭈나방 과립병바이러스의 불활성화에 미치는 영향을 보기 위하여 포트에 식재된 케일의 잎표면, 뒷면, 전체에 PxBV를 살포하여 온실, 비닐하우스, 노지 포장에 두고 태양광선에 방치 후 일별로 잎을 채취하여 2령 유충에 먹인 결과 온실에서는 잎의 앞면 살포구의 경우 2일 경과부터 병원성을 상실하기 시작하였으나 뒷면과 전체에 살포한 것은 5일째부터 병원성이 상실되었다(Fig. 4).

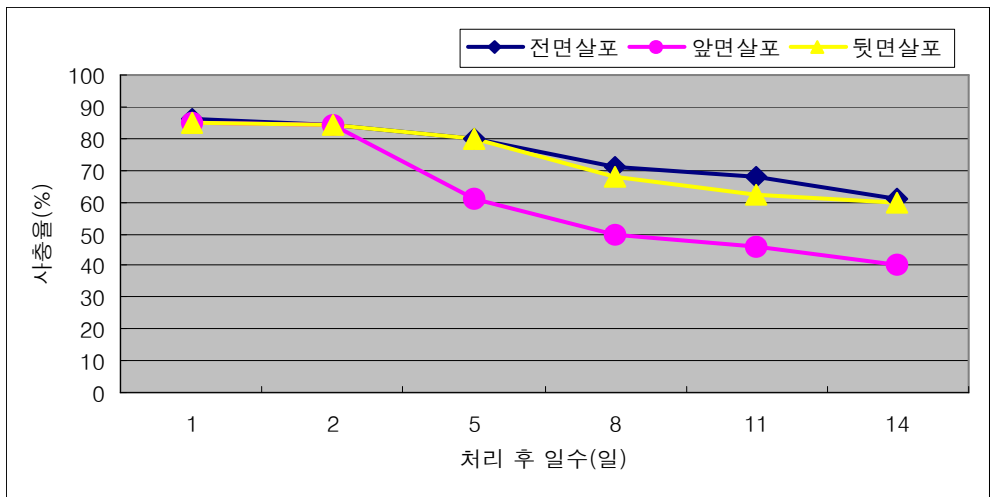


Fig. 4. Comparison of mortality of PxBV by spray site on greenhouse

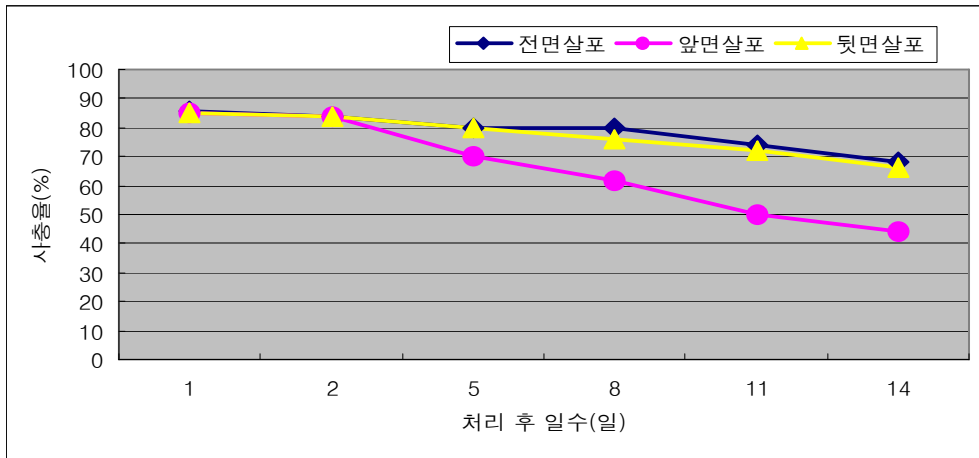


Fig. 5. Comparison of mortality of PxGV by spray site on PVC house

비닐하우스에서도 온실과 비슷하게 잎 앞면 살포는 2일 경과부터 병원성을 상실하기 시작하였으나 뒷면과 전체에 살포한 것은 5일 이후부터 병원성을 상실하여 표면보다는 안정하였다. 살충력은 표면이 14일에 50% 이하로 떨어졌으나 잎 뒷면과 전체에 살포한 것은 60% 이상 유지되었다(Fig. 5).

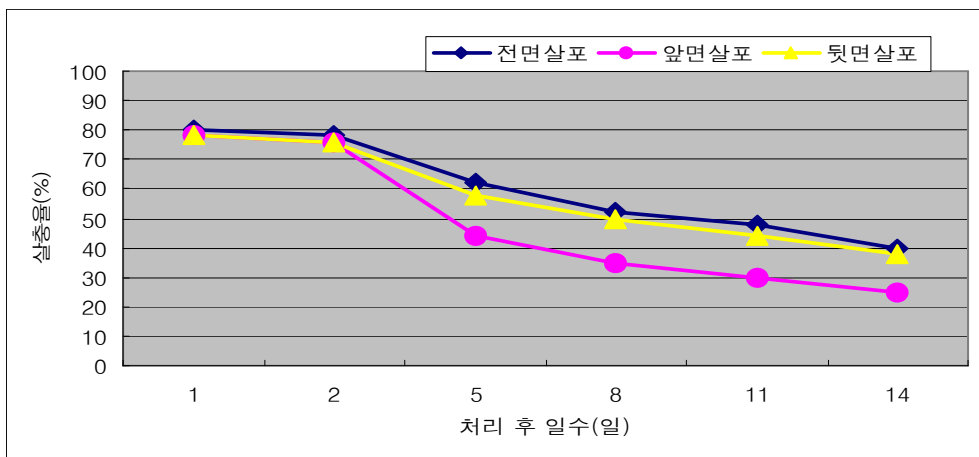


Fig. 6. Comparison of mortality of PxGV by spray site on the field

노지포장에서는 살포면에 관계없이 2일부터 불활성화가 나타나기 시작하였으나 뒷면과 전체는 불활성화 정도가 잎 앞면 살포보다는 낮았다(Fig. 6). 또한 온실, 비닐하우스보다는

빨리 병원성이 상실되어 노지포장에서 살포할 때는 병원활성을 높여주고 자외선에 의한 분해를 억제하거나 안정화 할 수 있는 물질의 탐색과 검정이 요구되었다.

4. 결과요약

과립병바이러스의 기주식물, 온도에 의한 영향, 보관조건 및 태양광선에 대한 불활성화에 대한 안정성을 밝힘으로서 본 바이러스에 대한 방제효과를 높이고자 시험한 결과는 다음과 같다.

기주 식물별로 배추좀나방 2령 유충을 접종한 후 바이러스를 1.0×10^8 OBs/ml를 살포한 결과 모든 작물에서 60% 이상의 살충율을 보였으며, 평균 살충기간도 7일 정도였다. 그리고 약해 증상도 보이지 않아 기주식물에 안정하였다.

바이러스의 안정성은 60℃에서는 5분 이상을 가열했을 때 약 30% 정도의 병원성이 감소하였다. 80℃ 이상에서는 병원성을 완전히 상실하여 과립병바이러스는 60℃ 이상에서 5분 이상 가열시 병원성이 떨어졌다.

배추좀나방 과립병바이러스는 40℃ 이하의 저온에서는 8시간 동안 장시간 처리했을 때도 바이러스 활동에는 크게 영향을 미치지 않았으나 60℃ 에서는 1시간 이상 경과할 수록 병원성을 거의 상실하였다.

배추좀나방 과립병바이러스를 장기간 사용하기 위하여 보관조건을 검정한 결과 -20℃ 이하의 저온에 동결 보관하는 것이 6개월까지 병원성의 활력을 유지하였으며, 5℃에서는 60일 정도 까지는 병원성의 상실이 없었다. 그러나 상온이나 25℃, 15℃는 60일 이후부터 병원성이 급격히 떨어지기 시작하였다.

케일의 잎표면, 뒷면, 전체에 PxGV를 살포하여 온실, 비닐하우스, 노지 포장에 두고 태양광선에 방치 후 일별로 잎을 채취하여 2령 유충에 먹인 결과 온실과 비닐하우스에서 잎의 앞면 살포구의 경우 2일 경과부터 병원성을 상실하기 시작하였으나 뒷면과 전체에 살포한 것은 5일째부터 병원성이 상실되었다. 살충력은 표면이 14일에 50% 이하로 떨어졌으나 잎 뒷면과 전체에 살포한 것은 60% 이상 유지되었다. 노지포장에서는 살포 면에 관계없이 2일부터 불활성화가 나타나기 시작하였다.

제11절 배추좀나방 과립병바이러스의 제형의 안정성 및 효과 검정

1. 서언

최근까지 해충방제에는 화학적 방제가 주를 이루고 있으며 이로 인하여 환경오염 및 생태계 파괴 등 심각한 문제로 대두되고 있다. 배추좀나방도 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.

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 년 간 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. 그러나 우리나라의 곤충 바이러스 연구는 곤충 바이러스의 분리·동정, 병원성 검정을 중심이고 외국의 곤충병리 연구현황과 비교할 때 국내 연구수준은 기주곤충과 바이러스의 대량증식 시설이나 바이러스 살충제 제형화 등에 관한 연구가 매우 미진하다. 곤충 병원성바이러스의 해충방제 이용확대를 위해 바이러스 살충제의 제형에 필요한 물질들의 안정성을 검정하고 가장 안정한 제형형태를 구명하기 위하여 실시하였다.

2. 재료 및 방법

가. 배추좀나방 증식

시험용 배추좀나방(*Plutella xylostella*)은 나주시에 위치한 전라남도농업기술원 포장에서 유충을 채집하여 사육하였다. 사육은 아크릴케이지 사육 상자를 이용하였으며, 사육조건은 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, 16L:8D이었고, 배추 유묘를 먹이로 제공하였다.

나. 과립병바이러스 증식

배추좀나방 과립병바이러스는 농업과학기술원 농업해충과 곤충병리연구실 에서 분양 받아 배추잎 표면에 1ml의 바이러스 현탁액을 처리한 후 20분 정도 음건시켜 petridish (9×1cm)에 3령 유충 5마리와 함께 넣고 완전히 섭식하게 하면서 사망 직전의 유충을 수확하였다. 바이러스의 정제는 Su(1987)의 방법에 따랐다. 수확한 이병충의 10배(v/w)에 달하는 0.05M Tris-HCl buffer(pH 7.2)에 넣고 마쇄한 후 이중 거즈로 여과한 부유액을 3,000rpm에서 10분간 원심 분리하여 유충의 찌꺼기를 제거한 후 12,000rpm에서 다시 40분간 원심 분리하였다.

원심 분리된 침전물을 취하여 Tris-HCl buffer(pH 7.2)으로 부유시켜 40~60% 설탕 밀도구배에 중층하여 초원심분리기 Swing Rotor를 사용하여 25,000xg, 4°C, 40분간 원심 분리하여 바이러스를 순화하였다. 이 바이러스 용액을 -20°C 냉동고에 보관하면서 사용하였다.

다. 바이러스 효과 유묘검정

포트에 배추(품종: 장생호배추)를 식재하여 20일이 경과한 뒤에 포트당 배추좀나방 2령 유충을 접종하여 한냉사로 망실을 만들어 1일 후에 바이러스를 1.0×10^6 , 10^7 , 10^8 OBs/ml 농도와 전착제인 TritonX-100(0.1%)를 혼합 살포하여 매일 일정한 시간에 사충율 및 피해율을 조사하였다. 처리 당 30마리씩 3반복 실시하였다. 중국종과 비교시험은 같은 방법으로 $1.0\times 10^4\sim 1.0\times 10^8$ 농도로 하여 살포 후 9일까지 사충율을 누적 조사하였다.

라. 바이러스 효과 포장 검정

바이러스 살충제의 살충효과는 전라남도 나주의 노지포장에서 2007년 4월 20일부터 6월 20일에 걸쳐 수행하였다. 노지에 배추(품종: 장생호배추)를 식재하여 20일이 경과한 뒤에 20주를 1구로 배추좀나방 2령 유충을 접종하였다. 1일 후에 사전밀도를 조사하고 시험구는

2×1.2×1.5m 크기의 한냉사로 망실을 만들어 유충의 이동을 방지하였다. 바이러스는 1.0×10^8 , 10^9 , 10^{10} OBs/ml 농도와 전착제인 TritonX -100(0.1%)를 혼합 살포하고 3일, 7일 14일 21일 후에 배추좀나방의 발생밀도, 사충율 및 피해율을 조사하였다. 처리 당 30마리씩 3반복 실시하였다.

마. 제형첨가제의 안정성 구명

제형화 검토를 위하여 보조제를 탐색하고자 제형에 들어가는 여러 가지 보조제를 인공 사료에 도포하여 배추좀나방 2령 유충을 접종하여 3일, 5일, 7일 동안 유충의 체중변화와 사충수를 조사하였다. 또한 배추, 유채, 갓의 유묘에 농도별로 직접 처리하여 약해 유무를 농촌진흥청 농업과학기술 연구조사 분석기준(2003년)에 준하여 조사하였다.

바. 바이러스 시제품의 살충효과 검정

제형별 살충율 검정은 (주)경농에서 제조한 유제, 입상수화제 등을 가지고 바이러스효과 포장 검정과 같은 방법으로 실시하였다.

사. 시제품의 약해시험

(주)경농에서 제작한 입상수화제 및 유제형태로 만든 시제품을 가지고 유채, 배추, 갓을 대상으로 10, 20, 50, 100, 200, 500배로 각각 살포하여 3일, 6일, 9일 후의 약해 증상을 확인하였다. 약해조사는 농촌진흥청 농업과학기술 연구조사분석기준(2003년)에 준하였다. 반점 및 윤문의 유무, 황변 또는 엽소 여부, 경엽의 위조, 위축여부 및 기타 생육 사항을 조사하여 약해는 0~5로 나누어 표시하였다.

아. 천적에 대한 시제품의 영향

칠레이리응애 성충의 약제에 대한 감수성 시험을 위하여 15cm의 페트리디쉬에 물을 충분히 적신 탈지면을 깔고, 그 위에 점박이응애가 접종된 직경 7cm 이상의 강낭콩잎을 아랫면이 위를 향하도록 올려놓고 붓으로 칠레이리응애의 성충을 30마리이상 접종하였다. 그리고 점박이응애가 접종되어있는 강낭콩 새순을 정단하여 탈지면 위의 강낭콩 잎에 올려 놓았다. 새순이 건조하지 않게 절단 부위를 탈지면에 접촉하여 놓고, 칠레이리응애 성충이 충분히 이동하도록 하였으며, 칠레이리응애가 이동한 새순을 추천농도로 희석된 약액에 20초간 침치한후, 키친타올로 침치된 강낭콩 새순의 수분을 제거하고, 점박이응

에만 있는 새로운 페트리디쉬의 강낭콩 잎에 올려놓았다. 성충은 약제처리 24시간 후에 생충수를 조사 하였다.

온실가루이좀벌, 황온좀벌, 콜레마니진디벌은 머미에 시제품을 추천농도 10배, 20배, 100배, 500배로 희석하여 살포한 후, 머미에서 우화되어 나오는 온실가루이좀벌과 콜레마니좀벌 성충의 수를 세어 우화율을 조사하였으며, 대조구의 경우 물 4ml를 같은 방법으로 살포하여 우화율을 조사하였다. 머미 형성시기에 따라 우화되는 날짜가 각기 다르기 때문에 약제 살포후 10일까지 관찰하여 누적 계산하였다.

애꽃노린재는 샐레에 시제품 10배, 20배, 100배, 500배 희석된 약액을 살포하고 음건하여 성충 30마리를 CO₂에 10초간 마취하여 붓으로 10마리씩 옮겨주고 처리된 페트리디쉬는 25±1℃, 상대습도 65±5%, 광주기16:8(L:D)로 조절하여 보관한 후 48시간째에 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 유묘검정

포트에 배추(품종: 장생호배추)를 식재하여 바이러스 농도별로 배추좀나방에 대한 유묘 검정을 실시한 결과 피해엽율에서 무처리는 21일 후에 45.8%의 피해를 보였으나 1.0×10⁶에서는 25.8%, 1.0×10⁷은 11.8%, 1.0×10⁸에서는 5.4%로 피해율이 낮아졌다(Fig. 1). 이는 배추좀나방이 곤충병원성 바이러스에 감염된 3일 이후에는 섭식을 제대로 하지 못한 결과로 보인다.

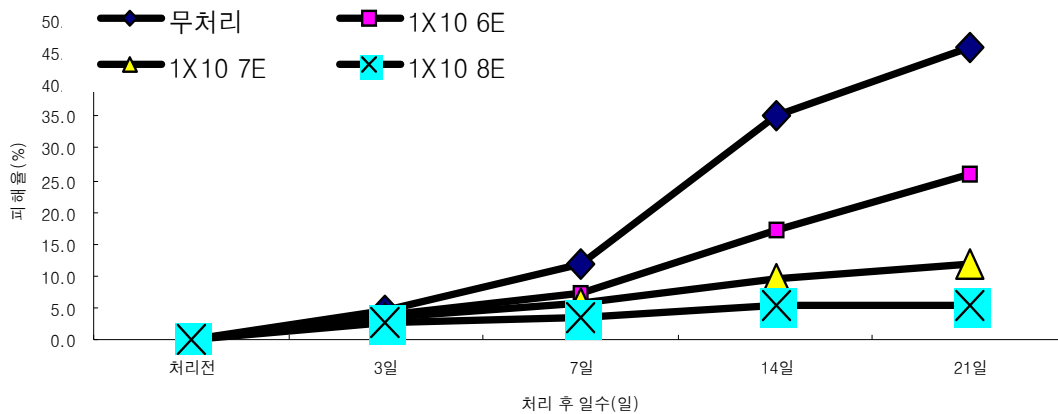


Fig. 1. Rate of damaged leaves on chinese cabbage by different PxGV concentration

배추좀나방 사충수 변화에 있어서는 처리 3일째부터 사충이 시작되어 바이러스 농도가 높을수록 높은 사충을 보였다. 무처리에서는 21일까지 1마리도 죽지 않았는데 비하여 1.0×10^6 에서는 17.3마리, 1.0×10^7 은 22마리, 1.0×10^8 에서는 28.3마리로 거의 대부분의 배추좀나방이 죽었다(Fig. 2). 이것을 방제가로 나타내면 Table 1과 같이 1.0×10^8 에서는 7일째에 70%, 21일째에는 94.3%의 방제를 보였다. 이보다 농도가 낮은 1.0×10^7 에서는 7일째에 51%, 21일에는 73.3%로 1.0×10^8 보다는 떨어지는 경향이였다.

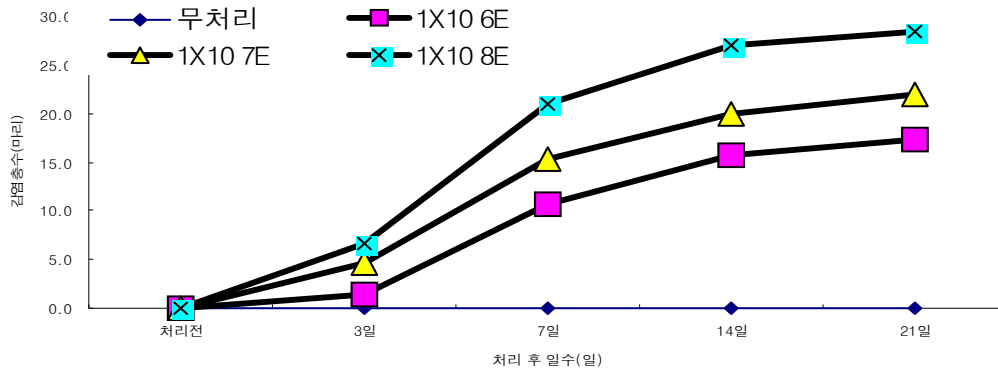


Fig. 2. Number of Dead larva of *Plutella xylostella* on chinese cabbage by different PxGV concentration

Table 1. Protection value of different PxGV concentration

Concentration (OBs/ml)	Protection value(%)			
	3d	7d	14d	21d
1X10 6E	4.4	35.7	52.3	57.7
1X10 7E	15.6	51.0	66.7	73.3
1X10 8E	22.2	70.0	90.0	94.3

중국 제원에서 확보한 중국 배추좀나방 과립병바이러스와 국내에서 채집된 종을 가지고 배추 유묘에서 병원성 비교한 결과 한국과 중국의 바이러스 효과는 우수한 편이었다. 두 균주 중에는 한국종이 저농도에서 고농도까지 모두 사충율이 높은 편이었다(Table 2).

Table 2. Comparison of Pathogenicity between PxGV-Kr and PxGV-Ch

Virus concentration (OBs/ml)	Mortality(%)	
	PxGV-Kr	PxGV-Ch
1X10 ⁴ E	51.4	43.2
1X10 ⁵ E	62.8	53.6
1X10 ⁶ E	68.9	60.4
1X10 ⁷ E	78.2	72.2
1X10 ⁸ E	82.9	79.8

나. 포장검정

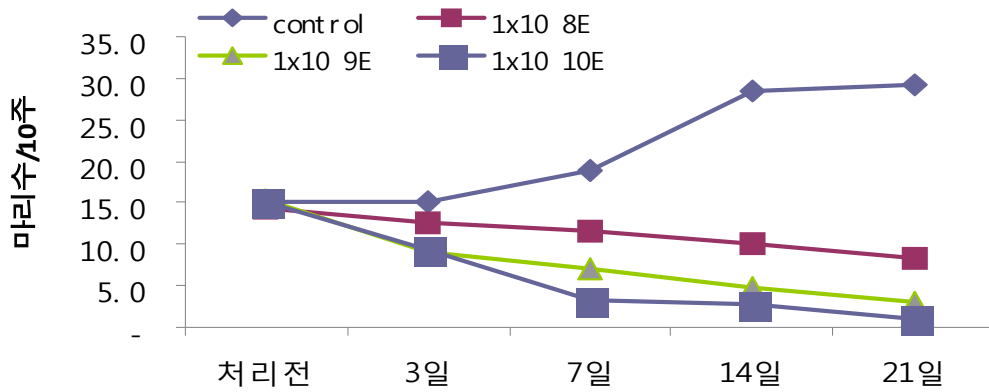


Fig. 3. Population fluctuation of *Plutella xylostella* by different PxGV concentration on chinese cabbage fields

노지에 배추(품종: 장생호배추)를 식재하여 배추좀나방 2령 유충을 접종하여 바이러스 살포농도에 따른 밀도변화를 본 결과 무처리에서는 21일째에 접종밀도보다 1.9배가 증가하였다. 그러나 바이러스를 1.0×10^8 , 10^9 , 10^{10} OBs/ml 농도로 살포한 구에서는 0.6배, 0.2배, 0.07배로 배추좀나방 밀도가 낮아졌다(Fig. 3). 이것은 바이러스에 의하여 배추좀나방이 사충이 되어 증식이 되지 못하였다.

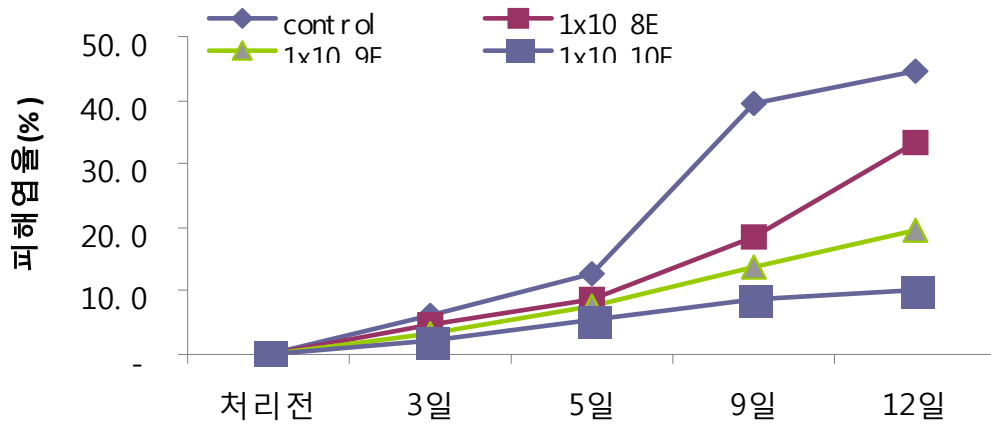


Fig. 4. Rate of damaged leaves of *Plutella xylostella* by different PxGV concentration on chinese cabbage fields

바이러스 접종농도별로 배추좀나방에 의한 피해엽율은 무처리에서 접종 3일째부터 6.0%의 피해를 보이기 시작하여 12일째에는 44.7%의 높은 피해율을 보였으나 1.0×10^8 에서는 4.7%, 33.3%, 1.0×10^9 은 3.3%, 19.7%, 1.0×10^{10} 에서는 2.3%, 10.0%의 각각에 대한 피해를 보여 배추좀나방의 밀도변화와 비슷한 결과를 나타냈다(Fig. 4).

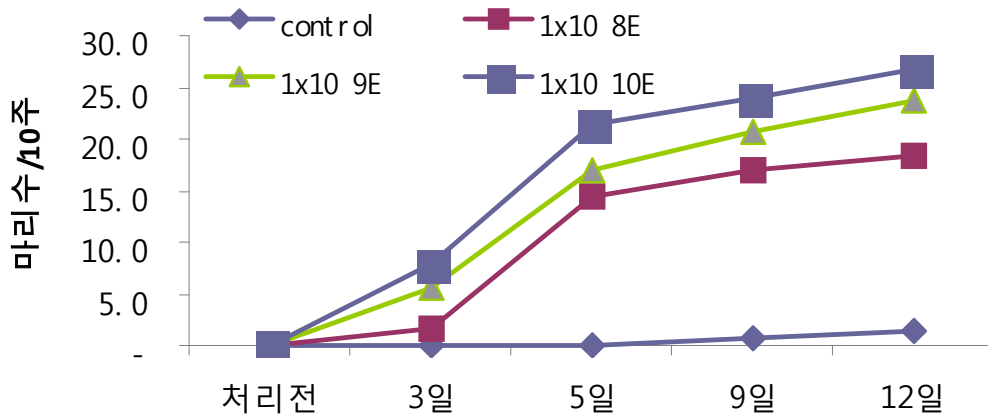


Fig. 5. Number of dead larva of *Plutella xylostella* by different PxGV concentration on chinese cabbage fields

노지포장에서 배추좀나방 사충수 변화 처리 3일째부터 사충이 시작되어 바이러스 농도가 높을수록 높은 사충을 보였다. 무처리에서는 12일까지 거의 죽지 않는데 비하여 1.0×10^8 에서는 19마리, 1.0×10^9 은 24마리, 1.0×10^{10} 에서는 27마리로 대부분의 배추좀나방이 죽었다(Fig. 5). 이것을 방제가로 나타내면 Table 3과 같이 1.0×10^8 에서는 5일째에 71.1%, 12일째에는 88.9%의 방제를 보였다. 이보다 농도가 낮은 1.0×10^8 에서도 12일에 61.1%, 1.0×10^9 에서는 78.9%로 1.0×10^{10} 보다는 떨어지는 경향이였다. 따라서 미생물 농약인 바이러스를 포장에서 살포 시 농도는 최소 1.0×10^8 이상은 되어야 할 것으로 판단된다.

Table 3. Protection value of different PxGV concentration on chinese cabbage fields

Concentration (OBs/ml)	Protection value(%)			
	3DAT	5DAT	9DAT	12DAT
1X10 ⁸ E	5.6	47.8	56.7	61.1
1X10 ⁹ E	19.0	56.7	68.9	78.9
1X10 ¹⁰ E	26.7	71.1	80.0	88.9

Table 4. Growth of *S. exigua* by additive for formulation

additive	Weight of pre-treat(mg)	Weight after treatment(mg)			Mortality (%)
		3DAT	5DAT	7DAT	
White carbon	0.29	0.38	0.90	3.02	3.4
Diatomite	0.28	0.41	0.91	3.04	0
Talc	0.29	0.44	0.93	3.08	0
Kaolin	0.29	0.31	0.54	1.98	52
CaCO ₃	0.28	0.44	0.90	3.09	0
Bentonite	0.28	0.37	0.68	2.12	47.2
control	0.29	0.45	0.96	3.12	0

제형화 검토를 위하여 보조제를 탐색하고자 제형에 들어가는 여러 가지 보조제를 인공사료에 도포하여 배추좀나방의 생육을 살펴본 결과 다른 첨가 물질들은 배추좀나방의

유충 생육에 지장을 주지 않았지만 Kaolin은 52%, Bentonite는 47.2%의 살충율을 보여 배추좁나방에 살충효과가 인정되었다(Table 4). 이것은 이 두 물질이 광물질, 즉 돌가루이기 때문에 인공사료에 따로 처리되어 섭식 시 기계적인 소화불량에 의한 것으로 생각되어진다. 태양자외선 차단제로 알려진 White carbon도 3.4%의 사충율을 보여 첨가 시 농도를 고려하여야 할 것으로 생각된다. 또한 이러한 물질들을 배추, 유채, 갯의 유묘에 농도별로 직접 처리하여 약해를 검정한 결과 다른 물질들은 문제가 없었으나 소포제와 계면활성제에서 1정도의 일부 약해가 발생하여 제형 시 농도를 조정하던지 다른 물질로 교체해야 할 것으로 생각되어진다(Table 5).

Table 5. Damage of additive for formulation

additive	dilute	Chinse cabbage	leaf mustard	Rape
Bentonite	500X	×	×	×
	1,000X	×	×	×
Kaoln	500	×	×	×
	1,000	×	×	×
CaCO ₃	500	×	×	×
	1,000	×	×	×
White carbon	500	×	×	×
	1,000	×	×	×
Diatomite	500	×	×	×
	1,000	×	×	×
Talc	500	×	×	×
	1,000	×	×	×
antifoaming	0.2%	×	1	×
surfactant	7%	1	×	×

다. 시제품 포장검정

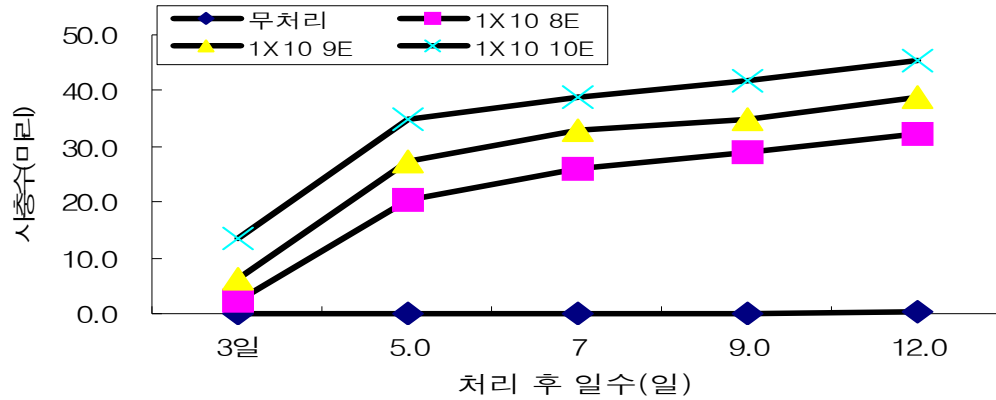


Fig. 6. Mortality of prototype PxGV WG on chinese cabbage fields

(주) 경농에서 제작한 시제품을 가지고 포장에서 살충효과를 검정한 결과 입상수화제에서도 바이러스 현탁액과 마찬가지로의 효과를 나타냈는데 모든 농도에서 3일째부터 사충수가 증가하기 시작하여 9일까지 지속되었으며 농도가 높을수록 사충율이 높았다(Fig. 6). 유제에 있어서도 입상수화제와 같은 경향이었으나 사충율이 약간 떨어졌다(Fig. 7).

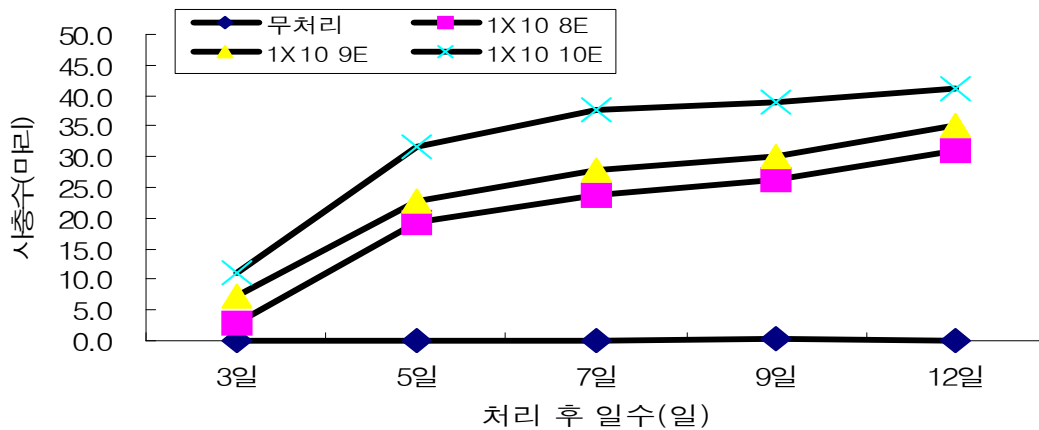


Fig. 7. Mortality of prototype PxGV EC on chinese cabbage fields

바이러스 시제품 형태별로 방제가를 살펴보면(Table 6), 입상수화제 1.0×10^{10} 에서는 5일에 70%로 현탁액 71.1보다 낮았으나 12일에는 91.1%로 현탁액 85.6%보다 높았다.

그러나 유제에서는 전체적으로 현탁액보다 낮아 바이러스 제형 형태는 입상수화제가 우수하였다. 바이러스 제형 시제품에서도 1.0×10^8 에서 방제가는 전부 60%를 넘어 현장에서 적용할 수 있다고 생각된다. 다만 배추좀나방 과립병바이러스는 바이러스 수거 시 너무 많은 배추좀나방을 사육해야 하기 때문에 경제적으로 비용이 많이 소요되어 다른 미생물제와 혼합 살포가 필요하다고 생각된다.

Table 6. Protection value of PxGV formulation

Formulation	Concent.	Protection value(%)				
		3DAT	5DAT	7DAT	9DAT	12DAT
WG	1X10 ⁸ E	4.4	41.1	52.2	57.8	64.4
	1X10 ⁹ E	12.2	54.4	65.6	70.0	77.8
	1X10 ¹⁰ E	26.7	70.0	77.8	83.3	91.1
EC	1X10 ⁸ E	4.2	38.9	47.8	52.2	62.0
	1X10 ⁹ E	11.6	45.6	55.6	60.0	70.4
	1X10 ¹⁰ E	22.2	63.3	75.6	77.8	82.4
PxGV	1X10 ⁸ E	5.6	47.8	56.7	61.1	62.2
	1X10 ⁹ E	19.0	56.7	68.9	78.9	75.6
	1X10 ¹⁰ E	26.7	71.1	80.0	88.9	85.6

배추좀나방의 피해가 심한 유채, 배추, 갯을 대상으로 과립병바이러스 시제품을 제형 형태별로 입상수화제와 유제를 가지고 희석농도 10, 50, 100, 200, 500배로 각각 살포하여 3일, 6일, 9일 후의 약해 증상을 농촌진흥청 농업과학기술 연구조사 분석기준(2003년)에 의하여 조사하였다. 입상수화제는 유채에서는 10배에서도 약해가 나오지 않았지만 배추와 갯에서는 1정도의 약해가 나타났다. 유제의 경우는 10배에서는 1~2의 약해가 50배에서는 배추에서 1정도의 약해가 나타났다. 제형형태에서 약해는 입상수화제에서 더 안전할 것으로 생각되며 시제품들은 100배 이상으로 사용해야 할 것으로 판단된다(Table 7).

Table 7. Chemical injury of prototype PxGV

Formulation	Dilution	Degree of chemical injury		
		Rape	Chinese cabbage	Leaf mustard
WG	10X	0	1	1
	50X	0	0	0
	100X	0	0	0
	200X	0	0	0
	500X	0	0	0
EC	10X	1	2	1
	50X	0	1	0
	100X	0	0	0
	200X	0	0	0
	500X	0	0	0

라. 시제품의 천적에 미치는 영향

시제품의 천적에 미치는 영향을 평가하기 위한 시험에서 PxGV-SC는 칠레이리응애에 대해 10배와 20배에서는 영향을 주었지만 100배에서는 3일째에 23.3%, 500배에서는 5일째에 57.8%로 영향이 아주 낮았다. PxGV-WG는 PxGV-SC 보다 영향이 훨씬 적어 10에서도 15.6%가 살아남았으며 20배에서는 3일째까지 54.4%가 살아남아 칠레이리응애가 있는 경우 WG 형태로 100이상으로만 살포한다면 거의 문제가 없을 것으로 판단되었다(Table 8, 9). 산란수 역시 PxGV-SC에서는 20배까지 거의 산란을 하지 못하였으나 WG 제형에서는 10에서 0.3개, 20배에서 3.3개까지 산란을 하여 이들 모두 부화하였다(Table 10). 따라서 PxGV는 칠레이리응애에 대해 추천농도에서 거의 독성을 나타내지 않은 것으로 판단되었다.

Table 8. Survival rate of *Phytoseiulus persimilis* after spray of PxGV-SC

Dilution	No. of tested mites	Survival rate(%)		
		1 DAT	3 DAT	5 DAT
10X	30.0	4.4	4.4	0.0
20X	30.0	10.0	16.7	7.8
100X	30.0	31.1	23.3	17.8
500X	30.0	68.9	67.8	57.8
Control	30.0	87.8	85.6	76.7

Table 9. Survival rate of *Phytoseiulus persimilis* after spray of PxGV-WG

Dilution	No. of tested mites	Survival rate(%)		
		1 DAT	3 DAT	5 DAT
10X	30.0	18.9	18.9	15.6
20X	30.0	54.4	54.4	27.8
100X	30.0	73.3	70.0	41.1
500X	30.0	75.6	76.7	55.6
Control	30.0	87.8	85.6	76.7

Table 10. Number of eggs laid of *Phytoseiulus persimilis* after spray of PxGV

Dilution	Number of eggs laid/3 days	
	GV-SC	GV-WG
10X	0	0.3
20X	0	3.3
100X	4.7	12.6
500X	15.3	11.3
Control	18.3	18.3

Table 11. Survival rate of *Orius strigicollis* after spray of PxGV

Dilution	Survival rate/2 days	
	GV-SC	GV-WG
10X	14.3	14.3
20X	23.9	19.0
100X	38.1	23.8
500X	47.6	33.3
Control	66.7	66.7

으뜸애꽃노린재의 경우 100배 살포한 경우 SC와 WG에서 각각 38.1%와 23.8%의 생존율을 나타내었는데 무처리의 경우 66.7%만이 생존한 것과 비교하면 상당히 높은 편이

였으며 500배에서는 SC에서 47.6%까지 높아졌다(Table 11).

콜레마니진디벌은 SC 100배 처리에서 42.9%로 무처리인 66.7%와 비교하여 낮지 않았으나 WG의 경우 500배에서도 23.8%로 아주 낮은 편이어서 제형에 따라 각각의 천적에 미치는 영향이 다를 수 있었다(Table 12). 따라서 이들 바이러스를 살포할 경우 사전에 어떤 천적이 투입되었는지를 파악하거나 투입 계획 등을 사전에 인지하여 바이러스 제형별 살포농도를 결정하는 것이 현명할 것으로 보인다.

Table 12. Survival rate of *Aphidius colemani* after spray of PxGV

Dilution	Survival rate/2 days	
	GV-SC	GV-WG
10X	9.5	0
20X	19.0	4.7
100X	42.9	19.0
500X	66.7	23.8
Control	66.7	66.7

온실가루이좀벌과 황온좀벌의 우화율은 무처리에서 각각 62.7%와 54.0%로 나타났는데 온실가루이좀벌은 각 바이러스 제형에 따라 무처리보다 높거나 낮게 나타나 이들 바이러스가 거의 영향을 미치지 않은 것으로 보였으며, 황온좀벌에 대해서는 약간 영향을 주는 것으로 보였다(Table 13, 14).

Table 13. Emergency rate of *Encasia formosa* after spray of PxGV

Dilution	Emergency rate/10 days	
	GV-SC	GV-WG
10X	51.4	53.6
20X	47.8	69.5
100X	51.1	57.4
500X	56.8	68.0
Control	62.7	62.7

Table 14. Emergency rate of *Eretmocerus eremicus* after spray of PxGV

Dilution	Emergency rate/10 days	
	GV-SC	GV-WG
10X	49.4	33.6
20X	32.4	43.2
100X	44.8	56.8
500X	50.7	58.1
Control	54.0	54.0

4. 결과요약

근충 병원성바이러스의 해충방제 이용확대를 위해 바이러스 살충제의 제형에 필요한 물질들의 안정성을 검정하고 가장 안정한 제형형태를 구명하기 위하여 실시한 시험 결과는 다음과 같다.

유묘 검정을 실시한 결과 피해엽율에서 무처리는 21일 후에 45.8%의 피해를 보였으나 1.0×10^6 에서는 25.8%, 1.0×10^7 은 11.8%, 1.0×10^8 에서는 5.4%로 피해율이 낮아졌다. 이는 배추좀나방이 근충병원성 바이러스에 감염된 3일 이후에는 섭식을 제대로 하지 못한 결과로서 1.0×10^8 에서 7일째 70%, 21일째에는 94.3%의 방제가를 보였다.

중국 제원에서 확보한 중국 배추좀나방 과립병바이러스와 국내에서 채집된 종을 가지고 배추 유묘에서 병원성 비교한 결과, 두 균주 중에는 한국종이 저농도에서 고농도까지 모두 사충율이 높은 편이었다.

노지에 배추좀나방 2령 유충을 접종하여 바이러스 살포농도에 따른 밀도변화를 본 결과 무처리에서는 21일째에 접종밀도보다 1.9배가 증가하였다. 그러나 바이러스를 1.0×10^8 , 10^9 , 10^{10} OBs/ml 농도로 살포한 구에서는 0.6배, 0.2배, 0.07배로 배추좀나방 밀도가 낮아졌다.

바이러스 접종농도별로 배추좀나방에 의한 피해엽율은 무처리에서 접종 3일째부터 6.0%의 피해를 보이기 시작하여 12일째에는 44.7%의 높은 피해율을 보였으나 1.0×10^8 에서는 각각 4.7%, 33.3%를 나타냈다.

노지포장에서 배추좀나방 사충수의 변화는 처리 3일째부터 사충이 시작되어 바이러스 농도가 높을수록 높은 사충을 보였다. 무처리에서는 12일까지 거의 죽지 않는데 비하여 1.0×10^8 에서는 19마리로 대부분의 배추좀나방이 죽어, 1.0×10^8 에서는 12일째에 88.9%의

방제가를 보였다.

Kaolin은 52%, Bentonite는 47.2%의 살충율을 보여 배추좀나방에 살충효과가 인정되었다. (주) 경농에서 제작한 시제품의 포장 살충효과를 검정한 결과 입상수화제에서도 바이러스 현탁액과 마찬가지로 효과를 나타냈는데 유제에 있어서 사충율이 약간 떨어졌다. 입상수화제는 유채에서 10배에서도 약해가 나오지 않았지만 배추와 갯에서는 1정도의 약해가 나타나 시제품들은 100배 이상으로 사용해야 할 것으로 판단된다.

시제품의 천적에 미치는 영향을 평가하기 위한 시험에서 PxGV-SC는 칠레이리응애에 대해 10배와 20배에서는 영향을 주었지만 100배에서는 3일째에 23.3%, 500배에서는 5일째에 57.8%로 영향이 아주 낮았다. 으뜸애꽃노린재와 콜레마니진디벌 WG 제제에서 약간 높은 독성을 보였으나 온실가루이좀벌과 황온좀벌에서는 Sc에 비해 더 낮은 독성을 보여 천적 종류에 따라 제형별 독성은 달랐다.

제12절 배추좀나방 과립병바이러스 제형화

1. 서언

생물농약의 경우 안정적인 약효를 갖는 화학농약에 비해 살아있는 활성을 유지시켜야 하기 때문에 제형에 따라 효과는 차이가 매우 크다고 할 수 있다. 특히 본 연구의 활성 성분인 GV의 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 제형화 연구에서부터 다양한 제형검토를 통하여 본 연구에서 최적의 제형을 선별하게 되었다.

2. 재료 및 방법

가. 기초 제형화

1) 제형화 연구

가) 제형화 검토방법

과립병바이러스(GV)의 2차 제형화 검토를 위하여 1차년도 제형화 검토를 통하여 확인된 처방을 기초로 하여 약효증진을 위한 보조제를 탐색하고자 문헌자료와 자체적으로 축적된 정보를 바탕으로 다양한 보조제를 검토하여 최적의 보조제를 선별하여 처방검토를 실시하였으며 처방검토된 시료는 제형별로 농약관리법상의 검사 및 검토항목을 검사한 다음 생물시험용 시료로 사용하였으며 각 처방의 약효 및 약해시험 결과를 바탕으로 최종 처방을 확립하였다.

나) 약효증진용 보조제의 탐색

주관연구기관으로부터 입수한 과립병바이러스 원제를 대상으로 1차년도 제형화 검토를 통하여 확인된 처방을 기초로 하여 제형화 가능성을 검토하였다. 생물농약의 경우, 원료 물질의 특성상 제제가 불가능한 경우도 발생할 수 있으므로 제형화 가능성에 대한 사전 검토는 필수적이라고 할 수 있다. 2차년도의 경우, 약효증진을 위한 보조제의 선별이 필수적이었으므로 다양한 보조제를 선별하여 보조제별 이화학적 특성을 검토하고 과립병바이

러스 원제와의 혼용 가능성 및 약효증진 가능성을 체크하여 처방검토에 이용하였다. 생물 농약에 있어서 적절한 보조제의 선발은 유효성분의 안정성 및 활성에 미치는 영향이 크므로 처방검토에 필수적인 과정이라고 할 수 있다.

다) 제형화 다양성 검토

과립병바이러스의 상품화를 위한 다양한 제형검토를 위하여 1차적으로 검토된 액상 수화제 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.

2) 환경영향성 연구

가) 과립병바이러스(GV)의 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 평가에 이용하는 것이 용이하다.

④ 순화 및 검역

동물을 입수한 후 암·수 각 10마리를 검역·부검하고, 나머지 동물은 동물실험실 사육 환경 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 사육상자

순화 및 시험기간 중 폴리카보네이트 사육상자(270×220×130mm)에 대패밥 깔집(삼육 실험동물, 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) 투여약량 수준설정 및 약제조제

① 투여약량 설정

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

② 투여약량 수준별 실험동물수

실험동물수는 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 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 20ml의 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 10ml/kg(체중)으로 설정하였다.

(4) 시험물질의 투여

① 사료의 절식

투여개시 3~4시간 전부터 절식을 시킨 후 투여 3~4시간 후 사료급이를 재개하였다.

② 투여경로 및 투여방법

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

(5) 관찰 및 조사항목

① 일반중독증상 및 치사동물

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

② 체중측정

시험에 이용된 모든 동물에 대하여 투여 당일부터 D1, D3, D7, D10, D14일째 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.

나) 과립병바이러스(GV)의 랫드를 이용한 단회 투여 경피독성시험

(1) 시험계

① 동물종(계통) : SPF Rat(SD계)

② 공급원

명 칭 : 삼육실험동물연구소

주 소 : 경기도 오산시 서랑동 77-1번지 ☎ 031-372-3636

대표이사 : 배 치 남

③ 시험계의 선택사유

농촌진흥청고시 제2004-4호 농약의 독성시험기준과 방법에 랫드를 사용하도록 되어 있으며 SD계통은 농약의 경피독성 시험에 널리 사용되고 있어 기초 자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과의 해석 및 평가에 이용하는 것이 용이하다.

④ 순화 및 검역

동물을 입수한 후 암·수 각 10마리를 검역·부검하고, 나머지 동물은 동물실험실 사육 환경 하에서 7일간 순화시키면서, 피모상태 및 건강을 확인한 후 건전한 개체 선별하여 시험에 이용하였다.

(2) 사육환경

① 사육환경

본 실험의 환경은 온도 21±1℃, 상대습도 55±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 사육상자(420×260×180mm)에 대패밥 깔집(삼육 실험동물, 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) 투여약량 수준설정 및 약제조제

① 투여약량 설정

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

② 투여약량 수준별 실험동물수

실험동물수는 농약의 등록시험기준과 방법(농촌진흥청고시 제2004-4호)에서와 같이 암·수 각 5마리를 이용하였고, 개체식별은 미부에 유성매직을 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 20ml의 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 5ml/kg(체중)으로 설정하였다.

(4) 시험물질의 투여

① 사료의 절식

경피독성시험의 투여경로상 절식시간은 따로 두지 않았다

② 투여경로 및 투여방법

시험개시 전 약제처리를 위한 공시동물의 등부위를 동물용 제모기를 이용하여 체표면 적의 약 10%를 제모하고, 조제된 공시약제를 체표에 곁고루 바른 후 약제유실을 방지하기

위하여 임상용 거어즈로 고르게 감고 비자극성 테이프로 고정시켜주었다. 약제처리 24시간이 경과한 후 도포물을 제거하고, 한편 피부에 남아 있는 공시약제를 증류수를 이용하여 잘 닦아주었다.

(5) 관찰 및 조사항목

① 일반중독증상 및 치사동물

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

② 체중측정

시험에 이용된 모든 동물에 대하여 투여 당일부터 D1, D3, D7, D10, D14일째 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.

다) 과립병바이러스(GV)의 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 급성어독성시험의 경우 시험어류는 잉어를 사용하도록 되어 있으며, 농약의 어독성시험에 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 유리수조 장치를 이용,

시험용수는 지하수를 이용하여 수온은 22~24℃, 조도는 200~300Lux의 범위 내에서 사육, 순화시켰다.

② 사료 급여

사료는 잉어용 부상성 고형사료(부산관상어용식품, 한국)를 1일 1회 급여 하였다.

(3) 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 어류는 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 담가서 23±1℃로 유지시켰다.

⑤ 산소공급

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

⑥ 사료 급여

시험개시 48시간 전부터 시험 종료시까지 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.

(4) 관찰 및 검사항목

① 일반중독증상 및 생사율

처리당일은 1시간에서 4시간까지는 매시간, 그 이후에는 24, 48, 72, 96시간 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.

라) 과립병바이러스(GV) 액상수화제의 마우스를 이용한 단회 투여 경구독성시험

(1) 시험계

① 동물종(계통) : SPF Mouse(ICR계)

② 공급원

명 칭 : 삼육실험동물연구소

주 소 : 경기도 오산시 서랑동 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 시험결과의 해석 및 평가에 이용하는 것이 용이하다.

④ 순화 및 검역

동물을 입수한 후 암·수 각 10마리를 검역·부검하고, 나머지 동물은 동물실험실 사육 환경 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 사육상자

순화 및 시험기간 중 폴리카보네이트 사육 상자($270\times 220\times 130\text{mm}$)에 대패밥깔집(삼육 실험동물, 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), 한국)를 음수는 상수도수를 대형 고압멸균기를 이용하여 멸균 후 자유 섭식 및 섭수 시켰다.

(3) 투여약량 수준설정 및 약제조제

① 투여약량 설정

기초시험 투여약량인 $5,000\text{mg/kg}$ 에서 암·수 공히 시험을 수행하였다.

② 투여약량 수준별 실험동물수

실험동물수는 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 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 20ml의 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 10ml/kg(체중)으로 설정하였다.

(4) 시험물질의 투여

① 사료의 절식

투여개시 3~4시간 전부터 절식을 시킨 후 투여 3~4시간 후 사료급이를 재개 하였다.

② 투여경로 및 투여방법

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

(5) 관찰 및 조사항목

① 일반중독증상 및 치사동물

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

② 체중측정

시험에 이용된 모든 동물에 대하여 투여 당일부터 D1, D3, D7, D10, D14일째 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) 과립병바이러스(GV) 액상수화제의 랫드를 이용한 단회 투여 경피독성시험

(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 독성시험에 널리 사용되고 있어 기초 자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과의 해석 및 평가에 이용하는 것이 용이하다.

④ 순화 및 검역

동물을 입수한 후 암·수 각 10마리를 검역·부검하고, 나머지 동물은 동물실험실 사육환경 하에서 7일간 순화시키면서, 피모상태 및 건강을 확인한 후 건전한 개체 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 사육상자($420\times 260\times 180\text{mm}$)에 대패밥 깔집(삼육 실험동물, 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), 한국)를 음수는 상수도수를 대형 고압멸균기를 이용하여 멸균 후 자유 섭식 및 섭취 시켰다.

(3) 투여약량 수준설정 및 약제조제

① 투여약량 설정

기초시험 투여약량인 $4,000\text{mg/kg}$ 에서 암·수 공히 시험을 수행하였다.

② 투여약량 수준별 실험동물수

실험동물수는 농약의 등록시험기준과 방법(농촌진흥청고시 제2004-4호)에서와 같이 암수 각 5마리를 이용하였고, 개체식별은 미부에 유성매직을 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 20ml의 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 5ml/kg(체중)으로 설정하였다.

(4) 시험물질의 투여

① 사료의 절식

경피 독성시험의 투여 경로상 절식시간은 따로 두지 않았다

② 투여경로 및 투여방법

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

(5) 관찰 및 조사항목

① 일반중독증상 및 치사동물

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

② 체중측정

시험에 이용된 모든 동물에 대하여 투여 당일부터 D1, D3, D7, D10, D14일째 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) 과립병바이러스(GV) 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 회

③ 시험계의 선택사유

농촌진흥청고시 제 2004-4호 농약의 독성시험기준과 방법에 급성어독성시험의 경우 시험어류는 잉어를 사용하도록 되어 있으며, 농약의 어독성시험에 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 수조장치를 이용, 시험용수는 지하수를 이용하여 수온은 22~24℃, 조도는 200~300Lux의 범위 내에서 사육, 순화시켰다.

② 사료 급여

사료는 잉어용 부상성 고품사료(부산관상어용식품)를 1일 1회 급여 하였다.

(3) 시험농도 수준설정 및 약제조제

① 시험농도 설정

기초시험 투여농도인 10ppm에서 시험을 수행하였다.

② 시험용 수조

원통형의 유리제품 10 L (φ24×30cm) 용기를 사용하였다.

③ 시험어류의 크기 및 시험어류 수

잉어의 크기는 전장 5cm 정도의 것으로 선별하였으며, 수조 당 시험 어류는 5마리를 수용하고, 시험농도 수준 당 2개의 수조를 사용하였다.

④ 시험용수 및 수온

시험용수는 지하수를 72시간 이상 정체시켰다가 사용하였으며, 수온의 조절은 항온수조 내에 시험용 유리 수조를 담가서 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 로 유지시켰다.

⑤ 산소공급

시험기간 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.

(4) 관찰 및 검사항목

① 일반중독증상 및 생사율

처리당일은 1시간에서 4시간까지는 매시간, 그 이후에는 24, 48, 72, 96시간 간격으로 일반중독증상 및 생사율을 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) 과립병바이러스(GV) 입상수화제의 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 평가에 이용하는 것이 용이하다.

④ 순화 및 검역

동물을 입수한 후 암·수 각 10마리를 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 사육상자

순화 및 시험기간 중 폴리카보네이트 사육 상자($270\times 220\times 130\text{mm}$)에 대패밥 깔집(삼육 실험동물, 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) 투여약량 수준설정 및 약제조제

① 투여약량 설정

기초시험 투여약량인 $5,000\text{mg/kg}$ 에서 암·수 공히 시험을 수행하였다.

② 투여약량 수준별 실험동물수

실험동물수는 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 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 20ml의 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 10ml/kg(체중)으로 설정하였다.

(4) 시험물질의 투여

① 사료의 절식

투여개시 3~4시간 전부터 절식을 시킨 후 투여 3~4시간 후 사료급이를 재개 하였다.

② 투여경로 및 투여방법

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

(5) 관찰 및 조사항목

① 일반중독증상 및 치사동물

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

② 체중측정

시험에 이용된 모든 동물에 대하여 투여 당일부터 D1, D3, D7, D10, D14일째 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) 과립병바이러스(GV) 임상수화제의 랫드를 이용한 단회 투여 경피독성시험

(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 경피독성시험에 널리 사용되고 있어 기초자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과의 해석 및 평가에 이용하는 것이 용이하다.

④ 순화 및 검역

동물을 입수한 후 암·수 각 10마리를 검역·부검하고, 나머지 동물은 동물실험실 사육환경 하에서 7일간 순화시키면서, 피모상태 및 건강을 확인한 후 건전한 개체 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($420\times 260\times 180\text{mm}$)에 대패밥 깔집(삼육 실험동물, 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) 투여약량 수준설정 및 약제조제

① 투여약량 설정

기초시험 투여약량인 $4,000\text{mg/kg}$ 에서 암·수 공히 시험을 수행하였다.

② 투여약량 수준별 실험동물수

실험동물수는 농약의 등록시험기준과 방법(농촌진흥청고시 제2004-4호)에서와 같이 암·수 각 5마리를 이용하였고, 개체식별은 미부에 유성매직를 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 20ml의 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 5ml/kg(체중)으로 설정하였다.

(4) 시험물질의 투여

① 사료의 절식

경피 독성시험의 투여경로 상 절식시간은 따로 두지 않았다

② 투여경로 및 투여방법

시험개시 전 약제처리를 위한 공시동물의 등부위를 동물용 제모기를 이용하여 체표면적의 약 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.

(5) 관찰 및 조사항목

① 일반중독증상 및 치사동물

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

② 체중측정

시험에 이용된 모든 동물에 대하여 투여 당일부터 D1, D3, D7, D10, D14일째 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) 과립병바이러스(GV) 입상수화제의 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 회

③ 시험계의 선택사유

농촌진흥청고시 제 2004-4호 농약의 독성시험기준과 방법에 급성 어독성 시험의 경우 시험어류는 잉어를 사용하도록 되어 있으며, 농약의 어독성시험에 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 수조장치를 이용, 시험용수는 지하수를 이용하여 수온은 22~24℃, 조도는 200~300Lux의 범위 내에서 사육, 순화시켰다.

② 사료 급여

사료는 잉어용 부상성 고품사료(부산관상어용식품, 한국)를 1일 1회 급여 하였다.

(3) 시험농도 수준설정 및 약제조제

① 시험농도 설정

기초시험 투여농도인 10ppm에서 시험을 수행하였다.

② 시험용 수조

원통형의 유리제품 10 L (φ24×30cm)용기를 사용하였다.

③ 시험어류의 크기 및 시험어류 수

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

④ 시험용수 및 수온

시험용수는 지하수를 72시간 이상 정체시켰다가 사용하였으며, 수온의 조절은 항온수조 내에 시험용 유리 수조를 담가서 23±1℃로 유지시켰다.

⑤ 산소공급

시험기간 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.

(4) 관찰 및 검사항목

① 일반중독증상 및 생사율

처리당일은 1시간에서 4시간까지는 매시간, 그 이후에는 24, 48, 72, 96시간 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

과립병바이러스(GV) 원제의 경우, 주관연구기관으로부터 입수당시 물을 포함하는 액상의 현탁액이었으므로 우선적으로 액상제형을 대상으로 제형 검토를 실시하였다. 먼저 과립병 바이러스 원제는 물에 불용성인 관계로 액제는 검토가 불가능하였고 이에 따라 현탁액의 형태로 제조가 가능한 액상수화제를 대상으로 제형을 검토하였다. 액상수화제는 농약관리 법상 액상 또는 점질액상으로서 물에 희석하였을 때 수화되는 농약을 말하는 것으로 물에 불용성인 성분을 포함하는 원제에 적합한 제제형태이며 제제검토시 중요 검토항목으로는 분산제의 선발과 입도관리 그리고 저장안정성의 확보를 들 수 있다. 먼저 분산제의 경우

다양한 선택이 가능하지만 기초적인 제형화 가능성에 대한 정보를 얻고자 일반적인 액상수화제의 범용적 처방에 사용되는 것을 선별하여 이용하였고 입도문제는 기본적인 액상수화제의 자체 관리규격에 준하여 검토하였다. 저장안정성은 주로 경시적인 층분리와 입도성장과 관련된 것으로 10% 미만의 함량을 가지는 액상수화제의 경우, 처방검토시 저장안정성을 확보하기 위하여 증점제 및 보조제에 대한 고려가 필수적이므로 여러가지 실험을 통하여 적절한 조합과 요구되는 함량을 결정하였다. 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 원가절감이라는 측면에서도 매우 중요하기 때문이다.

문헌자료 검토결과, 다양한 보조제에 대하여 과립병병바이러스의 약효증진 효과시험을 수행한 것으로 나타났으나 대부분 그 효과가 미미하였다. 그러나 boric acid의 경우, 실제적인 효과가 인정된 경우가 있었으므로 이것을 선별하여 제형화 연구에 사용하였다. 선별된 보조제에 대한 제형화 검토결과, 적정함량으로 제제하는데 어려움이 없었으므로 기존의 액상수화제의 처방에 포함시켜 처방을 확립하였다.(Table 1)

이상의 결과로 확립된 처방은 다음의 Table 1과 같으며 확립된 처방은 농약의 검사 및 검토항목에 해당되는 이화학적 검토를 마친 다음, 시험용 시료로 분양하였다. 분양된 액상수화제 시료의 활성시험 결과, 활성이 양호하였고 분쇄에 의하여 활성이 크게 영향을 받지 않는 것으로 나타남에 따라 보다 안정적이고 효과적인 처방을 확립하고자 다양한 보조제의 검토를 통한 추가적인 검토를 실시하였다.

2) 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 고상제형에 대한 추가적인 검토를 실시하였다. 고상제형의 경우는 세계적인 추세가 환경친화적이고 생력적인 제형을 선호함에 따라 기존의 수화제를 개선한 입상수화제로 검토를 실시하였다. 입상수화제는 농약관리법상 입상으로서 물에 희석하여 사용하는 농약을 말하는 것으로 제제검토 시 계면활성제의 선별과 입도관리 그리고 저장안정성의 확보가 중요하다.

Table 1. Recipes of GV suspension concentrate

Formulation recipe	Material	Content(%)		Note
		Recipe 1	Recipe 2	
	GV tech	2	2	3×10^8 OBs/ml
	Dispersing agent	5	5	DAN
	Anti-freezing agent	10	10	AFG
	Additive	3	3	ASA
	Thickening agent	0.2	0.2	XG
	Antiseptic agent	0.1	0.1	PRE
	Antifoaming agent	0.2	0.2	DFA
	Diluent	Rest	Rest	Water
	Total	100	100	
Method	Instrument	Dynamill	Blender	
	Milling	○	×	
Physico- chemical properties	Items	Results		Note
	Formulation type	SC		
	Apperance	viscous liquid		
	Suspensibility	Good	Good	
	Fineness	Good	Bad	325mesh 98% up
Storage stability	Good	Bad	50°C, 4 weeks	

Table 2. Recipes of GV water-dispersible granule

Formulation recipe	Material	Content(%)		Note
		Recipe 1	Recipe 2	
	GV tech.	2	2	3×10^8 OBs/ml
	Dispersant 1	2	2	
	Dispersant 2	5	5	
	Wetter	3	3	
	Additive	5	5	
	Diluent	Rest	Rest	CaCO ₃
	Total	100	100	
Method	Instrument	Oven	유동층	
	Drying Temp.	65°C	80°C	
	Drying Time	2hr	5min	
Physico- chemical properties	Items	Results		Note
	Formulation type	WG		
	Apperance	granule		
	Suspensibility	Good	Good	
	Fineness	Good	Good	325m 98% up
Storage stability	Good	Good	50°C, 4 weeks	

먼저 계면활성제의 경우 증량제의 종류에 따라 다양한 종류가 사용되고 있지만 원가 및 제제상의 선호도 등을 고려하여 습윤제와 분산제를 복합적으로 선별하여 이용하였고 입도는 기본적인 입상수화제의 자체 관리규격에 준하여 검토하였다. 입상수화제의 저장 안정성은 액상수화제와는 달리 주로 경시적인 분말도의 악화현상과 입도성장 문제로 원제가 액상일 경우 더욱 큰 문제가 된다. 하지만 과립병바이러스 원제의 경우 외관은 액상이지만 주성분은 고상이었으므로 증량제와 계면활성제 그리고 보조제의 적절한 조합을 선별하여 이러한 문제를 극복하였다. 또한 저함량 입상수화제의 경우 원제보다는 기타부재에 의한 영향이 크므로 적절한 부재의 선별은 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 2).

건조작업은 실생산에서도 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. 제형화 검토결과, 과립병바이러스는 분쇄작업이나 건조온도에 의하여 활성이 크게 영향을 받지 않는 것으로 나타남에 따라 액상 제형의 경우는 액상수화제로, 고상 제형의 경우는 입상수화제로 제제가 가능하여 다양한 제품 개발이 가능할 것으로 판단되었고, 적절한 보조제를 선별한다면 이에 따른 약효상승 효과를 통하여 과립병바이러스가 가지는 단점들을 극복할 수 있을 것으로 기대되었다.

나. 제형별 제형화

1) 약효증진용 보조제의 탐색

과립병바이러스(GV) 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 유효성분, 수화성 그리고 분말도를 이화학적 검사항목으로 하고 있다. 그러므로 제제검토 시 분산제의 선별과 입도관리 그리고 저장안정성의 확보가 매우 중요하다. 이에 따라 액상수화제의 기본처방은 1차년도 시험결과에 기초하여 분산제 및 보조제의 종류와 함량을 결정하였다.

문헌자료 검토결과, 다양한 보조제에 대하여 과립병바이러스의 약효증진 효과시험을

수행한 것으로 나타났으나 대부분 그 효과가 미미하였다. 그러나 boric acid의 경우, 핵다각체병바이러스에서도 실제적인 효과가 인정되었으므로 이것을 선발하여 제형화 연구에 사용하였다. 선발된 보조제에 대한 제형화 검토결과, 적정함량으로 제제 하는데 어려움이 없었으므로 기존의 액상수화제의 처방을 활용하여 시험용 처방을 확립하였다(Table 3).

Table 3. Final recipe of GV suspension concentrate for efficacy test

Formulation recipe	Material	Content(%)	Note
	GV tech	1	4×10^9 OBs/ml
	Dispersing agent	5	DAN
	Anti-freezing agent	10	AFG
	Additive	3	ASA
	Stabilizing agent	1	BA
	Thickening agent	0.2	XG
	Antiseptic agent	0.1	PRE
	Antifoaming agent	0.2	DFA
	Diluent	Rest	Water
	Total	100	
Physico-chemical properties	Apperance	viscous liquid	
	Suspensibility	good	
	Fineness	good	325mesh 98% up
	Storage stability	good	50°C, 4 weeks

이상의 결과로 확립된 처방에 따라 원부원료를 배합한 다음, 1차년도의 검토에서 활성에 영향이 없었던 습식 분쇄기인 Dyno mill을 이용하여 액상수화제를 제조하였다. 제조된 시료는 농약관리법상 검사항목에 해당하는 수화성과 분말도를 측정한 결과, 검사기준에 부합하여 생물활성 시험 및 독성시험용 시료로 분양하였다.

분양된 액상수화제 시료의 활성시험 결과, 활성이 양호하였고 분쇄에 의하여 활성이 크게 영향을 받지 않는 것으로 나타났으나, 분쇄과정에서 발생하는 미세한 손상과 수분에 장기 보존성의 문제로 보다 안정적인 처방을 확립하고자 다양한 보조제의 검토를 통한 추가적인 제형 검토를 실시하였다.

2) 제형화 다양성 검토

과립병바이러스의 상품화를 위한 다양한 제형검토를 위하여 1차적으로 검토된 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 과립병바이러스 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 제제검토 시 계면활성제의 선발과 입도관리 그리고 저장안정성의 확보가 중요하다. 이에 따라 1차년도 제형화 검토를 통하여 확인된 처방을 기초로 하여 약효증진 효과가 기대되는 다양한 보조제를 탐색하여 처방 검토를 실시하였다.

과립병바이러스의 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. 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. 입상수화제의 시험처방은 1차년도 제형화 검토를 통하여 확인된 처방을 기초로 하고 상기 3종의 보조제들은 적정량을 포함시켜 4가지 처방을 확립하였다(Table 4).

Table 4. Recipes of GV water-dispersible granule for selection of adjuvants

Formulation recipe	Material	Content(%)				Note
		Recipe 1	Recipe 2	Recipe 3	Recipe 4	
	GV tech.	5	5	5	5	1.5×10 ¹¹
	Dispersant 1	2	2	2	2	DAS
	Dispersant 2	5	5	5	5	DAP
	Wetter	3	3	3	3	WAS
	Additive	5	5	5	5	DCA
	Adjuvant 1	1	—	—	—	BA
	Adjuvant 2	—	1	—	—	OBA
	Adjuvant 3	—	—	1	—	OBB
	Adjuvant 4	—	—	—	1	OBC
	Diluent	Rest	Rest	Rest	Rest	CaCO ₃
	Total	100	100	100	100	

Physico-chemical properties	Item	Results	Note
	Wettability	good	
	Fineness	good	325mesh 98% up
	Storage stability	good	50℃, 4 weeks

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 약효상승효과가 우수하였고 형광표백제들 간에는 구조적으로 차이를 보여 stilbene disulfonic acid 유도체인 fluorescent brightener 28 (free acid, Sigma-Aldrich 제품; OBA)가 가장 우수한 효과를 보였다.

이상의 결과로부터 과립병바이러스는 고상 제형인 입상수화제로도 제제가 가능하여 다양한 제품 개발이 가능할 것으로 판단되었고, 적절한 보조제를 선별한다면 이에 따른 약효상승 효과를 통하여 과립병바이러스가 가지는 단점들을 극복할 수 있을 것으로 기대되었다.

3) 최종처방의 선발

최종처방을 선발하고자 액상 제형인 액상수화제와 고상 제형인 입상수화제에 대하여 약효 및 안정성을 비교 시험을 실시하였다. 입상수화제의 경우, 이화학적 특성과 함께 보관 및 수송적인 측면에서 보다 안정적이고 효과적이었으나 제조적인 측면에서 분쇄, 조립 및 건조공장에 의한 원가상승 요인이 발생하였다.

반면, 액상수화제의 경우는 활성측면에서 보다 우수한 특성을 보였으나 보관 및 수송적인 측면에서 문제가 있었다. 이에 따라 액상수화제에 적합한 GV 원제를 개발하고자 동결건조 방식대신 이물질을 제거하여 정제된 액상 원분을 제조하였다. 이를 통하여 저장 안정성의 확보와 분쇄에 의한 원가상승 요인을 제거할 수 있었다.

이에 따라 액상수화제를 개발제형으로 정하여 과립병바이러스 액상수화제 최종처방을 선발하였다(Table 5).

최종검토를 위하여 과립병바이러스(1.0×10^{11} OBs/ml) 원료 액상을 수급하여 처방검토에 활용하였으며, 최종처방에는 과립병바이러스의 약효증진을 위하여 처방검토를 통하여 선발된 약효 증진제를 포함시켰으며, 원가절감을 위하여 Dynamill 대신 Blender를 사용하여 단순 교반하여 제조하였다.

Table 5. Final recipe of GV suspension concentrate for efficacy test

Formulation recipe	Material	Content(%)	Note
	GV tech	10	1×10^{11} OBs/ml
	Dispersing agent	5	DAN
	Anti-freezing agent	10	AFG
	Additive	3	ASA
	Stabilizing agent	1	BA
	Thickening agent	0.2	XG
	Antiseptic agent	0.1	PRE
	Diluent	Rest	Water
	Total	100	
Physico-chemical properties	Apperance	viscous liquid	
	Suspensibility	good	
	Fineness	good	325mesh 98% up
	Storage stability	good	50°C, 4 weeks

제조된 시료는 농약관리법상의 검사 및 검토항목을 검사한 결과, 농약관리법상에 정한 관리규격에 합당한 우수한 이화학적 특성을 보임에 따라 이후의 시험인 이화학시험, 생물 시험 및 독성시험용 시료로 사용하였다.

시험결과, 최종제품은 안정적인 이화학적 특성과 우수한 생물활성 그리고 인축 및 환경에 낮은 독성을 보임에 따라 과립병바이러스 개발을 위한 최종처방을 확립할 수 있었다.

다. 환경영향성 연구

(가) 과립병바이러스(GV)의 마우스를 이용한 단회 투여 경구독성시험

GV(3×10^9 OBs/ml)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 5,000mg/kg에서 암·수 공히 시험을 수행하였다.

② 투여약량 수준별 실험동물수

실험동물수는 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 대조군을 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 현탁 시켜 조제하였다.

⑤ 투여액량의 설정

투여액량은 시험에 이용되는 마우스의 체중과 약액 투여량을 고려하여 투여 액량 수준별 공히 10ml/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 10mg/kg 용량을 경구로 위내에 삽입, 1회에 한하여 강제투여 하였다.

(3) 결과 및 고찰

① 치사동물 및 LD50값

이상의 시험결과로 본 시험의 시험물질인 GV(3×10^9 PIBs/ml)는 기초시험 약량인 5,000mg/kg에서 시험기간(14일)동안 암수 모두 치사개체가 발견되지 않았다. 따라서 본 시험물질의 반수치사약량(LD50)은 > 5,000mg/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 체중기록 결과로 보아 약제투여군은 무처리 대조군과 비교하여 유의차가 없었다.

④ 부검소견

육안적 부검소견으로 전 개체에서 특이한 이상소견은 관찰되지 않았다.

(4) 요 약

① 시험물질을 암수 모두 기초시험 투여약량인 5,000mg/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 > 5,000mg/kg으로 독성분류상 저독성으로 확인되었다.

(나) 과립병바이러스(GV)의 랫드를 이용한 단회 투여 경피독성시험

GV(3×10^9 OBs/ml)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 4,000mg/kg에서 암수 공히 시험을 수행하였다.

② 투여약량 수준별 실험동물수

실험동물수는 농약의 등록시험기준과 방법(농촌진흥청고시 제2005-7호)에서와 같이 암수 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 20ml의 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 5ml/kg(체중)으로 설정하였다.

(2) 시험물질의 투여

① 사료의 절식

경피 독성시험의 투여경로 상 절식시간은 따로 두지 않았다

② 투여경로 및 투여방법

시험개시 전 약제처리를 위한 공시동물의 등부위를 동물용 제모기를 이용하여 체표면 적의약 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 GV(3×10^9 PIBs/ml)는 기초시험 약량인 4,000mg/kg에서 시험기간(14일)동안 암수 모두 치사개체가 발견되지 않았다. 따라서 본 시험물질의 반수치사약량(LD50)은 > 4,000mg/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 체중기록 결과로 보아 약제투여군은 무처리대조군과 비교하여 유의차가 없었다.

④ 부검소견

육안적 부검소견으로 전 개체에서 특이한 이상소견은 관찰되지 않았다.

(4) 요약

- ① 시험물질을 암·수 모두 기초시험 투여약량인 4,000mg/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 내부장기에 대한 영향은 없었다.

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

(다) 과립병바이러스(GV)의 잉어를 이용한 단회 투여 급성독성시험

GV(3×10^9 OBs/ml)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 10ppm에서 시험을 수행하였다.

② 시험용 수조

원통형의 유리제품 10 L ($\phi 24 \times 30$ cm)용기를 사용하였다.

③ 시험어류의 크기 및 시험어류 수

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

④ 시험용수 및 수온

시험용수는 지하수를 72시간 이상 정체시켰다가 사용하였으며, 수온의 조절은 항온수조 내에 시험용 유리 수조를 담가서 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 시험기간 동안 유지시켰다.

⑤ 산소공급

시험기간 중 시험 중인 수조 내에 인위적인 산소공급은 시키지 않았다.

⑥ 사료 급이

시험개시 48시간 전부터 시험 종료 시까지 사료 급이를 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 GV(3×10^9 OBs/ml)는 기초시험 투여농도인 10ppm으로 10마리의 잉어에 투여한 결과 시험기간(96h) 중 치사개체가 발견되지 않았다. 따라서 본 약제의 반수치사약량(LC50)은 48시간에서 > 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 1.01 ± 0.21 g, 전장은 평균 4.08 ± 0.26 cm이었다.

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°C (최저 22.0°C - 최고 23.0°C)였다.

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

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

(라) 과립병바이러스(GV) 액상수화제의 마우스를 이용한 단회 투여 경구독성시험
GV 액상수화제에 대한 급성경구독성을 마우스(ICR계통)를 이용하여 1회 경구처리한 후 2주간 치사 수, 일반중독증상, 체중 변화 및 부검소견을 관찰 조사한 결과는 다음과 같다.

(1) 투여약량 수준설정 및 약제조제

① 투여약량 설정

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

② 투여약량 수준별 실험동물수

실험동물수는 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 대조군을 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 10ml/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 10mg/kg 용량을 경구로 위내에 삽입, 1회에 한하여 강제투여 하였다.

(3) 결과 및 고찰

① 치사동물 및 LD50값

이상의 시험결과로 본 시험의 시험물질인 GV 액상수화제는 기초시험 약량인 5,000mg/kg에서 시험기간(14일)동안 암수 모두 치사개체가 발견되지 않았다.

따라서 본 시험물질의 반수치사약량(LD50)은 > 5,000mg/kg으로 독성 분류상 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 5,000mg/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 내부장기에 대한 영향은 없었다.

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

(마) 과립병바이러스(GV) 액상수화제의 랫드를 이용한 단회 투여 경피 독성시험

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

(1) 투여약량 수준설정 및 약제조제

① 투여약량 설정

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

② 투여약량 수준별 실험동물수

실험동물수는 농약의 등록시험기준과 방법(농촌진흥청고시 제2005-7호)에서와 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 20ml의 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 5ml/kg(체중)으로 설정하였다.

(2) 시험물질의 투여

① 사료의 절식

경피 독성시험의 투여경로 상 절식시간은 따로 두지 않았다

② 투여경로 및 투여방법

시험개시 전 약제처리를 위한 공시동물의 등부위를 동물용 제모기를 이용하여 체표면 적의약 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 GV 액상수화제는 기초시험 약량인 4,000mg/kg에서 시험기간(14일)동안 암수 모두 치사개체가 발견되지 않았다.

따라서 본 시험물질의 반수치사약량(LD50)은 > 4,000mg/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 체중기록 결과로 보아 약제투여군은 무처리대조군과 비교하여 유의차가 없었다.

④ 부검소견

육안적 부검소견으로 전 개체에서 특이한 이상소견은 관찰되지 않았다.

(4) 요 약

- ① 시험물질을 암·수 모두 기초시험 투여약량인 4,000mg/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 > 4,000mg/kg으로 독성분류상 저독성으로 확인되었다.

(바) 과립병바이러스(GV) 액상수화제의 잉어를 이용한 단회 투여 급성독성시험
GV 액상수화제에 대한 급성어독성을 잉어를 이용하여 96시간 동안 생사 수, 일반중독 증상을 관찰하고 체중 및 전장을 조사한 결과는 다음과 같다.

(1) 시험농도 수준설정 및 약제조제

① 시험농도 설정

기초시험 투여농도인 10ppm에서 시험을 수행하였다.

② 시험용 수조

원통형의 유리제품 10 L (φ24×30cm)용기를 사용하였다.

③ 시험어류의 크기 및 시험어류 수

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

④ 시험용수 및 수온

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

⑤ 산소공급

시험기간 중 시험 중인 수조 내에 인위적인 산소공급은 시키지 않았다.

⑥ 사료 급여

시험개시 48시간 전부터 시험종료시까지 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 GV 입상수화제는 기초시험 투여농도인 10ppm으로 10마리의 잉어에 투여한 결과 시험기간(96h) 중 치사개체가 발견되지 않았다. 따라서 본 약제의 반수치사약량(LC50)은 48시간에서 > 10ppm, 96시간에서 > 10ppm으로 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 $22.8^{\circ}C$ (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 어독성III급으로 확인되었다.

(사) 과립병바이러스(GV) 입상수화제의 마우스를 이용한 단회 투여 경구독성시험 GV 입상수화제에 대한 급성경구독성을 마우스(ICR계통)를 이용하여 1회 경구처리한 후 2주간 치사 수, 일반중독증상, 체중 변화 및 부검소견을 관찰 조사한 결과는 다음과 같다.

(1) 투여약량 수준설정 및 약제조제

① 투여약량 설정

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

② 투여약량 수준별 실험동물 수

실험동물 수는 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 대조군을 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 현탁 시켜 조제하였다.

⑤ 투여액량의 설정

투여액량은 시험에 이용되는 마우스의 체중과 약액 투여량을 고려하여 투여액량 수준별 공히 10ml/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 10mg/kg 용량을 경구로 위내에 삽입, 1회에 한하여 강제투여 하였다.

(3) 결과 및 고찰

① 치사동물 및 LD50값

이상의 시험결과로 본 시험의 시험물질인 GV 입상수화체는 기초시험 약량인 5,000mg/kg에서 시험기간(14일)동안 암수 모두 치사개체가 발견되지 않았다.

따라서 본 시험물질의 반수치사약량(LD50)은 > 5,000mg/kg으로 독성 분류상 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) 요 약

- ① 시험물질을 암·수 모두 기초시험 투여약량인 5,000mg/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 내부장기에 대한 영향은 없었다.

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

(아) 과립병바이러스(GV) 입상수화제의 랫드를 이용한 단회 투여 경피독성시험

GV 입상수화제에 대한 급성경피독성을 SPF 랫드(SD계통)를 이용하여 1회 경피 처리한 후 2주간 치사 수, 일반중독증상, 체중 변화 및 부검소견을 관찰 조사한 결과는 다음과 같다.

(1) 투여약량 수준설정 및 약제조제

① 투여약량 설정

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

② 투여약량 수준별 실험동물수

실험동물수는 농약의 등록시험기준과 방법(농촌진흥청고시 제2005-7호)에서와 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 20ml의 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 5ml/kg(체중)으로 설정하였다.

(2) 시험물질의 투여

① 사료의 절식

경피 독성시험의 투여경로 상 절식시간은 따로 두지 않았다

② 투여경로 및 투여방법

시험개시 전 약제처리를 위한 공시동물의 등부위를 동물용 제모기를 이용하여 체표면 적의약 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 GV 입상수화제는 기초시험 약량인 4,000mg/kg에서 시험기간(14일)동안 암수 모두 치사개체가 발견되지 않았다.

따라서 본 시험물질의 반수치사약량(LD50)은 > 4,000mg/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 체중기록 결과로 보아 약제투여군은 무처리대조군과 비교하여 유의차가 없었다.

④ 부검소견

육안적 부검소견으로 전 개체에서 특이한 이상소견은 관찰되지 않았다.

(4) 요약

① 시험물질을 암·수 모두 기초시험 투여약량인 4,000mg/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 내부장기에 대한 영향은 없었다.

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

(자) 과립병바이러스(GV) 입상수화제의 잉어를 이용한 단회 투여 급성독성시험
GV 입상수화제에 대한 급성어독성을 잉어를 이용하여 96시간 동안 생사수, 일반중독 증상을 관찰하고 체중 및 전장을 조사한 결과는 다음과 같다.

(1) 시험농도 수준설정 및 약제조제

① 시험농도 설정

기초시험 투여농도인 10ppm에서 시험을 수행하였다.

② 시험용 수조

원통형의 유리제품 10 L (φ24×30cm)용기를 사용하였다.

③ 시험어류의 크기 및 시험어류 수

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

④ 시험용수 및 수온

시험용수는 지하수를 72시간 이상 정체시켰다가 사용하였으며, 수온의 조절은 항온수조 내에 시험용 유리 수조를 담가서 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 로 시험기간 동안 유지시켰다.

⑤ 산소공급

시험기간 중 시험 중인 수조 내에 인위적인 산소공급은 시키지 않았다.

⑥ 사료 급여

시험개시 48시간 전부터 시험종료시까지 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 GV 입상수화제는 기초시험 투여농도인 10ppm으로 10마리의 잉어에 투여한 결과 시험기간(96h) 중 치사개체가 발견되지 않았다. 따라서 본 약제의 반수치사약량(LC50)은 48시간에서 > 10ppm, 96시간에서 > 10ppm으로 판명되었으며, 독성분류상 어독성 III급으로 사료된다.

② 일반중독증상

처리군에서 시험물질 투여 후 96시간동안 관찰되지 않았다.

(3) 요약

- ① 일반중독증상은 처리군에서 시험물질 투여 후 48시간경과시 수면부상하는 개체가 관찰되었다.
 - ② 체중은 평균 $1.01 \pm 0.21\text{g}$, 전장은 평균 $4.08 \pm 0.26\text{cm}$ 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°C (최저 22.0°C - 최고 23.0°C)였다.
 - ⑤ Total Hardness는 82.4(Moderately Hard), Alkalinity는 70.1(Moderately Hard)였다.
- 이상의 결과 본 시험물질의 LC50(48hrs)은 $> 10\text{ppm}$ 이었으며, 독성분류상 어독성Ⅲ급으로 확인되었다.

라. 결과요약

- (가) 과립병바이러스(GV)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 약효증진제를 선별하였으며, 이를 제형간 비교를 통하여 선별된 액상수화제에 적용하여 최적화된 과립병바이러스(GV) 제제 처방을 확립할 수 있었다.
- (다) 과립병바이러스(GV)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 어독성Ⅲ급에 해당하는 것으로 나타나 제품개발에 문제가 없을 것으로 판단되었다.

4. 결과요약

환경 친화적인 해충방제제 개발하고자 과립병 바이러스의 제형화 연구를 통하여 처방을 확립하였으며, 인축 및 환경에 대한 독성시험을 통하여 제품의 안전성을 확보하였다. 기초 제형연구를 통하여 과립병바이러스에 사용가능한 부자재를 선별하여 다양한 제형에 대하여

처방을 검토하였다. 고상 제형 중에는 입상수화제를 액상 제형 중에는 액상 수화제를 선택하여 처방을 검토하였으며, 제품의 약효를 증진시키기 위한 보조제로서 특정 무기산을 선별하였다. 선별된 부자재를 이용하여 액상수화제 및 입상수화제의 처방을 확립하였고 약효비교 시험을 수행하였다. 약효시험결과, 액상 수화제보다는 입상수화제가 우수한 효과를 보임에 따라 입상수화제를 선별하였다. 선별된 입상수화제의 안전성을 확보하고자 인축 및 환경에 대한 독성 시험을 수행하였다. 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 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	40	100	제 1 절
	2. 온, 습도 등 사육조건 구명			제 1 절
2. 과립병바이러스 대량생산	1. 과립병바이러스 최적생산 조건 구명	30	100	제 2 절
	2. 주요환경에 대한 안정성 구명			제 10 절
3. 과립병바이러스 생화학적특성검정	1. 세포학적 특성검정	20	100	제 4, 5 절
	2. 조직학적 특성 검정			제 5, 6 절
4. 과립병바이러스의 제형화	1. 기초 제형화 연구 : 문헌 등의 분석	10	100	제 12 절
	2. 과립병바이러스 제제의 특성 연구			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. 기준곤충의 대량사육 법 개발	1. 인공사료 개선	20	100	제 1 절
	2. 온, 습도 등 사육조건 구명			제 1 절
2. 과립병바이러스 대량 생산	1. 과립병바이러스 최적생산 조건 구명	30	100	제 2 절
	2. 주요환경에 대한 안정성 구명			제 3 절
	3. 바이러스 살포량 및 살포방법 구명			제 11 절
3. 과립병바이러스 생화 학적특성검정	1. 생화학적 특성 및 병원성 검정	20	100	제 7, 8 절
	2. 유묘 및 포장 병원성 검정			제 11절
4. 과립병바이러스의 제형화	1. 제형화를 위한 첨가제 선발	30	100	제 12절
	2. 상품화를 위한 제형화			제 12절
	3. 안정성 및 독성시험			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 절
2. 과립병바이러스 대량생산	1. 과립병바이러스 안정성 구명 2. 바이러스의 살포효과 증진 3. 시제품 병원성 검정	30	100	제 2 절 제 3 절 제 11 절
3. 과립병바이러스 생화학적 특성검정	1. 생화학적 특성 검정 2. 바이러스 발현과정조사 3. 조직화학적 배추좀나방 조직세포 변화양상	10 50	100 100	제 2 절 제 3, 4 절 제 7~9 절
4. 과립병바이러스의 제형화	1. 제형 개발 3. 환경안전성 연구			제 12절 제 12절

4. 최종 평가의 착안점 및 목표 달성도

평가의 착안점	평 가		목표 달성도 (%)	참조부문 (제 2 장)
	평가의 척도 (%)			
1. 기주곤충의 대량사육법 개발	20		100	제 1 절
2. 과립병바이러스 대량생산	30		100	제 2, 10, 11절
3. 과립병바이러스 생화학적 특성검정	20		100	제 3 ~ 9 절
4. 과립병바이러스 제형화	30		100	제 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 중 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 과립병바이러스의 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 배추좀나방 과립병바이러스를 사용하기 위하여 그 숙주 곤충인 배추좀나방을 대량 사육할 수 있는 인공사료를 개선하였으며, 기주식물로 사육할 수 있는 체계를 세웠다. 2) 우리나라에 분포하는 배추좀나방 과립병바이러스의 병원성 효과를 중국에서 가져온 과립병바이러스와 비교하여 우리나라 과립병바이러스가 효과가 뛰어난 것을 증명하였다. 3) 전라남도 농업기술원에서 자체 생산한 배추좀나방 과립병바이러스를 이용해서 배추좀나방을 대상으로 유묘와 포장에서 이용 가능성을 검토하여 노지와 비닐하우스에서 살충 효과가 뛰어난 것을 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 배추좀나방 과립병바이러스의 면역유전자 탐색 및 발현패턴 등을 중심의 기초자료를 제공하였다. 배추좀나방 과립병바이러스는 온실, 비닐하우스,

노지포장에서 배추좀나방을 방제 효과가 탁월한 미생물이다. 이 바이러스는 현재 알려진 바로 태양광선에 의하여 급속도로 불활성화 되는 문제가 있다. 이 때문에 여러 물질 등을 혼합하여 자외선 차단효과 및 병원성을 증식시키며, 또한 이 첨가물로 인해 다른 해충 및 병도 방제 할 수 있을 것이다. 또한 중국산 PxGV와 비교해 우리나라 PxGV의 우수성을 조사하였다.

본 연구에 의하여 정립된 배추좀나방 과립병바이러스의 제형방법을 이용하면 다른 곤충 병원 미생물 농약 개발에 이용할 수 있을 것이다. 또한 이 연구 내용을 국내 농약 제조 회사에 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 배추좀나방 방제제 개발에 관한 연구로 과립병바이러스에 대한 많은 정보를 제공하였다. 따라서 본 연구는 해충학, 병리곤충학, 곤충 미생물 바이러스 분야의 발전에 기여했다고 판단된다. 본연구의 결과는 다음과 같이 학술지나 학술대회에 발표되었다.

가. 국제학회

- 1) Seung Han Oh, R. J. Kim, M. Y. Noh, S. A. Kim, S. W. Kang, Y. S. Lee, I. S. Kim, Y. S. Han. 2007. Cloning and expression patterns of a nitric oxidase synthase gene from the diamondback moth, *Plutella xylostella*. International Congress of Insect Biotechnology and Industry, Poster Presentation.
- 2) Seung Han Oh, R. J. Kim, C. H. Park, M. Y. Noh, J. D. Park, S. G. Kim, I. S. Kim, Y. S. Lee, Y. S. Han 2007. Cloning and expression patterns of a thioredoxin peroxidase from the diamondback moth, *Plutella xylostella*. International Congress of Insect Biotechnology and Industry, Poster Presentation.
- 3) Sun Am Kim, R. J. Kim, S. H. Oh, C. H. Park, M. Y. Noh, J. D. Park, S. G. Kim, I. S. Kim, Y. S. Lee, Y. S. Han. 2007. Cloning and expression patterns of an antibacterial peptide lebecin from the diamondback moth, *Plutella xylostella*. International Congress of Insect Biotechnology and Industry, Poster Presentation.

- 4) Rye Jin Kim, S. H. Oh, M. Y. Noh, S. A. Kim, H. R. Chio, S. W. Kang, Y. S. Lee, I. S. Kim, Y. S. Han. 2007. Cloning and expression patterns of a catalase gene from the diamondback moth, *Plutella xylostella*. International Congress of Insect Biotechnology and Industry, Poster Presentation.
- 5) Rye Jin Kim, S. H. Oh, M. Y. Noh, S. A. Kim, H. R. Chio, S. W. Kang, Y. S. Lee, I. S. Kim, Y. S. Han. 2007. Cloning and expression patterns of calreticulin homologue from the diamondback moth, *Plutella xylostella*. International Congress of Insect Biotechnology and Industry, Poster Presentation.

나. 국내학회

- 6) Rye Jin Kim, Seung Han Oh, Mi Young Noh, Sun Am Kim, Hwal Ran Choil, Se won Kang, Yong Seok Lee, In Seok Bang, Hyung Uk Jeong, Ik soo Kim and Yeon Soo Han. Cloning of full length cDNA of calreticulin homologue using RACE method from the diamondback moth, *Plutella xylostella*. The Entomological Society of Korea. Poster Presentation.
- 7) Mi Young Noh, Yong Hun Jo, Seon Gon Kim, Jong Dae Park, Do Ik Kim, Yong Seok Lee, and Yeon Soo Han. Screening of the GV-dependent up/down regulated genes from *Plutella xylostella*. 한국분자세포생물학회. Poster Presentation.

3. 경제, 산업적 측면에의 기여도

본 연구는 산업적 효용가치를 고려하여 특허출원 준비 중에 있으며 배추좀나방 방제용으로 미생물농약의 활용법을 영농기술 자료로 활용중이다. 또한 친환경재배 농가에서 배추, 쌈채 등에서 효과를 농업들로부터 확인하였다. 그리고 전남농업기술원 부설 전남농업생명대학과 천적교육 시에 곤충병원 미생물을 이용한 해방방제 교육 자료로 활용 중에 있다.

제5장 연구개발결과의 활용계획

제1절 추가연구의 필요성

1. 곤충 바이러스의 다른 해충으로 추가 연구의 필요성

3년으로 계획된 본 연구가 성공적으로 이루어져 곤충 병원성 바이러스에 대한 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. 또한 배추좀나방 과립병바이러스는 생체내에서 증식하고 기주가 작은 해충이기 때문에 바이러스 수거량이 담배겨세미나방이나 파밤나방 보다 훨씬 적다. 이를 해결할 수 있는 방법으로 BT와 같은 다른 미생물과 혼합하여 초기 방제가를 높이고 제품을 만들 때 적은량을 넣는 방법을 개발해야 할 것이다.

2. 포장 및 타 작물로의 확대의 필요성

본 연구에서 얻어진 결과는 주로 일부지역에서 배추 작물만을 대상으로 국한되었으므로 좀더 광범위한 십자화과 작물과 노지재배가 아닌 시설과 같은 고소득 작물에도 확대 적용해야 할 것이다. 따라서 더 많은 작물의 배추좀나방에 대하여 3년 정도의 포장시험을 수행해야 할 것으로 사료된다.

제2절 기업화 추진방향

배추좀나방 과립병바이러스를 주식회사 경농으로 기술 이전하여 기업화할 예정이고 앞으로 지속적 많은 십자화과 작물에서 배추좀나방에 대한 포장시험을 통하여 미생물 농약 사용범위를 확대 할 예정이다. 또한 지금까지 수행된 다른 미생물과 혼합제를 만들어 주식회사 경농과 연계하여 계속적으로 기업화할 예정이다.

제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제1절 독일 바이엘 크롭 사이언스 방문

1. 출장개요

가. 목 적

농업의 국제화, 개방화에 부응한 친환경 살충제인 곤충병원성 미생물연구의 선진국인 독일의 연구 동향을 파악하여 금후 곤충병원성 바이러스의 신제품 개발과 미생물 살충제 연구의 발전에 기여할 수 있는 계기를 마련하고자 함

나. 위치 : Monheim, Bayer CropScience AG, Alfred-Nobel-Str. 50, 40789
Monheim am Rhein Germany

다. 연혁

- 1851 : Ernst Schering에 의해 "Green Pharmacy"를 베를린에 설립
- 1863 : Friedrich Bayer and Johann Friedrich Weskott에 의해 "Friedr. Bayer et comp."
- 1893 : 세계 최초의 합성살충제 antinonin 개발 및 시판
- 1924 : Bayer Crop Protection 연구부 설립
- 1991 : 진딧물 전용 살충제 Imidacloprid 판매 시작
- 1994 : Hoechst (60%) and Schering (40%) 합병하여 AgrEvo 설립
- 2000 : AgrEvo and Rhne-Poulenc Agro와 합병하여 Aventis CropScience 설립
- 2002 : Aventis CropScience에서 분리하여 Bayer Crop Science 설립
- 2005 : 영국과 중국에 흰가루병약 Fluopicolide을 처음으로 등록

라. 설립목적

- 친환경 농업 실현
- 첨단 바이오 기술을 이용한 산업의 혁신 주도
- 종업원이 일하기 좋은 환경 조성

혁신기술 제품과 종합기술 해법을 제공하는 세계의 선두기업



마. 정보기술 수집

- 농업 주요해충의 인공사료에 의한 사육방법
- 각종 해충에 대한 생물검정 방법
- 기타 최근 연구동향 및 실험실 견학

바. 만난사람들

- Dr. Janis Rodmanis : global regulatory support manager,
janis.rodmanis@bayercropscience.com
- Dr. Peter Meisner : Site management, nursery & breeding, Global biology insecticides. peter.meisner@bayercropscience.com
- Dr. Ulrich Ebbinghaus-Kintscher : Neurophysiology. Global biology insecticides.
ulrich.ebbinghaus-kintscher@bayercropscience.com
- Dr. Erich Sanwald. Head of profiling. Global biology insecticides.
erich.sanwald@bayercropscience.com



<인공사료에 의한 나방류 대량사육>

제2절 중국 농업과학원 산하 생물농약 연구기관 방문

1. 병원미생물 증식 및 이용연구 기관 및 회사 방문

1) 중국과학원 동물연구소 곤충바이러스연구실 견학

- 곤충병원미생물 증식을 위한 곤충인공사육 시스템 운영 : 바이러스 증식: 배추좀나방, 목화다래나방, 담배거세미나방, 파밤나방

식 용 : 황분충

동물먹이 : 파리

- 곤충세포배양에 의한 바이러스 증식 검토 : 담배나방 세포주 확립

2) 하남성 제원시 백운실업유한공사(중국과학원동물연구소 생물농약중심시험기지)

- 동물연구소 연구기술 실용화 회사 : 현재 4종 바이러스살충제 시판 : 담배나방, 담배거세미나방, 파밤나방, 배추좀나방

2. 정보기술 수집

농업해충의 미생물적방제 자원수집 및 최근 연구정보 수집

가. 자원 및 정보수집 : 중국과학원 동물연구소 및 백운실업유한공사 : 바이러스살충제

샘플 4종

나. 기타 최근 연구동향 및 실험실 견학

3. 방문기관 조직 및 기구

가. 중국 농업과학원 현황

- 개요 : 1957년 설립된 농업부 직속 종합 연구기관
- 기관현황 : 40개 연구소, 정원 8,000명 (연구인력 5,000명)
- 주요기능 : 국가단위 농업기술연구 및 농업전문가 훈련

○ 주요 연구분야 소개

- 국가가 필요한 기술개발연구 (총연구비의 60~70%)
- 지방 및 기업 등의 위탁에 의한 응용기술 개발연구

- 현장중심의 기술보급 수행 (전체 연구직 중 30% 참여)
- 최근 동향 (설립 40주년 기념 江擇民 주석의 교시)
 - 기초연구는 세계적 추세에 맞춰 폭넓고 심도 있게 진행
 - 농업 현장과 시장성을 연계한 실용성 있는 연구 수행을 강조
 - ⇒ 실제 생산력 증진을 위한 연구를 중점 추진하고 수익성 있는 연구소는 기업화 하는 등 농업의 산업화방향을 지시

나. 중국농업과학원 식물보호연구소 식물병해충생물학 국가중점실험실

1) 연구기구

- 생물방제연구실 : 생물기술팀, 생물농약팀, 천적해충팀
- 분자식물병리학연구실 : 분자상호팀, 분자바이러스팀, 분자세균팀
- 식물병해연구실 : 식물바이러스팀, 맥류작물병해팀, 식물선충팀, 경제작물병해팀
- 농업해생물예측예보연구팀 : 식물보호교신기술팀, 재해연구팀, 농업생물자원팀
- 농업곤충학연구실 : 목화해충팀, 채소해충팀, 수도해충팀, 옥수수해충팀, 비래해충팀

* 현재 지속가능개발 연구소의

- (1) 위해외래생물침입 예측경계감시연구
- (2) 곤충기생균 연구
- (3) 선충생물적방제연구
- (4) 기타 GMO 안전평가 관련 연구 등은 현재 직제상 식물보호연구소 소속이며 연구소 2008년 신축 후 현재 식물보호연구소에 합병함.

2) 인원

- 고정인원 : 64명 (연구원 24명, 부연구원 13명, 고급실험사 1인, 조리연구원 8인)
박사 65.2%
- 연령분포 : 45세 이하 76.1%

다. 하남성 제원백운실업유한공사 중국농과원 동물연구소 생물농약중점시험기지

1) 설립 : 1998년

- 아시아 최대 곤충바이러스살충제연구발전 생산기지)
- 하남성 생물농약 제조기술 연구 중심
- 박사 후 과학기술연구실습장

- 2) 투자 : 56억원, 총자산액 70억원, 대지 60,000km²
- 3) 인력 : 공원 250명 (연구기술인력 38명 : 박사 3명, 석사 1인, 고급기술자 14명 등)
- 4) 회사대표 : Cheng Qinquan
- 5) 공동협약자 : 동물연구소 곤충바이러스연구실 Dr. Qin Qilian
- 6) 협약내용 : - 바이러스살충제상품화 공동개발 및 판매
 - 곤충대량사육기술 기술이전
 - 곤충바이러스 자원제공
 - 곤충바이러스살충제 농가이용기술 공동보급
 - 사육, 바이러스분리, 제형 등 회사 직원 수시교육
 - 농민 및 기술지도자 연간 워크샵 개최지도
 - 전체 연간 매상액의 25%를 개발자 연구개발비 투자
- 7) 회사사업 내용
 - 초기 농가 플라스틱 제품 제조
 - 2003년부터 중국과학원 동물연구소 공동 곤충바이러스살충제 개발비 56억원 투자
 - 곤충바이러스살충제 개발 : 2007년 현재 4종 개발 시판
 - 판매보급지역: 신강, 하남, 강소, 안휘, 광서, 호북, 광둥 등 목화다래나방 핵다각체 병바이러스(*Helicoverpa armigera* NPV) : 신강, 광둥, 광시 등 목화대상
 - 담배겨세미나방 핵다각체병바이러스(*Spodoptera litura* NPV) : 채소재배지역
 - 파밤나방 핵다각체병바이러스(*Spodoptera exigua* NPV) : 채소재배지역
 - 2007년 시판 배추좀나방 과립병바이러스(*Plutella xylostella* GV) : 채소재배지역
 - 기타 9종의 생물농약 개발 중으로 앞으로 6개 이상 곤충바이러스살충제 신상품 예정

라. 중국과학원 동물연구소 농업충해서해 종합방제연구 국가중점실험실

- 1) 세계은행차관으로 1991년 설립
- 2) 인력 : 16명 연구원, 12개 연구분야
 - 연구훈련생수 : 199명 (석사 53명, 박사 134명, 박사연수생, 12명)
 - 훈련중 : 3명 박사 후 연수, 99명 대학원생
- 3) 연구분야
 - 생태, 생리, 행동, 계놈, 진화, 해충이동, GMO, IPM, 침입해충, 해충 저항성, 친환경 농업, 등

4) 주요 연구팀

- 진화생태학 연구팀, 분자생태학과 진화연구팀 항성분자 유전연구팀
- 분자병리학 연구팀, 동물천연면역연구팀, **곤충바이러스연구팀**
- 곤충행위생리학과 생물화학연구팀, 삼림해충화학생태연구팀
- 동물생리 생태학 연구팀, 농업동물생태연구팀, 종군생태와 지구변화연구팀
- 경제생태학 및 곤충독리학연구팀

5) 곤충바이러스연구팀 조직과 연구내용

- 인원 : 팀장 - Qin Qilian 부연구원
팀원 : Zhang Aijun 조리연구원, Li Xian 공정사 Miao Lin 리공정사
- 곤충생리, 곤충병리, 생물화학과 분자생물학적 방법과 수단, 해충과 천적과 병원
전개 기초적 및 응용성 연구, 목화다래나방, 과밤나방, 담배거세미나방, 배추좀나방
인공대량사육기술 개발, 상기 해충 바이러스 대량증식기술개발, 동물연구소와 생물
농약중심기지하남성 제원백운실업유한공사 투입생산, 곤충세포확립기술개발 등

4. 주요 접촉인물 및 활동내용

가. 식물보호연구소 :

- Mr. Gao Shijun 부소장 및 중국측 공동연구자 팀 등 5명
- Dr. Wan Fanghao (생물 유해평가)
- Dr. Zhang Kecheng(중국측책임자)연구팀, 생물농약연구실. 길항미생물.
- Drs. Wang Zhenying, He Kanglai 농업해충연구과장 및 부연구원
- Dr. Wen Liping (중국농업과학원 식물보호연구소 상무부비서장)
- Dr. Nong Xianqun(곤충기생균)
- Dr. Xie Ming (생태)

나. 동물연구소

- Dr. Qin Qilian(곤충바이러스 연구실장)
- Dr. Zhang Aijun(곤충생리 및 사육)
- Dr. Miao Lin(연구학생)

다. 백운실업유한공사

Mr. Cheng Qingquan (사장)

Mr.Zhou Yingjie (영업부장)

라. 중국농업과학원

Wang Yingfen (한중협력 중국사무관)

마. 자원수집

하남성 제원시 백운실업유한공사 바이러스살충제 상품 2007. 6. 15

Spodoptera exigua NPV, *S. litura* NPV

Helicoverpa armigera NPV, *Putella xylostella* GV

4. 사진



< 곤충바이러스 생산 공장 >



< 바이러스 생산 및 제품 >



<식물보호연구소>



<동물연구소 실험실>



<곤충바이러스 cell line>

제7장 참고문헌

- Agui, N., N. Ogura, and M. Okawara. 1975. Rearing of the cabbage armyworm, *Mamestra brassicae* L. (Lepidoptera: Noctuidae) and some lepidopterous larvae on artificial diets. (In Japanese with English summary). Jpn. J. Appl. Entomol. Zool. 19:91–96.
- Allen RG, Oberley LW, Elwell JH, Sohal RS. 1991. Developmental patterns in the antioxidant defenses of the housefly, *Musca domestica*. J Cell Physiol. 146(2):270–6.
- 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.
- Ariyanayagam MR, Fairlamb AH. 2001. Ovothiols and trypanothione as antioxidants in trypanosomatids. Mol Biochem Parasitol. 115(2):189–98.
- Arthurs, S. P. and L. A. Lacey. 2004. Field evaluation of commercial formulations of the codling moth granulovirus: persistence of activity and success of seasonal applications against natural infestations of codling moth in Pacific Northwest apple orchards. Biological Control 31(3): 388–397.
- Arthurs, S. P., R. Hilton, A. L. Knight, and L. A. Lacey. 2007. Evaluation of the Pear Ester Kairomone as a Formulation Additive for the Granulovirus of Codling Moth (Lepidoptera: Tortricidae) in Pome Fruit. J. Econ. Entomol. 100(3): 702–709.
- Arthurs, S.P., L.A. Lacey and R. Fritts. 2005. Optimizing Use of Codling Moth Granulovirus: Effects of Application Rate and Spraying Frequency on Control of Codling Moth Larvae in Pacific Northwest Apple Orchards. J. Econ. Entomol. 98(5): 1459–1468.

- Arthurs, S.P., L.A. Lacey and R.W. Behle. 2006. Evaluation of spray-dried lignin-based formulations and adjuvants as solar protectants for the granulovirus of the codling moth, *Cydia pomonella* (L). *Journal of Invertebrate Pathology* 93(2): 88–95.
- Asano, S., T. Maruyama, T. Iwasa, A. Seki, M. Takahashi and G. G. Soares, Jr. 1993. Evaluation of Biological activity of *Bacillus thuringiensis* test samples using a diet incorporation methods with Diamond back Moth, *Plutella xylostella*. *Appl. Entomol. Zool.* 28(4): 513–524.
- Asgari S. and O. Schmidt, 2003. Is cell surface calreticulin involved in phagocytosis by insect hemocytes?, *J. Insect. Physiol.* 49: 545–550.
- Bao Y, Yamano Y, Morishima I. 2005. A novel lebocin-like gene from eri-silkworm, *Samia cynthia ricini*, that does not encode the antibacterial peptide lebocin. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 140(1):127–31.
- Berger, R. S. 1963. Laboratory techniques for rearing *Heliothis* species on artificial medium. *USDA ARS (Ser.)* 33–84. 4 pp.
- Biever, K. D. and P. E. Boldt. 1971. Continuous laboratory rearing of the Diamond back moth and related biological data. *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 64: 651–655.
- Breek CK, Speijer D, Dekker H, Muijsers AO, Benne R. 1997. Further evidence for the presence of mitochondrially encoded subunits in cytochrome c oxidase of the trypanosomatid *Crithidia fascic ulata*. *Biol Chem.* 378(8):837–41.
- 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
- Carpenter, J.E. and S. Bloem. 2002. Interaction between insect strain and artificial diet in diamondback moth development and reproduction. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 102: 283–294.

- Charles IG, Chubb A, Gill R, Clare J, Lowe PN, Holmes LS, Page M, Keeling JG, Moncada S, Riveros–Moreno V. 1993. Cloning and expression of a rat neuronal nitric oxide synthase coding sequence in a baculovirus/insect cell system. *Biochem Biophys Res Commun.* 15:196(3):1481–9.
- Cheshenko N., B. Del Rosario, C. Woda, D. Marcellino, L.M. Satlin and B. C. Herold. 2003. Herpes simplex virus triggers activation of calcium–signaling pathways, *J. Cell. Biol.* 163: 283–293.
- Chi, H. and C. N. Sun. 1975. New method for rearing Diamondback moth (*Plutella xylostella* L.). (In Chinese). *Sci. Agric.* 23: 500.
- Choi J. Y., M. M. A. whitten, M. Y. Cho, K. Y. Lee, M. S. Kim, N. A. Ratcliffe and B. L. Lee, 2002. Calreticulin enriched as an early–stage encapsulation protein in wax moth *Galleria mellonella* larvae, *Dev. Comp. Immunol.* 26: 335–343.
- Chowdhury S, Taniai K, Hara S, Kadono–Okuda K, Kato Y, Yamamoto M, Xu J, Choi SK, Debnath NC, Choi HK. 1995. cDNA cloning and gene expression of lebecin, a novel member of antibacterial peptides from the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem Biophys Res Commun.* 5:214(1):271–8.
- Chung B. K., C. G. Park, D. J. Cho and W. G. Shin. 1989. Influence of Temperature on the Development Fecundity and Longevity of Diamondback moth *Plutella xylostella* L. *Res. Rept. RDA(C.P).* 31(4): 30–37.
- 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.
- Crook, N.E., Brown, J.D., G.N. Foster. 1982. isolation and characterization of a granulosis virus from the tomato moth, *Lacanobia oleracea*, and its potential as a control agent. *J. Invertebr. Pathol.* 40: 221–227.

- 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.
- Eleftherianos I, Marokhazi J, Millichap PJ, Hodgkinson AJ, Sriboonlert A, French-Constant RH, Reynolds SE. 2006. Prior infection of *Manduca sexta* with non-pathogenic *Escherichia coli* elicits immunity to pathogenic *Photorhabdus luminescens*: roles of immune-related proteins shown by RNA interference. *Insect Biochem Mol Biol.* 36(6):517–25.
- Engel N, Schmidt M, Lütz C, Feierabend J. 2006. molecular identification, heterologous expression and properties of light-insensitive plant catalases. *Plant Cell Environ.* 29(4):593–607.
- Foster, G.N. 1981. Pest problems of glasshouse tomatoes in the west of Scotland. *Proc. Crop Prot. North. Britain.* 301–306.
- Furukawa S, Taniai K, Ishibashi J, Hara S, Shono T, Yamakawa M. 1997. A novel member of leucocin gene family from the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem Biophys Res Commun.* 29;238(3):769–74.
- Furukawa S, Taniai K, Yang J, Shono T, Yamakawa M. 1999. Induction of gene expression of antibacterial proteins by chitin oligomers in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Mol Biol.* 8(1):145–8.
- Guo, H. F., J. C. Fang, J. P. Wang, W. F. Zhong and B. S. Liu. 2007. Interaction of *Xestia c-nigrum* Granulovirus with Peritrophic Matrix and *Spodoptera litura* Nucleopolyhedrovirus in *Spodoptera litura*. *J. Econ. Entomol.* 100(1): 20–25.
- Hama, H. 1990. Insecticide resistance of diamondback moth, *Plutella xylostella* in Japan. *JARQ* 24:22–30.
- Harcourt, D. G. 1957. Biology of the Diamond back moth *Plutella maculipennis*(Curt.) (Lepidoptera : Plutellidae), in eastern Ontario II. Life-history, behaviour and host relationship. *Can. Entomol.* 89: 554–563.

- Helen J. Matthews, Ian Smith, and John P. Edwards. Lethal and sublethal effects of a granulovirus on the tomato moth *Lacanobia oleracea*. 2002. Journal of Invertebrate Pathology 80: 73–80.
- Helenius A., E.S. Trombetta, D.N. Hebert and J.F. Simons, 1997. Calnexin, calreticulin and the folding of glycoproteins, Trends Cell Biol. 7: 193–200.
- Hou, R. F. and J. H. Hsiao. 1979. Antimicrobial agents in a semi-synthetic diet for the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: yponomeutidae). Plant Prot. Bull. (Taiwan) 21:251–256
- Hsiao, J. H. and R. F. Hou. 1978. Artificial rearing of the Diamond back moth, *Plutella xylostella*(L.), on a semi-synthetic diet. Bull. Inst. Zool. Acad. Sin. 17: 97–102.
- Hsiao, M.L.and R. F. Hou. 1982. An imptoved preparation of the semi-synthetic diet for the diamondback moth, *Plutella xylostella* (In Chinese). Chinese j. Entomol. 2:103 (Abstr.).
- Huber, J., Hunter-Fujita,F.R., Entwistle, P.F., Evans,H.F., Crook, N.E. (Eds.), 1998. Insect viruses and pest management. Wiley, Chichester, UK, pp.201–215.
- Ignoffo C.M. 1973. Development of a viral insecticides.: Concept to commer -tialization. Experimental Parasitology, 33: 380–406.
- 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.
- 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
- ishii, T., K. Nakamura, k.kawasaki, H. Nemoto, K. Takahashi, and A. kubota. 1981. Active space of sex pheromone of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: yponomeutidae). (In Japanese with English summary). Jpn. J. Appl. Entomol. Zool. 25:71–76.
- Iwanaga S. and B.L. Lee, 2005. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. J. Biochem. Mol. Biol. 38 (2005), pp. 128–150.
- Johnson S., M. Michalak, M. Opas and P. Eggleton, 2001. The ins and outs of calreticulin: from the ER lumen to the extracellular space, Trends Cell Biol. 11 (3): 122–129.
- Kanazawa R, Komori S, Sakata K, Tanaka H, Sawai H, Tsuji Y, Koyama K. 2003. Isolation and characterization of a human sperm antigen gene h-Sp-1. Int J Androl. 26(4):226–35.
- Kim B. Y., Kim H. J., Lee K. S., Seo S. J., Jin B. R. 2008. Catalase from the white-spotted flower chafer, *Protaetia brevitarsis*: cDNA sequence, expression, and functional characterization. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 149(1):183–90
- Kim HW, Batista LA, Hoppes JL, Lee KJ, Mykles DL. 2004. A crustacean nitric oxide synthase expressed in nerve ganglia, Y-organ, gill and gonad of the tropical land crab, *Gecarcinus lateralis*. J Exp Biol. 207(Pt 16):2845–57.
- 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, M. H. and S. C. Lee. 1991. Bionomics of Diamond-back Moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera : Plutellidae) in Southern Resion of Korea. Kor. J. Appl. Entomol. 30(3) : 169-173.
- 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 agrochmicals. pp. 44-45, In Chemistry and Technology of Agrochemical Formulations (ed. D. A. Knowles), Kluwer Academic Publishers, UK.
- Koshihara, T, and H. Yamada. 1976. A simple mass-rearing, technique of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) on geminating rape seeds. (In Japanese with English summary). Jpn. J. Appl. Entomol. Zool. 20:110-114.
- Koshihara, T, and H. Yamada. 1980. Attractant activity of the female sex pheromone of diamondback moth,*Plutella xylostella* (L.), and analogue. (In Japanese with english summary). Jpn. J. Appl. Entomol. Zool. 24:6-12.
- Kumar S, Christophides GK, Cantera R, Charles B, Han YS, Meister S, Dimopo ulos, G, Kafatos FC, Barillas-Mury C. 2003. The role of reactive oxygen species on Plasmodium melanotic encaps ulation in *Anopheles gambiae*. Proc Natl Acad Sci U S A. 25;100(24):14139-44.
- Kuraishi T., J. Manaka, M. Kono, H. Ishii, N. Yamamoto, K. Koizumi, A. Shiratsuchi, B.L. Lee, H. Higashida and Y. Nakanishi, 2006. Identification of calreticulin as a marker for phagocytosis of apoptotic cells in *Drosophila*, Exp. Cell Res.
- Lacey, L. A. and S. P. Arthurs. 2005. New method for testing solar sensitivity of commercial formulations of the granulovirus of codling moth (*Cydia pomonella*, Tortricidae: Lepidoptera). Journal of Invertebrate Pathology 90(2): 85-90.

- Lapointe R, Wilson R, Vilaplana L, O'Reilly DR, Falabella P, Douris V, Bernier-Cardou M, Pennacchio F, Iatrou K, Malva C, Olszewski JA. 2005. Expression of a *Toxoneuron nigriceps* polydnavirus-encoded protein causes apoptosis-like programmed cell death in *lepidopteran* insect cells. *J Gen Virol*. 86(Pt 4):963-71.
- Lavine MD, Chen G, Strand MR. 2005. Immune challenge differentially affects transcript abundance of three antimicrobial peptides in hemocytes from the moth *Pseudoplusia includens*. *Insect Biochem Mol Biol*. 35(12):1335-46.
- Leu JH, Wang HC, Kou GH, Lo CF. 2008. *Penaeus monodon* caspase is targeted by a white spot syndrome virus anti-apoptosis protein. *Dev Comp Immunol*. 32(5):476-86.
- Liu G, Kang D, Steiner H. 2000. *Trichoplusia ni* lebecin, an inducible immune gene with a downstream insertion element. *Biochem Biophys Res Commun*. 24;269(3):803-7.
- Liu, M. Y. and C. N. Sun. 1984. Rearing diamondback moth (Lepidoptera: Yponomeutidae) on rape seedlings by a modification of the Koshihara and Yamada method. *J. Econ. Entomol*. 75:153-155.
- Liu, M. Y., Y. J. Tesng, and C. N. Sun. 1982. Insecticide resistance in diamondback moth. *J. Econ. Entomol*. 75:153-155.
- Lloyd, L. 1920. The habits of the glasshouse tomato moth *Hadena oleracea* and its control. *Ann.Appl.Biol*. 7:66-102.
- 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.
- Matthews, H. J., I. Smith, H. A. Bell and J. P. Edwards. 2004. Interactions Between the Parasitoid *Meteorus gyrator* (Hymenoptera: Braconidae) and a Granulovirus in *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental Entomology* 33(4): 949-957.

- 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.
- Mery L., N. Mesaeli, M. Michalak, M. Opas, D.P. Lew and K.H. Krause, 1996. Overexpression of calreticulin increases intracellular Ca²⁺ storage and decreases store–operated Ca²⁺ influx, *J. Biol. Chem.* 271: 9332–9339.
- Michalak M., E.F. Corbett, N. Mesaeli, K. Nakamura and M. Opas, Calreticulin: 1999. one protein, one gene, many functions. *Biochem. J.* 344 :281–292.
- Miyata, T., H. Kawai, and T. Saito. 1982. insecticide resistance in the diamondback moth, *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Appl. Entomol. Zool.* 17:539–542.
- Monobrullah, Md. 2003. Optical brighteners – pathogenicity enhancers of entomopathogenic viruses. *Current Science* 84(5): 640–645.
- Mukawa, Shigeyuki and Goto, Chie. 2007. Enhancement of Nucleopolyhedrovirus Infectivity Against *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae) by Proteins Derived from Granulovirus and a Fluorescent Brightener. 100(4): 1075–1083.
- Nemoto, H., K. Kiritani, and H. Ono. 1984. Enhancement of the intrinsic rate of natural increase induced by the treatment of the diamondback moth (*Plutella xylostella* (L.)) with sublethal concentrations of methomyl. (In Japanese with English summary). *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 28:150–155.
- Niedzwiecki A, Reveillaud I, Fleming JE. 1992 Changes in superoxide dismutase and catalase in aging heat–shocked *Drosophila*. *Free Radic Res Commun.* 17(6):355–67.
- OECD. 1996. OECD Guidelines for Testing of Chemicals, No. 203, Fish, Acute Toxicity Test.
- OECD. 1996. OECD Guidelines for Testing of Chemicals, No. 401, Acute Oral Toxicity Test.

- Orr EC, Bewley GC, Orr WC. 1990. cDNA and deduced amino acid sequence of *Drosophila* catalase. *Nucleic Acids Res.* 25;18(12):3663.
- Orr WC, Orr EC, Legan SK, Sohal RS. 1996. molecular analysis of the *Drosophila* catalase gene. *Arch Biochem Biophys.* 15;330(2):251–8.
- Ouellet M, Falguyret JP, Ear PH, Pen A, Mancini JA, Riendeau D, Percival MD. 2002. Purification and characterization of recombinant microsomal prostaglandin E synthase–1. *Protein Expr Purif.* 26(3):489–95.
- Parthasarathy R, Palli SR. 2007. Developmental and hormonal regulation of midgut remodeling in a lepidopteran insect, *Heliothis virescens*. *Mech Dev.* 124(1):23–34.
- Rani P, Lalitha K. 1996. Evidence for altered structure and impaired mitochondrial electron transport function in selenium deficiency. *Biol Trace Elem Res.* 51(3):225–34.
- Regulski M, Tully T. 1995. molecular and biochemical characterization of dNOS: a *Drosophila* Ca²⁺/calmodulin–dependent nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 26;92(20):9072–6.
- Rodriguez J, Agudo M, Van Damme J, Vandekerckhove J, Santarén JF. 2000. Polypeptides differentially expressed in imaginal discs define the peroxiredoxin family of genes in *Drosophila*. *Eur J Biochem.* 267(2):487–97.
- Shoji Asano. 2005. Ultraviolet protection of a granulovirus product using iron oxide. *Applied Entomology and Zoology* 40(2): 359–364.
- Singh, P. 1977. Artificial diets for insects, mites, and spiders. IFI/Plenum New York, Washington, London. 594 pp.
- 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.

- Song Ling, Xiujun Pi and Joseph Holoshitz. 2007. The Rheumatoid Arthritis Shared Epitope Triggers Innate Immune Signaling via Cell Surface Calreticulin. *The Journal of Immunology*, 179: 6359–6367
- Speyer, E. R., E. J. Parr. 1948. Biology and economic status of the tomato moth (*Lacanobia oleracea*) and measures for its control in commercial glasshouse. Misc. Publ. no. 2. Exp. Res. Stn. Cheshnut.
- Su, C. Y. 1987. Utilization of *Plutella xylostella* Granulosis virus(PxGV) for control of *P. xylostella* in the field. *Plant Prot. Bull.* 29: 85–87 (In Chinese).
- Subramanian, S., R. J. Rabindra, S. Palaniswamy, N. Sathiah and B. Rajasekaran. 2005. Impact of granulovirus infection on susceptibility of *Spodoptera litura* to insecticides. *Biological Control* 33(2): 165–172.
- Szewczenko–Pawlikowski et al., 1997 M. Szewczenko–Pawlikowski, E. Dziak, M.J. McLaren, M. Michalak and M. Opas, Heat shock–regulated expression of calreticulin in retinal pigment epithelium. *Mol. Cell. Biochem.* 177: 145–152.
- 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.
- Tanaka H, Matsuki H, Furukawa S, Sagisaka A, Kotani E, Mori H, Yamakawa M. 2007. Identification and functional analysis of Relish homologs in the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochim Biophys Acta.* 1769(9–10):559–68.
- Tanaka H, Yamamoto M, Moriyama Y, Yamao M, Furukawa S, Sagisaka A, Nakazawa H, Mori H, Yamakawa M. 2005. A novel Rel protein and shortened isoform that differentially regulate antibacterial peptide genes in the silkworm *Bombyx mori*. *Biochim Biophys Acta.* 25:1730(1):10–21.

- Tang L, Gounaris K, Griffiths C, Selkirk ME. 1995. Heterologous expression and enzymatic properties of a selenium-independent glutathione peroxidase from the parasitic nematode *Brugia pahangi*. *J Biol Chem.* 4;270(31):18313–8.
- Taniai K, Furukawa S, Shono T, Yamakawa M. 1996. Elicitors triggering the simultaneous gene expression of antibacterial proteins of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem Biophys Res Commun.* 24;226(3):783–90.
- Timothy Alefantisa, Katherine E. Flaig, Brian Wigdahlb and Pooja Jainb. 2007 Interaction of HTLV-1 Tax protein with calreticulin: Implications for Tax nuclear export and secretion. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 61:194–200
- Tomiyama, H. and J. Aoki. 1982. infection of *Erynia blunckii* (Lak. ex Zimm.) Rem. et Henn. (Entomophthorales: Entomophthoraceae) in the diamondback moth, *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Appl. Entomol. Zool.* 17:375–384.
- Vilaplana L, Pascual N, Perera N, Bellés X. 2007. molecular characterization of an inhibitor of apoptosis in the Egyptian armyworm, *Spodoptera littoralis*, and midgut cell death during metamorphosis. *Insect Biochem Mol Biol.* (12):1241–8.
- Weiner LM. 1995. Quantitative determination of thiol groups in low and high molecular weight compounds by electron paramagnetic resonance. *Methods Enzymol.* 251:87–105.
- Whitfield CW, Band MR, Bonaldo MF, Kumar CG, Liu L, Pardinias JR, Robertson HM, Soares MB, Robinson GE. 2002. Annotated expressed sequence tags and cDNA microarrays for studies of brain and behavior in the honey bee. *Genome Res.* 12(4):555–66.
- Wu, K. C. 1968. Bionomic study of *plutella maculipennis* Curtis. In Chinese). *Agric. Res.* 17:51–64.
- Yamada, H. and K. Kawasaki. 1983. The effect of temperature and humidity on the *xylostella* (L.). (In Japanese with English summary). *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 27:17–21.

Yamada, H. and T.Koshihara. 1978. A simple mass rearing method for the diamondback moth. (In Japanese). Plant Prot. 32:253-256.

Yamamoto K, Banno Y, Fujii H, Miake F, Kashige N, Aso Y. 2005. Catalase from the silkworm, *Bombyx mori*: gene sequence, distribution, and overexpression. Insect Biochem Mol Biol. 35(4):277-83.

Yuda M, Hirai M, Miura K, Matsumura H, Ando K, Chinzei Y. 1996. cDNA cloning, expression and characterization of nitric-oxide synthase from the salivary glands of the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. Eur J Biochem. 15;242(3):807-12.

Zhang G. Zhang, O. Schmidta and S. Asgari, 2006. A calreticulin-like protein from endoparasitoid venom fluid is involved in host hemocyte inactivation, Dev. Comp. Immunol. 30: 756-764.

농업과학기술원(1996) 농약의 검사방법. pp. 3-7, 농업과학기술원고시 제1996-2호.

농촌진흥청. 2005. 농촌진흥청고시 제2005-7호, 농약의 등록시험 기준과 방법.

동양물산. 2002. 미생물 고정화용 다공성 세라믹 담체. 한국공개특허출원 10-2002-0013184.

이정열. 2002. 미생물 및 그 배양액을 용해성이 뛰어나고, 통양에서의 생존률이 높은 단일 및 복합 미생물 제제로 입상의 형태로 담체화하는 방법. 한국공개특허출원 10-2002-0008354.

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.