

T0077064

GOVP1201025380

발간등록번호

78-6460077-000092-01

제충국과 멀구슬을 이용한 친환경 해충 방제제 개발

(Development of botanical insecticide using *Chrysanthemum cinerifolium* and *Melia azedarach* for organic farm)

연구기관
전라남도농업기술원
전남대학교
(주)팜스코리아

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “제충국과 멀구슬을 이용한 친환경 해충 방제제 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2010년 5월 28일

주관연구기관명 : 전라남도농업기술원

주관연구책임자 : 김 선 곤

세부연구책임자 : 김 선 국

세부연구책임자 : 김 도 익

연 구 원 : 고 숙 주

연 구 원 : 최 덕 수

연 구 원 : 강 범 용

협동연구기관명 : 전남대학교

협동연구책임자 : 심 재 한

협동연구기관명 : (주)팜스코리아

협동연구책임자 : 이 윤 희, 김 진 섭

여 백

요 약 문

I. 제 목

제충국과 멀구슬을 이용한 친환경 해충 방제제 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

유기 합성살충제는 농업해충 방제에 의한 식량증산 및 위생해충구제에 의한 인류보건 향상에 크게 기여하였으나, 살충제의 연용과 남용은 천적과 유용곤충의 살해, 잠재해충의 주요 해충화, 저항성 해충의 출현, 인축에 대한 독성, 토양 및 식품 잔류, 각종 환경오염문제 등의 부작용을 유발하여 종래의 화학합성을 통한 해충 방제제 개발이라는 형태와는 다른 약효의 선택성 및 안전성 측면에서 새로운 해충 방제제 개발이 절실히 요구되고 있다. 이에 농산업도 병해충 방제와 작물의 생육촉진을 위해 합성농약과 화학비료가 아닌 생물이나 천연자원을 이용하는 친환경농업을 적극적으로 실천하고 있다. 정부는 2013년까지 화학비료와 합성농약의 사용량을 2003년을 기준으로 40% 감축하는 친환경농업 육성계획을 세우고 실천중이다.

이처럼 합성농약과 화학비료를 대안할 수 있는 병해충 방제법이 절실히 필요한 실정으로서 자생식물에서 추출한 천연물질들이 합성화학제를 대체할 수 있는 천연농약으로서의 충분한 가격 경쟁력을 지니고 세계 시장에 진출할 수 있으며 농업생산부분에 보다 폭넓게 응용될 수 있으며, 가정에서 사용하는 대부분의 살충제를 대체할 수 있을 것이다. 식물은 페놀화합물, 테르펜화합물, 알칼로이드 등 다양한 물질을 함유하고 있으며, 이들 물질들은 해충에 선택성을 보이며, 비표적 생물 및 환경에는 거의 해가 없고, 여러 종류의 해충에 다양하게 작용하며, 합성살충제와 마찬가지로 작물에 처리할 수 있다는 점에서 IPM의 한 수단으로 인식되고 있다. 식물추출물은 햇빛에 약하여 자연상태에서 쉽게 광분해가 일어나 식물체 내의 독성분이 빠르게 소실되므로 인축에 영향이 적은 특성이 있으며 환경에도 안전한 새로운 대안이 될 수 있다.

이런 식물 중에 제충국은 식물체, 특히 꽃부분에 피레트린이라는 담적황색의 기름과 같은 물질이 있다. 피레트린은 유기용매에 용해된다. 이것은 냉혈동물, 특히 곤충에 대하여 독성이 강하여 운동신경을 마비시키지만, 온혈동물에는 독성이 없으므로 가정용 고급 구충제로 적당하다. 한국은 남부지방이 재배의 적지이며 브라질·콩고·케냐, 호주 등에서 재배한다. 피레트린은 곤충의 기문(氣門) 또는 피부를 통하여 침입되며, 침입 즉시 신경을 마비시켜 죽게 한다. 그러나 사용한 양이 부족하면 일시적인 마비에서 다시 소생하게 된다. 제충국제는 온혈동물인 사람이나 가축에는 무해하며 곤충에만 유효하고 또한 식물에 대한 약해작용도 전혀 볼 수 없으므로 매우 안전한 생물농약이다. 멀구슬나무는 동남아시아의 열대 혹은

아열대 지역에 서식하는 낙엽활엽교목으로 우리나라에서는 흑산도, 월출산, 백양산, 해남, 신안, 목포, 무안, 나주, 완도, 진도 등 주로 해안지방에서만 자생하고 있다. 멀구슬의 잎, 수피, 가지, 과실, 종자추출물은 광범위한 저장해충들과 노지포장 해충에 대해 기피, 섭식저해, 살충, 성장저해 등을 가져오며 멀구슬의 잎에서 추출된 활성성분은 파라이신(paraisin), 잎과 과실에서 아자디락틴(azadirachtin) 등이 분리되었는데 국내의 연구보고는 미미한 실정이다.

따라서, 작물을 안정적이고 지속적으로 공급하고 소비자들에게는 안전한 먹거리를 공급하기 위해서는 화학 약제를 대체할 다양한 생물농약(천연물 유래 생화학농약)의 개발을 비롯한 해충 방제를 위한 체계적인 방제 메뉴얼 작성이 절실하며 아올리, 생물농약의 원료가 되는 식물체 대량증식체계 연구는 거의 없는 실정으로 식물추출물을 이용한 생물농약개발에는 천연원료가 되는 식물체를 대량 증식할 수 있는 재배기술 체계 확립이 절실히 요구되고 있어 제충국과 멀구슬을 이용한 새로운 친환경 병해충 방제제를 개발하고자 하였다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

제충국과 멀구슬 추출물을 제형화하기 위하여 제충국의 대량증식, 재배법을 구명하고 이들 추출물을 이용 대량추출 및 살충활성을 높이는 제형을 통하여 새로운 생물농약을 개발하여 화학농약을 대체하고 이 기술을 특허출원하여 공동 연구기관인 (주)팜스코리아에 산업체 기술 이전을 통하여 생물농약 제조에 노하우를 습득하도록 하여 이를 상품화 할 수 있도록 하겠다. 그리고 해충을 방제하기 위하여 외국에서 원료로 수입되고 있는 농약이나 친환경 농자재의 대체용으로 활용하고 또한 연구 내용을 다른 식물추출물 이용 생물농약 개발에 이용 할 수 있다.

이 제품을 통하여 벼, 배추, 딸기 주요 해충을 화학농약 대신 친환경 생물농약으로 대체 하여 우리의 주식인 쌀과 반찬거리인 채소를 소비자인 국민이 안심하고 먹을 수 있도록 한다.

1. 살충효과 우수한 제충국 품종 선발 및 재배 기술 체계 확립

살충효과가 우수한 제충국 우량품종을 선발하기 위해 국내 친환경 재배농가에서 자체적으로 도입 재배 중인 5개 계통과 일본 등 국외에서 판매 또는 재배되고 있는 10개 품종을 수집하여 초형, 엽형, 화색, 화형, 화서 등 형태적 특성과 개화특성, 그리고 국내에서의 적응성을 알아보기 위한 월동 전후 생육특성을 확인하였으며 번식 기술 개발을 위하여 분주, 경삼, 종자채종, 종자 발아율과 발아이후 묘 소질, 육묘 후 생존율 등을 조사하였으며, 꽃 수량을 높이기 위하여 재식밀도와 적심방법에 기술을 검정하였다. 농가 생산단지 조성을 위해 전남 담양군의 농가에서 대량 증식용 단지를 조성하였으며, 우수선발 계통을 채종 증식 육묘하여 2010년 4월에 12,400주를 농가에 보급하였다.

2. 제충국, 멀구슬 추출물의 살충물질 탐색

식물추출물의 살충물질 탐색을 위해 문헌조사 및 기존 연구를 검토하였으며, 추출물에 대한 분획물을 제조하기 위해 멀구슬 잎(발엽과 낙엽), 과실(설익은 것, 익은 것) 그리고 가지 껍질을 각각 채취하여 methanol, ethanol, n-hexane, ethyl acetate, CH_2Cl_2 , n-butanol을 이용하였다. 살충활성물질 확인을 위해 각 부위별 시료 2 g을 50 mL 삼각플라스크에 담고, methanol 20 mL를 첨가해 Ultrasonic을 이용해 30분간 추출하여 감압여과 후 농축하여 2 mL methanol에 재용해하였으며 thin layer chromatography를 이용하여 서로 비교하였다. 추출방법 확립을 위해서 각각 다른 농도의 ethanol 수용액(30%, 60%, 70%, 95%)으로 추출하여 TLC를 이용하여 서로 비교한 결과 70% ethanol 수용액을 추출용매로 선택하였다. 추출물질 중 활성물질을 분리하기 위해 5kg 의 멀구슬 과실을 3.5L 70% ethanol/ H_2O 을 이용해 Ultrasonic으로 3회 추출하여 celite를 통과시켜 감압여과 하고 n-hexane 5L, 5L, 5L, 4L을 이용하여 4회 분별하였다. n-hexane층을 분리한 후 물층은 CH_2Cl_2 5L, 5L, 5L, 3L을 이용하여 다시 4회 분별하고, CH_2Cl_2 층을 분리한 후 물층은 다시 ethyl acetate 5L, 5L, 5L, 3L을 이용하여 4회 분별하고, ethyl acetate 층을 분리한 후, 물층은 n-butanol 포화 수용액 각각 2.5L로 4회 분별하여 n-butanol 층을 분리하였다. 분리된 유기용매 층을 감압 농축하여 건고물을 n-hexane 층에서 27g, CH_2Cl_2 층에서 93g, ethyl acetate 층에서 8g, n-butanol 층에서 34g 얻었다. 살충물질 분리를 위해 위에서 얻은 건고물을 70~230 mesh 60Å silica gel 260g을 충전한 open preparative chromatographic glass column(700 × 80 mm id)에 loading 하여 n-hexane/ethyl acetate 로 각각 500 mL씩 1:0 2회, 9:1 4회, 5:5 7회 3:7 4회 1:9 3회, 0:1 2회 용리하고, ethyl acetate/methanol 9:1 6회 5:5 4회 0:1 13회 methanol/ H_2O 9:1로 1회 용리시켜 총46개의 fractions를 얻었다. 각각의 fraction을 TLC 를 이용하여 비교 후 구성성분이 같은 fraction을 서로 혼합하여 n-hexane 분획물에서 최종 12개의 fraction, CH_2Cl_2 분획물에서 최종 11개의 fraction을 얻었다. 이들 분획에 대한 살충효과를 검증하여 추출물에 대한 정량법 확립과 함량조사를 하며 제충국과 멀구슬 중 활성성분의 대량분리 정제법 고안 및 분리-대량 추출법 개발, 살충물질 증진 방법을 개발하였다.

3. 제충국, 멀구슬 추출물의 주요 해충의 살충활성 검증

제충국과 멀구슬의 추출 부위 및 방법별 살충효과 검정을 위하여 제충국의 잎, 꽃, 전초를 대상으로 추출하였다. 추출방법은 시료를 분말분쇄기로 간 이후, 시료 300g을 취하여 3배량의 에탄올과 메탄올(MeOH)을 가하여 상온에서 24시간 동안 추출하였다. 살충효과 검증은 복숭아혹진딧물, 벼멸구, 점박이용애를 대상으로 실시하였다. 생물검정은 유묘검정법과 leaf disc법을 활용하였다. 멀구슬을 30% Ethanol, hexane, CHCl_3 , EtoAc, H_2O , BuOH 분획별로 점박이용애 부화율, 산란수를 확인하였으며, 시제품을 제작하여 벼멸구, 점박이용애, 담배 거세미나방, 배추좀나방 등의 살충효과와 기피지수도 확인하였다. 또한 살포 방법을 정립하기 위해 제충국과 멀구슬의 처리횟수와 살포 순서를 결정하였다.

4. 친환경 해충 방제용 제충국, 멸구슬의 제품화

시제품의 살충효과를 검정하기 위해 유화제 농도를 3, 5, 10%로 달리하여 제작하였으며 벼멸구를 대상으로 하였으며 작물에 대한 약해유무를 확인하기 위해 벼, 배추, 딸기를 대상으로 50, 100, 200배로 각각 살포하여 3일, 6일, 9일 후의 약해 증상을 관찰하였다. 또한 시제품의 환경에 미치는 영향을 조사하기 위해 포식성천적인 칠레이리용애, 아큐레이퍼이리용애, 오이이리용애, 긴털이리용애, 지중해이리용애, 황온좁벌, 은실가루이좁벌은, 유럽애꽃노린재를 대상으로 직접독성과 잔류독성을 확인하였으며, 보조제를 이용하여 살충활성을 증가시키기 위해 TKS, 80-TW, NP-7, 살충비누, 카테킨을 사용하였다. 시제품을 제작한 이후 살충효과의 지속성을 확인하기 위해 12개월, 6개월, 1개월 된 제품을 가지고 살충효과를 검정하였다.

시제품과 비교하기 위하여 시중에서 유통되고 있는 제충국 제품 4가지를 수집하여 벼 및 원예작물의 주요해충인 벼멸구, 점박이용애, 복숭아혹진딧물, 배추좀나방, 담배거세미나방을 대상으로 유묘에 접종하여 시판제품의 효능을 검정하였다.

5. 제충국, 멸구슬 추출 시제품 이용 해충 방제 매뉴얼 개발

작물재배 포장에서 시제품의 살충효과를 증진시키기 위하여 제충국+창포, 멸구슬+살충비누, 멸구슬+창포로 만든 제품을 사용하여 벼멸구에 대한 밀도변화를 처리 후 5일, 22일, 30일, 38일, 44일에 조사하였으며 살포간격은 7일, 10일, 14일 간격으로 3회 처리하였다. 배추좀나방 역시 7일, 10일 간격 3회, 7일 간격 5회 살포시 살충율을 확인하였으며 제충국과 멸구슬에 고삼, 창포, 상사화, 천남성을 첨가하여 활성을 증진 시켜 점박이용애, 배추좀나방, 목화진딧물 등에 검정하였다. 또한 멸구슬과 제충국을 이용한 입제를 제작하여 점박이용애와 벼물바구미, 벼줄기굴파리리의 살충효과를 검정하여 제형의 다양화를 검토하였다.

IV. 연구개발결과

제충국과 멸구슬을 이용한 해충 방제제 개발 결과 효과가 우수한 2개의 시제품을 특허 출원할 계획이며 이들 제품에 대한 어독성, 경구, 경피독성까지 확인한 결과 환경에 미치는 영향이 아주 적은 우수한 친환경 방제 자재였다. 이들 제품은 벼물바구미 방제를 위한 멸구슬 입제 제형이며 하나는 딸기의 잣빛곰팡이병과 점박이용애, 목화진딧물을 동시에 방제 할 수 있는 자재들이다. 입제 제형은 비닐하우스 등 시설재배지에도 토양혼화처리에 이용 가능할 것으로 보이며 동시방제제는 딸기뿐만 아니라 토마토, 가지, 배추 등에도 확대하여 사용가능할 것이다. 또한 제충국을 대량 생산할 수 있는 단지를 조성하고, 전남의 멸구슬 생산단지 조성을 고흥, 진도, 영광 등에 15억을 투자하여 100ha에 할 계획이며 이를 통해 천연농자재의 수입 대체 및 원료 자가 생산 이용 기반을 확보하여 유기농 생태농업이 실현될 수 있을 것이다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 연구를 통해 '제충국 계통의 특성 및 추출물 방법에 따른 주요 해충의 살충활성 검정'과 '제충국, 멀구슬 추출물의 친적에 대한 독성 및 배추좀나방 방제 효과'에 대한 논문을 한국 유기농업학회에 제출하였으며 산업재산권으로 '벼멸구 방제용 멀구슬 열매 추출 조성물(출원번호 10-2007-0109294)'과 '벼물바구미 방제용 멀구슬 열매 추출 조성물'과 딸기 병해충 방제용 멀구슬열매 추출 조성물'에 관한 특허를 청구할 예정이다. 멀구슬나무 열매를 입체화 시킴으로써 벼물바구미 94.4%, 벼굴파리류는 94.8%까지 방제할 수 있는데, 지금까지 벼물바구미를 방제하기 위해서는 이앙 후 유제를 사용하였으나 이번에 개발된 제품은 이앙당일 상자당 80g씩 뿌려줌으로써 방제에 드는 노동력을 78% 절감하는 이점을 가지고 있다. 또한 딸기에서 점박이응애는 멀구슬 추출물을 3회 살포하여 방제하면 98% 방제효과가 나오며 진딧물은 멀구슬과 제충국을 교호로 살포하여 93.8%의 방제가 가능하다. 잣빛곰팡이병은 황련추출물을 딸기 개화 후 14일 이내에 7일 간격으로 3회 살포하면 62%의 방제 효과가 나타난다는 결과를 바탕으로 멀구슬에 황련과 황을 일정 비율로 혼합하여 제품을 개발하였는데 500배로 7일 간격 3회 살포함으로써 점박이응애 93%, 복숭아혹진딧물 92%, 잣빛곰팡이병 61% 방제가 가능하며, 병해충 단독방제 했을 때와 동일한 방제효과와 함께 살포횟수 감소에 따른 노동력과 방제비용을 절감하여 생산비를 절감하는 성과를 얻었다. 이번에 개발된 제품에 대한 경구독성, 경피독성, 어독성을 평가하여 독성이 없어 유기목록 공시자재로 등록할 계획이며 특허출원을 하여 지적재산권을 확보하며 친환경자재회사에 기술을 이전하여 농가에 조기 보급될 수 있도록 할 계획이다.

SUMMARY

(영문요약문)

The characteristics of 15 strains for *Chrysanthemum cinerariaefolium* grown in the country and foreign countries were examined. The flower yield and local adaptability of 0721 strains was highest among 15 strains. At the late season crown division, the growth was poor and flowering delayed. Especially in the middle of March when the crown division, flowering was delayed in June, the quantity of flowers was only 23% in compare with level of crown division in mid October at last year. As a result, crown division conducted in mid October was the most efficient method for the quantity of flower. At stem cutting by using stock plant at open field for 0721 strain, because stem cutting was carried out from May to June, the quality of rooted cutting was the poor, the survival rate of rooted cutting was low. As a result, by using stock plant at unheating greenhouse in mid March, the survival rate of rooted cutting increased. The rate of seed germination showed a low level as 4.7 to 22.7%, the effect of the bee for fertilization did not show distinctly. As a result, the seed germination of *Chrysanthemum cinerariaefolium* is low, but because the amount of seed per plant be enough, farmer is expected to be fully able to seed harvesting. Also, by pinching, flowering is delayed, the flowers yield decreased.

Melia azedarach Linn (Meliaceae), also known as chinaberry or persian lilac tree, is a fast growing deciduous tree, native to southwestern Asia and northwestern India, has long been recognized for its insecticidal properties and is cultivated and naturalized in many warm and temperate countries of the world. Different parts of the tree, such as the bark and the leaves, are used in folk medicine. In our research, the fruits, leaves, barks, leaf-stalks, and fruit-stalks was analyzed by thin layer chromatography (TLC). The fruits gave comparatively more interests. Our study was focused on the fruits of *M. azedarach*.

The extraction efficiency of 30% ethanol/water, 60% ethanol/water, 70% ethanol/water, ethanol and methanol were studied. Finally, 70% ethanol in water was selected as extraction solvent. 5 kg of fruit of melia azedarach was extracted with 3.5 L of 70% EtOH/H₂O for three times. The extract was evaporated to remove ethanol. Then the extract aqueous solution was partitioned with n-hexane, dichloromethane, ethyl acetate and n-butanol one by one. After removed the solvent by evaporation, 27 g of n-hexane portion, 93 g of dichloromethane portion, 8 g of ethyl acetate portion and 34 g of n-BuOH portion were obtained respectively. N-hexane portion and dichloromethane portion were separated by silica column chromatography. Then 12 fractions and 11

fractions were obtained from n-hexane portion and dichloromethane portion, separately. All the portions and fractions were sent to test the bioactivity effect on *Nilaparvata lugens* and *Tetranych usurticae*. The bioassay results showed that all the tested samples had more or less positive effects on the two insects and fractions H₂, H₃, H₈, H₉, H₁₀, H₁₁, H₁₂, C₂₋₁, C₂₋₂, and C₂₋₃ had comparatively higher bioactivity than the other fractions and portions. Then the further separation and isolation were focused on these fractions. Finally, 3 compounds was isolated from fraction H₂ by column chromatography and preparative-HPLC and identified by GC-MS. They were 1,2-Benzene dicarboxylic acid, di isooctyl ester (Compound1, C₂₄H₃₈O₄, MW:390.28), olean-12-en-28-oic acid, 3-oxo-, methyl ester (Compound2, C₃₁H₄₈O₃, MW:468.36) and olean-18-en-28-oic acid, 3-oxo-, methyl ester (Compound3, C₃₁H₄₈O₃, MW:468.36). As accharide (Compound4) was isolated from fraction H₁₀ by repeating column chromatography. 2 compounds were isolated from fraction C₂₋₂ by column chromatography, preparative-HPLC and recrystallization. The chemical structure was elucidated by UV, IR, LC-MS, ¹H-NMR and ¹³C-NMR. They were melianone (Compound5, C₃₀H₄₆O₄, MW:470.34) and melianodiol (Compound6, C₃₀H₄₈O₅, MW:488.70).

Mortality of brown plant hopper (BPH, *Nilaparvata lugens*) was 78.5% on five days after treatment in dried flower extracts of *Chrysanthemum cinerariaefolium* (CC). Extracts of total plant part had 69.4%, and green flower extracts had 62.1% mortality. In leaf extracts, mortality was low. Mortality of brown plant hopper was 78.2% and 66.4% in ethanol extracts *C. cinerariaefolium* and *M. azedarach*, respectively. In heating and 40% concentrated extracts mortality was 72.6% and 77.2% for brown plant hopper and two spotted spider (TSSM, *Tetranychus urticae*), respectively. Hatchability of *T. urticae* was 9.8% in ethyl acetate and water fraction of *M. azedarach* but 60.7% in butanol. Number of eggs laid of TSSM in extracts treatment was lower than in non treatment, which could decrease the density of TSSM and manage. To manage of TSSM, *M. azedarach* with magic lily was high effectiveness in farm made extracts.

Prototype of *C. cinerariaefolium* and *M. azedarach* was high mortality for BPH as 89.4%, and 95.45, respectively. Prototype of *M. azedarach* mixed calamus was increase mortality as 97.0% but *C. cinerariaefolium* mixed calamus decreased as 72.7%. To manage of TSSM, prototypes of *C. cinerariaefolium*, *M. azedarach*, *Sophora flavescens*, and *M. azedarach*+calamus were 95% mortality but *C. cinerariaefolium*+calamus prototype was low mortality as 77.9%. To manage of *Spodoptera litura* which very difficult control insect pest, prototypes of *C. cinerariaefolium*, *Sophora flavescens*, and *M. azedarach* were 66.7%, 63.3%, 59.8% mortality. To diamond back moth (DBM, *P. xylostella*), *C. cinerariaefolium*+calamus prototype was highset mortality as 98.4%.

Ethanol extracts of 0718 line of flower was high mortality as 63.8% on *Tetranychus urticae*. Ethanol mixed emulsifier extracts were the highest mortality as 69.4% at 5 days after. Mortality in water extract was lower than in ethanol and ethanol mixed emulsifier extracts. Ethanol mixed emulsifier extracts were higher mortality as 69.4% at 5 days after in 0718 line of flower on *N. lugens*. Mortality in water extract was lower than in ethanol and ethanol mixed emulsifier extracts.

On *Aphis gossypii*, *Chrysanthemum* flower extracts could decrease the density of aphids in early days but the density of that was increase as time goes by because aphids produce offspring. When 0721 line extracts added emulsifier, mortality was 53.6% after 1 day spray and maintained 39.1% on 3 days.

Repellency effect of *C. cinerariaefolium* and *M. azedarach* was weak against plant hopper as 52.2 and 58.9 after 1 days treatment but more weak against two-spotted spider mite as 42.2 and 48.9, respectively.

There was evaluation of systematically spray method of *C. cinerariaefolium*(CC) and *M. azedarach*(MA) extracts. In treatment of MA sprayed first and then sprayed CC, the density of *Aphis gossypii* decreased after 1 days below 10% and inhibited after 15 days spray. But it need another spray after 22 days because the density increases slowly after 15 days. In treatment of CC sprayed first and then sprayed MA, it was not easy to suppress the density which was 35% after seven days. In case of three times spray system, The density of *Aphis gossypii* decreased quickly and maintained after 22 days in MA+MA+CC and MA+CC+MA spray plot. Especially, when MA sprayed consecutively two times and then CC sprayed, the density maintained low as 45 after 22 days. The density decreased slowly after 15 days and increased 15% after 22 days in CC+CC+MA and CC+MA+CC spray plot.

Protection value of *A. gossypii* was 98.9 and 98.0 on CC and MA extracts combined in two or three times spray after 15 days and 81.4 and 90.8 after 21 days. When MA extracts sprayed first and then sprayed CC, protection value was 91 in MA and 71.1 in CC. On the contrary to this, when CC extracts sprayed first and then sprayed MA, protection value was 53.9~50.9 in CC and 88.6~89.3 in MA. It suggested that *M. azedarach* should spray first and then alternative spray.

The second prototype contained too low concentration of MA and CC to control of insect pest. The third prototype raised concentration of MA and CC. M80 which contain *M. azedarach* 80% had high protection value on *A. gossypii* as 64%, *T. urticae* as 96.7%, and *P. xylostella* as 70%.

Commercial pyrethrum products collected and conducted bioassay. The products had high mortality as 70%, 75.5%, 93.3%, 92.3% and 80% on BPH, TSSM, DBM, *S. gossypii*, and *S. litura*, respectively. There was difference by products and by insect pests.

There was no damage from plant extracts prototype on rice, strawberry, chinese cabbage in the concentration of 50, 100 and 200 dilution. Prototype containing MA needed only 3% emulsifier and 89.9% mortality on BPH. But prototype containing CC needed 10% and 84.4% mortality.

For evaluation of the toxicity on natural enemies, effect against predatory natural enemy was classified as moderate selective toxicity based on the criterion of international organization of biocontrol (IOBC), whereas against parasitic natural enemies was found to be relatively safe.

Contact toxicity of *Phytoseiulus persimilis* increased on CC and MA as 38.9% and 45.0% after 5 days spray. *Phytoseiulus persimilis* survived on CC and MA as 81.1% and 70.0% after 5 days in residual toxicity test. It suggested natural enemies should release after *M. azedarach* extract spray. *Hypoaspis aculeifer* was more susceptibility than *P. persimilis*, *Amblyseius cucumeris*, *A. wormsleyi* and *A. swirski* were pretty similar with *P. persimilis*. Toxicity of *Orius laevigatus* was 68.2% and 54.2% on CC and MA extracts. It showed high toxicity so careful use when *O. laevigatus* release fields. *Aphidius colemani* was the lowest susceptibility on *M. azedarach* which could mixed spray with natural enemies. *Eretmocerus eremicus* had low emergence rate on *M. azedarach*, so it suggested that *M. azedarach* should spray first and then release *E. eremicus*. Emergence rate of *Encarsia formosa* was more higher than that of *E. eremicus* as 61.8% and 53.3% on CC and MA, respectively.

Among supplementary materials which need to synergy effect on prototype, NP-7 was 48.7% mortality for TSSM, but 80-TW was 38.6% for *A. gossypii*. It suggested supplementary need to difference materials and concentration by prototype. Prototype extended at least 12 months until it didn't exposure sun light

Mixed extracts with *M. azedarach* versus *S. flavescens* 2:1 was 85.9% mortality and MA vs. *Acorus calamus* 1:1 was 83.5% on *A. gossypii*. MA vs. *Acorus calamus* 2:1 was 90.0% on DBM and *M. azedarach* vs. *S. flavescens* 1:1 was 90.4% on TSSM.

Mixing ratio

When prototype of CC+calamus, MA+soap, MA+calamus sprayed 1 time, the density of BPH increase after 22 days, but maintained low density after 38 days on three times spray. Prototype could suppress density when 3 times spray at a week intervals, but couldn't suppress on two weeks intervals. Prototype of CC+emulsifier could not suppress DBM density when 1 time spray, but could manage when three times spray at a week intervals after 21 days as 91.1%. MA prototype had high mortality of DBM after 14 days as 96.7% on one time spray, and maintained 100% mortality on 3 times spray at a week intervals from 14 days to 28 days. CC prototype had 49.4% mortality but MA 96.7%. It means MA prototype should apply first then CC to control of DBM.

CC+S. *flavescens* prototype didn't synergistic effect but MA+S. *flavescens* had high synergistic effect so mortality was 94.4~100% after 7 days.

To manage rice water weevil(RWW, *Lissorhoptrus oryzophilus*), CC and MA extracts formulated granule. CC granule prototype of 200 dilution had low damaged leaf ratio of RWW as 11.7% at 80g treatment plot. MA granule prototype of 200 dilution had lower damaged leaf ratio of RWW as 9.3%, 4.7, 2.2% at 20g, 40g, 80g treatment plot, respectively. Damaged leaf ratio of rice stem maggot(*Chlorops oryzae*) had low on CC 80g and MA 80g of 200 dilution as 5.2% and 1.3%, respectively.

Protection value was 70% before 3 and 7 days application of TSSM occurrence, but high as 85.6% before 1 day application.

The third prototype of MA, named M80, had high protection value for *A. gossypii* (98.2%), TSSM(99.3%), and botrytis blight(60%) when sprayed 3 times at a week intervals. M80 could manage disease and insect pest of strawberry at the same time. MA granule prototype and M80 prototype was classified as the lowest level at acute oral, acute dermal and fish toxicity test and did not induce the irritancy at skin irritation test and eye irritation test.

CONTENTS

Chapter 1. Out line of research	17
Section 1. Purpose and aim of research	17
1. Purpose	17
2. Necessity	18
Section 2. Objective and content	19
1. Objective	19
2. Content and range of research	20
3. System of research processing	24
 Chapter 2. Current status between Korea and foreign	 25
Section 1. Research status in Korea	25
Section 2. Research status in foreign country	25
Section 3. Prospect	26
 Chapter 3. Results of research	 27
Section 1. Selection of pyrethrum variety and development of culture	27
1. Introduction	27
2. Materials and methods	28
3. Results and discussion	29
4. Abstracts	47
Section 2. Search of insecticidal material	49
1. Introduction	49
2. Materials and methods	50
3. Results and discussion	54
4. Abstracts	95
Section 3. Bioassay of plant extracts to insect pest	97
1. Introduction	97
2. Materials and methods	98
3. Results and discussion	99
4. Abstracts	118
Section 4. Prototyping of pyrethrum and china mulberry extracts	120
1. Introduction	120
2. Materials and methods	120
3. Results and discussion	122
4. Abstracts	133

Section 5. Development of insect pest management system on fields	134
1. Introduction	134
2. Materials and methods	135
3. Results and discussion	135
4. Abstracts	154
Section 6. Toxicity of prototype	155
1. Introduction	155
2. Toxicity of granule prototype	155
3. Toxicity of liquid prototype	198
4. Abstracts	240
Chapter 4. Achievement aims and contribution to related area	241
Section 1. Achievement of research aims	241
1. Aims, evaluation score and achievement on the first year	241
2. Aims, evaluation score and achievement on the second year	242
3. Aims, evaluation score and achievement on the third year	242
Section 2. Contribution to related area	243
1. Technical aspects	243
2. Academic aspects	244
3. Economic and industrial aspects	244
Chapter 5. Plan and application of results	246
Section 1. Plan of industrialization	246
Section 2. Education, guidance and information	246
Section 3. Guarantee Intellectual pro-perty right	246
Section 4. Additional and applicable planning of other research	247
Chapter 6. Information collected from abroad during the research	248
Section 1. Visit organic field and institute, Australia	248
Chapter 7. Reference	250

목 차

1장. 연구 개발과제의 개요	17
1절. 연구개발의 목적 및 필요성	17
1. 연구개발의 목적	17
2. 연구개발의 필요성	18
2절. 연구개발의 목표 및 내용	19
1. 연구개발 목표	19
2. 연구의 내용 및 범위	20
3. 연구개발 추진체계	24
 2장. 국내외 기술개발 현황	 25
1절. 국내 기술 현황	25
2절. 국외 기술 현황	25
3절. 앞으로 전망	26
 3장. 연구개발 수행내용 및 결과	 27
1절. 살충효과가 우수한 제충국 품종 선발 및 재배기술 개발	27
1. 서언	27
2. 재료 및 방법	28
3. 결과 및 고찰	29
4. 결과요약	47
2절. 제충국, 멸구슬 추출물의 살충물질 탐색	49
1. 서언	49
2. 재료 및 방법	50
3. 결과 및 고찰	54
4. 결과요약	95
3절. 제충국, 멸구슬 추출물의 주요 해충의 살충활성 검정	97
1. 서언	97
2. 재료 및 방법	98
3. 결과 및 고찰	99
4. 결과요약	118
4절. 친환경 해충 방제용 제충국, 멸구슬의 제품화	120
1. 서언	120
2. 재료 및 방법	120

3. 결과 및 고찰	122
4. 결과요약	133
5절. 제충국, 멀구슬 추출 시제품 이용 해충 방제 매뉴얼 개발	134
1. 서언	134
2. 재료 및 방법	135
3. 결과 및 고찰	135
4. 결과요약	154
6절. 시제품의 독성시험결과	155
1. 서언	155
2. 멀구슬 입제 시제품의 독성시험	155
3. 멀구슬 함유 액상 시제품의 독성 시험	198
4. 결과요약	240
4장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	241
1절. 목표달성도	241
1. 제 1차년도의 연구 개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도	241
2. 제 2차년도의 연구 개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도	242
3. 제 3차년도의 연구 개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도	242
2절. 관련분야에의 기여도	243
1. 기술적 측면에서의 기여도	243
2. 학문적 측면에서의 기여도	244
3. 경제·산업적 측면에서의 기여도	244
5장. 연구개발 성과 및 성과활용 계획	246
1절. 기업화 추진방향	246
2절. 교육 지도 홍보 계획	246
3절. 지식재산권 확보 계획	246
4절. 추가연구, 타 연구 활용 계획	247
6장. 연구개발과정에서 수집한 해외 과학 기술 정보	248
1절. 호주 유기농업 현장 방문	248
7장. 참고문헌	250

1장. 연구 개발과제의 개요

1절. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

유기 합성살충제는 농업해충 방제에 의한 식량증산 및 위생해충구제에 의한 인류보건 향상에 크게 기여하였으나, 살충제의 연용과 남용은 천적과 유용곤충의 살해, 잠재해충의 주요 해충화, 저항성 해충의 출현, 인축에 대한 독성, 토양 및 식품 잔류, 각종 환경오염문제 등의 부작용을 유발하여 종래의 화학합성을 통한 해충 방제제 개발이라는 형태와는 다른 약효의 선택성 및 안전성 측면에서 새로운 해충 방제제 개발이 절실히 요구되고 있다. 이에 농산업도 병해충 방제와 작물의 생육촉진을 위해 합성농약과 화학비료가 아닌 생물이나 천연자원을 이용하는 친환경농업을 적극적으로 실천하고 있다. 정부는 2013년까지 화학비료와 합성농약의 사용량을 2003년을 기준으로 40% 감축하는 친환경농업 육성계획을 세우고 실천중이다.

이처럼 합성농약과 화학비료를 대안할 수 있는 병해충 방제법이 절실히 필요한 실정으로서 자생식물에서 추출한 천연물질들이 합성화학제를 대처할 수 있는 천연농약으로서의 충분한 가격 경쟁력을 지니고 세계 시장에 진출할 수 있으며 농업생산부분에 보다 폭넓게 응용될 수 있으며, 가정에서 사용하는 대부분의 살충제를 대체할 수 있을 것이다. 식물은 페놀화합물, 테르펜화합물, 알칼로이드 등 다양한 물질을 함유하고 있으며, 이들 물질들은 해충에 선택성을 보이며, 비표적 생물 및 환경에는 거의 해가 없고, 여러 종류의 해충에 다양하게 작용하며, 합성살충제와 마찬가지로 작물에 처리할 수 있다는 점에서 IPM의 한 수단으로 인식되고 있다. 식물추출물은 햇빛에 약하여 자연상태에서 쉽게 광분해가 일어나 식물체 내의 독성분이 빠르게 소실되므로 인축에 영향이 적은 특성이 있으며 환경에도 안전한 새로운 대안이 될 수 있다.

이런 식물 중에 제충국은 식물체, 특히 꽃 부분에 피레트린이라는 담적황색의 기름과 같은 물질이 있다. 피레트린은 유기용매에 용해된다. 이것은 냉혈동물, 특히 곤충에 대하여 독성이 강하여 운동신경을 마비시키지만, 온혈동물에는 독성이 없으므로 가정용 고급 구충제로 적당하다. 한국은 남부지방이 재배의 적지이며 브라질·콩고·케냐, 호주 등에서 재배한다. 피레트린은 곤충의 기문(氣門) 또는 피부를 통하여 침입되며, 침입 즉시 신경을 마비시켜 죽게 한다. 그러나 사용한 양이 부족하면 일시적인 마비에서 다시 소생하게 된다. 제충국제는 온혈동물인 사람이나 가축에는 무해하며 곤충에만 유효하고 또한 식물에 대한 약해작용도 전혀 볼 수 없으므로 매우 안전한 생물농약이다. 멸구슬나무는 동남아시아의 열대 혹은 아열대 지역에 서식하는 낙엽활엽교목으로 우리나라에서는 흑산도, 월출산, 백양산, 해남, 신안, 목포, 무안, 나주, 완도, 진도 등 주로 해안지방에서만 자생하고 있다. 멸구슬의 잎, 수피, 가지, 과실, 종자추출물은 광범위한 저장해충들과 노지포장 해충에 대해 기피, 섭식저해, 살충, 성장저해 등을 가져오며 멸구슬의 잎에서 추출된 활성성분은 파라이신(paraisin), 잎과 과실에서 아자디락틴(azadirachtin) 등이 분리되었는데 국내의 연구보고는 미미한 실정이다.

따라서, 작물을 안정적이고 지속적으로 공급하고 소비자들에게는 안전한 먹거리를 공급하기 위해서는 화학 약제를 대체할 다양한 생물농약(천연물 유래 생화학농약)의 개발을 비롯한 해충 방제를 위한 체계적인 방제 메뉴얼 작성이 절실하며 아울러, 생물농약의 원료가 되는 식물체 대량증식체계 연구는 거의 없는 실정으로 식물추출물을 이용한 생물농약개발에는 천연원료가 되는 식물체를 대량 증식할 수 있는 재배기술 체계 확립이 절실히 요구되고 있어 제충국과 멀구슬을 이용한 새로운 친환경 병해충 방제제를 개발하고자 하였다.

2. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

국내에서 원자재를 재배 생산함으로써 고부가가치화로 연결될 수 있는 가능성이 높고 기술력 제공으로 특성화된 재가공 원료나 고부가가치제품으로 가공되어 수요처를 확대하는 결과를 갖게 됨으로써 환경오염 방지 및 응용연구를 확대할 수 있을 것이다. 농업선진국인 미국, 일본, 네덜란드 등과 경쟁하여 향후 “우리나라의 자원”을 최대한 활용할 수 있는 관련기술의 개발로 연결될 것이다. 우리만의 추출기술 노하우를 개발시켜 중국 등에서 crude 추출물을 이용한 개발대상국의 해충방제방법을 대체할 수 있다. 벼와 배추, 딸기의 주요 해충인 진딧물, 점박이용애, 배추좀나방 방제제로서 멀구슬나무 열매를 건조-분쇄-에탄올에 침지-여과 과정을 통해 추출한 추출물을 9:1 비율로 혼합한 액을 90% 첨가하여 주성분으로 하고 첨가제로서 지방산에 벗짚 잣물과 난황 레시틴을 함유하여 만든 액상 살충비누를 10%~50% 넣어 만든 액상 살충비누를 5~10% 보조성분으로 추출물이 500배액에서 95%이상의 살충효과 나타나며, 제충국에 TDE7과 OA1019 물질을 혼합하여 사용하는데 이는 친환경 재배에 부적합하므로 벗짚 잣물과 난황 레시틴을 함유한 유화제를 사용함으로써 기존 추출물과 같이 점박이용애, 진딧물에 대해 95%, 배추좀나방에 대해 80%이상의 살충효과를 보이고 있으므로 이러한 기술적인 발전이 이루어짐으로써 유기농업을 할 수 있는 조건이 더 다양해질 수 있다.

나. 경제·산업적 측면

2004년 현재 전 세계에 등록된 생물농약은 276여종으로 알려져 있는데, 이 중에서 살충제 172종(62%), 살균제 49종(18%), 살선충제 4종(1.4%), 제초제 16종(6%), 식물생장조절제와 기타가 각각 14종(5%)과 21종(7.6%)이며 이들의 대부분은 전량 외국의 농약 회사에서 수입되어 현장에서 사용되는 곱팡이 및 점박이용애 방제용 농약의 수입대체 효과는 막대할 것이다. 또한 유기농자재로 등록되어 있는 자재들의 원료 대부분은 수입에 의존하고 있는 실정으로 국내에 원료 단지를 만들어 대량 구매가 이루어 질 수 있도록 한다면 대체 작물로서의 가치 또한 크다 하겠다. 전 세계적으로 식물추출물에 의한 해충의 기피효과, 섭식저해, 곤충 성장조절에 관련하여 알려진 시료는 866여종이다. 선충에 대해서는 150여종, 응애류는 30여종, 두더지나 쥐에 대해서 33여종이 알려져 있다. 이 중에서 식물의 살충활성을 나타내는 화학성분의 생물학적 특성이나 분자구조식 등은 260여종에서 밝혀져 있다. 국내

기술로 개발된 특화된 기술 우위성을 선점하고 농산물의 가격 및 품질 경쟁력을 높일 수 있는 제품의 개발로 농민의 소득증대에 기여할 것이다. 생물농약은 순수 국내기술로 만들어진 것이므로 외국으로부터의 기술도입이 필요 없고 싼값으로 대량생산할 수 있는 장점이 있다. 경제성으로는 기존의 살충제에 비해 생산단가가 저렴하다. 이를 전체적인 생산기술과 경제적인 면에서 비교할 때는 기존의 것보다 10~20배의 절감 효과가 있다. 국내시장은 물론 환경규제가 엄격한 선진국으로의 수출전망도 밝다고 볼 수 있다.

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. 제충국과 멀구슬을 이용한 친환경 방제제 개발은 자연의 구성원인 식물체를 이용하기 때문에 합성농약처럼 잔류독성이나 인축에 대한 해가 훨씬 적은 장점이 있으며 또한 햇빛의 자외선에 쉽게 분해가 되기 때문에 환경 오염이나 농산물의 안정성 제고에도 도움을 줄 수 있다.

2절. 연구개발의 목표 및 내용

1. 연구개발 목표

- 살충효과 우수한 제충국 품종 선발 및 대규모 생산 농가 단지 조성
- 제충국, 멀구슬의 대량 추출법 개발 및 살충물질 탐색
- 제충국, 멀구슬 추출물이용 해충 방제제 개발
- 제충국, 멀구슬의 시제품 이용 무농약 해충 방제 매뉴얼 개발
- ⇒ 제충국 재배법 농가 보급으로 농가 소득증대, 국산 원료에 의한 친환경 자재 보급

식물에서 유래된 살충제를 보면 피레스린은 제충국 꽃의 살충성분으로서 합성하여 시판되고 있으며 neem나무 성분인 아자디락틴(azadirachtin)은 200여종의 해충에 대하여 섭식저해, 불임, 생육저해 및 살충활성 등 광범위한 생리활성을 나타내고 있다. 콩과작물인 *Physostigma venenosum* 종자의 독성분인 physostigmine의 살충효과가 발견, 이 화합물의 화학구조중 N-methyl carbamoyl.기를 모핵화합물로 하여 많은 카바마이트계 살충제를 개발하였다. *Piper betle*(후추과), *Ocimum sanctum*, *Nyctanthes arbor-tristis*, *Citrus limon*(운향과)의 잎 추출물들은 식물병원균의 균총 성장을 억제, 생체 내에서 벼의 병원균들의 성장을 억제하는 효과 등이 있는 것으로 알려져 있다. 이와 같이 세계적으로 제3세대농약으로 인식되고 있는 식물

체나 천연물질에서 새로운 살충효과를 탐색하는 연구들이 광범위하게 이루어지고 있는 현실에서 국내에서 재배, 생산할 수 있는 생물농약 원료 단지는 절실한 현실이다. 또한 친환경 재배 농가의 47%가 병해충 방제에 가장 큰 애로사항을 가지고 있기 때문에 다양한 작물과 해충에 대한 친환경 방제제 개발은 필수적이며 이러한 방제제에 의한 병해충 방제로 수량 손실을 30%이상 절감 시킬 수 있다. 따라서 본 연구에서는 기존의 다양한 식물추출물 중에 효과가 우수하다고 알려진 제충국과 멀구슬을 이용하여 새로운 해충 방제제를 개발하고 농가에서 쉽게 구할 수 있도록 제충국의 재배 단지를 개발하고자 하였다.

2. 연구의 내용 및 범위

- 살충효과 우수한 제충국 품종 선발 및 재배 기술 체계확립
 - 살충효과 우수한 제충국 우량품종 선발 및 우수계통 대량증식 보급
 - 영양체 번식과 종자 채종에 의한 대량 증식 기술 개발
 - 대규모 농가 생산단지 및 재배 농가 육성
- 제충국, 멀구슬 추출물의 살충물질 탐색
 - 대량 추출법 개발, 살충물질 증진 방법개발
 - 살충활성 물질 분리, 구조구명
- 제충국, 멀구슬 추출물의 주요 해충의 살충활성 검정
 - 추출 부위 및 방법별 살충효과 검정
 - 처리 횟수에 따른 밀도 조절
- 친환경 해충 방제용 제충국, 멀구슬의 제품화
 - 시제품의 약효, 약해 및 천적영향 검정
 - 시제품의 살충활성 증진제 선발, 보관방법, 보관기간 등
- 제충국, 멀구슬 추출 시제품 이용 해충 방제 매뉴얼 개발
 - 시제품 농도 및 해충별 포장 살충력 검정
 - 시제품, 해충별 살포시기, 간격, 횟수 검증
 - 딸기, 배추, 벼 농가현장 실증

가. 1차년도 추진내용

세부과제별	연구개발의 목표	연구개발의 내용
○ 살충효과가 우수한 제충국 품종 선발 및 재배기술 개발(세부)	○ 살충효과 우수 품종선발 ○ 번식 및 채종 기술 확립	○ 살충효과가 우수한 품종 선발 및 대량 증식 - 수집대상 : <i>Chrysanthemum cinerifolium</i> , <i>C. coccineum</i> , <i>C. maximum</i> 등 국내의 수집종 - 선발기준 : 살충물질(피레드린) 함량, 국내 적응성, 증식율 ○ 영양체 번식에 의한 증식기술 개발 - 번식방법 : 분주 및 삽목 시기 - 조사내용 : 증식율, 개화기간, 꽃 및 종자수량
○ 제충국, 멀구슬 추출물의 살충물질 탐색(협동)	○ 추출물의 대량 생산 ○ 추출물 살충 활성증진 ○ Extract bank 구축 및 활성검색 추출물 선정 ○ 활성분획의 살충 활성 검정 ○ 추출물의 대량 생산조건 검토	○ 추출물 대량 추출법 개발 - 대상식물 : 제충국 잎, 종자, 꽃, 멀구슬 열매, 잎, 뿌리 - 추출용매 : H ₂ O, Ethanol, 메탄올 등 - 추출온도 및 농도 : 60, 80℃ 등 - 조사내용 : 추출수율 ○ 추출물의 살충활성 증진제 개발 - 대상식물 : 제충국잎, 종자, 꽃, 멀구슬열매, 잎, 뿌리 - 보 조 제 : 화이트카본, 보릭산 등 - 대상해충 : 멀구류, 흑명나방, 벼물바구미 등 ○ 각종 database, 문헌조사 및 검색체계를 활용 - 살충활성 성분을 함유하는 추출부위 탐색 ○ 각종 활성분획에 대한 멀구류, 흑명나방, 벼물바구미 등에 대한 살충활성 검정 - 활성성분의 분리 및 구조분석 ○ 제충국의 잎, 종자, 꽃, 멀구슬 열매, 잎, 뿌리 등의 추출용매별 최적추출 조건 검토 - 각 추출부위별 Extract bank 구축
○ 제충국, 멀구슬 추출물의 주요 해충의 살충활성 검정(세부)	○ 추출물 살충활성 ○ 추출물 기피효과	○ 추출 부위별 살충효과 검정 - 추출부위 : 열매, 잎, 뿌리, 꽃 - 대상해충 : 멀구류, 흑명나방, 벼물바구미 등 - 조사내용 : 살충율, 기피율 ○ 추출방법에 따른 살충 효과 검정 - 추출방법 : 용매, 열수, 발효 등 - 조사내용 : 살충율, 기피율 ○ 처리 횟수에 따른 밀도 조절 - 처리횟수 및 간격 : 1, 3, 5회, 7일, 10일 ○ 해충의 추출물 기피지수 - 추출물 처리시기에 따른 기피율
○ 친환경 해충 방제용 제충국, 멀구슬의 제품화(협동)	○ 추출물 제품화	○ 시제품의 약해시험 - 대상작물 : 벼, 배추, 딸기 - 살포농도 : 200배, 500배, 1,000배 ○ 천적에 미치는 영향 검정 - 대상천적 : 기생벌, 거미류 등 ○ 시제품의 살충활성 증진제 선발 - 증진제 종류 : 살충비누, 식물성오일, 카테킨 - 유화제 종류 : 레시틴 등
○ 제충국, 멀구슬 추출 시제품 이용 해충 방제 매뉴얼 개발(세부)	○ 벼 해충 방제 매뉴얼개발 ○ 농가현장 실증	○ 해충별 추출물의 포장 살포시기 및 횟수 검증 - 살포시기 : 정식직후, 발생초기, 발생성기 - 살포농도 : 500배 - 살포기간 및 횟수 : 7일, 10일, 14일, 1회, 3회 - 조사내용 : 살충율, 밀도변화 ○ 시제품 농도별 벼 포장에서의 방제효과기간 구명 - 살포농도 : 100배~1,000배 - 시험장소 : 유기농 벼 재배 농가 - 대상해충 : 멀구류, 흑명나방, 벼물바구미 등

나. 2차년도 추진내용

세부과제별	연구개발의 목표	연구개발의 내용
○ 살충효과가 우수한 제충국 품종 선발 및 재배기술 개발(세부)	○ 살충효과 우수 품종 선발 ○ 번식 및 채종기술 확립 ○ 대량생산을 위한 제충국 재배기술 확립	○ 살충효과가 우수한 품종 선발 및 대량 증식 - 도입품종 특성검정 및 품종 선발 - 우수 품종 대량 증식 ○ 영양체 번식에 의한 증식기술 개발 - 번식방법 : 분주 및 삼목 시기 - 조사내용 : 증식율, 개화기간, 꽃 및 종자수량 ○ 대량생산을 위한 제충국 재식밀도 구명 - 재식밀도 : 20×20, 20×30, 30×30, 30×40cm - 조사내용 : 처리별 개화율, 꽃 및 종자수량
○ 제충국, 멀구슬 추출물의 살충물질 탐색(협동)	○ 살충활성 물질 분리 ○ 추출물에 대한 정량법 확립과 함량조사	○ 제충국과 멀구슬 채취 및 추출 - 추출물에 대한 분획물 제조 - 초음파 추출과 열탕추출의 비교 ○ 살충활성 검정을 위한 제충국과 멀구슬 최적추출 조건 확립 및 추출물 조제 ○ 추출물에 대한 정량법 확립과 함량조사 ○ 각종 Chromatography 사용 ○ 제충국과 멀구슬 중 활성성분의 대량분리 정제법 고안 및 분리
○ 제충국, 멀구슬 추출물의 주요 해충의 살충활성 검정(세부)	○ 추출물 살충활성 ○ 추출물 기피효과	○ 추출방법에 따른 살충 효과 검정 - 추출방법 : 용매, 열수, 발효 등 - 조사내용 : 살충율, 기피율 ○ 처리 횟수에 따른 밀도 조절 - 처리횟수 및 간격 : 1, 3, 5회, 7일, 10일 ○ 해충의 추출물 기피지수 - 추출물 처리시기에 따른 기피율
○ 친환경 해충 방제용 제충국, 멀구슬의 제품화(협동)	○ 시제품의 살충력 보전 ○ 추출물 제품화	○ 시제품의 보관방법 및 시기 - 보관기간 : 3, 6, 12개월 - 보관방법 : 실내, 온실, 냉장고, 냉동고 ○ 천적에 미치는 영향 검정 - 대상천적 : 애꽃노린재, 수정벌 ○ 시제품의 살충활성 증진제 선발 - 증진제 종류 : 살충비누, 식물성오일, 카테킨 - 유화제 종류 : 레시틴 등
○ 제충국, 멀구슬 추출 시제품 이용 해충 방제 매뉴얼 개발(세부)	○ 배추 해충 방제 매뉴얼 개발 ○ 농가현장실증	○ 해충별 추출물의 포장 살포시기 및 횟수 검증 - 살포시기 : 정식직후, 발생초기, 발생성기 - 살포기간 및 횟수 : 7일, 10일, 14일, 1회, 3회 - 조사내용 : 살충율, 밀도변화 ○ 시제품 농도별 배추 포장의 방제효과기간 구명 - 시험장소 : 유기농 배추 재배 농가 - 대상해충 : 진딧물, 점박이응애, 나방류

다. 3차년도 추진내용

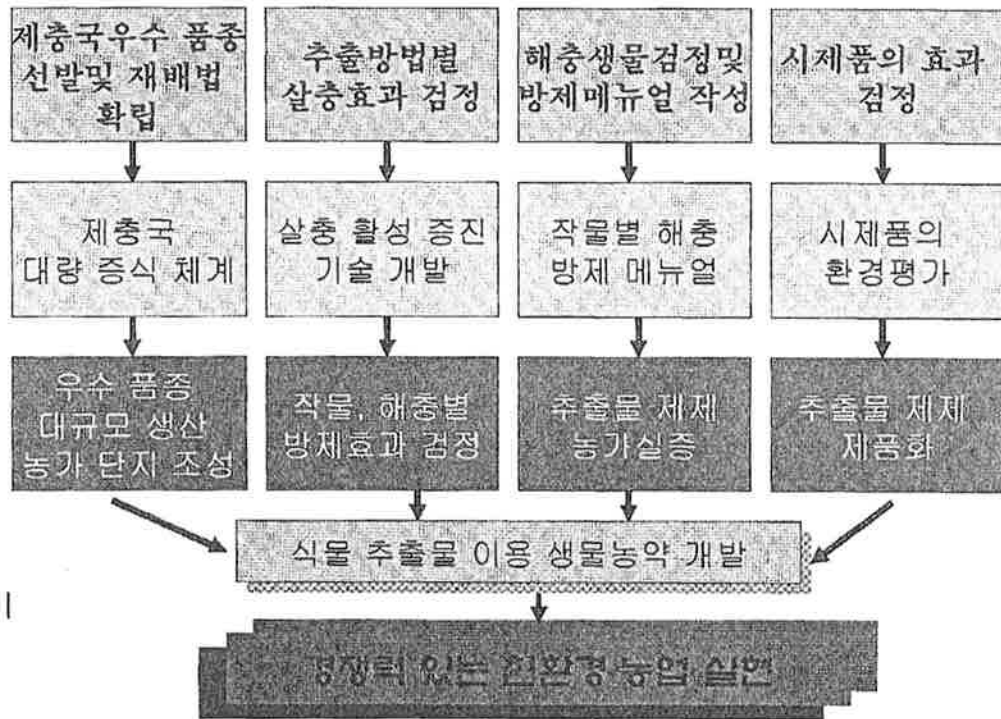
세부과제별	연구개발의 목표	연구개발의 내용
○ 살충효과가 우수한 제충국 품종 선발 및 재배기술 개발(세부)	○ 대량생산을 위한 제충국 재배기술 확립 ○ 농가 현장실증 및 확대보급	○ 살충효과가 우수한 품종 선발 및 대량 증식 - 도입품종 특성검정 및 품종 선발 - 우수 품종 대량 증식 ○ 종자 채종에 의한 증식기술 개발 - 실생번식을 위한 채종 방법 개발 - 조사내용 : 발아율, 개화기간, 꽃 및 종자수량 ○ 대량생산을 위한 제충국 적심방법 구명 - 적심시기 및 횃수 : 5월 중순, 6월 초순, 6월 하순, - 조사내용 : 적심시기 및 횃수별 개화율, 꽃 수량 ○ 대체작물 농가생산 단지 조성 및 생산 경제성 분석 - 전문 재배농가 육성 및 경제성 분석 - 대규모 농가생산단지 조성을 위한 우수선발 계통 분양 공급
○ 제충국, 멀구슬 추출물의 살충물질 탐색(협동)	○ 살충활성 물질 분리 ○ 해충 살충활성 성분의 물질 분리 및 확인	○ 활성성분의 대량 분리 및 정제 방법의 확립 ○ in vivo 실험과 시제품 생산을 위한 대량분리 ○ 활성성분 함유 최적의 추출용매 및 추출법 고안 ○ 살충활성을 위한 최적의 추출용매 및 추출법 고안 ○ 활성성분 함량별 추출물의 조제 및 조제방법의 확립 ○ 활성 화합물의 분리 및 구조확인 ○ 화합물 활성검색을 위해 적정량의 시료확보 및 제공
○ 제충국, 멀구슬 추출물의 주요 해충의 살충활성 검정(세부)	○ 시제품 살충활성 ○ 시제품 기피효과	○ 시제품 살충효과 검정 - 추출식물 : 제충국, 멀구슬 단독 또는 혼합제 - 대상해충 : 벼, 배추, 딸기 해충, - 조사방법 : 유묘검정 및 포장 검정 - 조사내용 : 살충율, 기피율 ○ 처리 횃수에 따른 밀도 조절 - 처리횃수 및 간격 : 1, 3, 5회, 7일, 10일 ○ 해충의 시제품 기피지수 - 시제품 처리시기, 농도에 따른 기피율
○ 친환경 해충 방제용 제충국, 멀구슬의 제품화(협동)	○ 시제품의 안전성	○ 시제품의 안전성 평가 - 시험내용 : 경구독성, 경피독성, 어독성 ○ 천적에 미치는 영향 검정 - 대상천적 : 칠레, 긴털, 오이이리응애
○ 제충국, 멀구슬 추출 시제품 이용 해충 방제 매뉴얼 개발(세부)	○ 딸기 해충 방제 매뉴얼 개발 ○ 농가현장실증	○ 해충별 추출물의 포장 살포시기 및 횃수 검증 - 살포시기 : 정식직후, 발생초기, 발생성기 - 살포농도 : 500배 - 살포기간 및 횃수 : 7일, 10일, 14일, 1회, 3회 - 조사내용 : 살충율, 밀도변화 ○ 시제품 농도별 딸기 포장의 방제효과기간 구명 - 살포농도 : 100배~1,000배 - 시험장소 : 유기농 딸기 재배 농가 - 대상해충 : 진딧물, 점박이용애, 나방류

3. 연구개발 추진체계

가. 연구개발의 추진전략 방법

친환경 농업에 사용 가능한 자재는 친환경농업 육성법 시행규칙에 표시가 되어 있으나 친환경 자재 생산회사의 난립으로 국적 없는 자재들이 시중에 유통되고 있으며 농민들은 무분별한 친환경 자재 사용으로 농가 경영비가 상승되고 있다. 본 연구를 통해 개발된 친환경 해충 방제제를 통하여 농가의 경영비 절감과 방제자재 사용의 기본을 확립시킨다. 또한 친환경 방제용으로 사용되는 식물의 재배법을 확립하여 친환경농업 실천농가의 애로 사항 해결 및 친환경농자재 등록을 유도하여 효과가 일정한 품질로 관리가 되도록 한다.

나. 연구개발의 추진체계



2장. 국내외 기술개발 현황

1절. 국내 기술 현황

국내에서 식물추출물을 이용한 해충방제용으로 상용화되어 있는 것은 저장해충용이며 농업해충용으로 사용할 수 있는 자재는 거의 없는 실정으로 제충국이나 멀구슬 열매 원료를 호주나 중국에서 수입하여 2차 처리 후 제품으로 만들고 있다. 그러나 이들 수입 원료들의 살충 성분 함량이 항상 일정하지 않아 농가에서 사용 시 효과가 없는 경우도 있어 문제가 되기도 한다.

1. 국내·외의 연구현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
전남농업기술원	멀구슬, 제충국 이용 살충력 검정 - 배추좀나방, 점박이응애 등에 효과 - 특허출원 예정 3건 1. 벼멀구 방제용 멀구슬 열매 추출 조성물 2. 딸기해충 방제용 멀구슬 추출 조성물 3. 딸기해충 방제용 제충국 추출 조성물	(주)팜스코리아와 공동 개발예정
식물추출물은행	멀구슬 3회, 산국, 구절초 2회 추출	추출후 분양위주 사업
네덜란드 Wageningenagkr	멀구슬 추출에 의한 배추좀나방 방제효과, 천적 프루텔고치벌의 영향 평가	제품의 약효증진 및 안정성 확보
미국농무성	제충국이 인간에 암 일으키지 않음	제충국의 유기농자재로 허용
미네소타대학	제충국 상승효과 검정	오일과 혼합하여 제품화
Organica Biotech	멀구슬의 상승효과 검정	멀구슬에 살충비누혼합 제품

2절. 국외 기술 현황

전 세계적으로 식물추출물에 의한 해충의 기피효과, 섭식저해, 곤충 성장조절에 관련하여 알려진 시료는 866여종이다. 선충에 대해서는 150여종, 응애류는 30여종, 두더지나 쥐에 대해서 33여종이 알려져 있다. 이 중에서 식물의 살충활성을 나타내는 화학성분의 생물학적 특성이나 분자구조식 등은 260여종에서 밝혀져 있다. 제충국은 *Chrysanthemum cinerariaefolium*과 *C. coccineum*, *C. marshalli*등을 포함하여 19종의 *Chrysanthemum*속이 살충활성이 있는 것으로 알려져 있다. 이 중 유기농협회로부터 인증 받은 제품은 Pyganic, Safer 등이 있으며 이외에도 Pyrellin, Pyola, Pyrenon, Pyronyl, Evergreen, Diatect V 등이 있다.

또한 제충국 살포로 효과가 있는 해충은 은실가루이, 진딧물, 나방류 등이며 굴파리나 응애는 효과가 적은 것으로 알려져 있다. 멀구슬은 중국 운남성에서 해충방제용으로 대단위로 재배하여 판매하고 있는데 특별히 알려진 제품은 없다. 그러나 이와 유사한 인도 멀구슬나무는 Agroneem, Azatrol, Ecosense, AZA, Amazin, Azatin, Bioneem, Ecosin 등 다양한 이름으로 판매되고 있다.

3절. 앞으로 전망

국내에서 식물성 농약의 개발은 멀구슬을 비롯하여 50여종이 알려져 있으며 친환경 재배 농가에서는 산야초를 중심으로 개별적으로 사용하고 있다. 식물추출물을 이용한 해충방제제의 생산업체, 제품 수, 출하량 등에 대해서는 정확한 집계가 어렵다. 천연추출물은 합성농약에 비하여 개발기간이 짧고 개발비용도 적게 소요되고 독성이 낮고, 생태계 영향이 거의 없다는 엄청난 장점이 있지만 방제효과가 낮고 유효기간이 짧으며 적용범위가 제한적이라는 문제점으로 인해 그 다수의 사용자에게 의한 일반화는 되어있지 않다. 우리나라는 경지면적이 협소하여 동일 작물이 연작되고 새로운 기술 개발과 다양한 작물의 보급 및 생산 환경의 급격한 변화에 맞추어 병해충의 발생 양상은 크게 달라져 더욱 복잡해 질 것으로 전망된다. 따라서 환경친화형 식물성 물질을 이용한 병해충 방제 체계 정립에 대한 연구와 현장에서의 적용이 지속적으로 시도되어야 한다고 본다. 환경 친화형 농업으로 전환하기 위한 식물체의 천연활성 물질 탐색으로 친환경 농약을 개발해 활용하는 생물학적 방제 방법이 모색되어 농업생산력 증대 및 국제 경쟁력 제고를 기대한다.

세계적으로 제3세대농약으로 인식되고 있는 식물체나 천연물질에서 새로운 살충효과를 탐색하는 연구들이 광범위하게 이루어지고 있고 국내 또한 새로운 천연물질 탐색이나 기술 개발이 이루어지고 있다. 일반 소비자들은 안전한 농산물 생산을 요구하고 있는 시점에서 세계 생물농약 시장은 2008년도에 30억 달러에서 2013년에는 50억 달러로 상승할 것으로 전망되고 있으며 국내는 미생물 살충제가 30억원, 기타 살충제가 140억원, 천적이 80억원 등 해충 방제에 필요한 시장이 250억원을 차지 할 것으로 전망된다. 따라서 새로운 생물농약의 지속적인 개발에 의한 병해충 방제제 개발은 지속적으로 이루어 져야 할 것이며 여기에 맞춰 생물검정 체계의 대량화 및 자동화가 이루어진다면 새로운 시장이 형성될 것으로 전망된다.

3장. 연구개발 수행내용 및 결과

1절. 살충효과가 우수한 제충국 품종 선발 및 재배기술 개발

1. 서언

제충국은 발칸반도 달마티아(Dalmatia) 지방이 원산지로서 알려져 있으며 이 지방에서는 예로부터 재배되었다고는 하지만 유럽에서 그 가치를 인정하고 널리 재배하게 된 것은 19세기 말엽부터라고 한다. 1840년경 달마티아 지방에서 재배가 시작되어 유럽에 점차 전파되었고, 1860년에는 미국에 전해졌으며, 일본에는 1885~1886년경에 미국과 호주에서 도입되었다고 한다. 우리나라에 도입된 시기는 분명하지 않으나 일본을 통하여 들어온 것으로 추정하고 있다. 제충국은 자가불화합성 식물이며(Singh and Sharma 1989) 계통에 따라서 꽃수량, 꽃 크기 피레트린 함량 등에 차이가 있다(Parlevliet 1974). 초기에 사용했던 제충국의 홍화종은 살충성분이 낮아 현재는 거의 사용하지 않으며 현재는 백화종을 주로 사용하고 있다. 제충국의 피레트린 함량과 꽃수량은 계통과 토양 온도 수확시기 건조 방법에 따라서 차이가 있으며, 첫해에는 250kg/ha의 전화를 생산하며 두번째 해에는 1,000~1,200kg/ha의 전화를 생산할 수 있다(Thijssen 1997). 또한 제충국은 건조 지역이 원산지로서 습해에 매우 약한 특성을 가지고 있으므로 국내의 장마철과 고온에 적응하고 피레트린 함량과 꽃 수량이 높은 계통을 선택하는 것이 매우 중요하다. 제충국은 종자와 삼목 등의 영양번식에 의하여 증식이 가능하다(Parlevliet 1974; Thijssen 1997). 그러나 이러한 삼목과 분주에 의한 번식은 증식 효율이 낮기 때문에 제충국의 우수 계통에 대한 셀 컬처를 이용한 대량증식 연구(Hitmi, Barthomeuf *et al.* 1999)연구가 추진되기도 하였다. 따라서 우수계통의 증식과 유지를 위하여 국내 환경에 적합한 영양체 번식기술을 개발할 필요가 있다. 제충국은 일반적으로 타가 수정작물로 수정율과 발아율이 낮은 것으로 알려져 있으며 Brewer(1960) 등은 128개의 유전자형을 자가 수정 시킨 결과 단지 2개의 계통만이 자가 수정이 가능하였다고 보고하였다. 그러나 제충국은 다른 개체의 꽃가루로 수정하였을 때 종자의 형성과 활력이 높지만 기본적으로 자가수정이 높은 작물(1956, Delhaye)이라 보고되고, 벌 등 곤충의 매개에 의한 수정을 하였을 때 종자 생산성이 크게 증가한다고 하였다(Smith 1958, FAO 1961). 따라서 종자에 의한 대량증식과 국내 농가의 자가 채종 이용을 위하여 채종 조건을 구명할 필요가 있을 것으로 판단된다. 제충국의 꽃 수량은 생산성과 수익을 높일 수 있는 일차적인 조건이기 때문에 꽃 수량을 높이기 위하여 paclobutrazol과 chlormequat chloride를 사용하는 연구가 진행되었으며(Haque, Farooqi *et al.* 2007), 재식밀도는 꽃 수량에 크게 영향을 주기 때문에, 1차년도는 16 주/m² 39 주/m² 에서 꽃의 수량이 높았고, 2차년도에서는 16주/m²에서 수량이 가장 높다고 하였다(Fulton, Clark *et al.*). 따라서 국내에서도 재배여건에 알맞은 재식밀도, 적심방법 등을 검정하여 꽃수량을 높일 수 있는 다양한 기술을 개발할 필요가 있다.

2. 재료 및 방법

가. 살충효과가 우수한 계통 선발 및 대량 증식

국내 친환경 재배농가가 재배 이용하고 있는 5개 계통과 일본 등 국외에서 판매 또는 재배되고 있는 12개 계통으로 총 17개 계통을 수집하였으며, 그 중 재배가 가능한 15계통에 대한 특성을 검정하였다. 수집 계통의 특성을 조사하기 위하여 수집시기에 따라서 2007년에는 0705, 0706, 0708, 0709, 0710계통의 월동된 식물체를 '07. 3. 11일과 '07. 3. 30일에 분주 또는 이식하여 정식하였고, 0702, 0704, 0715, 0718 계통의 경우 종자 파종 육묘 후 2007년 11월 5일 포장에 정식하였다. 2008년에는 0720, 0721, 0802 계통을 종자 파종 육묘 후 2008년 4월 1일 정식하였으며, 0804, 0805 계통은 10월 1일 정식하였다. 각 계통의 형태적 특성은 초형, 엽형, 화색, 화형 등을, 수집계통의 생육 특성은 월동 전후 생육특성과 개화기의 생육특성을 조사하였다. 개화특성은 개화 기간, 개화기의 생육, 화폭, 화수 등을 최종적으로 수확된 꽃을 건조하여 피레트린의 함량을 조사하였다.

나. 영양체 번식에 의한 증식기술 개발

수집계통의 형태적 특성에 따라 번식 방법을 분류하였으며, 분주에 의한 증식은 0708, 0710 계통은 2007년 10월 3일, 2007년 11월 1일, 2008년 2월 19일, 2008년 3월 13일에 하였으며, 2008년에는 0718, 0721계통을 대상으로 2008년 10월 18일, 2008년 11월 3일, 2009년 2월 11일, 2009년 3월 13일에 분주 증식을 하였다. 경삽(줄기삽)에 의한 증식방법은 0702, 0709, 0710 계통은 2007년 10월 5일, 2007년 11월 5일, 2008년 2월 19일, 2008년 3월 13일, 2008년 4월 13일에 하였으며, 0718과 0721계통은 형태적으로 경삽이 가능한 시기인 2008년 5월 7일과 2008년 6월 5일에 각각 실시하였다. 또한 2009년 3월 13일 0721계통을 대상으로 무가온 시설하우스 월동 모주를 이용한 경삽을 하였다. 런너 증식은 0702 계통은 수집시기가 늦어 2007년 8월 20일 정식 주를 이용하였고, 나머지 0709와 0710 계통은 2007년 10월 5일, 2007년 11월 5일, 2008년 2월 19일, 2008년 3월 13일에 하였다.

다. 우수 계통 자가 채종 가능 유무 및 채종기술 개발

수집 계통 중 해충 방제로 이용 가능성이 가장 높은 0718과 0721 계통에 대하여 채종 방법별 종자 채종량과 발아율을 조사하였다. 0718 계통의 경우 2007년 11월 5일에 정식한 포장을, 0721 계통은 2008년 4월 1일 정식한 포장을 채종포로 이용하였다. 종자 채종을 위하여 2009년 4월에 비닐하우스에 방충망을 설치하여 격리 하였으며, 각 계통별 일반 노지 채종 조건과 일반 비닐하우스 격리시설, 그리고 수정벌이 투입된 비닐하우스 격리시설에서 2009년 6월부터 10월 까지 종자 채종을 실시하여 각 채종 조건별 종자 채종량과 발아율을 조사하였다.

라. 대량생산을 위한 제충국 적심방법 구명

제충국 꽃 수확을 위한 적정 재식밀도 구명을 위하여 0805 계통을 공시계통으로 하여 추대기에 1~3회 적심 처리를 하였다. 1회 적심은 '09. 5.13 ~ '09. 5.20, 2회 적심은 09. 5.13 ~ '09. 5.20.과 '09. 6. 3 ~'09. 6. 12. 3회 적심은 09. 5.13 ~ '09. 5.20.'09. 6. 3 ~'09. 6. 12. '09. 6. 26 ~ '09. 7. 6에 실시하였다. 적심방법은 개화 전 추대한 줄기를 절간하는 방법으로 하였으며, 정식은 '08. 10. 1일에 45×30cm(5,700주/10a) 실시하였다. 정식 전 묘 소질, 재배 후 시기별 개화특성, 개화기 생육 및 꽃 특성, 생화수량을 조사하였다.

마. 대량생산을 위한 제충국 재식밀도 구명

제충국 꽃 수량 증대를 위하여 0805 계통을 공시계통으로 재식간격을 20×20cm(17,300주/10a), 20×30cm(11,550주/10a), 30×30cm(7,700주/10a), 30×45cm(5,700주/10a)로 처리하였다. 2008년 9월 8일 파종하여 2008년 10월 25일 정식하였으며, 정식 전 묘 소질, 정식 후 생육 특성, 개화기 생육 및 꽃 특성을 조사하였다.

바. 농가생산 단지 조성 및 생산 경제성 분석

농가실증 재배를 위하여 우수계통으로 선발된 0721 계통을 '09. 9. 3일 파종하여 담양군 무정면 오레리 2,000m²에 '09. 11. 3일 정식(45×30cm, 5,700주/10a) 하였다. 정식 후 월동 전후에 생육 특성을 지속적으로 조사하였고, 농가 재배의 경제성을 분석하고자 투입자재와 경영비 등을 조사하였다. 우수계통으로 선발된 0721 계통을 분양하기 위하여 '09. 4월 660m²(165m²×4동)의 격리재배 종자 채종포를 조성하였으며, '09. 6월 ~ 8월에 종자를 채종하여 육묘한 후 '09. 11. 11일과 '10. 4. 21일에 희망 농가와 시군지역에 분양 공급하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 살충효과가 우수한 계통 선발 및 대량 증식

(1) 국내외 제충국 수집 계통

국내 5종, 국외 12 등 총 17종의 계통을 수집하였으며 그 중 5계통은 식물체로, 12개 계통은 종자 형태로 수집하였다. 수집 시기는 2006년 4종, 2007년 9종, 2008년에는 4종을 수집하였으며, 국외 수집종은 일본, 미국, 프랑스, 호주 등이었으며, 농가 수집종의 경우에는 주로 중국에서 도입한 것을 자가 채종하여 사용한 계통으로 판단되었다. 수집 계통 중에서 정확한 학명이 확인된 것은 8종이며, 나머지 도입계통과 농가 수집계통은 이를 확인할 수 없었다.

표 1. 국내의 제충국 수집 계통

수집계통	수집지역	수집시기 (년. 월)	수집형태	비고
0702	국내(순천)	2007. 8	식물체	농가 자가 채종 재배
0704	국내(순천)	2007. 8	종자	농가 자가 채종 재배
0705	일본	2006	식물체	-
0706	미국	2007. 3	종자	<i>Chrysanthemum cineriaefolium</i>
0708	미국	2006	식물체	<i>Chrysanthemum coccineum</i>
0709	미국	2006	식물체	<i>Chrysanthemum coccineum</i>
0710	국내(제주)	2006	식물체, 종자	-
0715	일본	2007. 8	종자	<i>Chrysanthemum coccineum</i>
0718	프랑스	2007. 9	종자	<i>Tanacetum cineriaefolium</i>
0719	일본	2007. 10	종자	-
0720	일본	2007. 10	종자	-
0721	프랑스	2007. 11	종자	<i>Tanacetum cineriaefolium</i>
0722	국내(강원)	2007. 12	종자	농가 중국 도입계통
0802	호주	2008. 2	종자	-
0803	국내(함평)	2008. 3	식물체	농가 중국 도입계통 자가 채종
0804	독일	2008. 6	종자	<i>Chrysanthemum cineriaefolium</i>
0805	미국	2008. 8	종자	<i>Chrysanthemum cineriaefolium</i>

(2) 수집계통별 형태적 특성

수집계통의 형태는 0705, 0706, 0709, 0715, 0802 등은 주간형이었으며, 0702, 0704, 0708, 0710, 0718, 0720, 0721, 0803, 0804, 0805 등은 추대형의 초형을 이루고 있었다. 주간형의 경우 대부분 초형이 주지와 분지로 형성되어 줄기의 끝에 원추화서의 형태로 꽃이 형성되었다. 초형이 추대형인 경우에는 월동 후 4월경에부터 줄기의 신장과 더불어 추대가 이루어져 5월 이후 단정화서의 형태로 꽃을 피우게 된다. 또한 이러한 초형에 따라서 영양번식의 방법이 다르게 되어, 추대형의 경우 분주증식이 가능하나 주간형은 분주 증식이 불가하였고 경삽이나 런너삽목에 의한 영양번식이 가능하였다. 엽형은 결각의 정도에 따라 결각의 정도가 약한 0702, 0704, 0710 계통과, 중간 형태인 0705, 0706 계통, 결각의 형태가 강한 0708, 0715, 0718, 0719, 0720, 0721, 0803, 0804, 0805 계통으로 분류 할 수 있었으며, 화색은 0708과 0709 수집계통은 적색 계열이었고, 나머지 계통은 백색으로 개화하였다. 화형은 개화된 계통의 대부분이 일반적인 제충국의 꽃 형태인 아네모네형이었으며, 0706 수집계통만 품폰형으로 개화되어 원예종으로 육종된 품종으로 추정되어진다. 개화된 화서의 특성은 초형에 따라서 주간형인 경우에는 원추화서의 특성을, 추대형인 경우에는 단정화서의 형태로 개화되었다.

표 2. 제충국 수집 계통에 따른 식물체의 형태적 특성

수집계통	초형	엽형 (결각 정도)	화색	화형	화서
0702	추대형	소	백색	아네모네	단정화서
0704	추대형	소	백색	아네모네	단정화서
0705	주간형	중	백색	아네모네	원추화서
0706	주간형	중	백색	폼폰	원추화서
0708	추대형	대	분홍	아네모네	원추화서
0709	주간형	대	적색	아네모네	원추화서
0710	추대형	소	백색	아네모네	단정화서
0715	주간형	대	분홍	아네모네	원추화서
0718	추대형	대	백색	아네모네	단정화서
0719	추대형	대	백색	아네모네	원추화서
0720	추대형	대	백색	아네모네	단정화서
0721	추대형	대	백색	아네모네	단정화서
0802	주간형	대	백색	아네모네	원추화서
0803	추대형	대	백색	아네모네	단정화서
0804	추대형	대	백색	아네모네	단정화서
0805	추대형	대	백색	아네모네	단정화서

(3) 수집계통별 월동 전후 생육특성 및 포장 생존율

수집 계통에 대한 국내 재배 적응성을 검토하기 위하여 월동 전후의 생육특성과 여름 재배 이후 병해 발생에 의한 포장생존율을 조사하였다. 2007년 3월과 2008년 4월 정식한 계통의 경우 월동 후 초장과 초폭 등 생육이 감소하는 경향을 보이는데 이는 여름과 가을에 노화된 엽들이 겨울 동안에 고사하고 지저부에서 다시 측지가 발생하여 신초의 엽이 발생한 결과로 보이며, 2007년 11월과 2008년 10월에 정식한 계통의 경우에는 신엽이 계속 유지되면서 월동 후 생육이 전반적으로 증가하는 경향을 보였다. 계통별 월동 적응성을 보면 0709와 0802 수집계통은 월동기간에 100% 고사하였으며, 0705와 0706 계통의 경우에도 월동 후 고사율이 각각 20%와 59%로 국내 겨울철 재배의 적응이 어려운 계통으로 판단되었다. 그러나 나머지 계통의 경우 겨울철 재배가 양호한 결과를 보였다. 여름철 장마기 이후 병해 피해에 의한 고사율은 0718, 0720, 0804, 0805계통에서 약 46% ~ 73%로 전반적으로 높게 나타났으며, 0721, 0803수집계통은 병해 고사율이 각각 약 17% ~ 33%로 상대적으로 낮았다. 일반적으로 제충국은 습해에 약하고 역병과 균핵병 등의 토양병해에 피해가 많은 것으로 보고되고 있어 이러한 병해에 의한 고사율도 국내 장마기 이후 습해 등에 의한 병해의 피해 결과로 판단된다.

표 3. 수집계통별 월동 전후 생육특성 및 포장 생존율

정식 시기	수집 계통	월동전 ^a		월동후 ^b		월동후 고사율 (%)	병해고사율 (%)	
		초폭 (cm)	초장 ^c (cm)	초폭 (cm)	초장 (cm)		'08	'09 ^c
2007. 3	0705	21.3	16.7	18.3	11.8	20	0	-
	0706	11.6	15.4	15.4	8.0	59	0	-
	0708	15.7	-	8.3	-	0	0	-
	0709	12.8	-	-	-	100	-	-
	0710	12.5	-	14.7	-	0	0	-
2007.11	0702	9.6	-	15.3	-	0	0	-
	0704	8.4	-	14.0	-	0	0	-
	0715	7.2	-	10.8	-	0	0	-
	0718	5.4	-	11.2	-	0	64.2	50.0
2008. 4	0720	32.6	26.8	23.5	11.9	0	58.5	46.6
	0721	35.7	24.5	19.9	7.9	0	24.0	16.6
	0802	23.4	16.8	-	-	100	-	-
	0803	31.8	23.7	17.5	8.3	0	26.0	33.3
2008.10	0804	6.4	5.2	10.0	5.6	3.3	-	26.6
	0805	5.7	6.8	10.8	7.2	0	-	31.8

^a 0705, 0706, 0708, 0709, 0710, 0702, 0704, 0715, 0718 등 2007. 11. 5 조사; 0720, 0721, 0802, 0803, 0804, 0805 등 2008. 10. 30 조사

^b 0705, 0706, 0708, 0709, 0710, 0702, 0704, 0715, 0718 등 2008. 3. 12 조사; 0720, 0721, 0802, 0803, 0804, 0805 등 2009. 3. 11 조사

^c 2년차 선발 6계통에 대하여 조사

(4) 수집계통별 개화기 생육 및 꽃 특성

개화기의 생육 특성은 계통별로 다양한 결과를 보였지만 0708과 0715의 적색 계통은 일반적으로 초폭이 좁고 초장이 긴 특성을 보였으며, 조사 시기의 주당 개화수도 2 ~ 3개로 적은 경향을 보였다. 초형이 비슷한 0702, 0704, 0710은 초폭 39 ~ 41cm, 초장 42 ~ 44cm 이었으며, 주당 꽃수는 18 ~ 22개로 전반적으로 유사한 생육 특성을 보였다. 0718, 0720, 0721, 0803의 수집계통은 초폭 32 ~ 38cm, 초장 44 ~ 50cm 이었으며, 주당 꽃수는 10 ~ 24개로 0718 계통에서 24개로 가장 많았다.

수집계통의 초형 및 생육 특성에 따라서 꽃의 특성도 뚜렷한 차이가 구별을 보였다. 적색 계통의 0708과 0715 수집계통의 경우 화폭이 8 ~ 9cm 수준이고 화중이 3g 이상으로 상대적으로 꽃이 큰 특징을 보였고 0705와 0706의 계통은 화폭이 2cm 이하의 소화성이었으며 화중도 3g이하의 특징을 보였다. 또 초형과 형태가 유사한 0702, 0704, 0710 계통은 화폭이

4.8 ~ 7.4cm 수준이었으며 화중은 1.3 ~ 2.5g 이었으며, 꽃잎수는 33~34개의 특성을 보였다. 0718, 0720, 0721, 0803, 0804, 0805 계통은 0702, 0704, 0710 계통과 백색의 아네모네 형태의 유사한 화형을 가지고 있었으나 상대적으로 소화성의 특징을 가지고 있어서 화폭은 2.4 ~ 3.1cm, 화중은 0.3 ~ 0.5g 수준이었으며, 특히 꽃잎수가 16 ~ 19개 수준으로 뚜렷한 차이를 보였다.

표 4. 수집계통별 개화기 생육 특성

정식시기	수집계통	초폭(cm)	초장(cm)	개화수(개/주)
2007. 3	0705	29.4	42.7	33.5
	0706	32.7	48.7	39.8
	0708	25.4	51.4	3.1
	0710	39.8	42.1	20.4
2007.11	0702	39.4	46.8	18.4
	0704	41.2	48.4	22.6
	0715	29.7	54.8	2.0
	0718	37.6	44.2	24.3
2008. 4	0720	35.5	50.2	12.3
	0721	38.9	46.9	14.7
	0802	20.3	28.9	2.0
	0803	32.2	45.6	10.5
2008.10	0804a	(38.9)	(42.2)	-
	0805	36.9	45.2	10.2

° 개화기(50% 개화) 미도달

표 5. 수집계통별 꽃 특성

정식시기	수집계통	화중(g)	화폭(cm)	꽃잎수
2007. 3	0705	0.16	1.85	15.6
	0706	0.28	1.61	-
	0708	3.11	8.67	30.8
	0710	1.29	4.84	33.9
2007.11	0702	2.50	7.42	34.2
	0704	2.06	6.78	34.5
	0715	3.88	9.04	34.6
	0718	0.51	3.11	19.5
2008. 4	0720	0.34	2.44	16.8
	0721	0.40	2.78	16.1
	0802	0.11	0.88	16.8
	0803	0.45	2.84	15.7
2008.10	0804	0.46	2.95	17.4
	0805	0.44	2.82	16.8

(5) 수집계통별 개화 및 생화 수량 특성

0702, 0704, 0710 계통은 형태적으로 유사한 초형과 엽형을 가졌을 뿐만 아니라, 개화시기도 4월 하순에서 7월 초순으로 비슷한 개화기간을 보였으며, 0708과 0715 계통은 초형이 유사하고 화색이 적색 계통으로 개화기간도 5월 상순에서 6월 중순으로 나타났다. 0718, 0720, 0721, 0803의 수집계통도 초형과 엽형에서는 같은 그룹으로 분류 할 수 있는데, 1년차 개화에서는 0718 계통이 5월 중순에 개화하였으나, 정식시기가 늦은 0720, 0721, 0803 계통은 개화기가 6월 중순 이후로 늦은 경향을 보였고, 2년차 개화에서는 모든 계통이 5월 중하순에 개화가 시작되었다. 특히 0721 계통의 경우에는 11월 하순까지 개화가 지속되어 다른 계통과 구별되는 특성을 보였다. 2008년 10월에 정식한 0805 계통은 0718 계통과 유사한 개화특성을 보였으나 0804 계통은 일부 개화는 되었으나 개화율이 매우 낮았다. 2년차 선발 계통 중 0718, 0720, 0721, 0803 계통의 생화중의 수량은 1차 년도에 비하여 2차 년도에 크게 증가하는 경향이었으며 특히 상대적으로 개화기간이 긴 0721 계통에서 생화중의 수량이 크게 증가하는 경향을 보였다. 2008년 10월에 정식한 0804와 0805 계통의 경우 1차 개화로 상대적으로 생화 수량이 낮았으며, 특히 0804의 경우 개화율이 낮아 6개의 선발 계통 중 가장 낮은 생화수량을 보였다.

표 6. 수집계통별 개화기간 및 생화수량

정식 시기	수집 계통	'08			'09 ^a		
		개화시 (년. 월)	개화종 (년. 월)	생화중 (kg/10a)	개화시 (년. 월)	개화종 (년. 월)	생화중 (kg/10a)
2007.3	0705	'08. 5.25	'08. 7.24	813	-	-	-
	0706	'08. 5.29	'08. 7.20	1,294	-	-	-
	0708	'08. 5. 9	'08. 6.15	150	-	-	-
	0710	'08. 4.29	'08. 7.10	834	-	-	-
2007.11	0702	'08. 4.24	'08. 7. 5	1,804	-	-	-
	0704	'08. 4.21	'08. 7. 1	1,649	-	-	-
	0715	'08. 5. 1	'08. 6.10	153	-	-	-
	0718	'08. 5.13	'08.10.30	262	'09. 5.22	'09. 10.20	807
2008. 4	0720	'08. 8. 1	'08.10.30	96	'09. 5.22	'09. 10.23	409
	0721	'08. 6.10	'08.11.25	308	'09. 5.19	'09. 11.23	1,020
	0802	'08. 5. 2	'08. 8. 5	17	-	-	-
	0803	'08. 6.30	'08. 8.25	174	'09. 5.20	'09. 10.30	910
2008.10	0804	-	-	-	'09. 5.19	'09. 10.23	21
	0805	-	-	-	'09. 5.15	'09. 10.30	261

^a 2년차 선발 6계통에 대하여 조사

(6) 생육특성 및 살충성분(피레트린) 함량에 따른 계통 분류와 우수 계통 선발

제충국으로 유통되거나 재배되고 있는 총 수집계통 17개 계통에서 재배 및 조사가 가능한 15개 계통에 대한 특성 검정 결과 5개의 그룹으로 분류 할 수 있었다. A 그룹과 B 그룹은 초형이 주간형의 특성을 가지고 있으며, 월동이 어렵거나 불가능한 계통으로 원예종으로 육성된 계통들로 추정된다. C 그룹의 계통은 E 그룹의 계통과 초형과 엽형 등이 매우 유사하나, 꽃색이 적색이며 꽃수가 매우 적은 특성을 보였다. 국내에서 제충국으로 농가에서 재배되어 수집된 D 그룹의 계통과 주로 외국에서 수입된 E 그룹의 계통은 초형이 유사하나 엽의 결각과 형태에서 차이가 있었으며, 꽃의 특성에 있어서도 형태적으로는 유사하나 D 그룹의 계통이 꽃잎수가 상대적으로 많은 경향을 보였다. 또한 D그룹과 E 그룹 모두 월동이 가능 하였으나 E 그룹 계통의 경우 장마기 이후 병해의 피해가 높은 특성을 보였다. 살충성분의 함량은 꽃수가 많고 국내 월동이 가능한 D그룹과, E 그룹 계통에서 0718, 0721, 0803 계통을 대상으로 피레트린 함량을 분석한 결과, E 그룹 계통에서만 0721>0718>0803 순으로 피레트린 함량이 검출되었다. 따라서 E 그룹이 해충 방제를 위한 생물 농약의 원료 식물로 이용 가능할 것으로 판단되며, 특히 E 그룹에서 0721 계통이 포장적용성, 생화수량이 다른 계통에 비하여 우수한 특성을 가지고 있는 것으로 판단된다.

표 7. 생육 및 초형과 살충성분(피레트린) 함량에 따른 계통 분류

구분 (그룹)	수집계통	특성			
		초형	생육	꽃특성	피레트린 함유
A	0705, 0706, 0709	주간형	월동이 어렵거나 불가	백색, 꽃의 크기 작음 꽃수가 매우 많음	?
B	0802	주간형	월동불가	백색, 꽃의 크기 작음, 꽃수가 보통	?
C	0708, 0715	추대형	월동가능	적색, 꽃의 크기 큼, 꽃수가 적음	?
D	0702, 0704, 0710	추대형	월동가능	백색, 꽃의 크기 큼 꽃수 많음 꽃잎수 많음	무
E	0718, 0721, 0803, (0804, 0805, 0720) ^a	추대형	월동가능 병해 피해 높음	백색, 꽃의 크기 중간, 꽃수 많음 꽃잎수 적음	유

^a 지속적인 조사 필요

나. 영양체 번식에 의한 증식기술 개발

(1) 수집계통별 분주시기에 따른 육묘 및 생육 특성

2007년 3월에 정식하여 가을철 이후 분주 할 수 있는 식물 형태가 이루어진 0708, 0710 계통은 '07. 10. 3일, '07. 11. 1일, '08. 2. 19일과 '08. 3. 13일에 분주 정식하였다. 2007년 11월과 2008년 4월에 정식하여 분주 할 수 있는 식물 형태가 이루어진 0718과 0721 계통은 '08.10.18일, '08.11. 3일, '09. 2.11일과 '09. 3.13일에 분주 정식하여 생육특성 등을 조사하였다. 수집계통별로 보면 4 계통 모두 분주 정식 후 생존율이 97% ~ 100%로 정상적인 분주증식이 가능하였으며, 계통별로는 0708 계통에 비하여 0710 계통에서 주당 증식 개체수가 많았으며 2008년 10월 이후에 처리된 0718과 0721계통에서는 0718계통이 증식 개체수가 약간 높은 경향을 보였다. 특히 0718과 0721계통에서는 10월 중순에 분주 증식하는 것이 증식 개체수 확보에 유리한 것으로 판단된다.

표 8. 수집계통별 분주정식 시기에 따른 생육 특성과 증식율

수집계통	분주시기	정식전 묘소질		활착후 생육특성 ^a			정식후 생존율 (%)	증식 개체수 (개/주)
		관부직경 (cm)	엽수 (개/주)	초장 (cm)	초폭 (cm)	엽수 (개/주)		
0708	'07. 10. 3	0.64	28.9	10.4	9.4	21.5	100	3.2
	'07. 11. 1	0.79	32.4	9.9	10.2	24.1	100	3.0
	'08. 2. 19	0.74	12.2	9.1	8.4	15.4	100	3.0
	'08. 3. 13	0.82	17.6	6.4	7.6	15.2	100	3.2
0710	'07. 10. 3	0.83	35.3	10.2	11.3	19.6	100	4.2
	'07. 11. 1	1.32	47.7	10.5	10.6	27.8	100	5.5
	'08. 2. 19	1.25	30.7	8.9	10.2	19.0	97	6.6
	'08. 3. 13	1.12	33.2	7.2	8.2	18.2	100	6.0
0718	'08.10.18	0.62	24.2	7.0	10.4	23.5	100	35.2
	'08.11. 3	0.71	30.4	5.7	9.1	20.1	100	16.8
	'09. 2.11	0.68	15.4	4.2	7.9	14.8	100	21.5
	'09. 3.13	0.75	21.5	5.4	8.1	15.5	100	15.2
0721	'08.10.18	0.74	28.4	4.7	7.9	18.9	100	29.8
	'08.11. 3	0.78	26.2	4.7	6.2	14.0	100	20.5
	'09. 2.11	0.69	13.2	6.3	9.9	24.7	100	14.9
	'09. 3.13	0.80	18.7	6.7	8.9	18.8	100	15.6

^a 0708, 0710 '08. 4. 1 조사; 0718, 0721 '09. 3.13 조사('09. 3.13 분주처리는 '09. 4.14 조사)

분주 처리한 0721 계통에 대하여 생육 특성을 조사한 결과, 분주 시기가 늦을수록 생육이 지연되고 개화가 늦어지는 결과를 보였다. 특히 '09. 3.13에 분주를 하여 정식하는 경우 개화기가 6월로 지연되고, 분지수가 확보되지 않아 정상적인 개화를 할 수 있는 식물 형태를 갖추지 못하는 결과를 보였다.

표 9. 제충국 분주시기에 따른 개화기 생육특성

분주시기	생육특성			개화특성	
	초장 (cm)	분지수 (개/주)	초폭 (cm)	개화기 (월. 일)	만개기 (월. 일)
'08.10.18	49.5	36.5	45.8	'09. 5.20	'09. 5.25
'08.11. 3	52.4	26.4	39.0	'09. 5.25	'09. 5.28
'09. 2.11	50.0	22.3	39.8	'09. 5.25	'09. 5.28
'09. 3.13	48.2	8.7	-	'09. 6. 3	'09. 6.16

※ 조사계통 : 0721, 조사일 : '09. 5.20

결과적으로 분주 증식에 의한 제충국 번식은 10월 중순경에 실시하는 것이 꽃수 확보에 가장 유리할 것으로 판단된다. 10월 중순 분주 증식은 이후 분주시기에 비하여 생화수량이 2배 이상 증가하였으며, 이는 일찍 정식하여 충분한 발근 상태에서 저온에 감응함으로 개화에 필요한 분지수가 많아진 결과라 판단된다.

표 10. 제충국 분주시기에 따른 개화기 생육 및 꽃 수량특성

분주시기	주당 수량		10a 수량		
	화수 (개/주)	생화중 (g/주)	화수 (천개/10a)	생화중 (kg/10a)	생화중 수량지수(%)
'08.10.18	237.7	97.7	1,045	430	100
'08.11. 3	83.7	40.1	368	177	41
'09. 2.11	105.3	46.9	463	206	48
'09. 3.13	62.7	22.3	275	98	23

※ 조사계통 : 0721

(2) 수집계통별 경삽 증식 시기에 따른 육묘 및 생육 특성

0702, 0709와 0710 계통에 대하여는 '07. 10. 5일, '07. 11. 5일, '08. 2. 19일, '08. 3. 13일, 08. 4. 13일에 경삽을 실시하였으며, 줄기의 신장이 늦은 0718과 0721 계통은 각각 '08. 5. 7일과 '08. 6. 5일에 실시하였다. 수집계통별로 보면 0702, 0709와 0710 계통의 경우 육묘 후 생존율이 94%이상으로 높은 결과를 보였으나 0702 계통은 8월 20일 정식 주를 이용하였기 때문에 전반적으로 증식개체수가 낮은 경향을 보였다. 또한 0709 계통의 경우에는 주간형으로 분지수가 많지 않아 주당 증식 개체가 10 ~ 14개 수준으로 낮은 경향을 보였으며 0710 계통은 분지가 많아 상대적으로 많은 증식 개체수를 확보 할 수 있었다. 증식시기별로는 '07. 10. 5일에 비하여 '07. 11. 5일에 묘소질의 경경과 염수가 증가하는 결과를 보였으나 생존율은 모두 높은 경향을 보였다. 그러나 월동이후 처리에서는 0709계통의 경우 동해에

의한 피해로 재배가 불가능하였으며, 0702 계통의 경우 '08. 2. 19일과 '08. 3. 13일에서는 식물체가 로제트 상태로 경삼처리가 불가능하였으며 4월 이후의 처리에서는 정상적인 경삼처리가 가능 하였고, 0710 계통은 '08. 2. 19일에서는 로제트 상태로 경삼처리가 불가능하였으나, 3월 이후에는 경삼 처리가 가능하였다. 0718과 0721 계통은 0710 계통 등과는 달리 가을철이나 월동 후에 형태적으로 경삼이 불가능하였으며, 상대적으로 줄기의 신장이 늦어 개화가 이루어지기 전인 5월상순과 6월 상순에 각각 경삼처리를 실시하였다. 그러나 경삼의 실시하는 줄기의 경경이 매우 가늘고, 시기적으로 고온기에 접어드는 단계로 삼목에 의한 육묘 후 생존율이 각각 12%와 0%로 매우 낮은 결과를 보였다. 따라서 0721 계통의 경우 노지 월동 모주를 이용한 경삼이 어려움에 따라 2009년에는 무가온 시설하우스에서 재배된 모주를 이용하여 삼목한 결과, 노지재배 모주에 비하여 경삼을 할 수 있는 줄기의 확보가 3월에 가능하였으며, 상대적으로 경경이 크고 우수한 묘를 얻을 수 있었고, 증식 개체수도 262개로 크게 증가 하였다.

표 11. 수집계통별 경삼 증식 시기에 따른 육묘 생육 특성과 증식율

수집계통	경삼시기	육묘전 묘소질		육묘후 묘소질		육묘후 생존율 (%)	증식 개체수 (개/주)
		경경 (cm)	엽수 (개/주)	경경 (cm)	엽수 (개/주)		
0702	'07. 10. 5	0.42	7.7	0.45	9.2	100	8.3
	'07. 11. 5	0.54	11.6	0.61	10.5	100	9.5
	'08. 2. 19	로제트 상태로 경삼 번식 불가					
	'08. 3. 13	"					
	'08. 4. 13	0.42	2.0	0.45	5.3	100	23.4
0709	'07. 10. 5	0.47	7.7	0.43	9.0	100	10.1
	'07. 11. 5	0.55	9.4	0.58	11.7	100	14.4
	'08. 2. 19	월동 후 고사					
0710	'07. 10. 5	0.57	8.4	0.64	14.4	94	50.7
	'07. 11. 5	0.71	10.5	0.68	13.7	100	55.3
	'08. 2. 19	로제트 상태로 경삼 번식 불가					
	'08. 3. 13	0.66	5.3	0.54	10.5	97	64.5
	'08. 4. 13	0.54	2.0	0.58	5.8	100	94.6
0718	'08. 4. 13	로제트 상태로 경삼 번식 불가					
	'08. 5. 7	0.26	2.0	0.30	5.3	12	21.4
0721	'08. 6. 5	0.28	1.8	-	-	0	18.6
	'09. 3.13 ^a	0.34	1.5	0.35	2.3	97	262

^a 무가온 시설하우스 월동 모주 이용

해충 방제에 이용이 가능한 0718과 0721계통 중 무가온 시설하우스 삼목묘 0721 계통을 정식한 결과 정식 후 생존율은 약 80% 수준이었으며 당해연도 생화 수량은 약 95kg 수준이었다. 따라서 제충국의 경삼 증식을 위해서는 무가온 시설하우스 모주를 이용하여 3월 중순경에 증식하는 것이 육묘 생존율과 포장 활착률을 높일 수 있는 방법이라 판단된다.

표 12. 모주재배 조건 및 경삼시기에 따른 정식 후 생존율

모주재배	경삼시기 (월.일)	정식시기 (월.일)	정식 후 생존율(%)
무가온 시설하우스	'09. 3. 13	'09. 4. 27	77.8

※ 조사계통 : 0721

표 13. 모주재배 조건 및 경삼시기에 따른 개화특성

초장	엽수	개화시 (월. 일)	개화기 (월. 일)	총개화수 (개/주)	생화중 (kg/10a)
32.2	17.5	'09. 5.23	'09. 6. 9	48.2	95.4

※ 조사계통 : 0721(무가온 시설하우스 월동 이용 '09. 3. 13 삼목묘)

(3) 런너삼목에 의한 증식시기별 육묘 생육 특성

0705와 0706 계통은 특이하게 런너삼목 증식이 가능한 계통이었다. 수집계통별로 보면 두 계통 모두 육묘 후 생존율이 100%로 높은 결과를 보였다. 그러나 0705 계통은 10월 5일에는 식물체가 런너가 발달하지 않아 상태로 형태적으로 증식이 불가하였으며 11월 5일에는 주당 48개의 증식 개체를 얻을 수 있었다. 0706 계통은 상대적으로 식물체의 발달이 빠르고 상대적으로 런너의 발달이 양호하여 152 ~ 173개의 개체를 확보 할 수 있었다. 증식시기 별로는 '07. 10. 5일에 비하여 '07. 11. 5일의 육묘 소질의 관부직경이 크고 개체수도 많은 경향을 보였다. 그러나 월동 이후 2월과 3월에는 식물의 초형이 로제트 상태가 됨에 따라서 이러한 런너에 의한 증식이 불가 하였다.

표 14. 수집계통별 런너삼목 증식 시기에 따른 육묘 생육 특성과 증식률

수집계통	증식시기	육묘전 묘소질		육묘후 묘소질		육묘후 생존율 (%)	증식 개체수 (개/주)
		관부직경 (cm)	엽수 (개/주)	관부직경 (cm)	엽수 (개/주)		
0705	'07. 10. 5	-	-	-	-	-	0
	'07. 11. 5	0.43	8.1	0.54	13.4	100	48
	'08. 2. 19	로제트 상태로 런너 번식 불가					
	'08. 3. 13	"					
0706	'07. 10. 5	0.58	8.5	0.60	13.6	100	152
	'07. 11. 5	0.64	9.4	0.70	12.6	100	173
	'08. 2. 19	로제트 상태로 런너 번식 불가					
	'08. 3. 13	"					

다. 우수 계통별 자가 채종 가능 유무 및 채종기술 개발

종자 채종량은 0718과 0721 계통 모두에서 노지 채종은 8월과 9월에 비교적 많은 경향이었고, 하우스 채종의 경우에는 7월에 많았다. 제충국은 일반적으로 5월 하순경에서 6월 상순경에 만개기에 도달하며, 따라서 개화 1개월 후부터 채종이 가능하였다. 또한 노지 채종의 경우 6월 중순부터 장마기에 접어들어 상대적으로 채종에 불리한 조건으로 7월 채종량이 하우스 채종에 비하여 다소 감소하는 결과를 보인 것으로 판단된다.

종자의 채종량은 결과적으로 노지 채종에 비하여 하우스 채종에서 많은 경향을 보였다. 수정별 투입에서는 0718 계통에서는 차이를 보이지 않았으나, 0721 계통에서는 다소 증가하는 경향을 보였다. 재배기간에 주당 종자의 채종량은 약 1만립 내외가 수준이며, 종자 백립중은 0.110 ~ 0.123g로 미세 종자 특성을 갖는 것으로 판단된다.

표 15. 수집계통 및 채종 조건에 따른 종자 채종량 및 종자 백립중

계통	채종조건		채종량 (g/주)	종자수 (립/주)	종자 백립중(g)
	재배장소	수정별 유무			
0718	노지	무	12.4	10,333	0.120
0718	격리재배 하우스	무	15.6	13,684	0.114
0718	격리재배 하우스	유	15.1	13,727	0.110
0721	노지	무	10.2	8,644	0.118
0721	격리재배 하우스	무	14.8	12,033	0.123
0721	격리재배 하우스	유	16.7	13,917	0.115

제충국은 타가 수정 작물로 일반적으로 발아율이 낮은 것으로 알려져 있으며 본 연구에서도 종자의 발아율은 4.7 ~ 22.7% 수준으로 낮은 결과를 보였다. 특히 7월 6일 노지 채종의 경우에는 발아율이 매우 낮은 특성을 보였는데 이는 6월 ~ 7월 개화성기에 우기가 겹쳐 정상적인 수정이 되지 않았거나, 종자의 오염 등에 원인이 있는 것으로 추정된다. 그러나 8월 13일 채종의 경우에는 하우스 채종에 비하여 발아율이 증가하는 경향을 보였다. 하우스 격리재배 시 수정별 투입에 따라서 다소 높아지는 결과를 보였으나, 뚜렷한 경향을 나타내지는 않았다. 결과적으로 제충국의 채종은 발아율이 낮기는 하지만 주당 종자의 채종량이 많기 때문에 농가 단위에서도 충분히 가능할 것으로 판단된다. 다만 노지 채종의 경우에 우기에 종자의 오염과 타 계통과의 교배 등에 주의하여야 할 것이다.

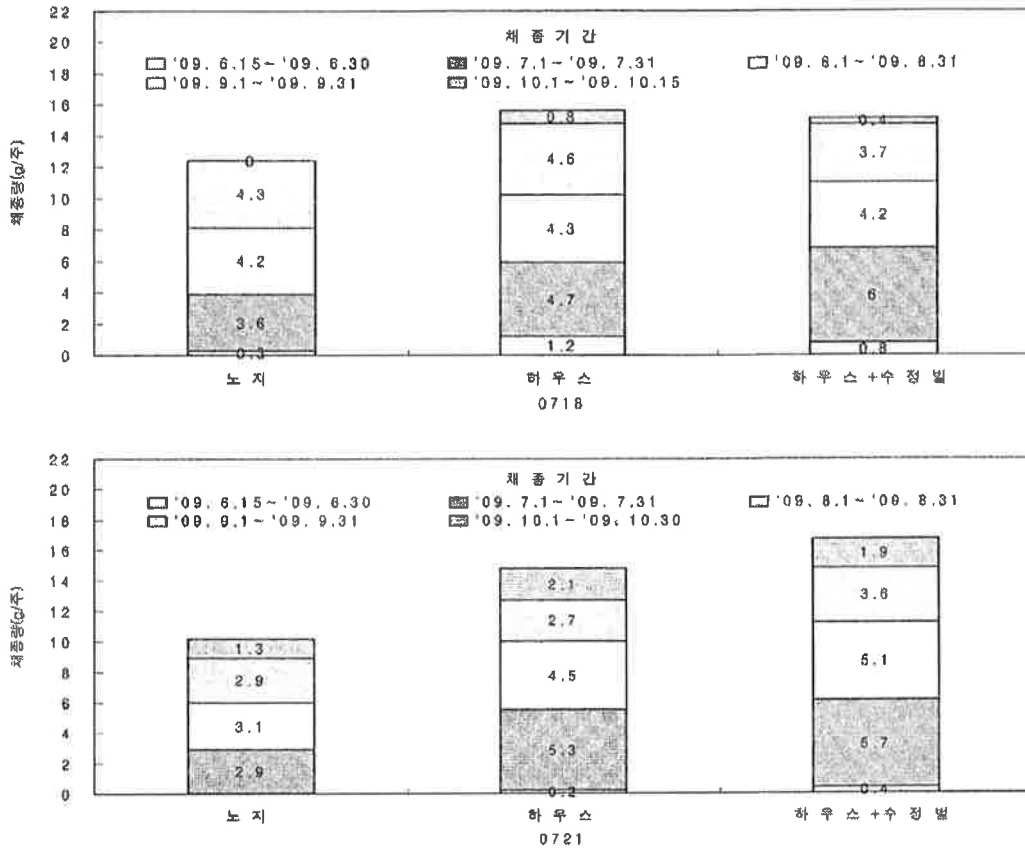


그림 1. 수집계통 및 채종 조건에 따른 채종기간별 종자 채종량(0721)

표 16. 수집계통 및 채종 조건에 따른 종자 발아특성

계통	채종조건		채종일 (월. 일)	발아율 (%)
	재배장소	수정별 유무		
0718	노지	무	'09. 7. 6	7.3
			'09. 8. 13	22.7
	격리재배 하우스	무	'09. 7. 6	14.7
			'09. 8. 13	10.0
격리재배 하우스	유	'09. 7. 6	15.3	
		'09. 8. 13	14.7	
0721	노지	무	'09. 7. 7	4.7
			'09. 8. 13	18.0
	격리재배 하우스	무	'09. 7. 7	15.3
			'09. 8. 13	12.3
격리재배 하우스	유	'09. 7. 7	16.0	
		'09. 8. 13	14.0	

※ 종자 채종 후 4.5℃저장, 파종일 '09. 9. 2일

라. 대량생산을 위한 제충국 적심방법 구명

제충국 대량생산을 위하여 '08. 10. 1 정식 전 0805 계통의 묘 소질은 초장은 4.85cm, 엽수는 주당 4.3개로 양호한 생육을 보였다.

적심을 실시하고 적심 횟수가 증가 할수록 개화기가 지연되는 경향을 보였으며 1회 적심과 2회 적심처리에는 최초 적심처리 후 개화기까지 약 33 ~ 36일 소요되어 각각 '09. 6. 15일과 '09. 7. 9일에 개화기에 도달하였으나 3회 적심 처리의 경우에는 개화가 더욱 지연되고 약 44일이 소요되어 '09. 8. 10일에 개화기에 도달하였다. 그러나 개화종 시기는 모든 처리에서 10월 29일 ~ 11월 3일에 이루어져, 적심 처리를 할 경우 꽃을 수확할 수 있는 기간이 크게 감소하는 결과를 보였다.

표 17. 정식 전 묘 소질

초장 (cm)	경경 (cm)	엽수 (개/주)
4.85	0.38	4.3

표 18. 적심처리별 개화특성

구분	처리			개화특성		
	1차 적심기간	2차 적심기간	3차 적심기간	개화시 (월. 일)	개화기 (월. 일)	개화종 (월. 일)
무적심				'09. 5. 15	'09. 5.27	'09. 10. 30
1회 적심	'09. 5.13 ~ '09. 5.20			'09. 6. 3	'09. 6. 15	'09. 10. 31
2회 적심	'09. 5.13 ~ '09. 5.20	'09. 6. 3 ~ '09. 6. 12		'09. 6. 25	'09. 7. 9	'09. 10. 29
3회 적심	'09. 5.13 ~ '09. 5.20	'09. 6. 3 ~ '09. 6. 12	'09. 6. 26 ~ '09. 7. 6	'09. 7. 20	'09. 8. 10	'09. 11. 3

적심처리에 의한 개화기 생육은 2회 적심까지는 생육 기간이 증감함에 따라서 초장과 초폭 등이 증가하는 결과를 보였으며 3회 적심에서는 2회 적심 처리와 유사한 생육 특성을 보였다. 이러한 이유는 이미 추대에 의하여 영양생장이 완료되고 7월 고온기에 접어들어 생육이 지연된 결과로 추정된다. 개화기의 꽃 특성도 적심 처리에 의하여 개화기가 지연됨에 따라서 주당 꽃수와 생화중도 감소하는 결과를 보였다.

표 19. 적심처리별 생육 및 꽃 특성

처리	초장 (cm)	초폭 (cm)	꽃수 (개/주)	생화중 (g)	화폭 (cm)
무적심	36.9	45.2	10.20	0.44	2.82
1회 적심	46.0	52.1	9.00	0.43	2.81
2회 적심	53.1	51.3	9.00	0.40	2.74
3회 적심	51.3	52.1	6.67	0.37	2.74

결과적으로 적심처리에 의한 총 생화수량은 적심처리를 할수록 감소하는 경향을 보여 무적심 대비하여 1회 적심에서는 68%, 2회와 3회 적심에서는 각각 46%, 30% 수준의 결과를 보였다. 이러한 결과는 제충국은 측지가 크게 발달하지 않고, 지저부에서부터 꽃대가 추대되어 올라오는 형태적 특성을 가지고 있어 적심처리에 의하여 꽃 수량을 증가하는 기대하기 어려울 것으로 판단되었다.

표 20. 적심처리별 생화수량

처리	총꽃수 (개/주)	생화중 (kg/10)	수량지수
무적심	135.0	339	100
1회 적심	94.7	232	68
2회 적심	69.0	157	46
3회 적심	48.3	102	30

마. 대량생산을 위한 제충국 재식밀도 구명

제충국 꽃 수확을 위한 적정 재식밀도 구명을 위하여 0805 계통을 공시계통으로 하여 2008년 10월 25일 정식하였으며, 정식 전 묘 소질은 표와 같다

표 21. 제충국 재식밀도 구명을 위한 정식전 묘소질

초장 (cm)	경경 (cm)	엽수 (개/주)
5.05	0.41	5.8

월동 후 생육은 초장은 증가하지 않았으나, 엽수가 월동 전 약 7매에서 월동 후 10매 이상으로 증가함에 따라서 초폭도 전반적으로 증가하는 경향을 보였으며, 처리별로는 20x20cm 보다는 20x30cm 이상의 처리에서 생육이 증가하는 결과를 보였다.

표 22. 제충국 재식밀도 구멍을 위한 월동전후 생육 특성

재식거리	월동전 ^a			월동후 ^b			월동후 고사율 (%)
	초폭 (cm)	초장 (cm)	엽수 (개/주)	초폭 (cm)	초장 (cm)	엽수 (개/주)	
20x20cm	7.06	5.65	7.1	7.14	5.05	9.8	0
20x30cm	7.32	5.87	7.6	7.62	6.22	13.4	0
30x30cm	7.85	6.14	7.2	8.19	6.08	12.8	0
30x45cm	7.01	5.26	6.6	8.09	5.69	12.2	0

^a 2008. 12.17 조사, ^b 2009. 3.10 조사

표 23. 제충국 재식밀도에 따른 개화기 생육특성

재식거리	개화특성		개화기 생육특성 ^a		
	개화시 (년. 월)	개화중 (년. 월)	초폭 (cm)	초장 (cm)	개화수/주 (개)
20x20cm	'09. 5.15	-	35.6	53.6	15.3
20x30cm	'09. 5.15	-	38.4	50.2	8.6
30x30cm	'09. 5.14	-	37.2	52.2	12.4
30x45cm	'09. 5.19	-	40.9	54.3	9.6

^a 조사일 : '09. 6. 19

바. 농가생산 단지 조성 및 생산 경제성 분석

(1) 농가생산 단지 조성을 위한 농가실증 재배

우수계통으로 선발된 0721 계통을 '09. 9. 3일 파종하여 '09. 11. 3일 정식 전 묘생육 특성을 조사한 결과, 초장은 5.92cm, 초폭은 6.2cm 수준이었으며, 주당 엽수는 4.23개로 양호한 생육을 보였다.

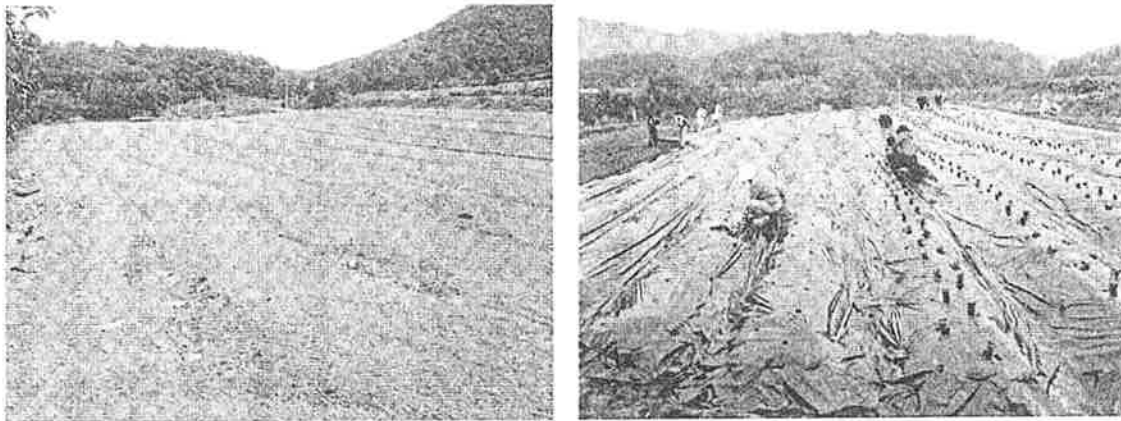
표 24. 농가 재배단지 정식 전 묘생육 특성

초장 (cm)	초폭 (cm)	엽수 (개/주)
5.92	6.20	4.23

정식 후 월동 전후로 생육 특성을 조사한 결과, '09. 12. 17일과 '10. 2. 12일에서는 초장과 초폭에서는 뚜렷한 차이를 보이지 않았으나 엽수는 5.6개에서 10.1개로 증가하였고 월동 전후 고사율은 8% 수준을 나타내었다. '10. 4. 8일 조사에서는 전체적으로 생육이 크게 증가하는 경향을 보였으나 고사율도 월동 후 조사에 비하여 크게 증가하여 16.7% 수준을 나타냈다. 이는 봄철 제조작업에 의한 뿌리 손상과 잦은 강우에 의한 습해 피해로 판단되어진다.

표 25. 농가 재배단지 시기별 생육 특성

조사일	초장 (cm)	초폭 (cm)	엽수 (개/주)	고사율 (%)
'09.12.17.	5.9	7.5	5.6	0
'10. 2.12.	6.7	8.3	10.1	8.0
'10. 4. 8.	20.1	20.5	29.5	16.7



<제충 농가 실증 재배>

종자 파종에 의한 육묘시기부터 정식 후 '10. 5월 까지 농가 투입 자재 및 경영비 조사한 결과 자가노력비를 제외한 투입 경영비는 약 3,300천원 수준이었으며, 초기에 주로 투자되는 제재료비가 41.7%로 가장 높은 비중을 차지하였으며, 고용노력비가 22.8%, 유기질비료대가 21.1%으로 높은 수준을 보였다. 향후 재배 기간이 지속됨에 따라서 노력비의 비중이 더 커질 것으로 예상되며, 제충국 꽃의 생산과 더불어 농가 소득 작목으로의 경제성 분석이 필요한 부분이라 할 수 있다.

표 26. 제충국 생산 경제성 분석을 위한 농가 투입 자재 및 경영비 조사('10. 5월 까지)

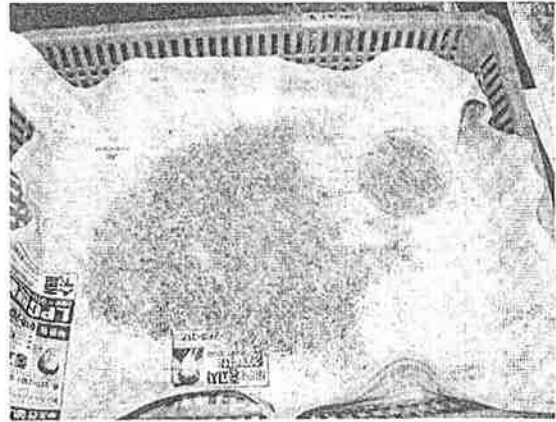
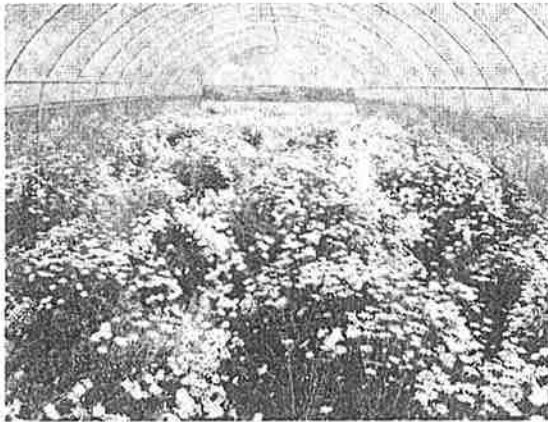
조사항목	세부내용	단위	수량	단가 (원)	금액 (원)	비고	경영비 비율(%)	
경영비	종묘비	제충국	g	50	5,000	250,000	자가채종가능	7.5
	유기질비료	퇴비	kg	4,000	100	400,000		21.1
		유박	kg	400	750	300,000		
	농약비		원	-				
	광열동력비	전기	kw	-				0.8
		유류	리터	20	1,300	26,000		
	수리(水利)비		원	-				
	제재료비	육묘상토	포	15	7,000	105,000	원예용상토	41.7
		육묘포트	개	13,000	20	260,000		
		멀칭비닐	롤	4	45,000	180,000		
		고정편	개	600	30	18,000		
		물통	개	1	200,000	200,000	3톤	
		관수펌프	개	1	200,000	200,000		
		관수시설	m	840	500	420,000		
	기타			-				
	소농구비		원	-				
	영농시설상각비		원	-				
	수리(修理)비		원	-				
	기타요금		원	-				
	기계임차	트랙터	회	2	50,000	100,000	경운작업 2회	6.0
		관리기	회	1	100,000	100,000	이랑작업 1회	
토지 임차	밭	m ²	-					
고용노력비	남	인	6	50,000	300,000	정식준비 4인 관수시설 2인	22.8	
	여	인	13	35,000	455,000	파종 4인 정식 6인 제초관리 3인		
합 계					3,314,000		100	
자가노력비	남	인	4	50,000	200,000	파종 8h 정식준비 8h×2회 정식 8h		
	여	인	5	35,000	175,000	파종 8h 정식 8h 육묘관리 0.5h×16회 포장관리 2h×8회		

(2) 농가재배단지 육성을 위한 우수계통 분양

우수계통으로 선발된 0721 계통을 증식하여 분양하기 위하여 09. 4월 660m²(165m²×4동) 규모의 격리재배 종자 채종포를 조성하였으며, '09. 6월 ~ 8월에 종자를 채종하여 육묘한 후 '09. 11. 11일과 '10. 4. 21일에 진도 등 14개 지역과 희망농가에 총 12,400주를 분양 공급하였다.

표 27. 우수 선발 계통 분양 내역

구분	분양계통	분양일	분양농가 및 지역	분양량(주)
1차 분양	0721	'09. 11. 11.	진도	2,000
2차 분양	0721	'10. 4. 21.	화순 등 13개 지역	10,400
합계				12,400



<제충국 격리채종하우스 및 채종 종자>



<제충국 농가분양 육묘 및 분양작업>

4. 결과요약

국내 친환경 재배농가가 재배 이용하고 있는 5개 계통과 일본 등 국외에서 판매 또는 재배되고 있는 12개 계통, 총 17개 계통을 수집하였다. 이중 재배가 가능한 15계통에 대한 특성을 검정한 결과 0718, 0721, 0803 등의 수집계통이 실제 살충성분(피레트린)이 함유된 제충국으로 국내 월동이 가능한 계통으로 조사되었으나 계통별로 습해에 대한 내성과 꽃 수량에 차이를 나타내었으며, 수집 계통 중 국내 적용성과 꽃의 생산 수량이 가장 높은 계통은 0721 계통

이었다. 따라서 0721 계통을 최종 우수 계통으로 선발하여 채종 증식한 후 제충국 생산단지 육성을 위한 농가실증시험과 농가 분양 사업을 추진하였다.

수집계통의 분주처리에 의한 영양체 번식 결과, 살충성분(피레트린)이 높고 국내 월동이 가능한 0718, 0721 계통은 10월 ~ 11월과 2월 ~ 3월에 분주에 의한 증식이 가능하였으며, 증식율은 주당 15 ~ 35개의 증식 개체를 확보 할 수 있었다. 그러나 분주 시기가 늦을수록 생육이 지연되고 개화가 늦어지는 결과를 보였다. 특히 3월 중순에 분주를 하여 정식하는 경우 개화기가 6월로 지연되고, 분지수가 확보되지 않아 정성적인 개화를 할 수 있는 식물 형태를 갖추지 못하여 꽃수량이 전년 10월 중순 분주 처리에 비하여 23% 수준에 불과 하였다.

경삽처리에 의한 영양체 번식은 0718, 0721 계통의 경삽 증식은 노지 모주를 이용할 경우 삼목 시기가 5월에서 6월로 늦고 묘소질이 낮아 육묘 후 생존율이 낮았으며, 무가온 시설재배의 모주를 이용 할 경우 삼목 증식이 3월에 가능하였으며, 우수한 묘를 얻을 수 있었고, 증식 개체수도 262개로 크게 증가하였다. 따라서 제충국의 경삽 증식을 위해서는 무가온 시설하우스 모주를 이용하여 3월 중순경에 증식하는 것이 육묘 생존율과 포장 활착률을 높일 수 있는 방법이라 판단되었다.

제충국은 종자의 발아율은 4.7 ~ 22.7% 수준으로 낮은 결과를 보였으며 특히 7월 6일 노지 채종의 경우에는 발아율이 매우 낮았는데 이는 6월 ~ 7월 개화성기에 우기가 겹쳐 정상적인 수정이 되지 않았거나, 종자의 오염 등에 원인이 있는 것으로 추정된다. 그러나 8월 13일 채종의 경우에는 하우스 채종에 비하여 발아율이 증가하는 경향을 보였다. 하우스 격리재배 시 수정별 투입에 따라서 발아율이 다소 높아지는 결과를 보였으나, 뚜렷한 경향을 나타내지는 않았다. 제충국의 채종은 발아율이 낮기는 하지만 주당 종자의 채종량이 많기 때문에 농가 단위에서도 충분히 가능할 것으로 판단된다. 다만 노지 채종의 경우에 우기에 종자의 오염과 타 계통과의 교배 등에 주의하여야 할 것으로 판단된다.

적심처리별 총 생화수량은 적심처리를 할수록 감소하는 경향을 보여 무적심 대비하여 1회 적심에서는 68%, 2회와 3회 적심에서는 각각 46%, 30% 수준의 결과를 보였다. 따라서 적심 처리에 의하여 꽃 수량을 증가하는 기대하기 어려울 것으로 판단되었다.

재식밀도는 20x20cm 보다는 20x30cm 이상에서 생육이 증가하는 결과를 보였다. 개화기 생육특성은 재식밀도가 높을수록 개화가 빠르고, 초폭은 작은 경향을 보였으나 뚜렷한 차이는 나타나지 않았다.

농가실증 재배를 위하여 우수계통으로 선발된 0721 계통을 담양군 무정면 오례리에서 생육 특성 및 농가 투입 자재와 경영비 등을 조사한 결과 육묘시기부터 '10. 5월 까지 농가 투입 경영비는 약 3,300천원 수준이었으며, 제재료비가 41.7%로 가장 높은 비중을 차지하였으며, 고용노력비가 22.8%, 유기질비료대가 21.1% 순 이었다. 향후 재배 기간이 지속됨에 따라서 노력비의 비중이 더 커질 것으로 예상되며, 제충국 꽃의 생산과 더불어 농가 소득 작목으로의 경제성 분석을 추진할 계획이다. 우수계통으로 선발된 0721 계통을 격리재배 종자 채종포를 조성하여, '09. 6월 ~ 8월에 종자를 채종하여 육묘한 후 '09. 11. 11일과 '10. 4. 21일에 진도 등 14개 지역과 희망농가에 총 12,400주를 분양 공급하였다.

2절. 제충국, 멀구슬 추출물의 살충물질 탐색

1. 서언

멀구슬(*Melia azedarach*)은 빠르게 자라는 낙엽활엽교목으로 중국 및 인도가 원산지이며 현재 아프리카, 오스트레일리아 그리고 미국 등 전 세계적으로 분포하고 있다(Yang, et al., 2004; Bohnenstengel et al., 1999; Cecilia et al., 2002).

멀구슬 나무의 껍질, 잎, 과실 등의 부위는 민간요법에서 인체의 해열작용과 염증을 가라앉히는 작용으로 활용되고 있다(Shanghai Science and Technologic Publisher, 1985). 또한 methanol과 ethanol로 추출한 *Melia azedarach*의 추출물은 구충효과를 나타내며(Salib et al., 2008), 곤충의 섭식저해제(Wang et al., 1993; Wang et al., 2005; Defagó et al., 2006; Seffrin, Costa et al. 2008; Nepal, Carpinella et al. 2009; Roy, Mukhopadhyay et al. 2009)와 살충제로 작용하기도 하고(Goncalves, Goncalves et al. 2008), 또한 알을 죽이고(María et al., 2007; Maciel et al., 2006) 활동을 저해하는 등의 다양한 생물학적 영향을 미친다는 보고가 있다(Sengottayan et al., 2006; Wachsmann et al., 1998; Anidrade-Coelho, Souza et al. 2009; Sharma and Mehta 2009; Sharma and Mehta 2009)

점박이용애(*Tetranychus urticae*)는 많은 농작물에 큰 피해를 입히는 주요 해충으로써 과수를 포함한 다양한 종류의 원예작물을 가해하며, 피해 앞에는 가느다란 거미줄과 탈피껍질이 남아 있어 잎 뒷면이 지저분해져 상품가치를 떨어뜨리게 된다(김, 2009).

벼멸구(*Nilaparva talugens*)는 우리나라를 비롯하여 아시아, 오스트레일리아 북부, 남태평양 군도 등 벼 재배지역에 광범위하게 분포하고 있으며, 우리나라에서는 월동하지 못하고 중국, 동남아시아 등에서 저기압기류를 타고 비래하는 흡즙성 해충으로 연간 300만 불의 손실을 초래하는 것으로 추정되고 있다(Bae and Pathak, 1966; Dyck and Thomas, 1979; 김, 2008).

농업환경에서는 이러한 해충들을 통제하기 위해 다양한 살충제가 이용되고 있지만, 화학 살충제의 사용은 환경학적으로 악영향을 미치고 해충에게 살충제에 대한 면역력과 저항성을 기르며, 생태계 파괴 및 천적에 비선택적 살충작용 등 여러 문제를 일으킨다는 단점이 있다. 특히 우리나라의 일부 사과 재배농가에서 채집된 점박이용애는 일부 화학약제에 대하여 아주 높은 수준의 저항성을 가지는 것이 보고되었다(Koh 등, 2009). 이에 비선택적 독성작용을 최소화하고 기존의 저항성 살충제를 대체할 수 있는 친환경적이며 저독성의 안전한 친환경농자제의 개발이 필요한 실정이며 이에 대한 연구 또한 많이 이루어지고 있다(Breuer M, 2000; Isman, 2006; Kim 등, 2005; Park 등, 2008).

멀구슬에 대한 화학적이고 생물학적인 연구는 세계 여러 지역에서 행해지고 있으며, trioterpenoids, coumarins, polysacchorides 등 다양한 화합물이 확인되었다. Limonoid계 화합물인 nimbolidins (Ekong et al., 1969), sendanins (Ochi et al., 1976; Itokawa et al., 1995; Ahn et al., 1994; Huang et al., 1994), trichinlins (Nakatani et al., 1994),

azedarachins (Huang et al., 1994), meliacarpins (Takeya et al., 1996) 등의 화합물이 확인되었고, 이 화합물들은 세포독성과 섭식저해제로써 곤충에게 생물학적 작용을 하는 것으로 보고되었다 (Nakatani et al., 1998). 국화과의 여러해살이풀인 제충국(*Chrysanthemum cinerariaefolium*)의 주성분 pyrethrin은 곤충 및 어류에 강력한 독성을 나타낸다. 특히 곤충에 대하여 독성 및 소화독을 가지는 성질을 지녀 원예사업에서 살충제로 오랫동안 사용이 되고 있다. Pyrethrin은 다른 계통의 살충제와 효력을 비교하였을 때 높은 살충력이 있다는 보고가 있으며 (Forget, G, 1991; Valentine V.M., 1990), 최근 환경오염 및 농약 독성에 대한 우려가 커지면서 친환경 물질인 pyrethrins의 사용량은 크게 증가하고 있는 추세이다 (Casida JE, 1993; Glickman AH, 1982; Pan WH, 1995). 본 연구에서는 멀구슬의 열매를 실험 재료로 사용하여 추출 및 기기 분석을 통하여 새로운 물질을 분리하고, 정제된 물질의 점박이용에 목화진딧물 및 벼멸구에 대한 살충활성과 섭식저해제로서의 작용을 생물검정하였고, 제충국의 계통에 따른 pyrethrin I, II의 함량을 파악하였다.

2. 재료 및 방법

멀구슬 살충활성 물질의 분리 및 구조 확인을 위해 용매 추출법에 따라 추출하여 생물검정을 실시하였고, 생물검정 시 활성이 높은 분획을 취하여 살충성 물질을 확인하였다. 살충성 물질 확인을 위한 멀구슬(*Melia azedarach*)은 전남대학교(광주광역시 용봉동)에서 2007년 09월에 잎(발엽과 낙엽), 과실(설익은 것, 익은 것) 그리고 가지껍질을 각각 채취하여 사용하였고 살충물질 분리를 위한 멀구슬(*Melia azedarach*)은 전라남도농업기술원에서 2007년 12월에 받아서 사용하였다. 제충국 계통에 따른 pyrethrins의 함량 파악을 위해 국내 친환경 재배농가가 재배 이용하고 있는 3개 계통과 일본 등 국외에서 판매 또는 재배되고 있는 4개 계통, 총 7개 계통의 제충국을 수집하였다. 각 수집 계통의 특성을 조사하기 위하여 수집시기에 따라서 2007년에는 0705, 0714계통의 월동된 식물체를 '07. 3. 11일과 '07. 3. 30일에 분주 또는 이식하여 정식하였고, 0704, 0716, 0718 계통의 경우 종자 파종 후 2007년 11월 5일 포장에 정식하였다. 2008년에는 0721계통을 2008년 3월 2일 파종하여 4월 1일 정식하였으며, 0803계통은 2008년 9월 1일 파종하여 10월 1일 정식하였고, 최종적으로 수확된 꽃은 10월 정도 그늘에서 풍건후 4.5도에서 저온저장 하여 피레트린의 함량을 조사하였다. Methanol, ethanol, n-hexane, ethyl acetate, CH₂Cl₂, n-butanol은 LC grade Merck (Germany)사의 제품을 사용하였다. TLC plate는 silica gel 60 이 도포된 Merck(Germany)사의 제품을 사용하였고, 염색제로는 H₂SO₄ DC Chemical(Korea)사의 제품을 사용하였다. Column에 충전한 silica gel은 70~230 mesh, 60Å SIGMA(USA)사의 제품을 사용하였다. 실험 기기는 추출을 위해 Ultrasonic cleaner Branson(USA)사의 제품을 사용하였다. UV viewing cabinet은 Vilber Lourmat(France)사의 제품을 사용하였고, 감압농축기 EYELA(Japan)사의 제품을 사용하였다.

표 28. 제충국 수집 내역

수집계통	수집지역	수집시기 (년. 월)	수집형태	비고
0704	국내(순천)	2007. 8	종자	농가 자가 채종 재배
0705	일본	2006	식물체	-
0714	국내(제주)	2006	식물체, 종자	-
0716	일본	2007. 8	종자	<i>Chrysanthemum coccineum</i>
0718	프랑스	2007. 9	종자	<i>Tanacetum cineriaefolium</i>
0721	프랑스	2007. 11	종자	<i>Tanacetum cineriaefolium</i>
0803	국내(함평)	2008. 3.	식물체	농가 중국 도입계통 자가 채종

가. 살충성 물질 확인

멸구슬은 각각의 부분별 살충활성물질 확인을 위해 각 부위별 시료 2 g을 50 mL 삼각 플라스크에 담고, methanol 20 mL 를 첨가해 Ultrasonic을 이용해 30분간 추출하여 감압여과 후 농축하여 2 mL methanol에 재용해하여 thin layer chromatography를 이용하여 서로 비교하였고 위 결과를 토대로 TLC plate상 고농도이며, 활성물질로 추정되는 두 spot이 분리된 과실을 이용하여 살충활성 물질을 분리하기로 결정했다.

2 g의 제충국 샘플은 n-hexane:acetone(30:70) 50 mL를 첨가해 Ultrasonic을 이용해 1시간 동안 추출하여 감압여과 후 20 mL를 취하여 질소농축하였다. 농축된 샘플은 n-Hexane 5 mL에 재용해 하여 florisil cartridge(1000 mg/6 mL, phenomenex, USA)에 로딩한 후 n-hexane 5 mL로 씻어내고 n-hexane:acetone(8:2)로 용출시켰다. 용출된 시료는 질소농축한 뒤 methanol 2 mL에 재용해하여 HPLC로 분석하였다. 분석된 샘플은 methanol에 녹여진 1000 ppm standard와 비교하여 pyrethrin 함유량을 확인하였다.

나. 추출방법 확립

추출방법 확립을 위해 각각 다른 농도의 ethanol 수용액(30%, 60%, 70%, 95%)을 이용하여 추출하여 TLC를 이용하여 서로 비교한 결과 70% ethanol 수용액을 추출용매로 선택하였다. 추출물질 중 활성물질을 분리하기 위해 5 kg의 멸구슬을 3.5 L 70% ethanol in water를 이용해 Ultrasonic으로 3회 추출하여 감압여과 한 뒤 4가지의 용매(n-hexane, CH₂Cl₂, ethyl acetate, n-butanol)을 각각 4회씩 순서대로 추출하였고 추출된 유기용매 층은 감압농축하여 건고물을 얻었다. n-Hexane 층에서 27 g, CH₂Cl₂ 층에서 93 g, ethyl acetate 층에서 8 g, n-butanol 층에서 34 g을 획득하였다.

표 29. 제충국 분석을 위한 HPLC의 기계조건

Instrument	HPLC-UVD: SHIMADZU CORPORATION (JAPAN)
Flow rate	1 ml/min
Mobile phase	MeOH:H ₂ O (75:25, v/v)
Column	Aqua C18 200Å (4.6×250 mm, 5.0 μm, phenomenex,USA)
Wavelength	220 nm
Injection vol.	20 μL

다. 살충물질 분리

획득된 건고물을 70~230 mesh 60 Å silica gel 260 g을 충전한 open preparative chromatographic glass column(700 × 80 mm I.D.)에 loading 하여 n-hexane-ethyl acetate 로 각각 500 mL씩 1:0 2회, 9:1 4회, 5:5 7회 3:7 4회 1:9 3회, 0:1 2회 용리하고, ethyl acetate:methanol 9:1 6회 5:5 4회 0:1 13회 methanol:H₂O 9:1 1회 용리시켜 총46개의 fractions을 얻었다.

표 30. *Melia azedarach*로부터 추출된 fraction을 통한 벼멸구(*Nilaparva talugens*)에 대한 생물학적 활성 결과

Fraction	살충율 (%)			
	처리전 마리수	1 일	3 일	5 일
C ₀	110.3	0.0	13.7	13.7
C ₁	105.3	5.3	16.2	16.2
C ₂	92.3	6.9	25.0	25.0
C ₃	139.3	6.2	32.6	32.6
C ₄	74.7	8.1	16.0	16.0
C ₅	93.7	8.2	21.5	21.5
C ₆	106.7	12.2	20.3	20.3
C ₇	123.0	10.0	12.9	12.9
C ₈	128.3	1.4	5.4	5.4
H ₁	149.3	6.8	36.3	36.3
H ₂	88.0	4.2	15.4	15.4
H ₃	168.7	9.6	28.9	28.9
H ₄	105.0	17.5	28.4	28.4
H ₅	95.7	16.9	37.8	37.8
H ₆	89.3	17.4	30.2	30.2
H ₇	104.3	20.3	40.2	40.2
H ₈	111.7	6.6	27.8	27.8
H ₉	130.0	11.9	30.1	30.1
H ₁₀	90.7	11.2	30.0	30.0
H ₁₁	97.0	9.7	33.2	33.2
H ₁₂	89.3	31.9	56.6	56.6
C ₂₋₁	112.3	12.3	34.0	34.0
C ₂₋₂	111.3	23.2	44.5	44.5
C ₂₋₃	109.0	6.5	37.9	37.9
EtOAc	166.0	10.4	20.0	20.0
CH ₂ Cl ₂	109.7	9.8	31.4	31.4
BuOH	115.0	14.6	40.1	40.1
n-Hexane	99.3	8.8	15.4	15.4

각각의 fraction을 TLC 를 이용하여 비교 후 구성성분이 같은 fraction을 서로 혼합하여 n-hexane 분획물에서 최종 12개의 fraction, CH₂Cl₂ 분획물에서 최종 8개의 fraction을 얻었다.

이 20개의 fraction과 column chromatography를 실시하기 전 4개의 추출물(n-hexane, CH₂Cl₂, ethyl acetate, n-butanol)과 비슷한 성분을 가진 것으로 판단되어 혼합한 C₂-fraction의 혼합 전 각각의 fraction C₂₋₁, C₂₋₂, C₂₋₃ 이렇게 총 28개의 추출물 및 fraction을 이용하여 벼멸구와 점박이용애에 대한 살충활성을 검토하였다. 각각의 물질을 벼멸구 및 점박이용애에 처리하고, 1일, 3일, 5일후 살충률로 살충활성을 비교하였다.

표 31. *Melia azedarach*로부터 추출된 fraction을 통한 점박이용애(*Tetranychus urticae*)에 대한 생물학적 활성 결과

Fraction	살충율(%)			
	처리전 마리수	1 일	3 일	5 일
C ₀	110.3	21.5	46.3	47.2
C ₁	105.3	13.1	30.2	30.2
C ₂	92.3	12.5	34.9	34.9
C ₃	139.3	8.3	29.8	29.9
C ₄	74.7	4.6	40.9	40.9
C ₅	93.7	16.0	32.9	32.9
C ₆	106.7	4.0	43.4	43.4
C ₇	123.0	5.6	34.0	34.0
C ₈	128.3	9.6	57.1	57.1
H ₁	149.3	2.2	14.7	14.7
H ₂	88.0	16.7	47.8	47.8
H ₃	168.7	11.9	74.9	74.9
H ₄	105.0	14.8	41.8	41.8
H ₅	95.7	32.4	46.8	46.8
H ₆	89.3	11.6	54.4	54.4
H ₇	104.3	23.7	51.1	51.1
H ₈	111.7	19.0	60.6	60.6
H ₉	130.0	9.6	67.1	67.1
H ₁₀	90.7	36.8	85.9	85.9
H ₁₁	97.0	35.5	76.3	76.3
H ₁₂	89.3	22.9	54.1	54.1
C ₂₋₁	112.3	15.8	54.9	54.9
C ₂₋₂	111.3	47.1	62.4	62.4
C ₂₋₃	109.0	20.1	58.2	58.2
EtOAc	166.0	16.5	24.1	24.1
CH ₂ Cl ₂	109.7	11.8	36.4	36.4
BuOH	115.0	4.7	50.9	50.9
n-Hexane	99.3	29.1	77.9	77.9

3. 결과 및 고찰

가. 살충성 물질 확인

멀구슬(*Melia azedarach*)의 잎(발엽과 낙엽), 과일(철익은 것, 익은 것) 그리고 가지껍질 중 살충활성물질이 많은 부분을 선별하기 위하여 각각 methanol을 이용하여 추출후 Thin layer chromatography(TLC)를 이용하여 서로 비교하였다.

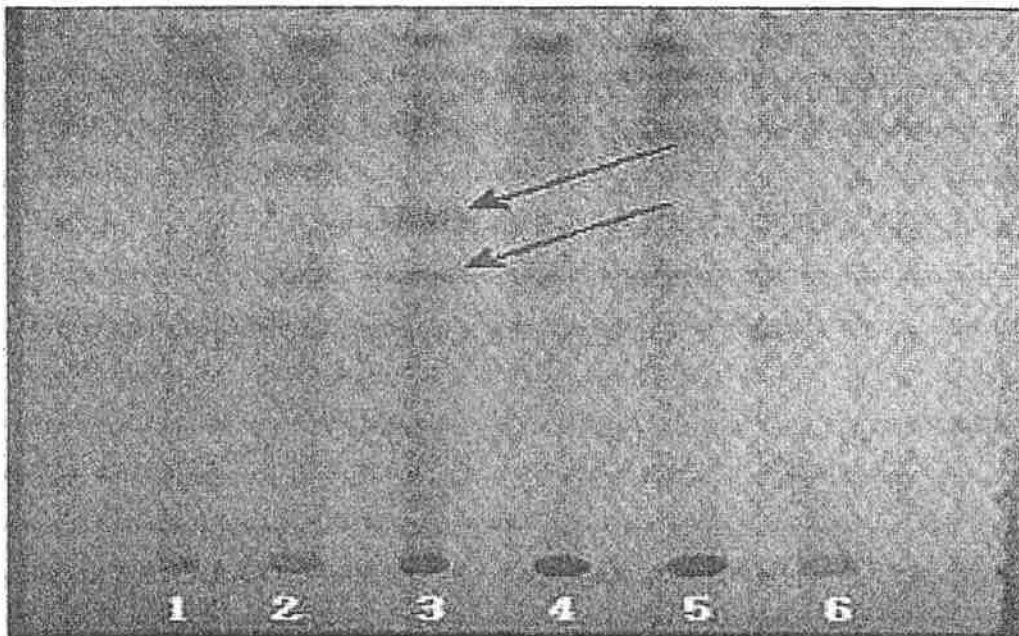


그림 2. 멀구슬 나무의 부위에 따른 추출물 TLC

1: 잎, 2: 잎줄기, 3: 열매, 4: 열매 줄기, 5: 가지껍질, 6: 열매씨앗

위 결과를 토대로 TLC plate상 고농도이며, 활성물질로 추정되는 두 spot(3번)이 분리된 과실을 이용하여 살충활성 물질을 분리하기로 결정했다.

제충국 계통에 따른 pyrethrins 함유량을 알아보기 위해 pyrethrins standard mixture 21.01%(pyrethrin I - 12.64%, pyrethrin II - 8.37%)를 methanol에 녹여 1000 ppm을 제조해 각각의 샘플과 비교하였다. 샘플 peak 면적을 1000 ppm standard 면적과 비교해서 ppm 단위로 변환한뒤, 실제 샘플에 있는 pyrethrin 농도를 %로 나타내었다. 7가지 계통의 제충국에서 pyrethrins이 검출된 계통은 3 계통이었고, 검출된 양은 1% 이하로 확인되었으며 pyrethrin 함유량이 가장 높은 샘플 0721noji였다. 제충국에 들어있는 pyrethrin의 함유량은 평균 0.5~2% 이라는 것을 고려했을 때(Pan WH, 1995; Kiriamiti H, 2003), 샘플 0721noji에서의 pyrethrin 회수율을 높이는 추출법 개발 또는 추출한 pyrethrin을 이용한 상품 개발 등 앞으로 많은 연구가 활발히 이루어질 수 있을 것으로 사료 되어진다.

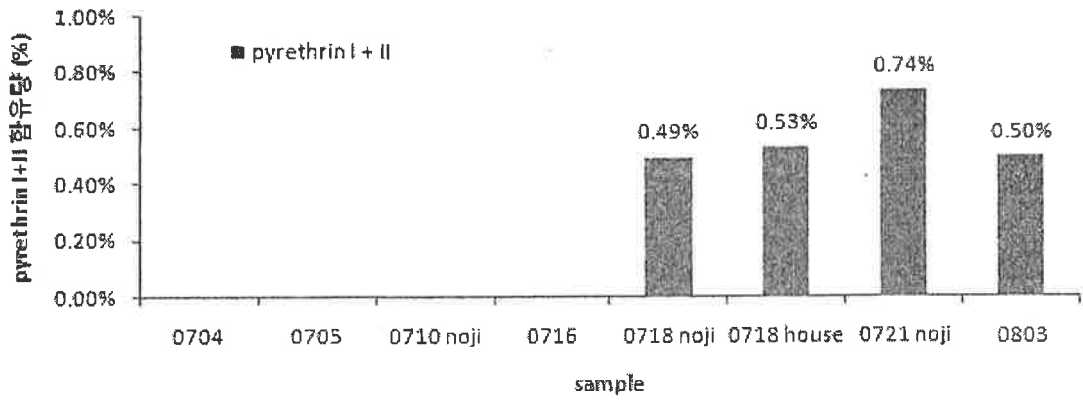


그림 3. 제충국 계통에 따른 pyrethrin 함유량

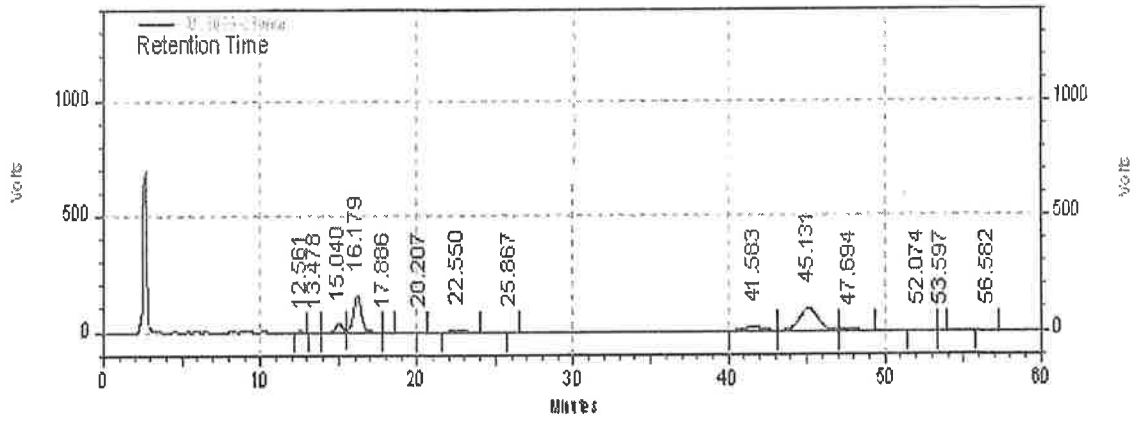


그림 4. Pyrethrin standard 1000 ppm

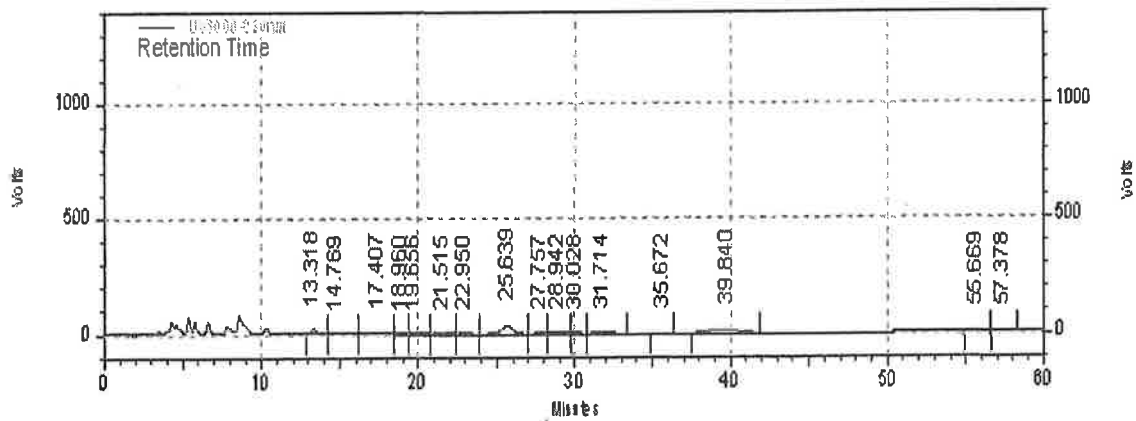


그림 5. Sample 0704의 크로마토그램

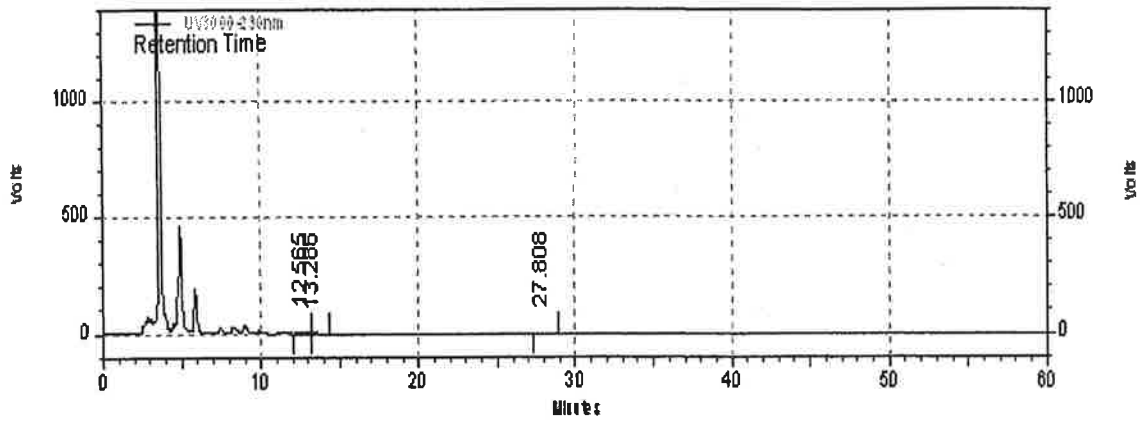


그림 6. Sample 0705의 크로마토그램

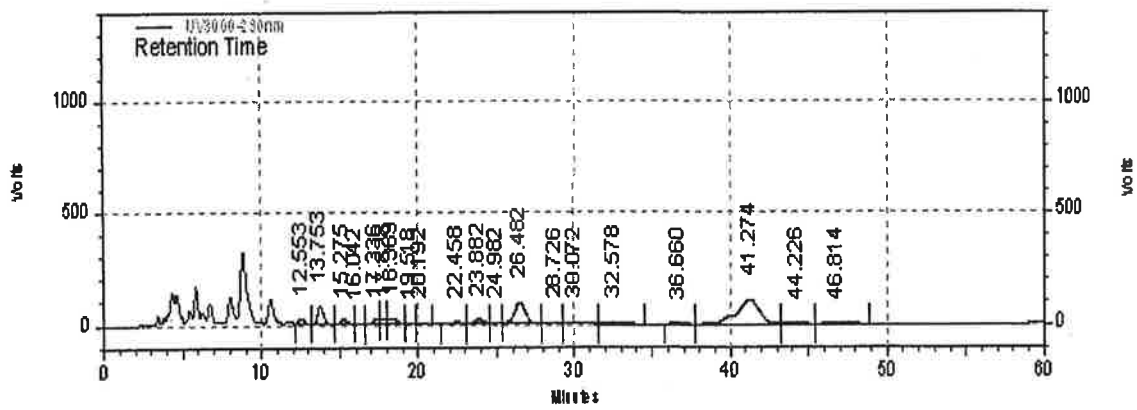


그림 7. Sample 0710noji의 크로마토그램

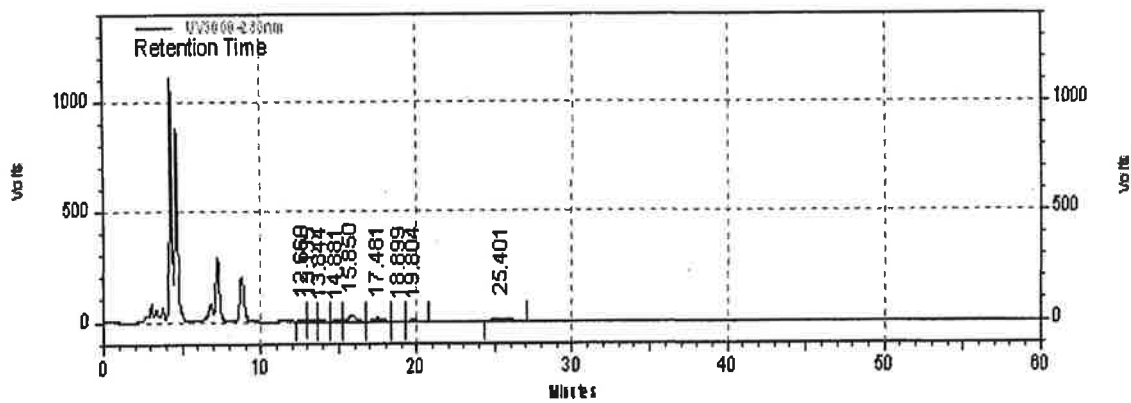


그림 8. Sample 0716의 크로마토그램

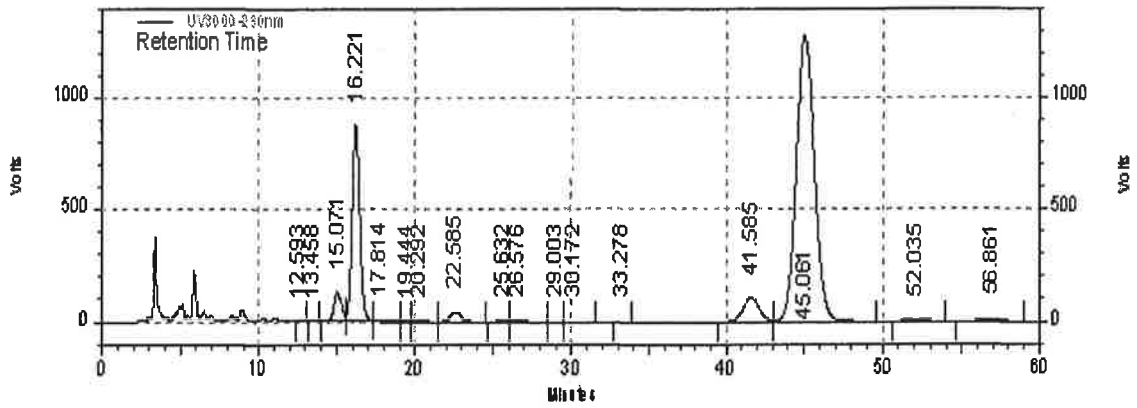


그림 9. Sample 0718 noji의 크로마토그램

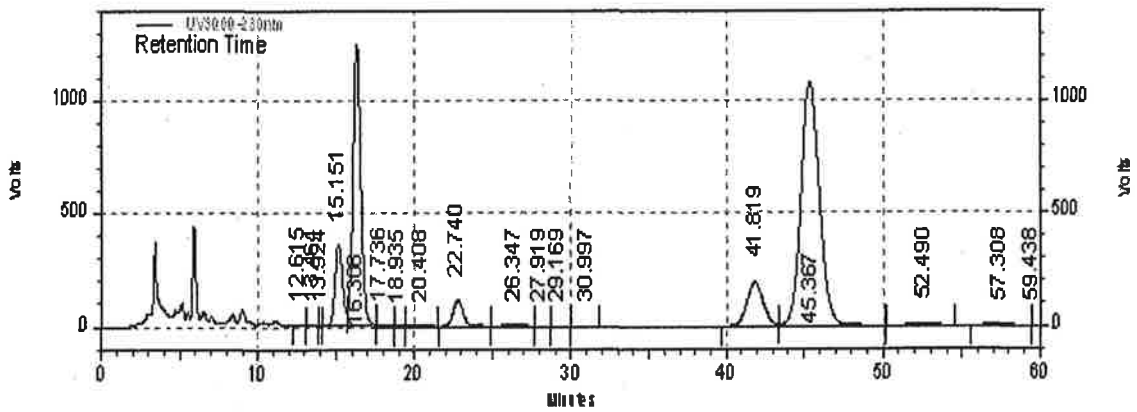


그림 10. Sample 0718house의 크로마토그램

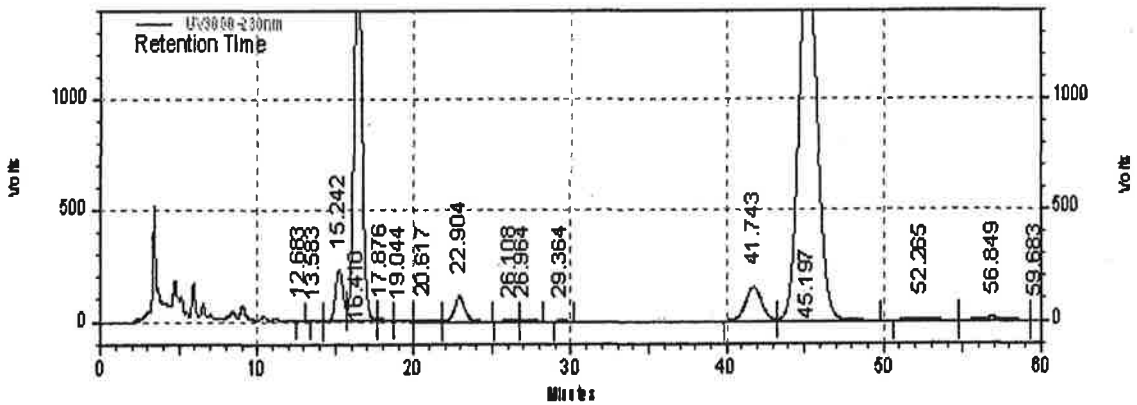


그림 11. Sapmle 0721noji의 크로마토그램

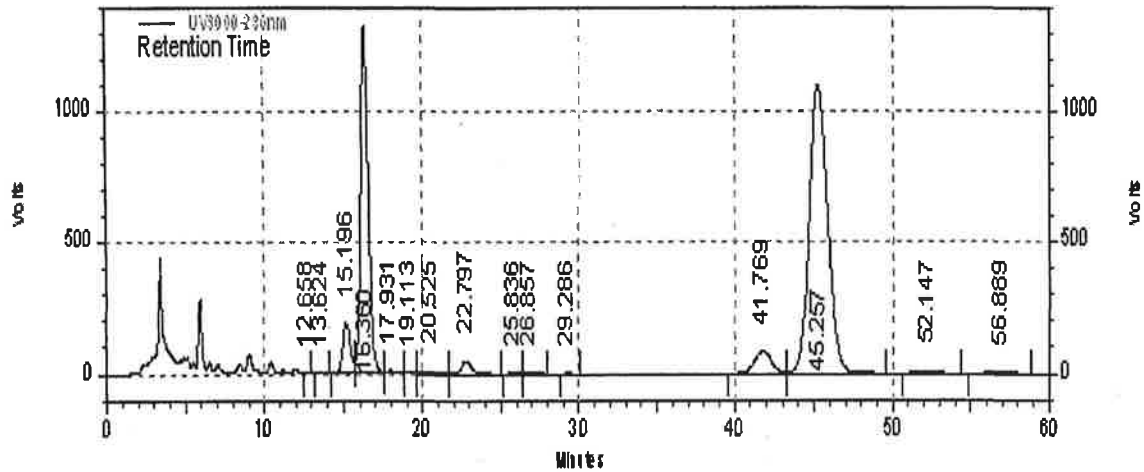


그림 12. Sample 0803의 크로마토그램

나. 추출방법 확립

일반적인 천연물 추출방법에는 두가지가 있다. 한가지는 극성이 작은 용매부터 점점 극성이 큰 용매를 이용하여 추출하는 방법으로, petroleum ether(PE) → dichloro methane (CH_2Cl_2) → ethyl acetate(EtOAc) → n-butanol(n-BuOH) 마지막으로 H_2O 를 이용하여 각각 추출한다. 하지만 이 방법은 많은 용매를 낭비하기 때문에 본 연구에서는 각각 다른 농도의 ethanol 수용액(30%, 60%, 70%, 95%)을 이용하여 추출하고 분별(n-hexane: H_2O , CH_2Cl_2 : H_2O , EtOAc: H_2O , n-BuOH: H_2O)하였다.

TLC 결과를 토대로 가장 추출효율이 좋은 70% EtOH: H_2O 을 추출용매로 선택하였다 (Figure 2). 5 kg의 딸구슬 과실을 3.5 L 70% EtOH: H_2O 를 이용하여 3차례 추출하였다. 추출물은 Celite를 이용하여 감압여과 후 감압농축 하여 5 L의 수용액 추출물을 얻었다.

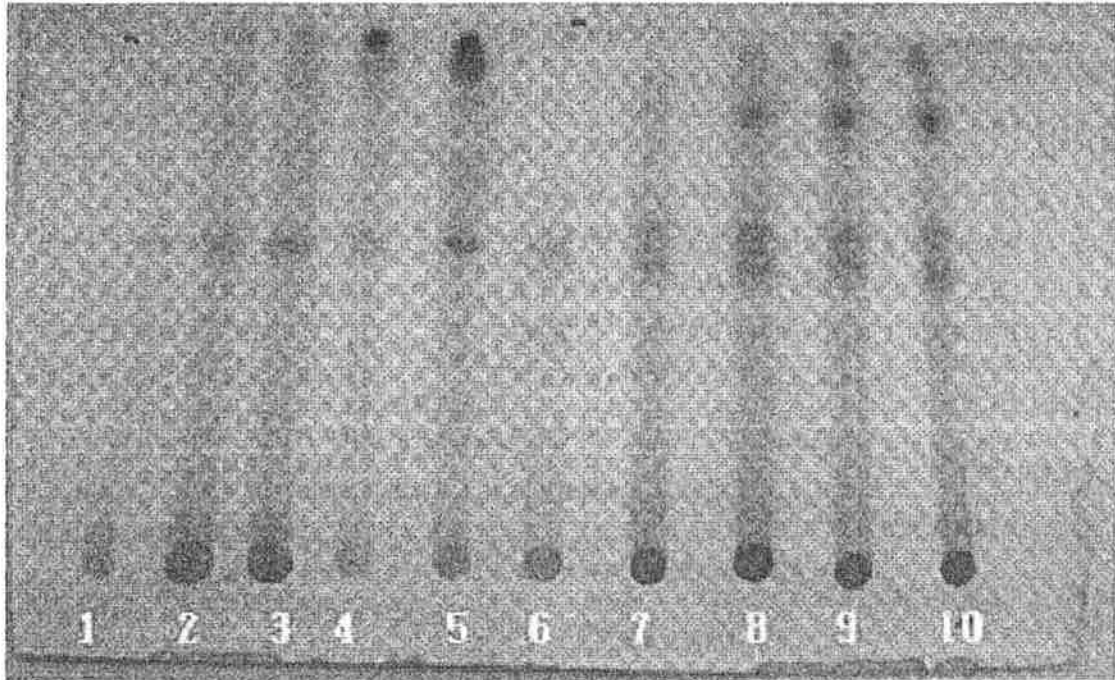


그림 13. 추출용매에 따른 멀구슬 잎과 열매의 TLC

1~5 : 잎 (1: 30% EtOH, 2: 60% EtOH, 3: 70% EtOH, 4: EtOH, 5: MeOH),

6~10 : 열매 (6: 30% EtOH, 7: 60% EtOH, 8: 70% EtOH, 9: EtOH, 10: MeOH)

다. 살충물질 분리

수용성 추출액을 n-hexane, CH₂Cl₂, EtOAc, n-BuOH 포화수용액을 이용하여 단계적으로 분별하였다. 각각의 단계별 4번에 걸쳐 추출하였다. 각각의 추출액을 감압농축하여 건조하였다. 최종적으로 n-hexane 분획물에서 27 g, CH₂Cl₂ 분획물에서 93 g, EtOAc 분획물에서 8 g, n-BuOH 분획물에서 34 g 을 얻었다.

n-hexane 분획물과 CH₂Cl₂ 분획물을 silica 260 g을 충전한 open preparative chromatographic glass column(700 × 80 mm id)을 통하여 분리하였다. n-hexane 분획물은 n-hexane:ethyl acetate로 각각 500 mL씩 1:0 2회, 9:1 4회, 5:5 7회, 3:7 4회, 1:9 3회, 0:1 2회 용리하고, ethyl acetate:methanol 9:1 6회, 5:5 4회, 0:1 13회 methanol:H₂O 9:1 1회 용리시켜 총 46개의 fractions을 얻었다.

TLC 결과를 이용하여 성분이 같은 fraction을 서로 혼합하여 12개의 fraction을 얻었다. 위와 같은 방법으로 CH₂Cl₂ 분획물에서 8개의 fraction을 얻었고, EtOAc와 n-BuOH 분획물 또한 column chromatography와 TLC를 이용한 물질분리를 통하여 총 28개의 추출물 및 fraction을 획득하였다.

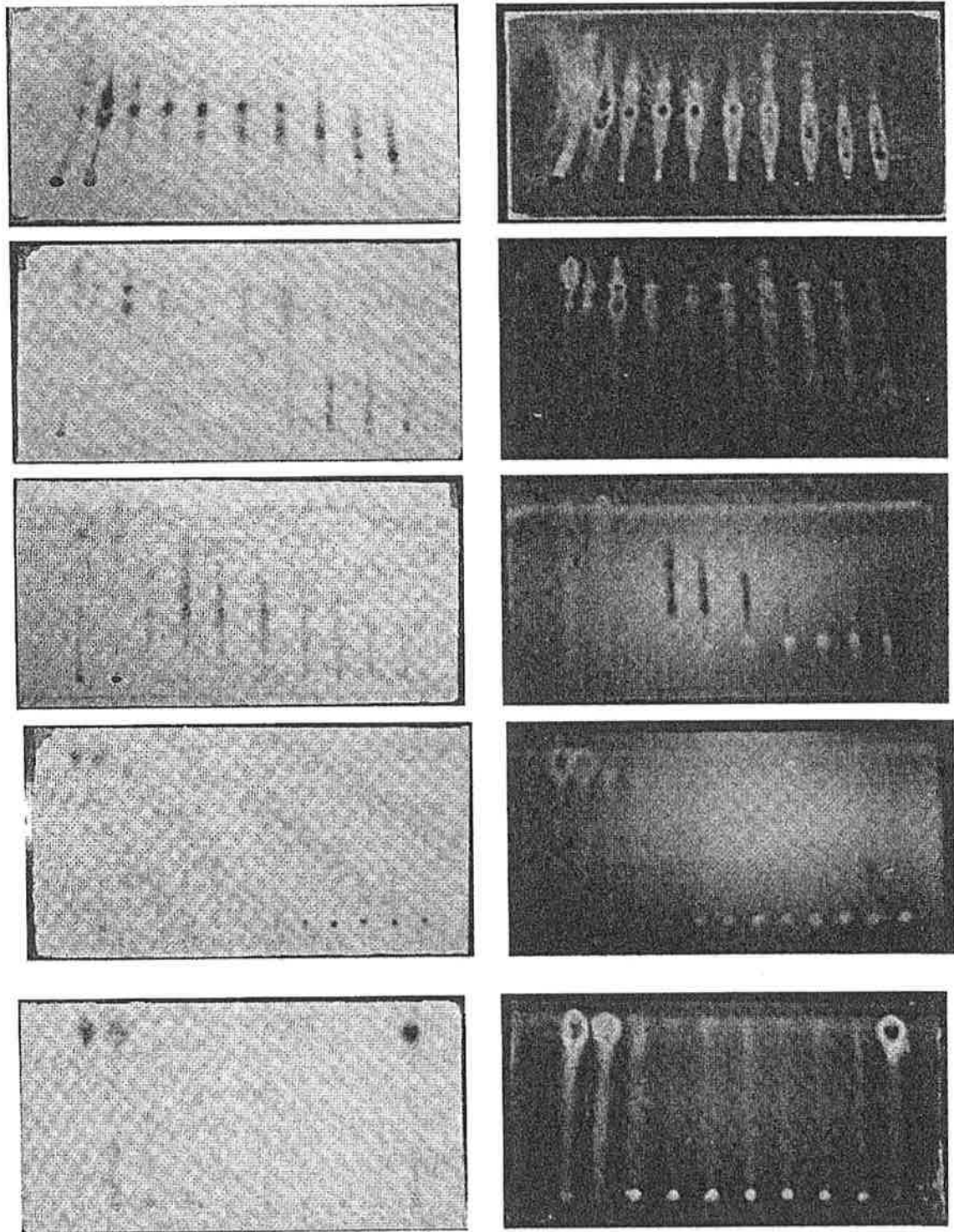


그림 14. n-Hexane 분획물에서 얻은 46개의 fraction
 (a)1~8번 fraction, (b)8~16번 fraction, (c)16~23번 fraction, (d)23~31번 fraction, (e)31~41번 fraction, 41번~46번 fraction

라. 살충물질 분리 및 확인

(1) Supercritical Fluid Extraction을 이용한 fraction C₂₋₂의 분리

초임계유체추출법(Supercritical Fluid Extraction)을 이용한 추출법은 다양한 분야에서 이용되고 있다. 초임계유체 추출법은 액체와 기체의 성질을 모두가지고 있는 초임계유체를 이용하여 추출하는 방법으로 액체와 같은 용해력과, 기체와 유사한 점성 및 확산계수를 가진 초임계유체의 성질 때문에 매우 신속하게 추출할 수 있다. 또한, 초임계유체의 용해력은 그 밀도의 기계적 조작에 의하여 조절이 가능하기 때문에 이 밀도의 차이에 의해서 물질을 선택적이고, 안정하게 추출할 수 있는 장점이 있다. 이러한 선택성을 이용하여 fraction C₂₋₂ 중 활성물질을 분리하기 위하여 초임계유체추출법을 시도하였다.

Filter paper에 0.2 g의 fraction C₂₋₂을 바르고 SFE vessel (10 × 150 mm I.D.)에 넣은 후, 온도, 압력, 보조제를 각각 변화시켜 최적의 추출조건을 설정하였다.

온도는 50℃이하로 설정하였고, 압력은 200 kg/cm² 에서 350 kg/cm² 까지 그리고, 서로 다른 농도의 methanol과 ethyl acetate가 보조제로 이용되어 각각의 추출효율을 비교하였다. 추출 후 각각의 추출효율은 TLC를 이용하여 비교하였다.

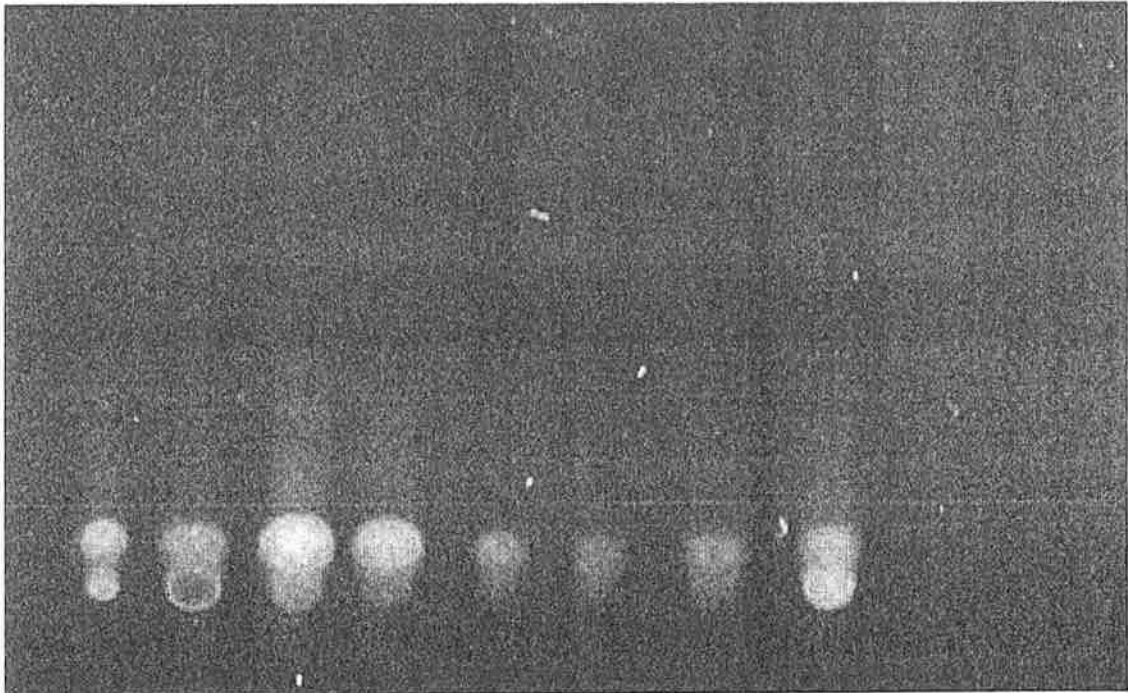


그림 15. 보조제, 압력에 따른 C₂₋₂ fraction TLC

1) C₂₋₂ 2) 보조제-10% MeOH, (3-8) 보조제-3.3% EtOAc 3) 200 kg/cm²-20 min 4) 220 kg/cm²-10 min 5) 240 kg/cm²-10 min 6) 260 kg/cm²-10 min 7) 300 kg/cm²-20 min 8) remained in vessel, 전개용매: n-hexane : acetone (8:2); at UV 365 nm.

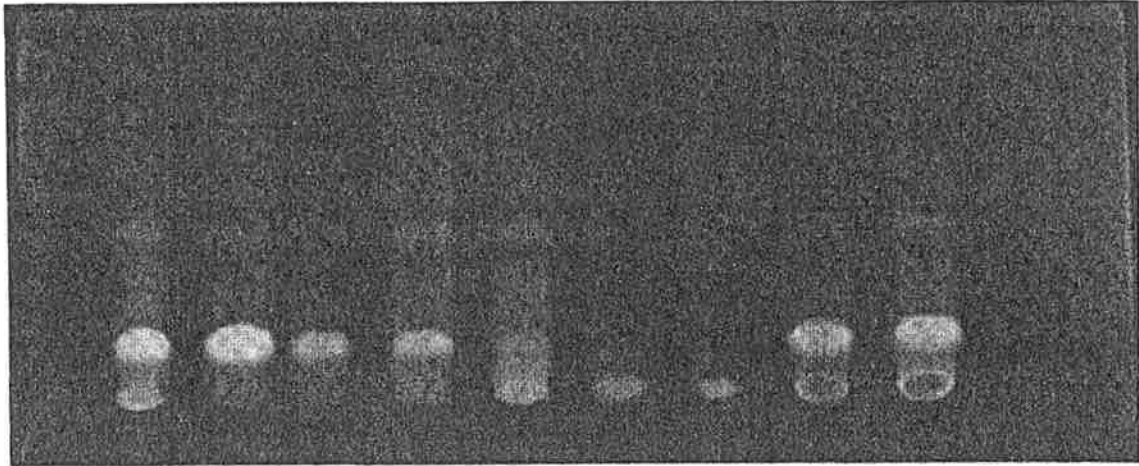


그림 16. 보조제, 압력에 따른 C_{2.2} fraction TLC

1) C_{2.2} 2) 3.3% EtOAc 300 kg/cm²-40min 3) 3.3% EtOAc 350 kg/cm²-35 min 4) 10% EtOAc 350 kg/cm²-50 min 5) 30% EtOAc 350 kg/cm²-30 min 6) 30% EtOAc 350 kg/cm²-10 min 7) remained in vessel 8) 10% MeOH, March 9th. 9) 10% MeOH, March 10th. 전개용매: *n*-hexane : ethylacetate(6:4); at UV 365 nm.

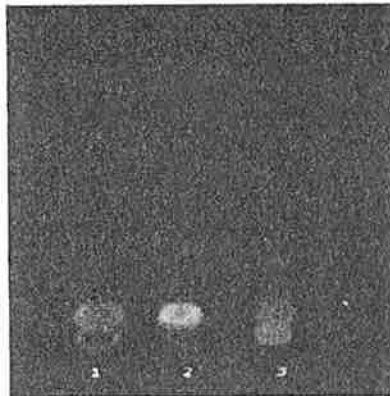


그림 17. 보조제, 압력에 따른 C_{2.2} fraction TLC

1) C_{2.2} 2) 3.3% EtOAc 220 kg/cm² 50℃1h 3) 30%EtOAc220kg/cm²50℃1h. 전개용매: *n*-hexane:acetone (8:2); at UV 365 nm.

TLC 결과에서 보면 초임계유체추출법의 추출조건을 달리해도 fraction C_{2.2}의 물질분리 및 추출효율에는 별다른 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과를 토대로 초임계유체추출법으로는 서로 다른 극성을 가진 성분들을 서로 분리하는 것이 매우 어렵고, fraction C_{2.2}의 성분들을 서로 분리하는 것은 불가능했다. 결론적으로 fraction C_{2.2}의 물질을 분리하기 위해서는 column chromatography를 이용해야 한다. 하지만, 초임계유체추출법을 이용하여 멀구슬(*Melia azedarach*)에서 살충활성 물질을 직접 추출해내는 방법은 더 연구해 볼 필요성이 있다.

(2) Column Chromatography를 이용한 fraction C_{2.2}의 분리

CH₂Cl₂ 추출물에서 얻어진 총 40 g의 fraction C_{2.2}을 column chromatography로 분리하기 위하여 다음과 같은 방법을 이용하였다.

10 g의 fraction C_{2.2}을 100 mL acetone에 녹여 1000 mL 삼각플라스크에 넣고, 400 mL의 n-hexane을 천천히 추가한다. 이 용액을 4℃에서 하루 동안 냉장보관한다. 하루 동안 냉장보관하면, 침전이 생기는데 이 침전물을 제외한 상등액을 35℃에서 감압여과 하여 건조한다. 여기에 10 mL CH₂Cl₂ 을 넣고 녹인 후 silica gel을 충전한 glass column(5.5 cm × 70 cm I.D., 300 g, 60Å)에 loading 한다. 이를 n-hexane:acetone(8:2, v/v), n-hexane:acetone (6:4, v/v), n-hexane:acetone (4:6, v/v), CH₂Cl₂ : acetone (1:9, v/v), acetone, methanol을 이용하여 차례로 용출시킨다. 각 용출액은 매 50 mL 마다 수집되었다. 최종적으로 61개의 fraction이 수집되었으며 살충활성 검정을 위한 bioassay를 위해 같은 성분을 가진 fraction을 서로 혼합한 뒤 분리한 각각의 fraction을 TLC로 분석하였다.

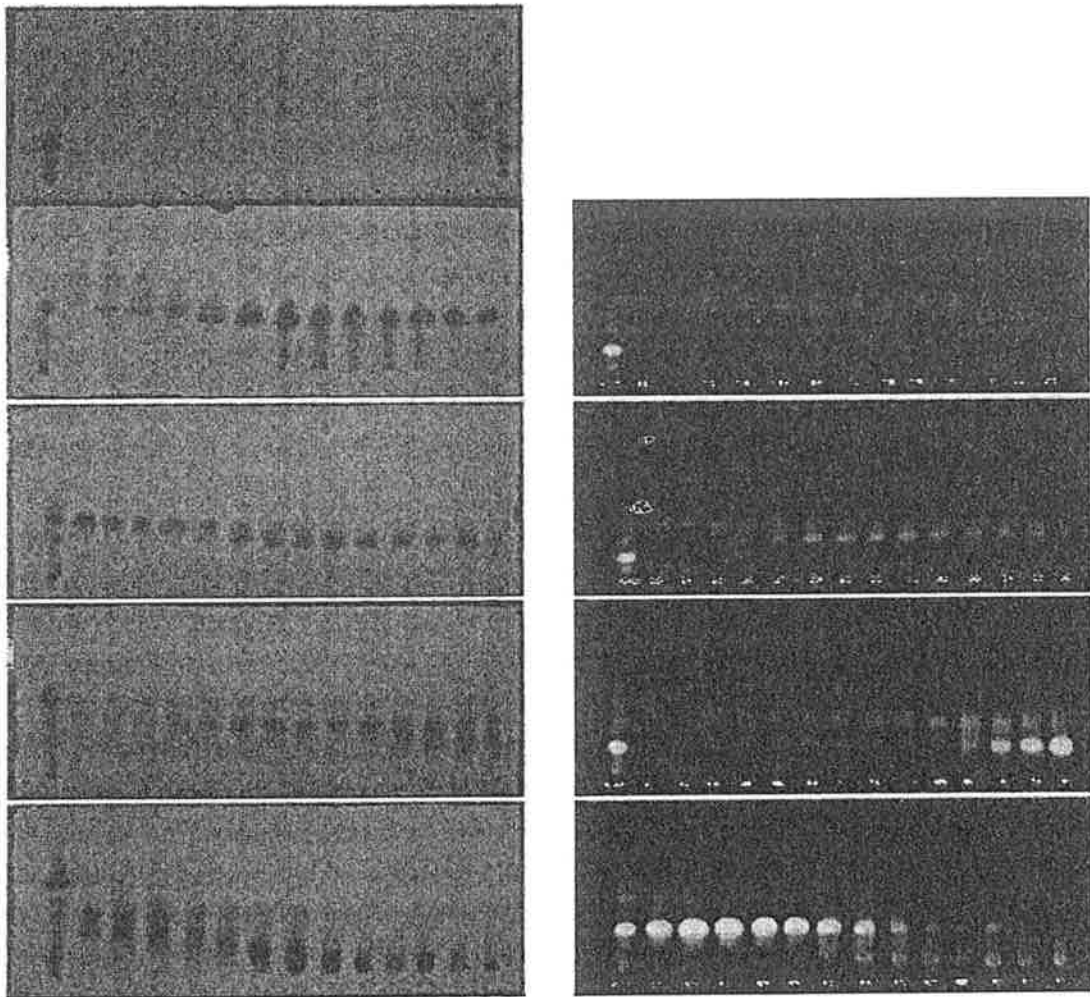


그림 18. Fraction C_{2.2}에서 컬럼 크로마토그래피로 분리된 모든 fraction의 TLC

(3) Fraction C₂₋₂의 분리

Fraction C₂₋₂에서 분리된 fraction C₂₋₂₋₍₁₂₋₁₆₎, C₂₋₂₋₍₁₅₋₂₆₎, C₂₋₂₋₍₃₀₋₃₆₎ 그리고 C₂₋₂₋₍₄₁₋₄₉₎는 각각 같은 화합물을 포함하고 있음을 알 수 있었고, 관련된 화합물들은 몇 가지 방법에 의해 분리되었다.

(가) Fraction C₂₋₂₋₁₇의 분리

Fraction C₂₋₂₋₍₁₅₋₂₆₎은 TLC plate에서 붉은갈색의 spot을 보여주고 있는데 이 구간을 대표하는 fraction C₂₋₂₋₁₇은 재결정화가 수행되었다. Fraction C₂₋₂₋₁₇은 아세톤 용매, 50°C의 온도조건에서 재결정화 되었는데, 이는 212 mg의 바늘같은 결정이 형성되어졌다. 결정은 dichloromethane에 재용해되고 TLC와 UV-를 통해 분석되어졌다. UV 측정결과 최대흡광도는 289 nm임을 확인할 수 있었다. Fraction C₂₋₂₋₁₇은 HPLC를 통해서도 분석되어졌다.

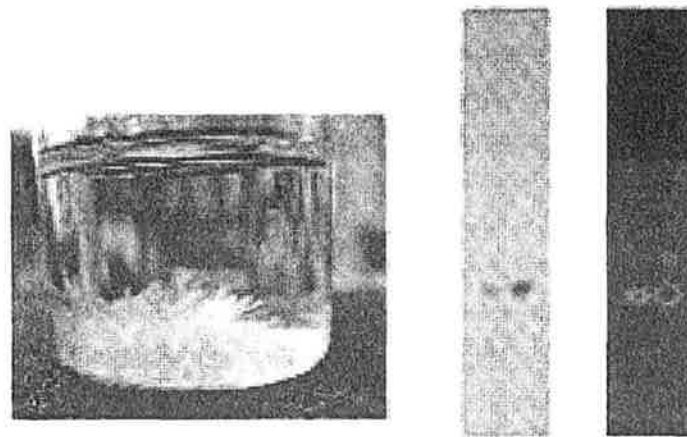


그림 19. C₂₋₂₋₁₇ 결정 사진 및 TLC

전개 조건 : n-hexane:acetone (7:3); Sprayed 10% H₂SO₄/EtOH; Heated at 105°C; Viewed under daylight(left) and 365 nm(right)

표 32. Fraction C₂₋₂₋₁₇ 분석을 위한 prep-HPLC의 기계조건

Instrument	HPLC-UVD: SHIMADZU CORPORATION (JAPAN)
Flow rate	5 ml/min
Mobile phase	dichloromethane:ethyl acetate (70:30, v/v)
Column	waters μ Porasil, 125 Å, 10 μ , 19×300 mm
Wavelength	289 nm
Injection vol.	0.8 mL

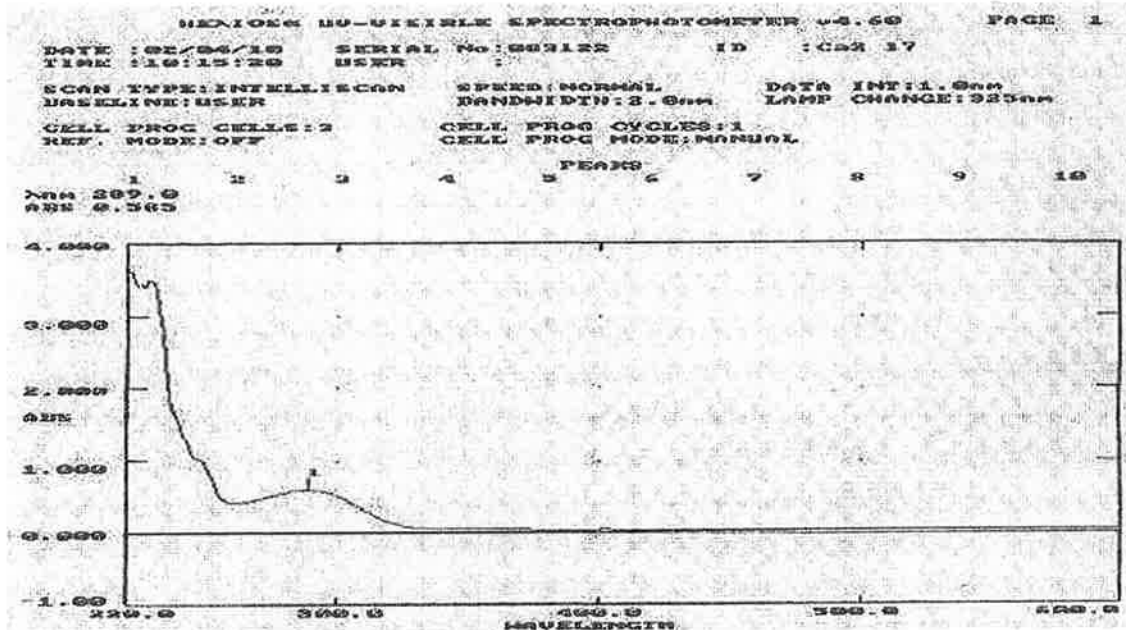


그림 20. Fraction C₂₋₂₋₁₇의 UV 흡수 spectrum

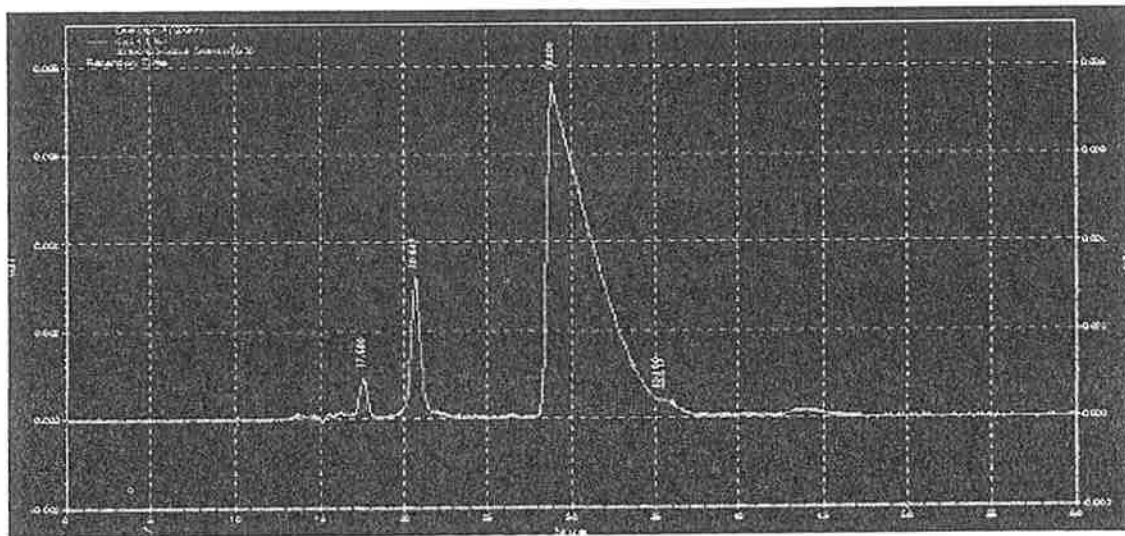


그림 21. Fraction C₂₋₂₋₁₇의 prep-HPLC 크로마토그램

Retention time 28.5분과 34.7분에서 용출되는 용매를 모아 총 173 mg의 하얀색 결정을 얻을 수 있었다(Compound 1). 획득되어진 결정은 Shimadzu LC MS-2010 Evolution을 통해 분석되어졌다. 493 m/z의 이온 fragment는 $[M+Na]^+$ 였고, infrared data는 JASCO JP/FI-IR 300E infrared spectrophotometer에 의해 얻어졌다. IR spectrum에서 OH band (3401 cm^{-1}), carbonyl band (1693 cm^{-1}) 그리고 methyl band (2946 cm^{-1} , 2867 cm^{-1})를 확인할 수 있었고 compound 1는 완전히 건조된 뒤 NMR 분석을 위해 chloroform-d에 재용해 되었다.

Compound 1의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum (500 MHz)은 몇 개의 methyl group과 관련된 0.83 ppm 1.12 ppm에서 signal이 나타났다. signal 2.177 ppm은 하나 또는 두 개의 OH group으로 추정되어진다. Compound 5의 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum (125 MHz)은 carbonyl group과 관련된 216.8 ppm에서 signal이 나타났고, alkene carbon과 관련된 145.5 ppm에서도 signal이 생성되었다. 또한 signals 101.7, 97.7, 78.4, 67.7, 65.3, 57.9 그리고 57.2 ppm은 oxygen group과 연결된 carbon과 관계가 있을 것으로 고려되어진다. 참고문헌(Judith P. etc., 1977)과 비교해 봤을 때 compound 1는 melianone ($\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_4$, Molecular weight 470.34)으로 판명되어진다.

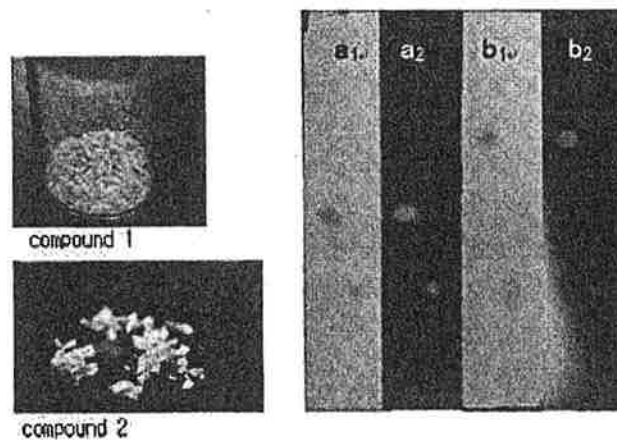


그림 22. Compound 1과 Compound 2의 고체결정 사진 및 TLC

전개조건 : n-hexane:acetone (7:3) (a_1, a_2); and DCM-EtOAc(5:5)(b_1, b_2); Sprayed 10% $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{EtOH}$; Heated at 105°C ; Viewed under day light(a_1, b_1); and 365 nm(a_2, b_2)

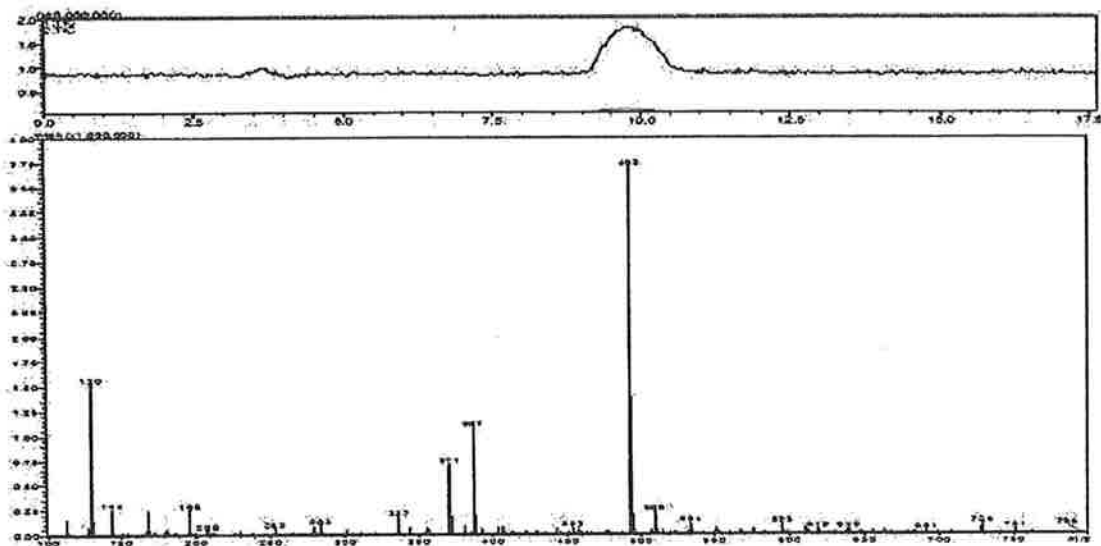


그림 23. Compound 1의 TIC 그리고 MS spectrum

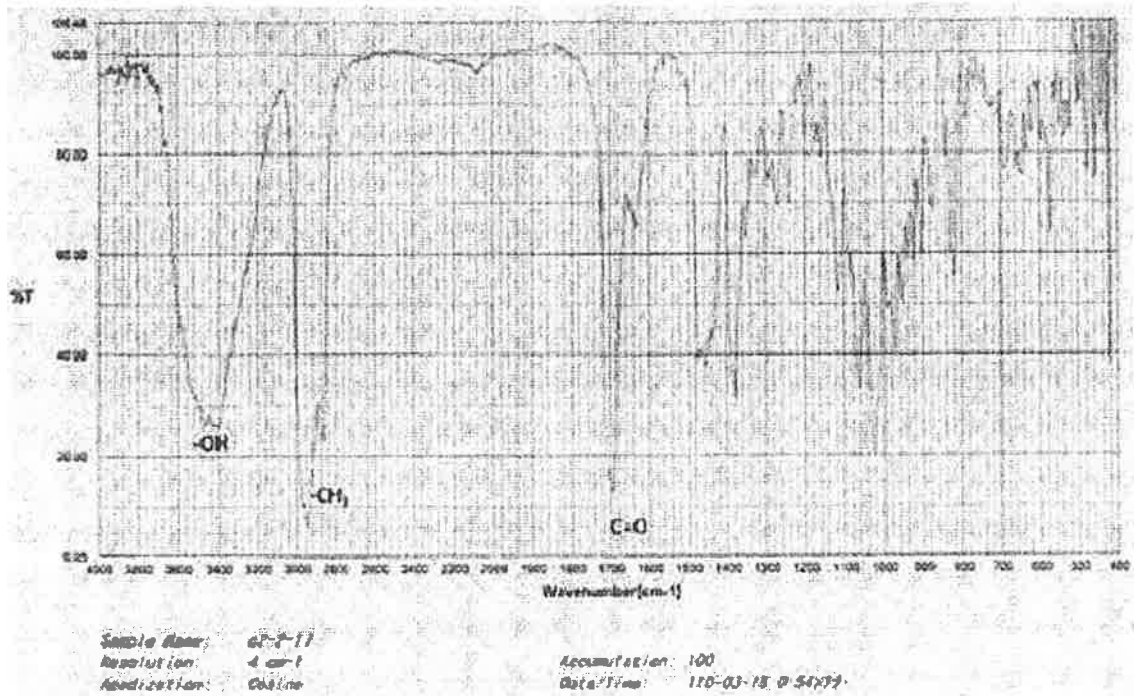


그림 24. Compound 1의 IR spectrum

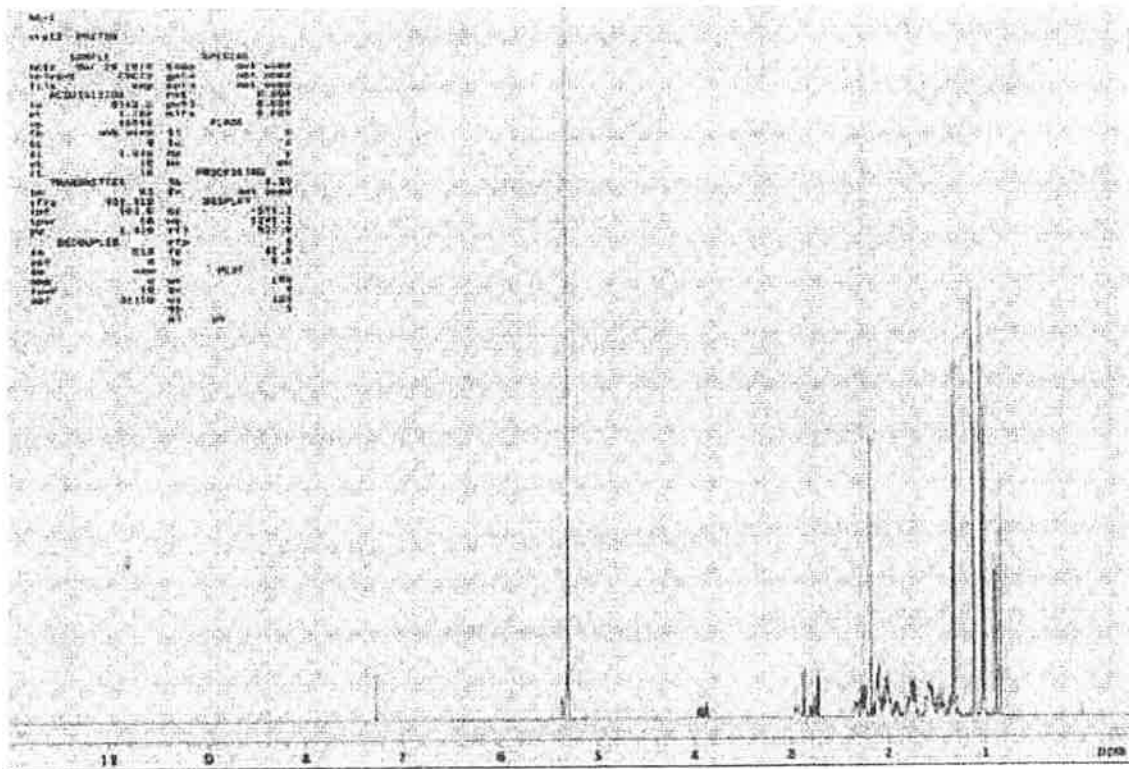


그림 25. Compound 1의 NMR spectrum-1

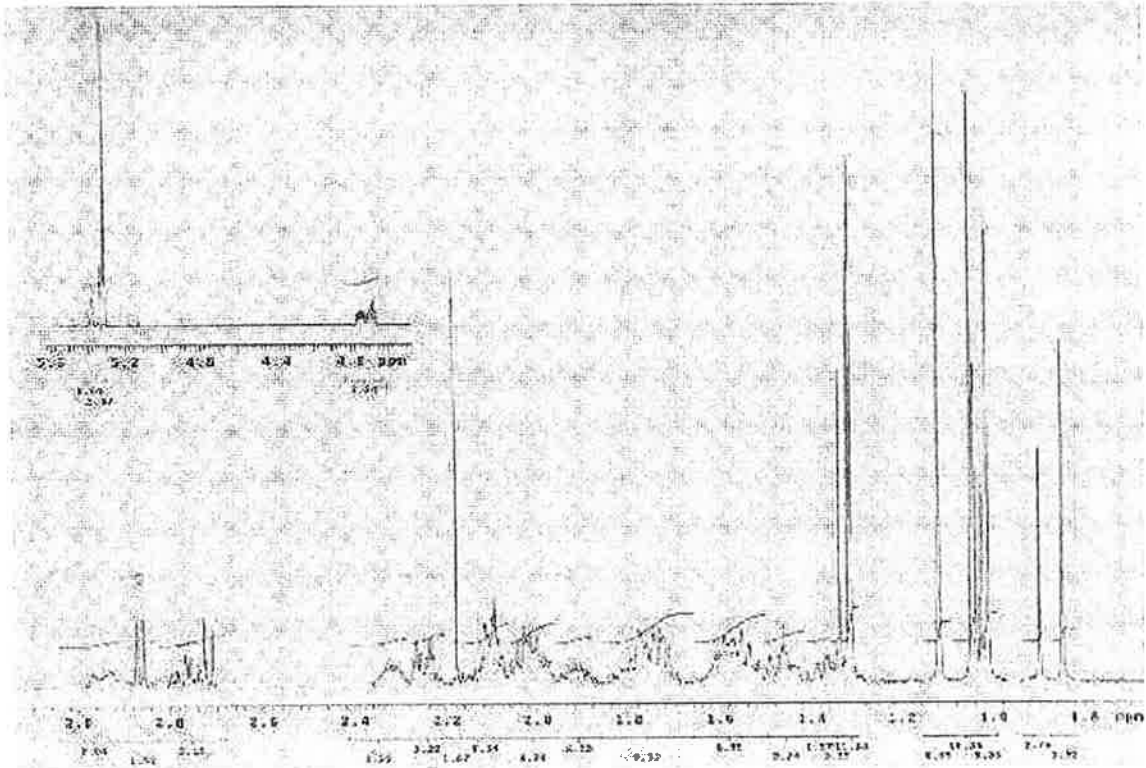


그림 26. Compound 1의 NMR spectrum-2

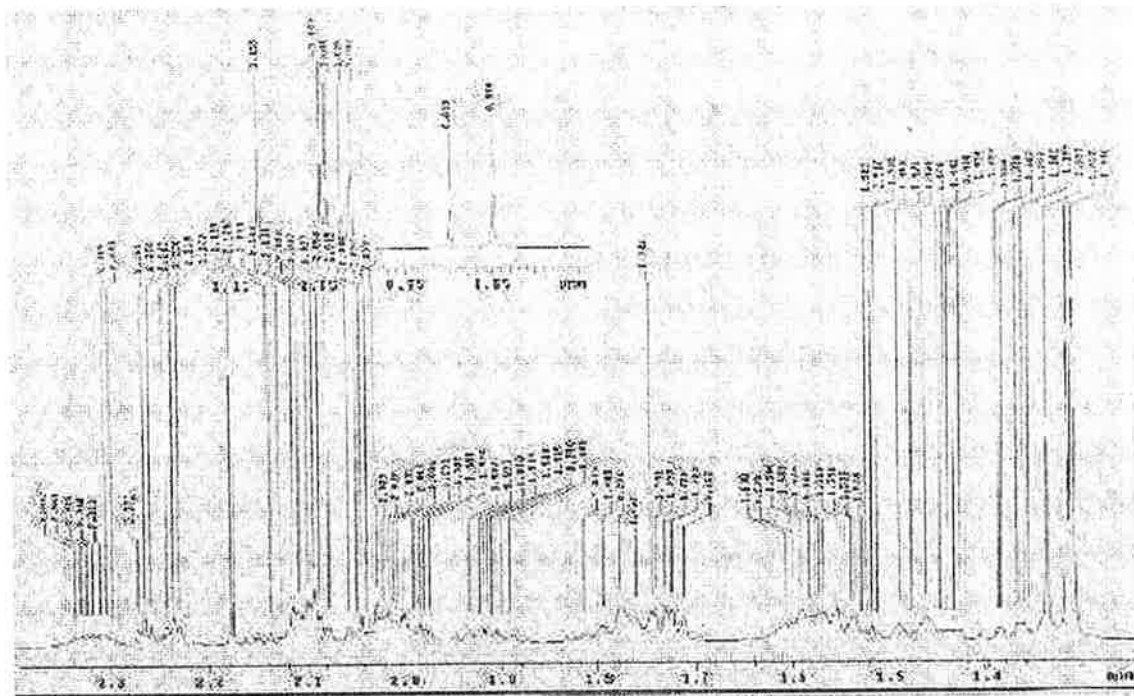


그림 27. Compound 1의 NMR spectrum-3

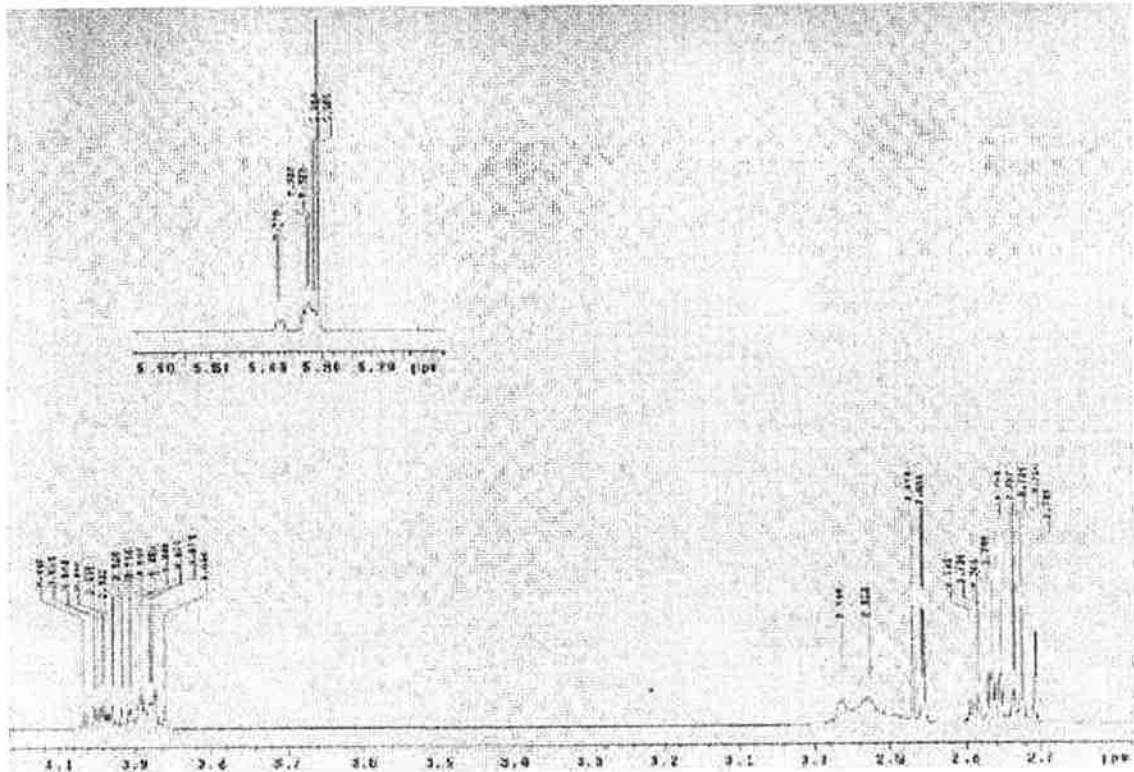


그림 28. Compound 1의 NMR spectrum-4

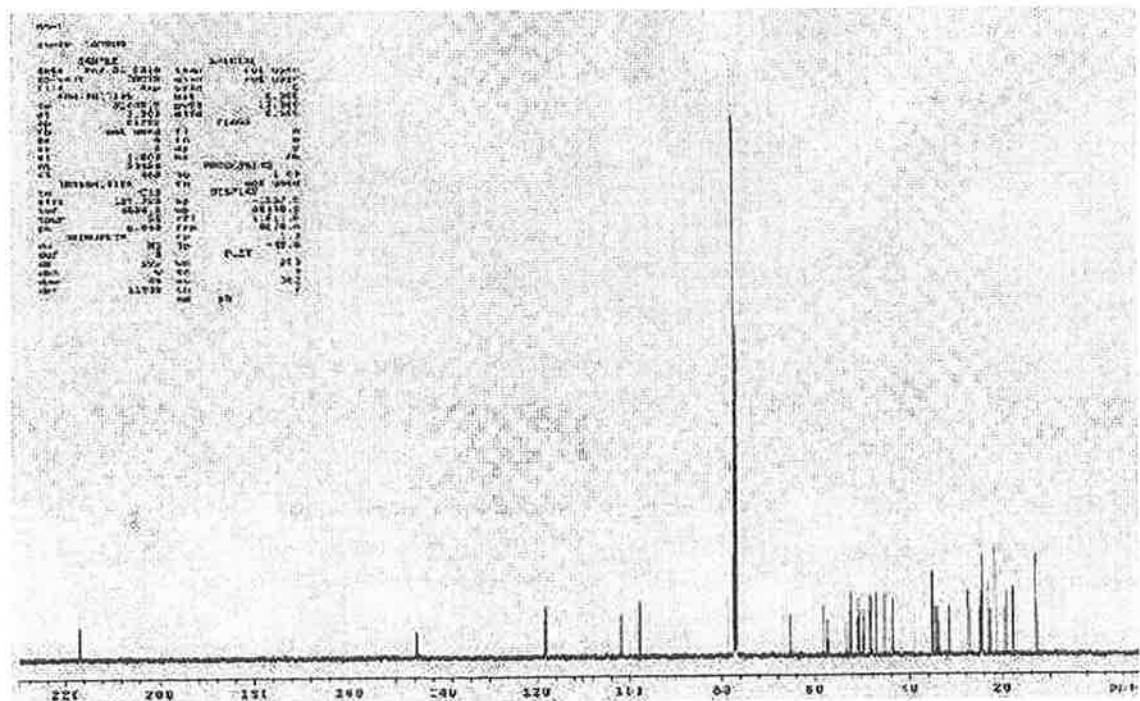


그림 29. Compound 1의 NMR spectrum-5

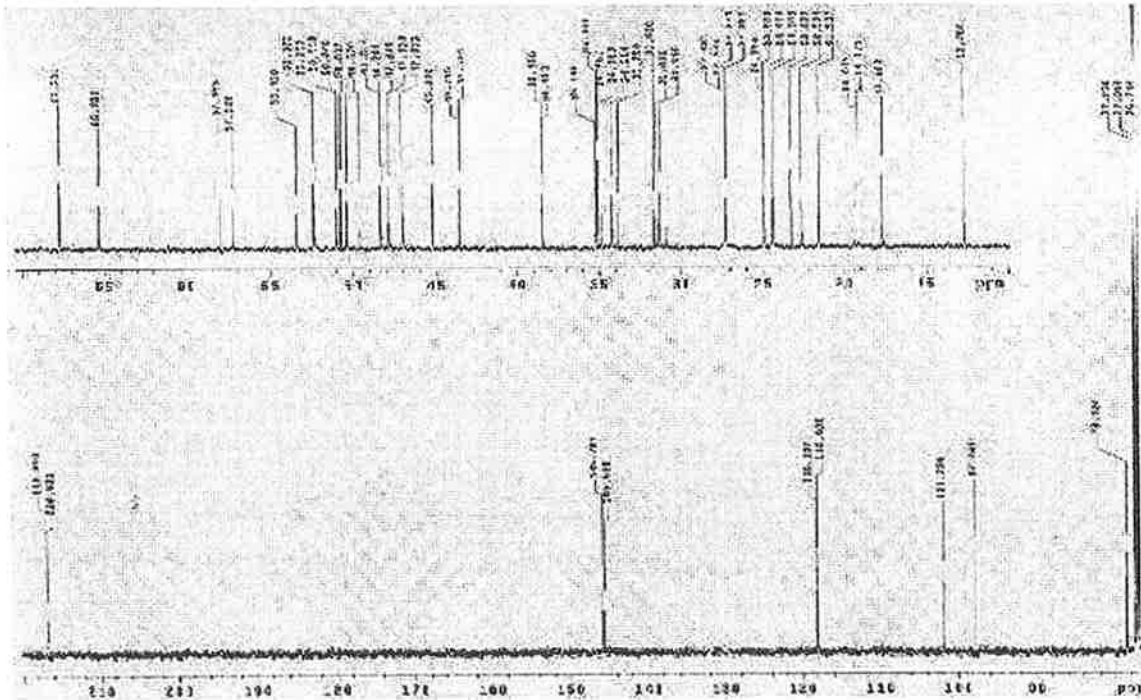


그림 30. Compound 1의 NMR spectrum-6

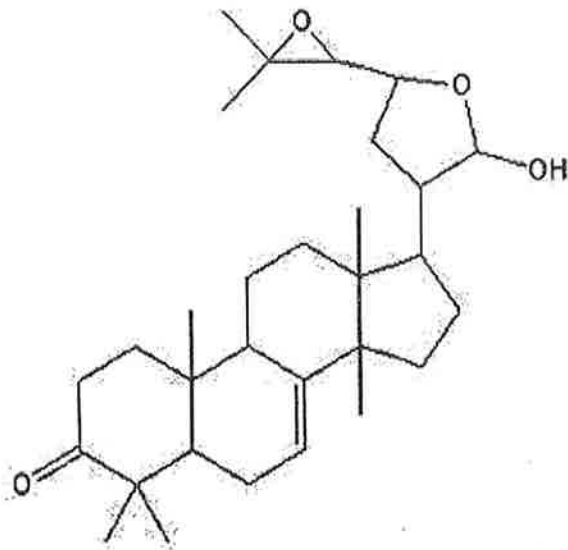


그림 31. Compound 1의 화학 구조식(melianone)

(나) Fraction C₂₋₂₍₄₁₋₄₅₎의 분리

Fraction C₂₋₂로부터 획득한 fraction C₂₋₂₍₄₁₋₄₉₎는 같은 물질을 함유하고 있음을 알 수 있으며 그중 fraction C₂₋₂₍₄₁₋₄₅₎는 매우 순수함을 확인할 수 있었다.

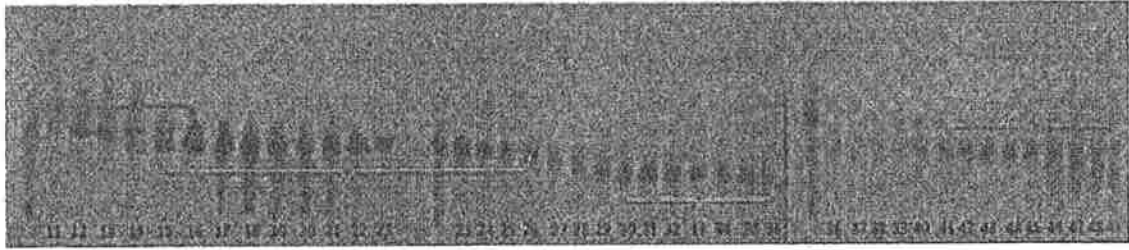


그림 32. Fraction C₂₋₂에서 분리된 fraction 11-19의 TLC

Fraction C₂₋₂₍₄₁₋₄₅₎는 다시 합쳐져 추가적인 분리가 이루어졌다. Column chromatography에 적합한 용매를 찾기 위해 TLC에서 몇 가지의 전개용매가 test 되었다. Fraction C₂₋₂₍₄₁₋₄₅₎는 농축되어진 뒤 0.161 g이 획득되었고 dichloromethane 2 ml에 녹여진 뒤 packed glass column (silica, 70-230 mesh, 2 cm × 15 cm)에 로딩 되어졌다. 용출용매로는 dichloromethane:ethyl acetate (70:30, v/v)가 사용되었고 총 28개의 fraction을 획득하였다. 모든 fraction은 TLC에 의해 분석되었고 target compound가 있는 fraction C₂₋₂₍₁₆₋₂₇₎은 혼합되었다.

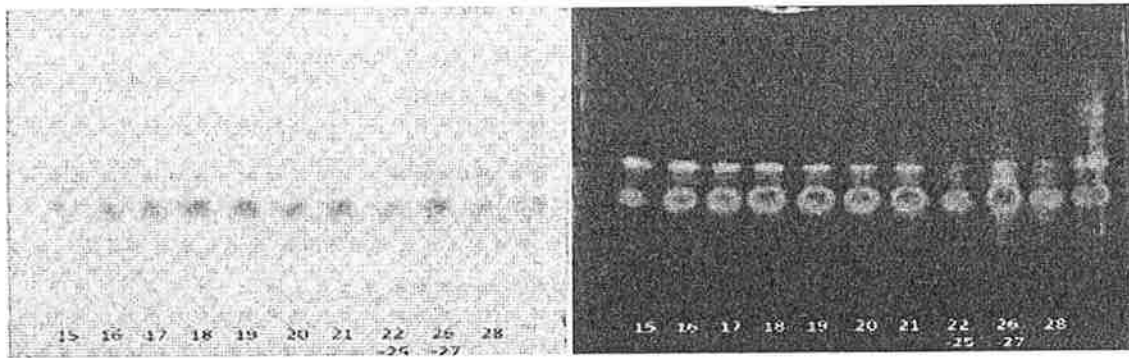


그림 33. fraction C₂₋₂₍₄₁₋₄₅₎에 포함된 타겟 화합물의 TLC

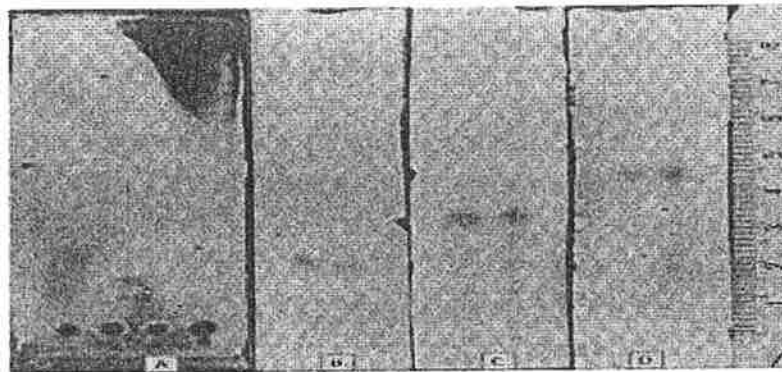


그림 34. Fraction C₂₋₂₍₄₁₋₄₅₎의 TLC

A) n-Hexane:ethyl acetate (7:3), B) n-hexane:ethyl acetate:methanol (7:3:0.3), C) n-hexane:ethyl acetate:methanol (7:3:0.4), D) n-hexane:ethyl acetate : methanol (7:3:0.6)

Fraction C₂₋₂₋₍₁₆₋₂₇₎의 column chromatography의 최적화 조건을 찾기 위하여 n-hexane:ethyl acetate (7:3, v/v), dichloromethane:ethyl acetate (7:3, v/v), n-hexane:ethyl acetate (5:5, v/v), n-hexane:ethyl acetate:methanol (7:3:0.3, v/v/v), n-hexane:ethyl acetate (7:3:0.6, v/v/v), 그리고 n-hexane:ethyl acetate:methanol (7:3:0.4, v/v/v)가 test 되었고 n-hexane:ethyl acetate:methanol (7:3:0.4, v/v/v)가 용출 용매로 선택되어졌다.

Fraction C₂₋₂₋₍₄₁₋₄₅₎₋₍₁₆₋₂₇₎은 농축되어진 뒤 용출용매로 재용해되어 packed glass column (silica, 230~400 mesh, 1.8 cm × 17 cm)으로 로딩되었고 200 mL의 n-hexane:ethyl acetate:methanol (7:3:0.4, v/v/v)로 용출되어 총 24개의 fraction을 획득하였다. 모든 획득물은 TLC에 의해 분석되어졌다.

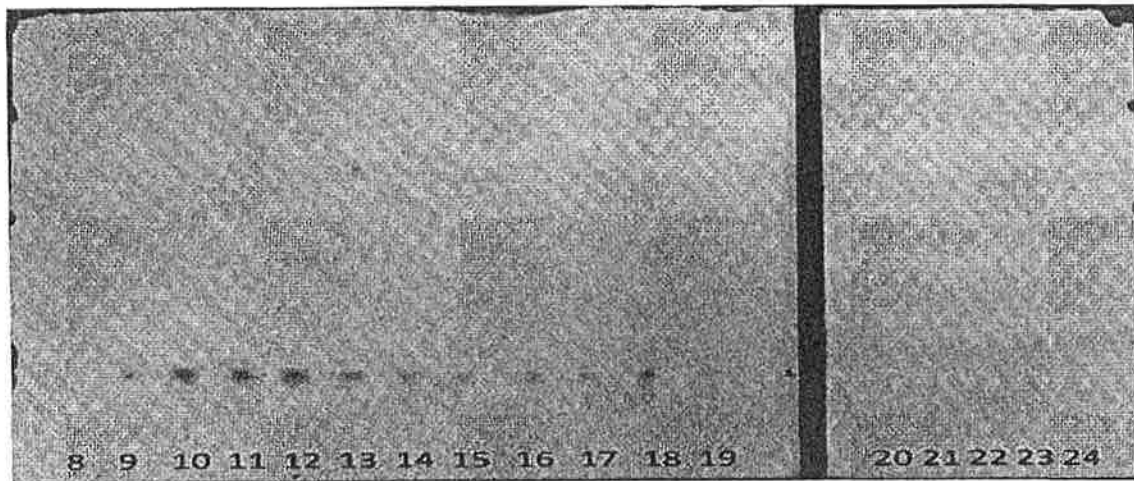


그림 35. Fraction C₂₋₂₋₍₄₁₋₄₅₎₋₍₁₆₋₂₇₎로부터 분리된 fraction들의 TLC

Fraction 10-15는 조합되어진 뒤 아세톤에서 재결정화 되어 총 6.9 mg의 흰색 결정이 획득되었다 (Compound 2). 결정의 1.0 mg을 취하여 1 mL의 아세톤에 녹여 LC MS-2010 Evolution을 이용하여 분석하였다. 511 m/z의 이온 fragment는 [M+Na]⁺였고, 남겨진 compound 2은 chloroform-d₆에 재용해되어 광주 과학기술원에서 Varian Unity Plus 300 spectrometer (500 MHz)으로 분석 하였다.

Compound 2의 분자량은 compound 1(melianone)보다 18 amu 높았으며, ¹H-NMR spectrum (500 MHz) 결과 compound 1의 spectrum과 매우 유사함을 보여주었다. Compound 1의 signal zone에서 2개의 signal은 C-23과 C-24의 proton에 의해 등장한 것으로 보아, compound 2의 분자량이 18 amu가 증가한 것은 compound 1의 epoxy group이 열리고 물 분자가 -diol group에 붙은 결과로 사려되어진다. Compound 2의 ¹³C-NMR spectrum은 signal 97과 217 ppm에서 그리고 12와 53 ppm에서 compound 1와 거의 일치함을 보여주었다. Compound 1의 C-24 signal은 67.701, 65.701이었으나, compound 2에서는 signal이 75.133, 73.194로 변하였고, C-25의 signal도 57.995에서 70.995로 바뀐 것으로 보아 compound 2는 melianodiol (C₃₀H₄₈O₅)로 고려되어진다.

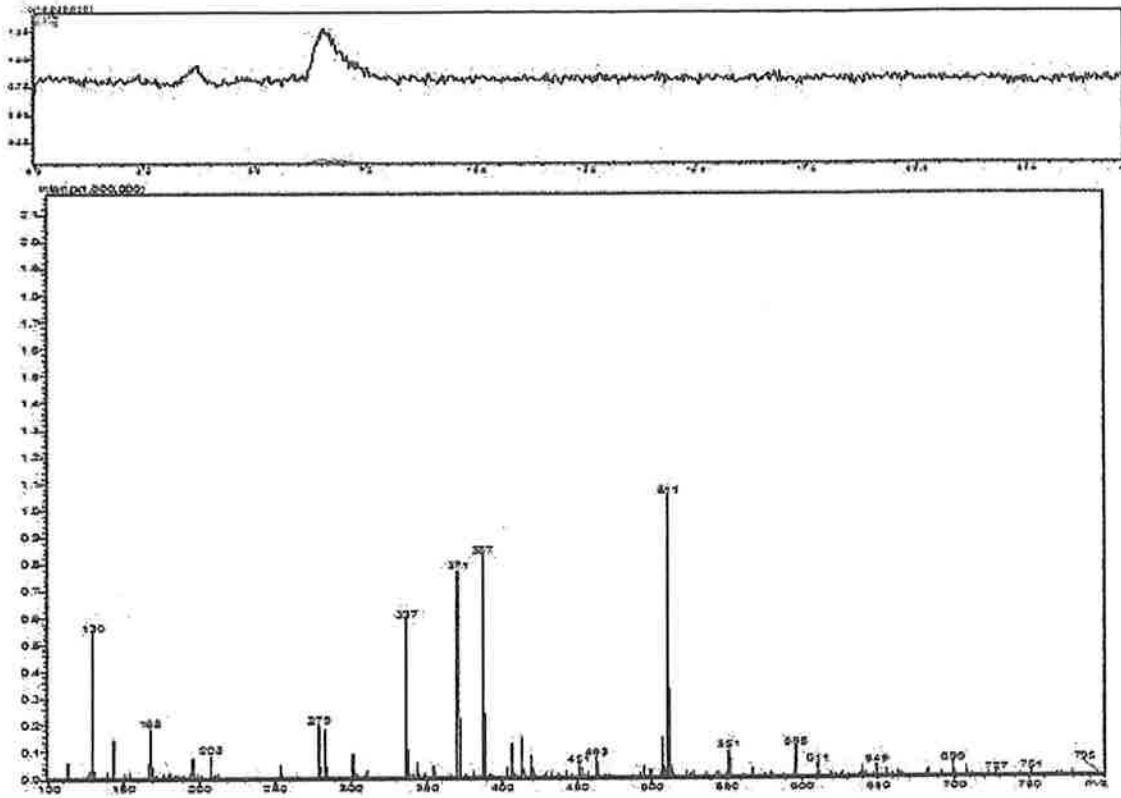


그림 36. Compound 2의 TIC와 MS spectrum

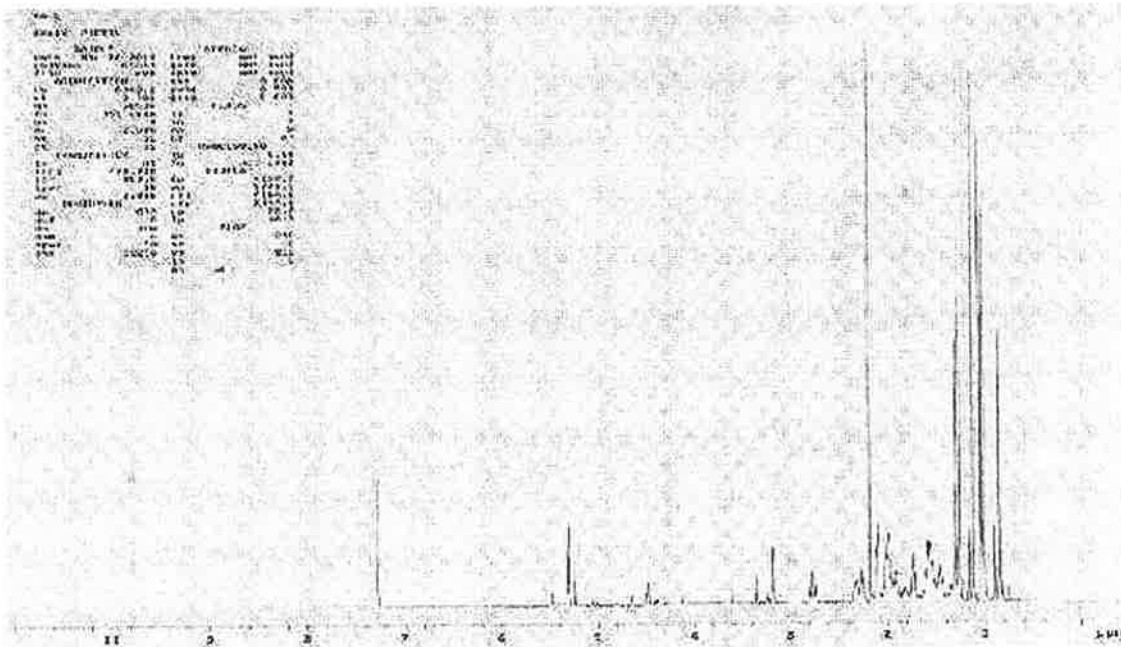


그림 37. Compound 2의 NMR spectrum-1

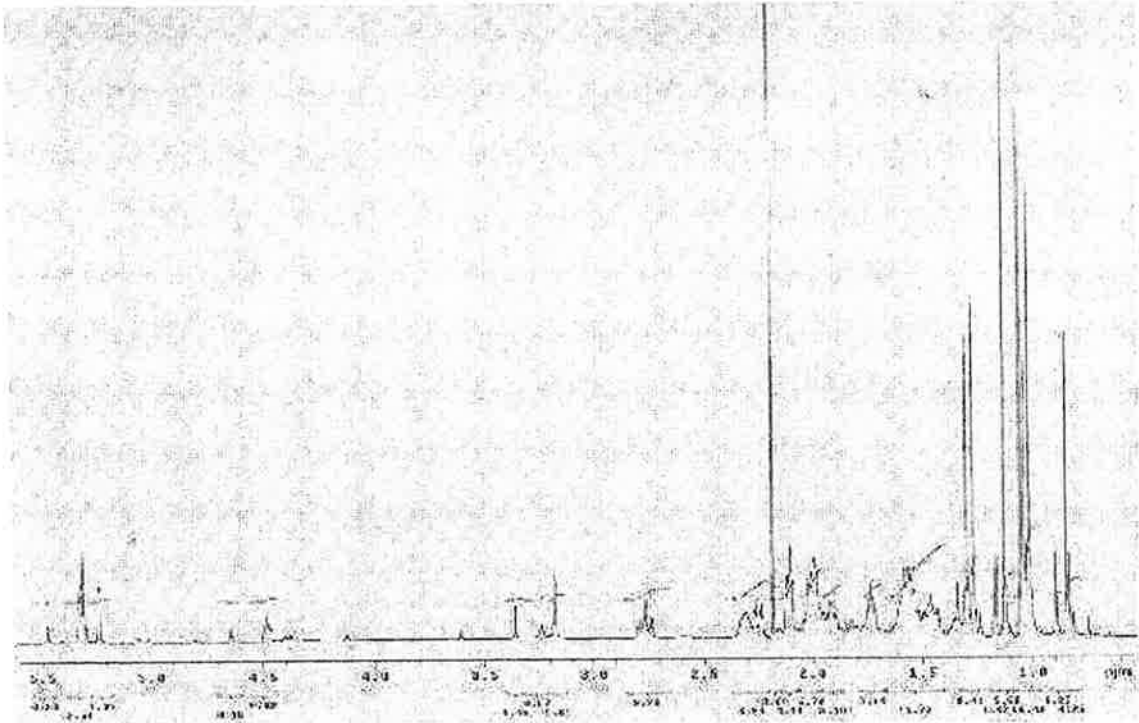


그림 38. Compound 2의 NMR spectrum-2

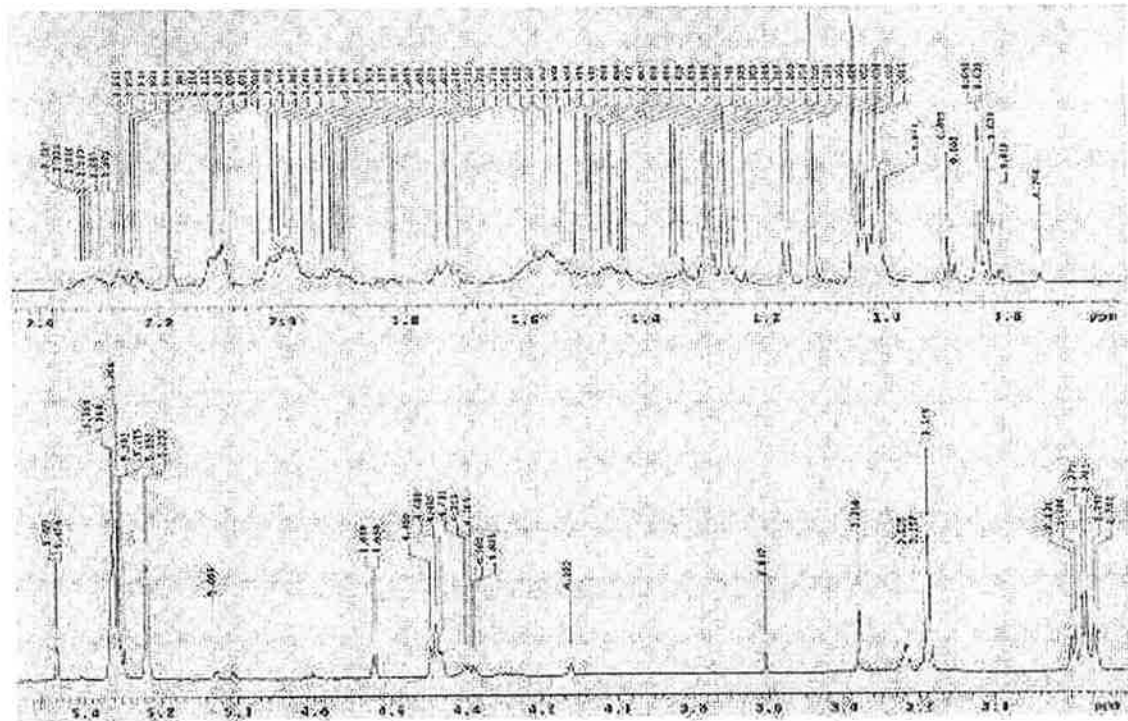


그림 39. Compound 2의 NMR spectrum-3

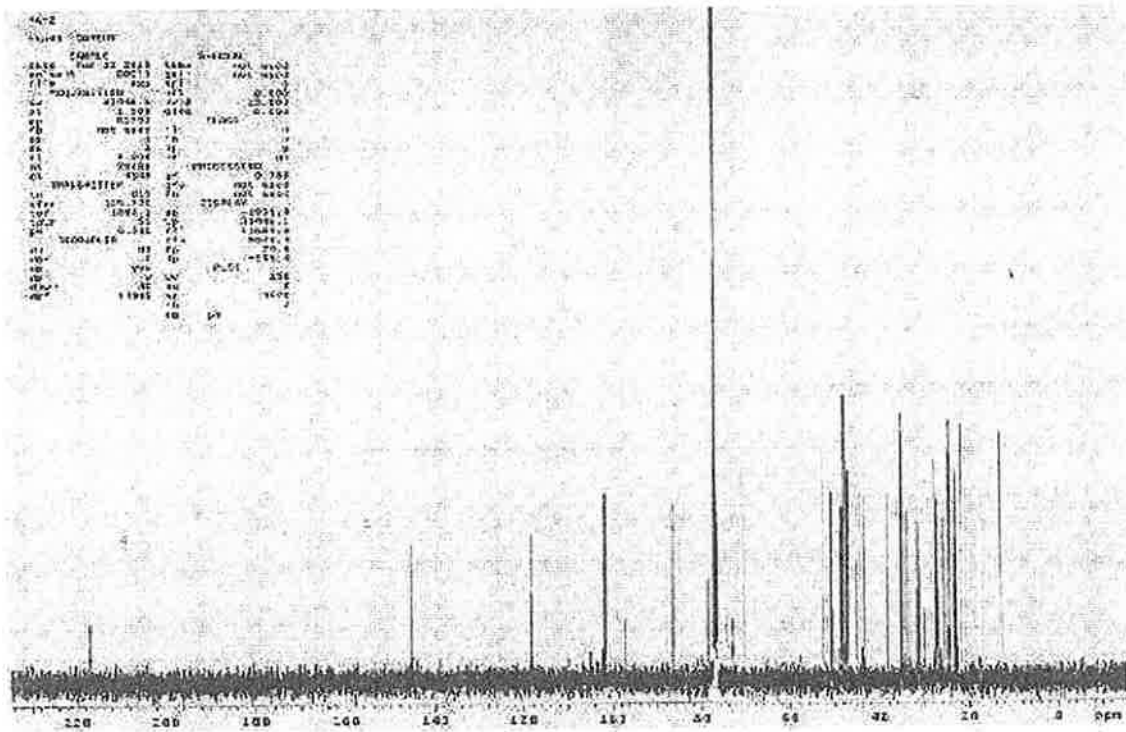


그림 40. Compound 2의 NMR spectrum-4

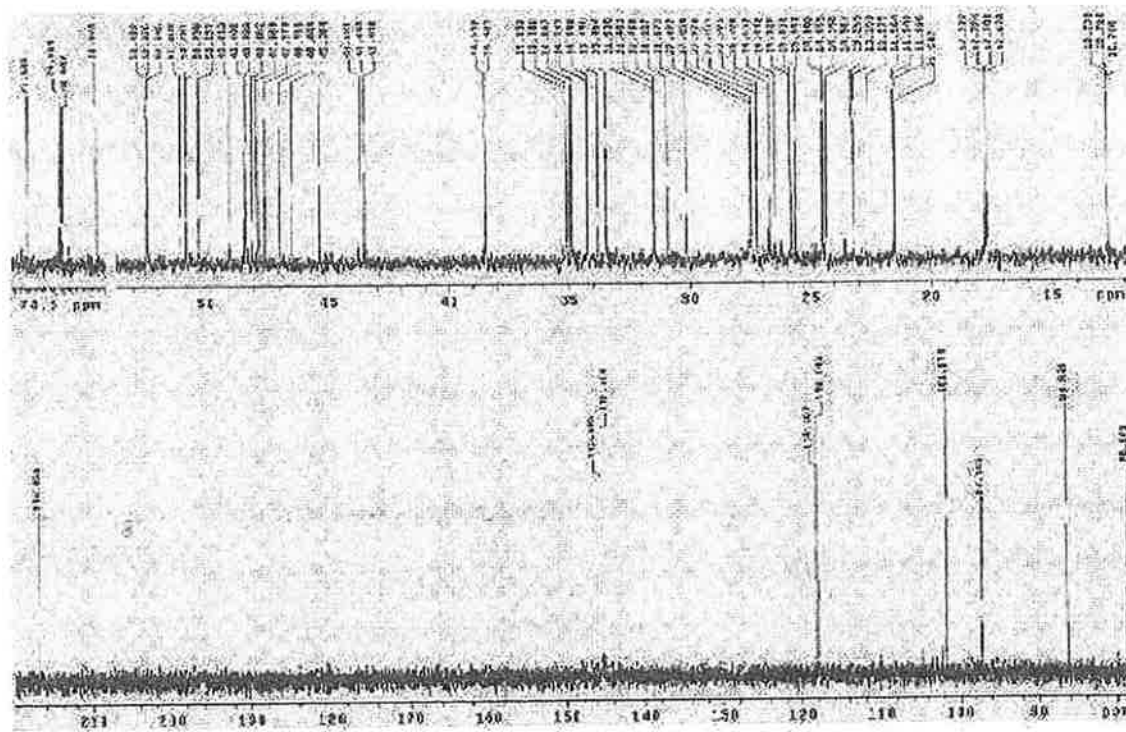


그림 41. Compound 2의 NMR spectrum-5

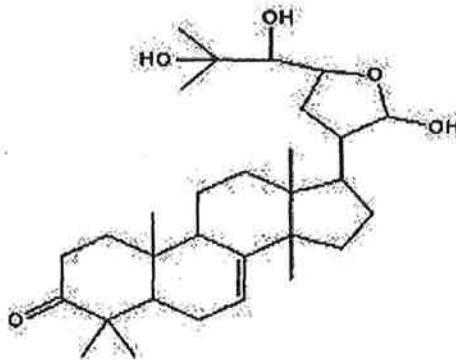


그림 42. Compound 2의 화학 구조식(melianodiol)

표 33. 125 MHz에서 melianone과 비교한 compound 1과 compound 2의 ¹³C-NMR data (δ)

Carbon number	Melianone ^a	Compound 1	Compound 2
1	38.5	38.439 d	38.469 d
2	35.0	35.168	35.092
3	216.8	216.855 d	216.856
4	47.8	47.835 d	47.860
5	52.4	52.300 d	52.381 t
6	24.4	24.476	24.499 d
7	118.0	118.083 d	118.076 d
8	145.6	145.611 d	145.618 d
9	48.3, 49.5	48.314, 49.570	48.333, 48.420
10	34.9	34.872 d	34.897
11	27.4	27.413 d	27.465 d
12	35.1	35.061	35.080
13	43.5	43.619 d	43.466 d
14	50.4	50.387	50.749 d
15	34.2	34.214	34.220 d
16	31.5	31.446 t	31.469 d
17	45.1, 46.9	45.192, 47.013	45.364, 46.955
18	12.7	12.704	12.721 t
19	17.7	17.667	17.777
20	33.8	33.790	33.454
21	97.7, 101.7	97.735, 101.754	97.185, 101.674
22	24.9	24.896	24.358
23	77.0, 78.4	77.000, 78.424	78.649, 86.352
24	65.4, 67.4	65.289, 67.701	73.194, 75.133
25	57.2, 57.9	57.220, 57.995	70.973
26	24.9	24.938 d	25.591
27	19.2	19.287 d	21.516 d
28	22.5	22.594	22.575
29	24.4	23.236	23.224 d
30	21.5	21.537	21.556 d

(4) Fraction H₂의 분리

n-Hexane을 이용하여 추출한 fraction H₂는 -24℃에 저장되면서 흰색의 고체 결정이 생성되었고 생성된 고체 결정과 상층액은 n-hexane으로 다시 용해시켜 TLC plate(3 cm × 5 cm, silica gel 60, Merck)에 점적하였다. Plate는 n-hexane:ethyl acetate (80:20, v:v)로 전개시켰고, 점적 후 5% vanillin/H₂SO₄를 스프레이한 뒤 105℃로 점적한 것이 보일 때 까지 말려 주었다.



그림 43. Fraction H₂의 TLC

1) Fraction H₂의 고체결정, 2) Fraction H₂의 상층액

TLC 결과 고체 결정과 상층액 모두에서 4개의 주요한 spots이 발견되었고, R_f 값은 0.1~0.33, 0.64, 0.71 그리고 0.86이었다. 상층액은 농축시킨 뒤 건조시켜 0.576 g의 물질을 획득 할 수 있었다. 획득된 물질은 n-hexane:ethyl acetate (60:40, v/v)으로 다시 용해시킨 뒤 silica filled column(70~230 mesh, 80 g, 2.6 cm × 18 cm)에 loading 하였다. 컬럼은 500 mL의 n-hexane:ethyl acetate (60:40, v/v)로 용출시켰고, 25개의 fraction이 얻어졌다.

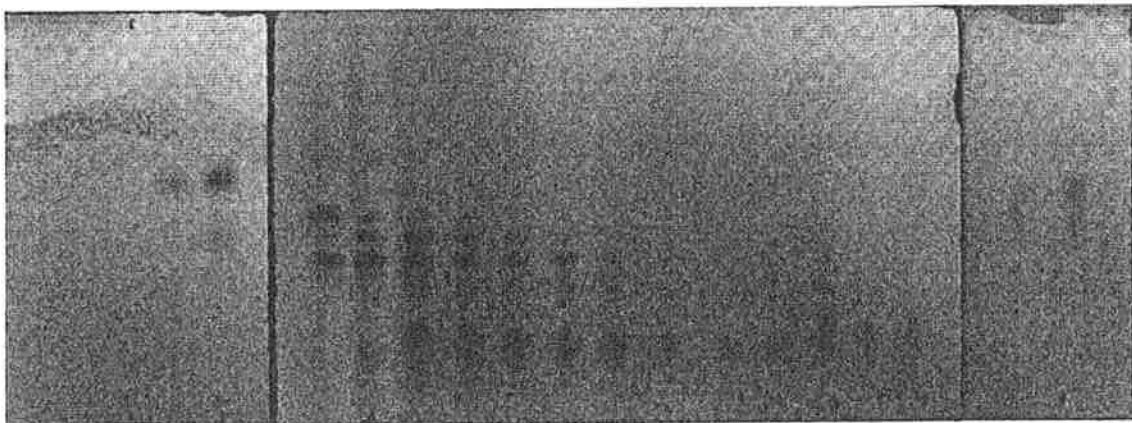


그림 44. Fraction H₂에서 컬럼 크로마토그래피로 분리된 모든 fraction의 TLC

25개의 fraction 중 14-15, 17-25번은 TLC 점적 결과 하나의 spot을 나타냈고 Rf값은 fraction H₂에서 보여주었던 것과 같은 0.1-0.33을 나타냈다. Fraction H₂₍₇₋₁₀₎에서 얻어진 물질들은 합쳐서 H_{2-P}라고 명명하고 prep-HPLC를 이용하여 다시 분리하였다. H_{2-P} fraction의 최대 흡광도는 273 nm였다.

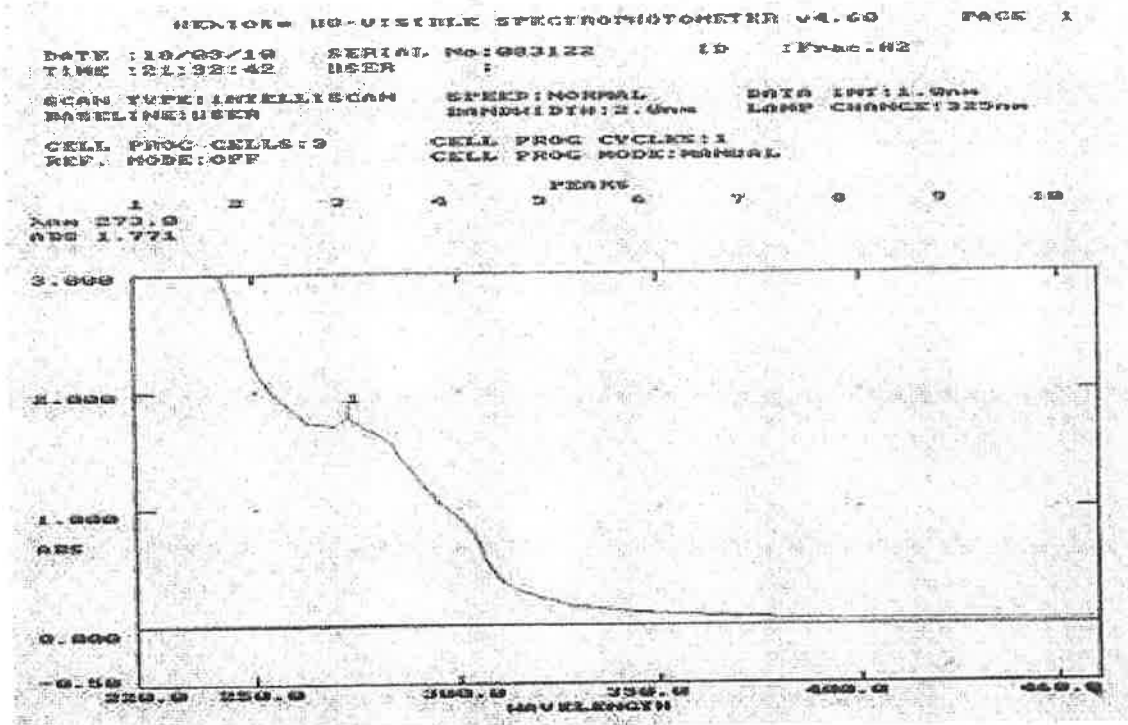


그림 45. Fraction H_{2-P}의 UV 흡수 spectrum

분리는 Shimadzu LC-10 VP series chromatographic system (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan)을 이용하여 이루어졌고, SCL 10A VP system controller, dual LC 6-AD pump, SPD 10A VP UV - V detector, 그리고 CTO-20A prominence column oven이 사용되었다. System control과 data 수집은 Class-VP software를 사용하였고, 총 14개의 fraction이 수집되었다.

표 34. Fraction H_{2-P}의 prep-HPLC 기계 조건

Detector	UV-Vis
Mobile phase	n-hexane : ethyl acetate (95:5, v:v)
Flow rate	10.0 ml/min
Column	waters, μporasil, 19 × 300 mm
Oven temp.	30℃
Injection vol.	0.8 ml

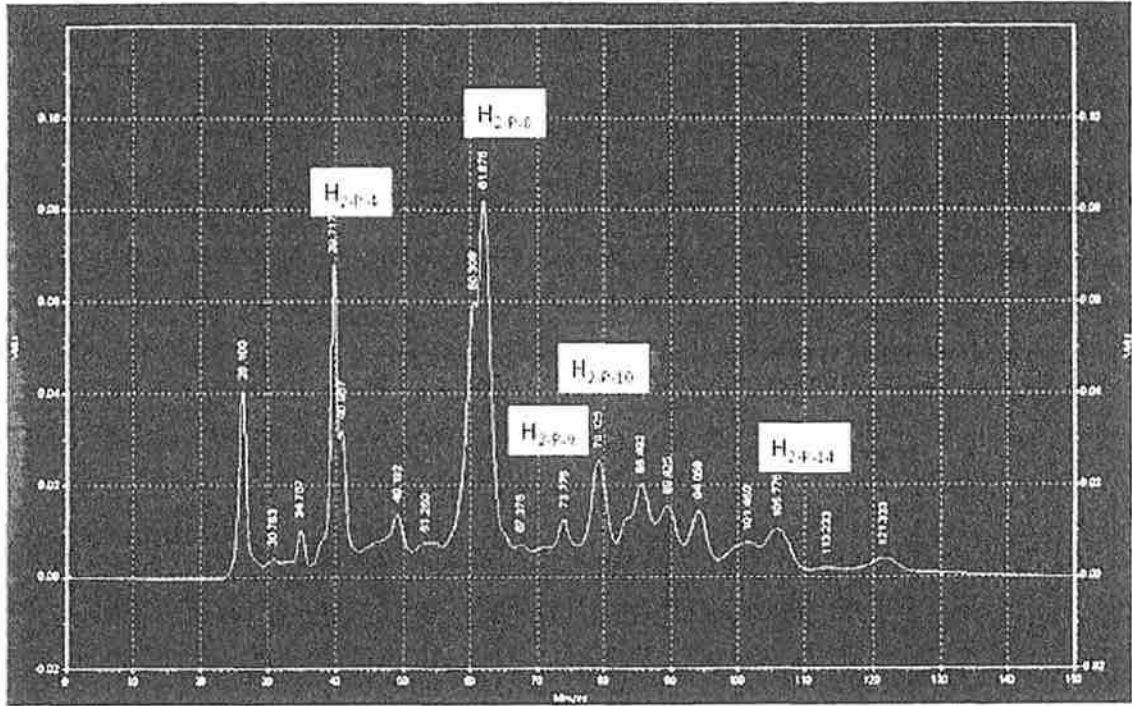


그림 46. Fraction H₂-P의 prep-HPLC 크로마토그램

14개의 fraction들이 농축되어진 후에 H₂-P-4는 0.8 mg, H₂-P-8은 16.3 mg, H₂-P-9는 10.4 mg, H₂-P-10은 3.6 mg 그리고 H₂-P-14는 1.1 mg가 얻어졌다. 얻어진 화합물들은 n-hexane으로 녹여진 뒤 GC-MS를 이용하여 구조를 파악했다.

표 35. Fraction H₂로부터 compound를 분리하기위한 GC-MS 기계조건

Instrument	Agilent Technologies 6890N network GC system
Split ratios	2:1
Column	HP5 MS column (30 m × 0.25 mm I.D., 0.25 μm)
Carrier gas	Helium
Flow rate	1.0 ml/min
Oven temp.	250°C -4°C/min-> 300°C (8min)
Injection temp.	250°C
Transfer line temp.	300 °C
Ionization temp.	230°C
Injection vol.	1 μL

Mass spectra는 full scan mode로 50-700 amu에서 모아졌고, data 수집과 control은 Agilent MSD Chemstation G1701 DA D.03.00.611.에 의해 이루어졌다. MS spectra는 50-700 amu에서 full scan mode로 수집되었고, system과 data 수집은 Agilent MSD Chemstation G1701 DA D.03.00.611에 의해 행해졌다. Figure 6은 각각의 화합물을 TIC로 분석한 결과이다. 분석된 화합물들은 PBM searching과 NIST database를 통하여 identification 되었다. PBM searching 결과 fraction H_{2-P-4}는 1, 2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester와 91%의 유사성을 보였다. Fraction H_{2-P-4}의 MS data는 NIST database의 1, 2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester와 비교했을 때 match factor가 939였고, R-match factor는 953으로 대략 42.4%의 유사성을 보였다.

Fraction H_{2-P-4}와 관련된 MS spectra는 그림 47에 나와있다. 위에서 언급되어진 결과들을 조합해 볼 때 fraction H_{2-P-4}는 1, 2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester (Compound 3, C₂₄H₃₈O₄, MW: 390.28)라고 추측되어진다.

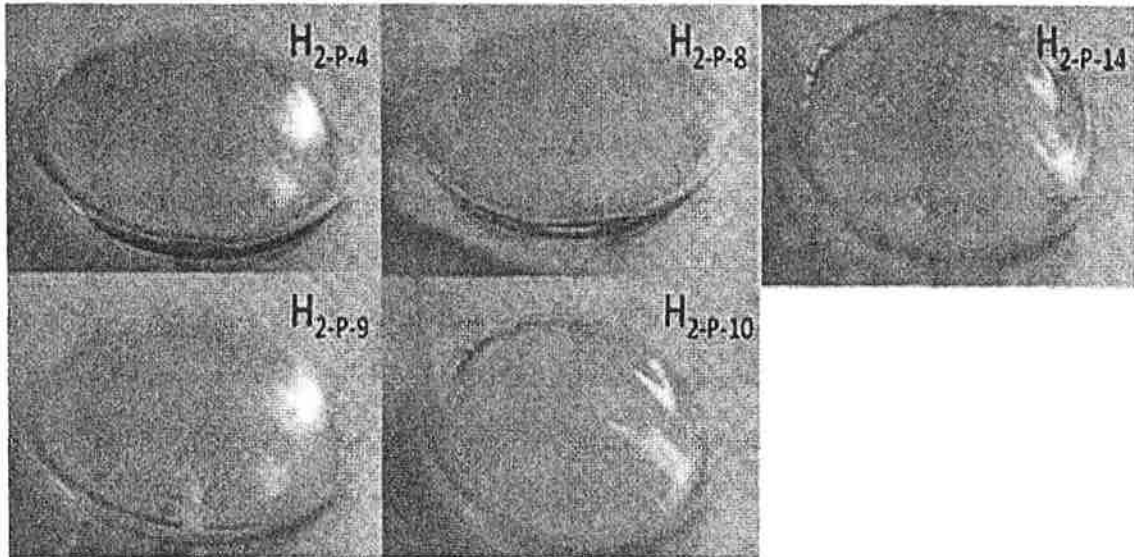


그림 47. prep-HPLC를 통해 fraction H_{2-P}에서 얻은 5가지 화합물

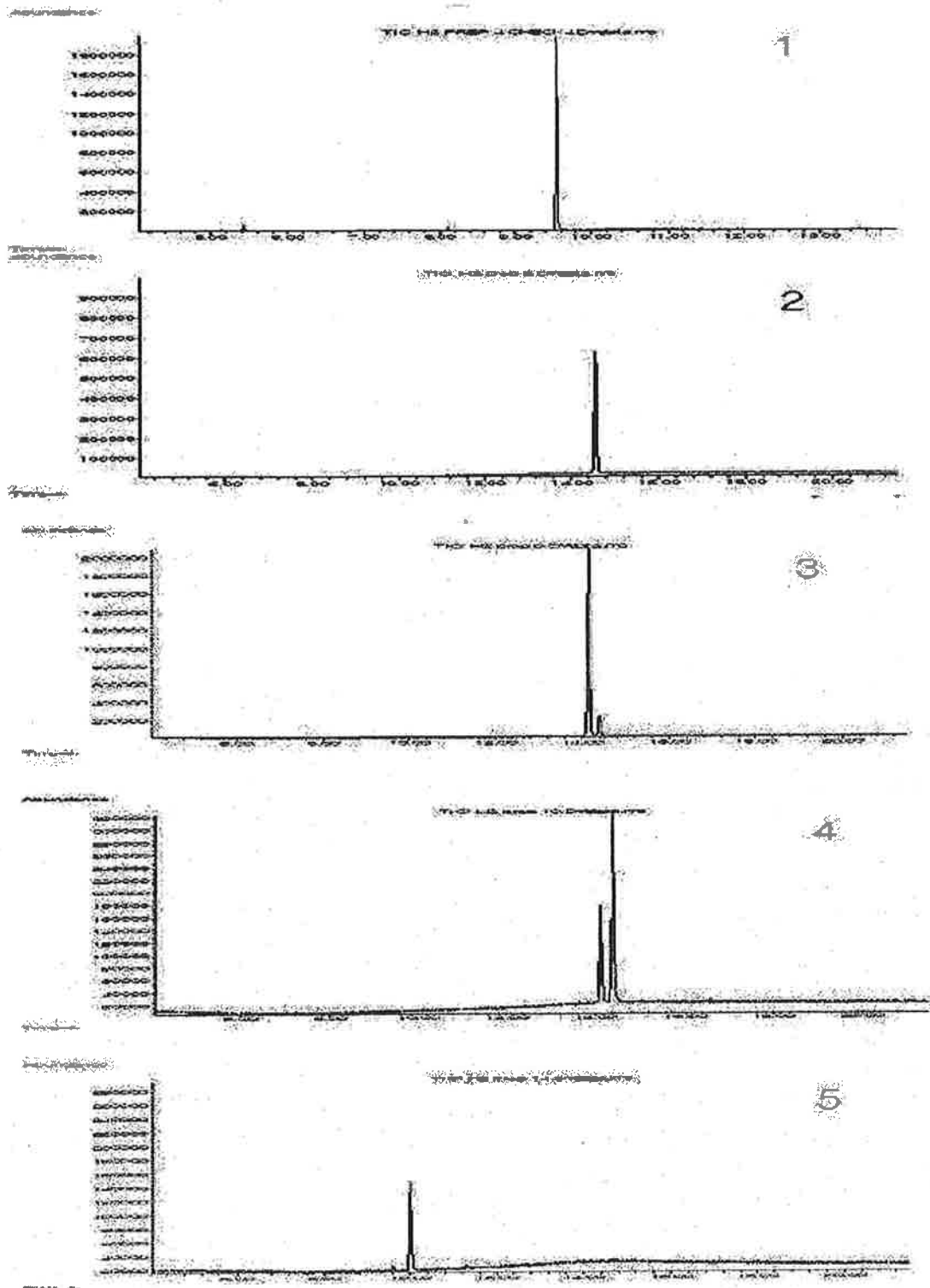


그림 48. Fraction H2-P에서 수집된 Total ion chromatogram

1) fraction H₂-P-4 2) H₂-P-8 3) H₂-P-9 4) H₂-P-10 5) H₂-P-14.

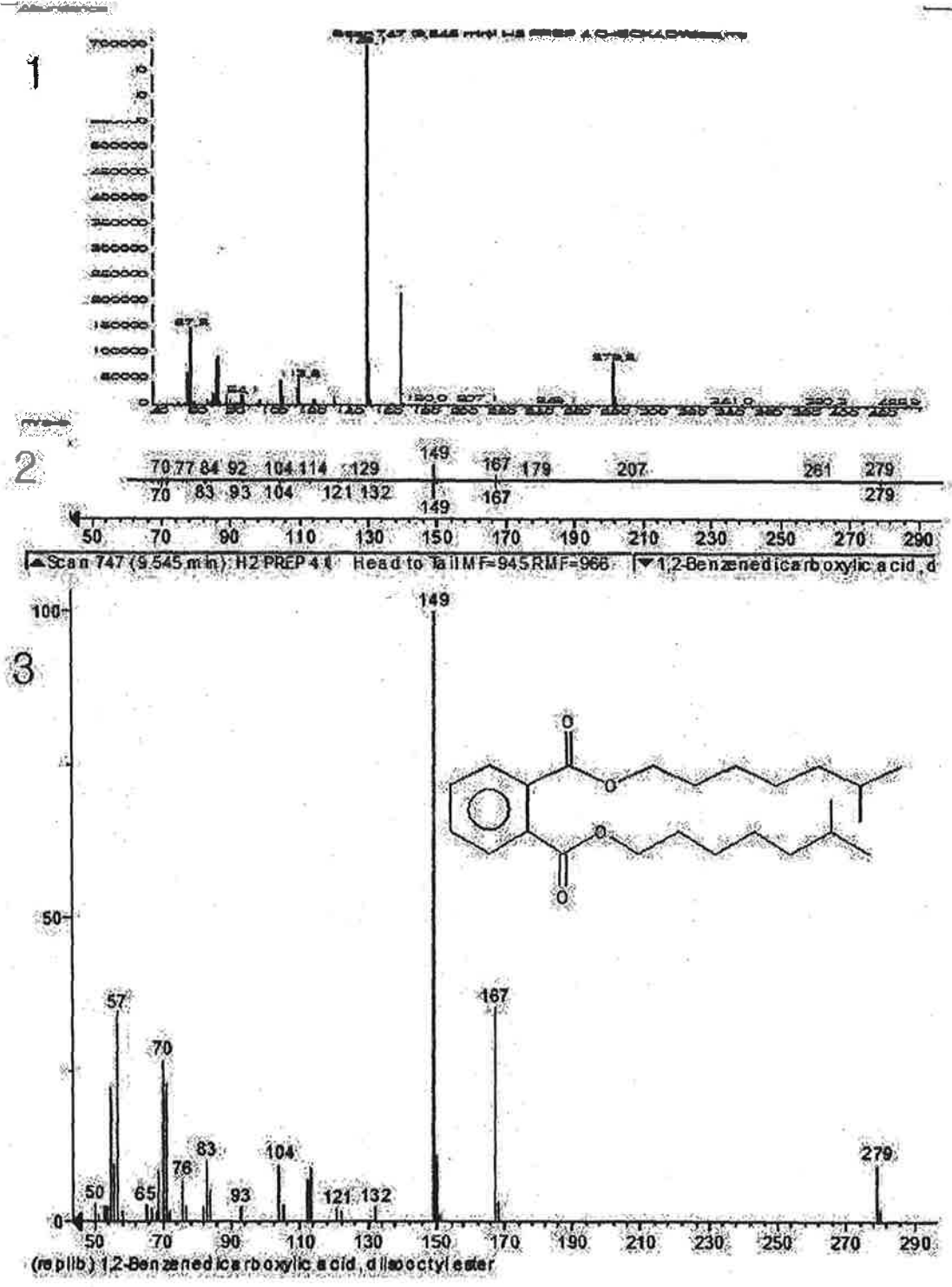


그림 49. Fraction H_{2-P4}의 MS spectra
 1) fraction H_{2-P4}의 MS spectrum, 2) 1번과 3번의 비교,
 3) NIST standard database의 1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester MS spectra

PBM searching에 의한 fraction H_{2-P-8}은 Olean-18-en-28-oic acid, 3-oxo-, methyl ester와 95%의 유사성을 보였지만 NIST database에서 제공하는 첫 번째 화합물은 -20(29)-en-3-ol, acetate (3á)- 이었다(C₃₂H₅₂O₂, MW: 468). Match factor는 761, R-match factor는 768였고 이는 20.1%의 유사성을 나타내었다. Fraction H_{2-P-8}, H_{2-P-9} 그리고 H_{2-P-10}의 TIC의 retention time을 고려해 볼 때, 그리고 fraction H_{2-P-9}의 NIST database의 결과를 종합해 보았을 때, fraction H_{2-P-8}은 olean-12-en-28-oic acid, 3-oxo-, methyl ester (Compound 4, C₃₁H₄₈O₃, MW: 468.36)으로 추정된다.

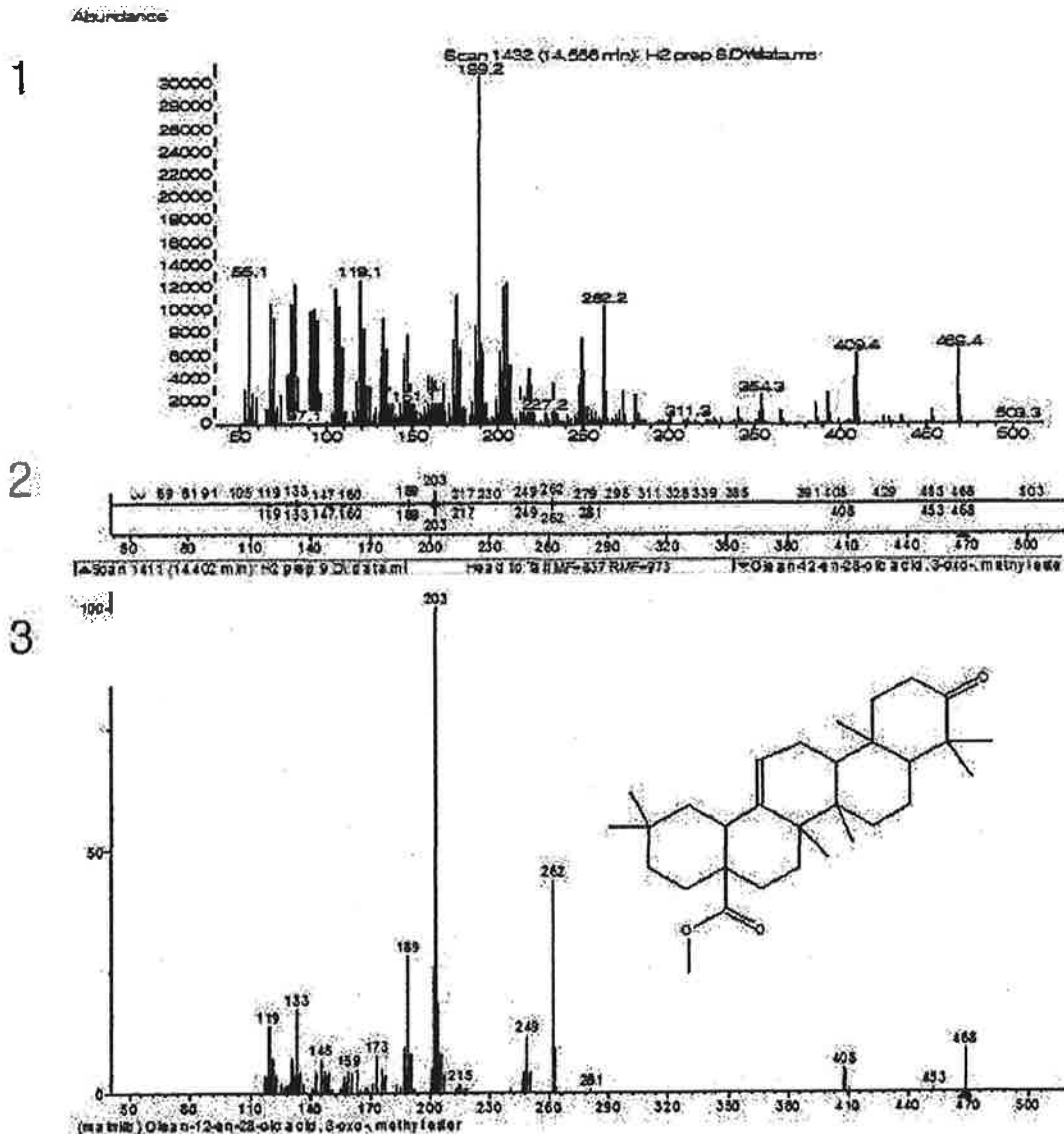


그림 50. Fraction H_{2-P-8}의 MS spectra

- 1) fraction H_{2-P-8}의 MS spectrum, 2) 1번과 3번의 비교,
- 3) NIST standard database의 olean-12-en-28-oic acid, 3-oxo-,methyl ester MS spectra

Fraction H₂P-9의 TIC는 retention time 14.175, 14.402 min에 2개의 peak을 보여준다. 이를 각각 H₂P-9-1, H₂P-9-2라고 명명했다. H₂P-9-1을 PBM을 통해 조사한 결과 olean-18-en-28-oic acid, 3-oxo-, methyl ester(C₃₁H₄₈O₃, MW: 468)과 99%의 유사성을 보였으며 NIST database를 통한 분석 결과도 같은 화합물로 유사성을 보였다. Match factor는 836, R-match factor는 935였으며 이는 76.2%의 유사성을 보였다. 그 결과 fraction H₂P-9-1은 olean-18-en-28-oic acid, 3-oxo-, methyl ester (Compound 5, C₃₁H₄₈O₃, MW: 468.36)로 추정되어진다.

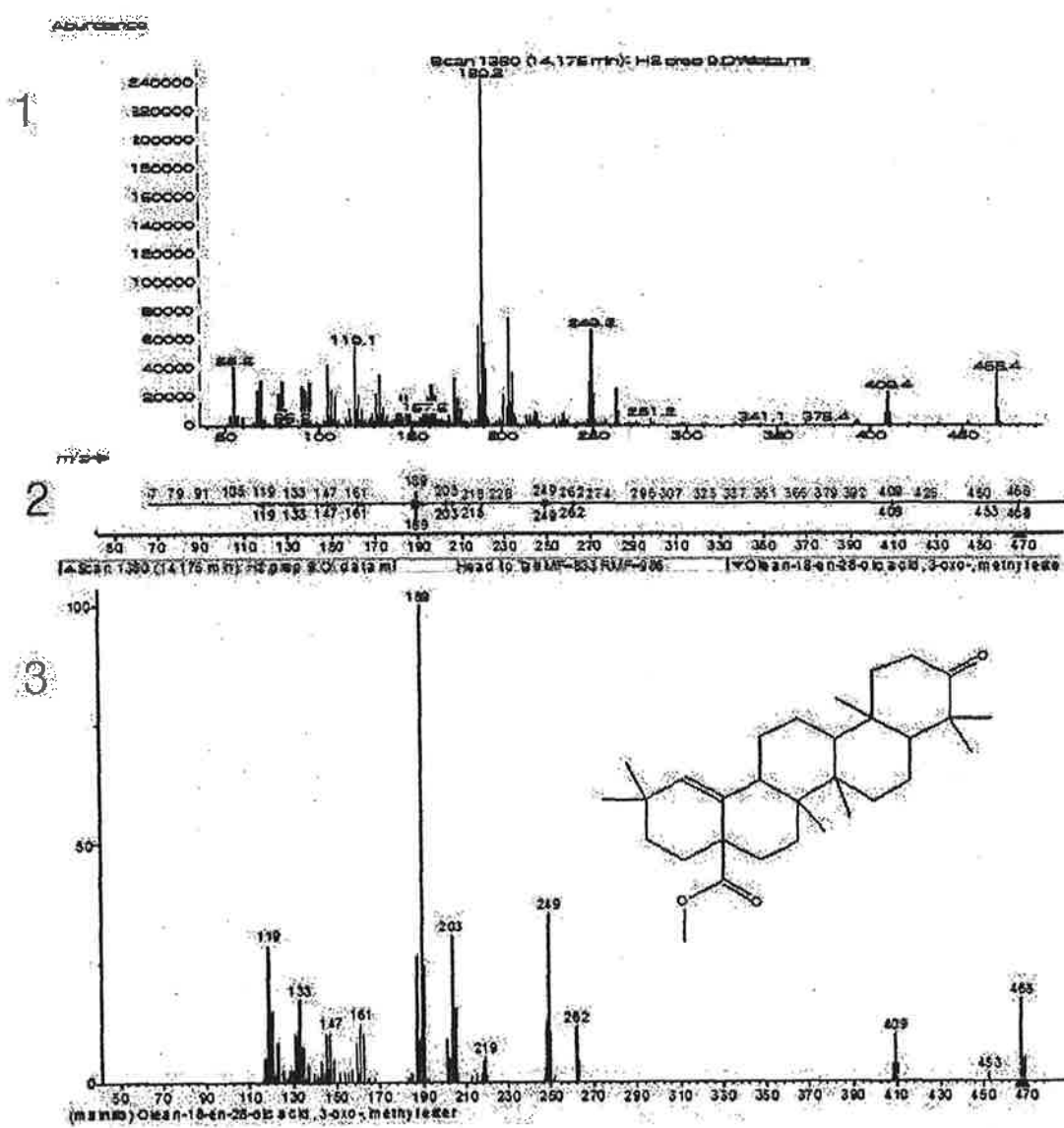


그림 51. Fraction H₂P-9의 MS spectra
 1) fraction H₂P-9 14.175 min의 MS spectrum, 2) 1번과 3번의 비교,
 3) NIST standard database의 olean-18-en-28-oic acid, 3-oxo-, methyl ester MS spectra

PBM 조사와 NIST database를 통한 fraction H_{2-P-9-2}는 Olean-12-en-28-oic acid, 3-oxo-, methyl ester(C₃₁H₄₈O₃, MW: 468)와 99%의 유사성을 보였다. Match factor는 807, R-match factor는 904였으며 58.3%의 유사성을 보였다. Fraction H_{2-P-9-2}는 olean-12-en-28-oic acid, 3-oxo-, methyl ester (Compound 4, C₃₁H₄₈O₃, MW: 468.36)으로 추정되어진다. Fraction H_{2-P-9-1}과 fraction H_{2-P-9-2}의 결과로 보아 fraction H_{2-P-9}는 compound 5가 주를 이루고, compound 4가 조금 혼합된 mixture로 구성되어 있음을 알 수 있었다. 이와 유사하게 fraction H_{2-P-10}도 compound 4와 compound 5의 mixture로 구성되어 있음을 확인할 수 있었다. PBM searching을 통한 fraction H_{2-P-10}의 두 화합물은 compound 4,5와 99%의 유사성을 보였고, NIST database를 통한 분석 결과 compound 4와 5의 match factor는 819, 914 그리고 R-match factor는 757, 919를 보였다. 이는 각각 60.4%와 53.1%의 유사성을 보였다. Fraction H_{2-P-14}는 PBM과 NIST를 통해 조사한 결과 매우 낮은 유사성을 보였으므로 다른 방법을 통한 확인이 요구 되어 졌다.

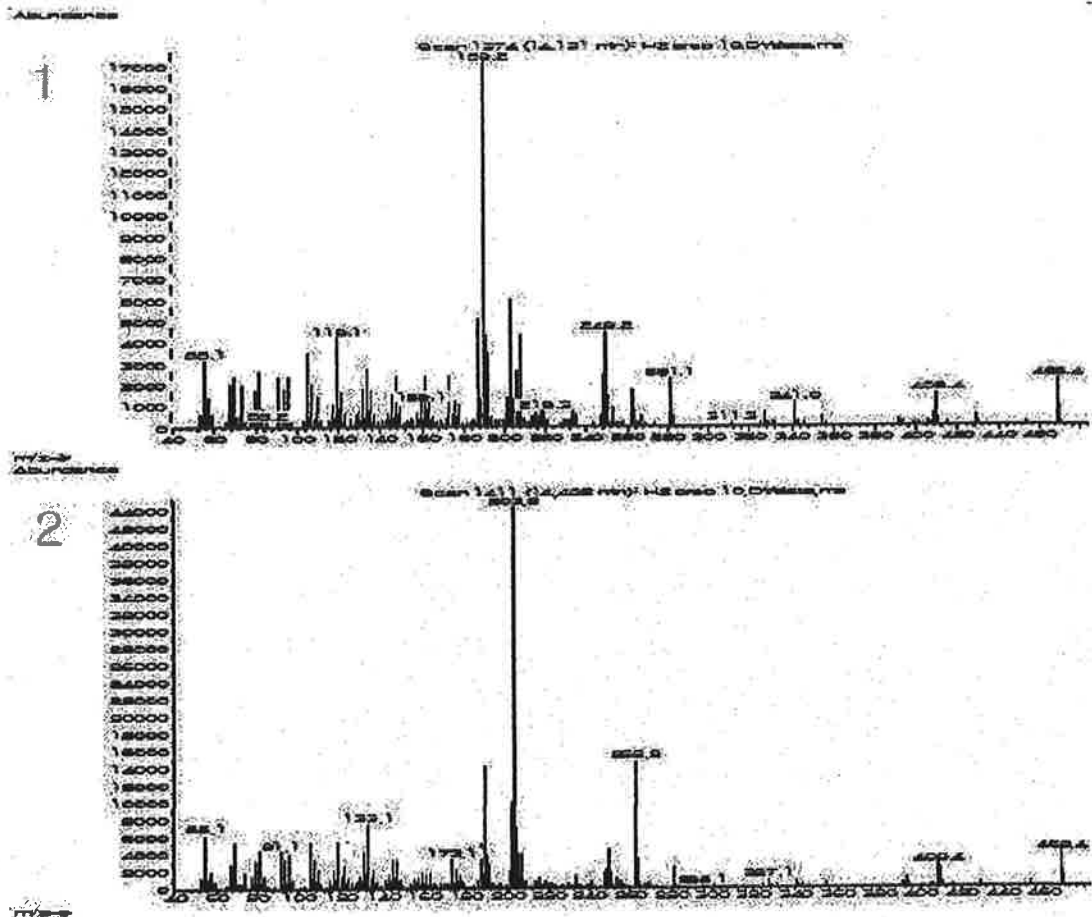


그림 52. Fraction H_{2-P-10}의 MS spectra

- 1) Fraction H_{2-P-10} 14.131min peak의 MS spectrum,
- 2) Fraction H_{2-P-10} 14.402min peak의 MS spectrum of fraction H_{2-P-10}.

(5) Fraction H₃의 분리

Fraction H₃은 -24℃에서 저장 후 갈색 침전물이 나타났다. 위쪽의 맑은 용매는 조심히 등근바닥플라스크에 옮겨진 뒤 농축시키고 7 g의 물질을 얻었다. 그 뒤 n-hexane과 acetonitrile을 이용하여 분배한 뒤 두 층을 TLC에 점적하였다. 전개용매로는 n-hexane:ethyl acetate (70:30, v/v)를 이용하였고, 염색제로 5% vanillin/H₂SO₄을 사용하였다. Plate는 spot이 선명해질 때 까지 105℃의 바람으로 건조시켰다. 그 결과 spot (a)는 n-hexane층을 대표하는 화합물이고, spot (b)는 acetonitrile 층을 대표하는 화합물로 나타났으며 이 두 화합물에 대한 연구는 앞으로 더 이루어져야 될 것이다.

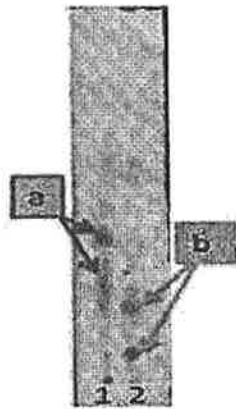


그림 53. Fraction H₆의 TLC

1) n-Hexane 층, 2) acetonitrile 층; a와 b는 두 층에서의 타겟물질

(6) Fraction H₈ and fraction H₉의 분리

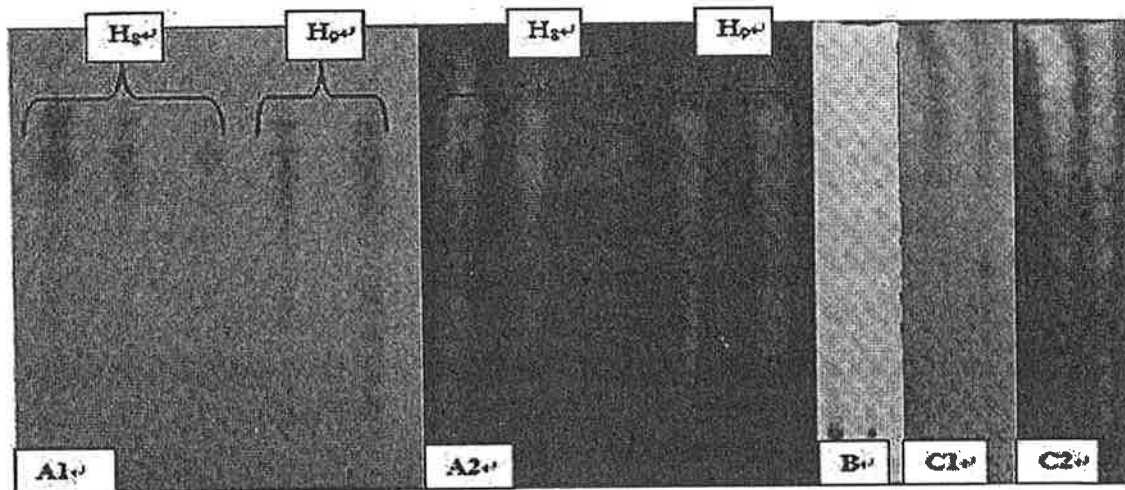


그림 54. Fraction H₈과 Fraction H₉의 TLC

A : EtOAc:MeOH (9:1) 1) daylight, 2) 365 nm; B : chloroform:acetone(75:25);

C : chloroform:MeOH:H₂O(7:2:0.1) 1) daylight, 2) 365 nm

Fraction H₈과 H₉에 대한 TLC 연구는 이 두 화합물이 매우 유사하고 복잡함을 보여주었다. 전개용매로 ethyle acetate:methanol (90:10, v/v), chloroform:acetone (75:25, v/v), chloroform:methanol: water (7:2:1, v/v/v), dichloromethane:ethyl acetate:methanol:water (53:27:18:2, v/v/v/v)를 사용했고, 10% H₂SO₄/ethanol을 염색제로 사용했다. Plate는 spot의 색이 선명해 질 때 까지 열이 가해졌고, spot이 선명해 진 뒤 UV lamp (365 nm)를 이용하여 관찰하였다.

(7) Fraction H₁₀의 분리

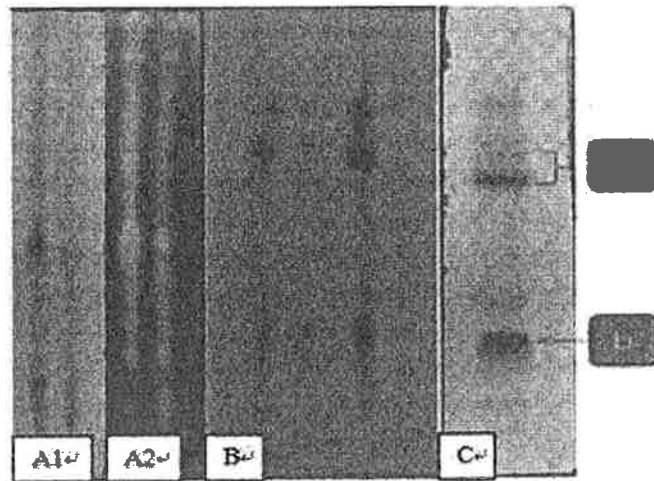


그림 55. 다양한 전개 용매에 따른 fraction H₁₀의 TLC

A : CHCl₃:MeOH:H₂O(7:2:0.1)에 의한 전개, 1) daylight, 2) 365 nm;

B : CHCl₃:EtOAc:MeOH:H₂O(15:40:22:10, <10 °C lower layer)에 의한 전개

C : CH₂Cl₂:EtOAc:MeOH:H₂O(47:23:29:3)에 의한 전개, a) 타겟그룹, b) 타겟 화합물.

Fraction H₁₀은 chloroform:methanol:water (7:2:0.1, v/v/v), dichloromethane:methanol (8:1, v/v), chloromethane:acetone (75:25, v/v), chloroform:ethyl acetate:methanol:water (15:40:22:10, v/v/v/v <10 °C lower layer), dichloromethane:ethyl acetate:methanol:water (53:27:18:2, v/v/v/v), dichloromethane:ethyl acetate:methanol:water (47:23:27:3, v/v/v/v)의 전개용매에 전개되었고 dichloromethane:ethyl acetate:methanol:water (47:23:27:3, v/v/v/v) mixture가 앞으로의 column chromatography를 위해 선택되어졌다. Fraction H₁₀은 농축후 3.3 g 이 얻어졌고 이것은 5 mL의 dichloromethane:ethyl acetate:methanol:water (47:23:27:3, v/v/v/v) mixture에 의해 재용해 되어진 뒤 silica(230~400 mesh, 4 cm×15.5 cm)로 충전된 유리컬럼에 로딩되었다. 900 mL의 dichloromethane:ethyl acetate:methanol:water (47:23:27:3, v/v/v/v) mixture로 용출 시켰고, 용출된 용매들은 각각 30 mL 씩 모아졌고, 총 27개의 fraction이 수집되어졌다. 모든 fraction은 TLC를 통해 검출되어졌다. 전개용매로는 dichloromethane:ethyl acetate:methanol : water (47:23:27:3, v/v/v/v) 이 사용되었고 염색제로 10% H₂SO₄/ethanol이 사용되었고 spot이 선명해 질 때까지 plate에 105 °C의 열을 가해주었다.

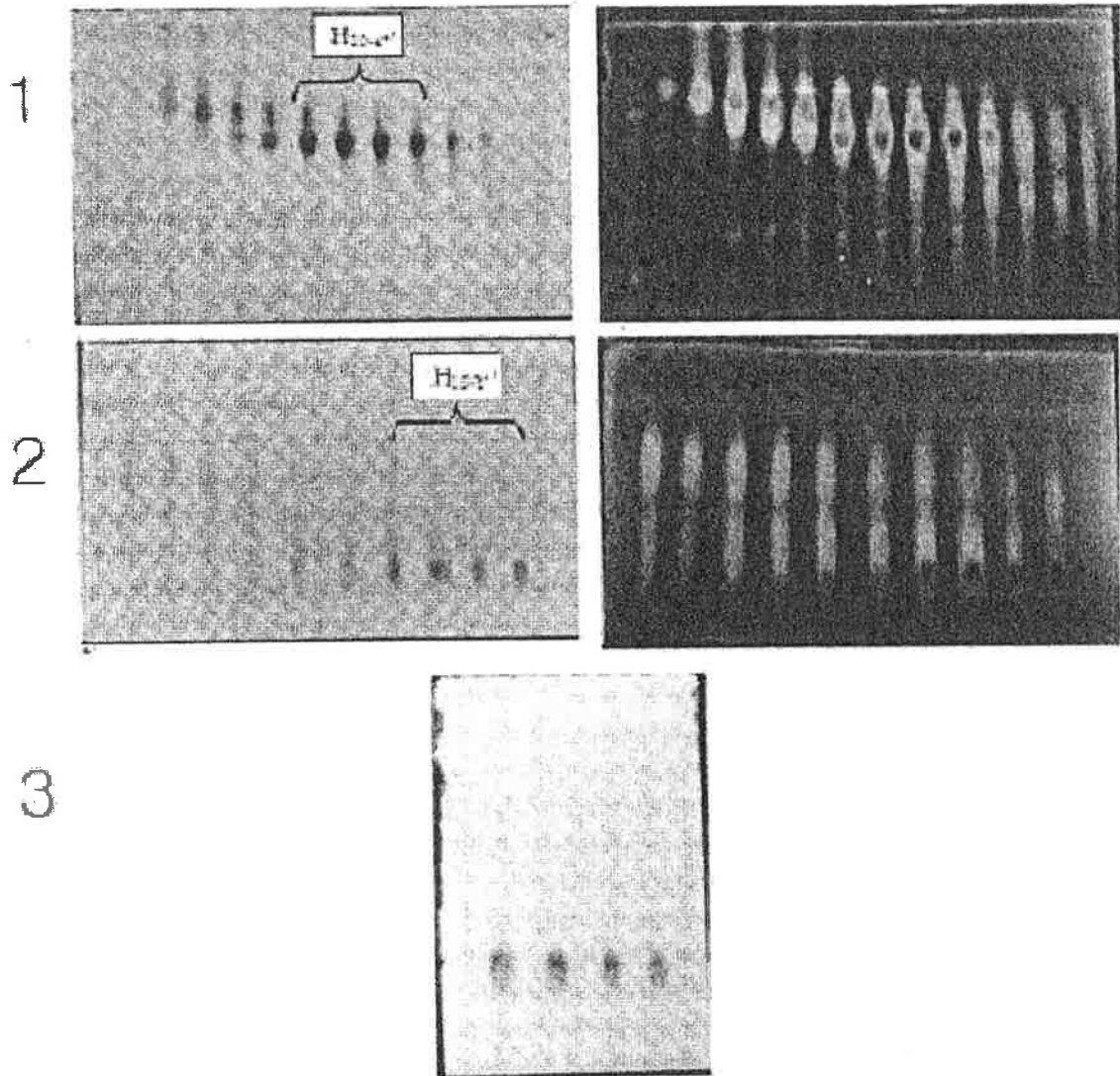


그림 56. Fraction H₁₀에서 분리된 모든 fraction의 TLC

1) Fraction 1~14 viewed under daylight and UV 365 nm, 2) Fraction 15~24 viewed under daylight and UV 365 nm, 3) Fraction 25~end viewed under daylight.

Fractions 7-10에서는 보라색 spot이 나타났는데 이 fraction들을 합하여 H_{10-a}라 하였고, fraction 21-27에서는 어두운 검은 녹색의 spot이 나타났는데 이들을 H_{10-b}라 하였다. Fraction H_{10-a}와 fraction H_{10-b}는 최적의 column chromatography 조건을 찾기 위해 여러 가지의 전개 용매들이 사용되었다. Chloroform:methanol, methanol:water, acetone:methanol, acetone:methanol:water, dichloromethane:ethyl acetate:methanol, dichloromethane:ethyl acetate:methanol:water 등의 전개용매에서 test 되었고, 최상의 조건으로 fraction H_{10-a}에서는 dichloromethane:ethyl acetate:methanol:water (53:27:18:2, v/v/v/v)이, fraction H_{10-b}에서는 acetone:methanol:water (8:1:1, v/v/v) 용매가 택해졌다.

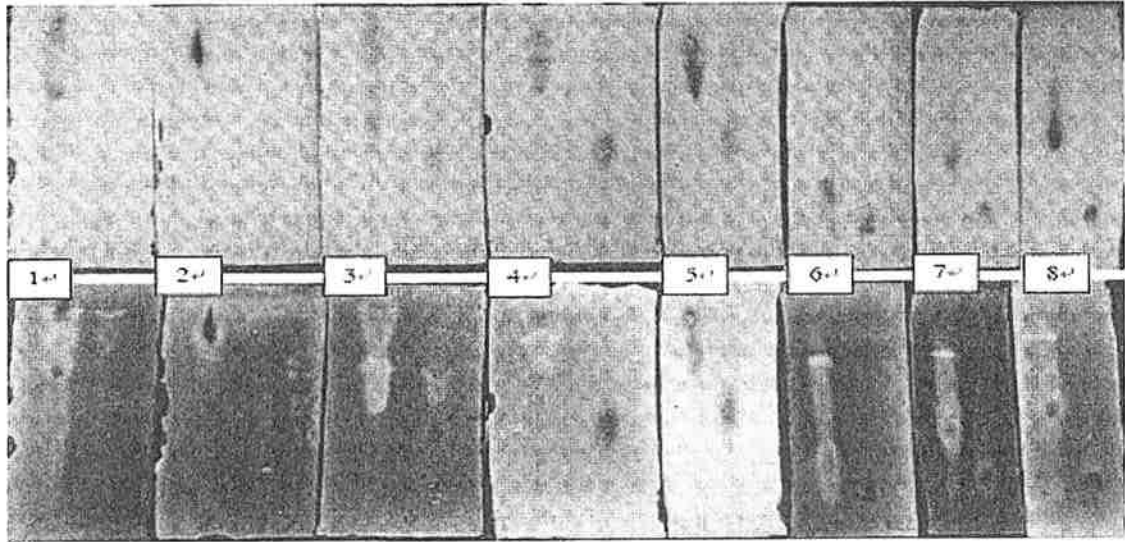


그림 57. 다양한 전개 용매에 따른 H_{10-a}과 H_{10-b}의 TLC

1) Me₂CO:MeOH(7:3), 2) Me₂CO:MeOH(3:7), 3) Me₂CO:H₂O(9:1), 4) Me₂CO:MeOH:H₂O (9:1:1), 5) Me₂CO:MeOH:H₂O(8:1:1), 6) CH₂Cl₂:EtOAc:MeOH(4:4:2), 7) CH₂Cl₂:EtOAc: MeOH:H₂O(4:4:2:0.2), 8) CH₂Cl₂:EtOAc:MeOH:H₂O(53:27:18:2);viewed under daylight (up), UV lamp 365 nm(down).

Fraction H_{10-b}는 농축된 뒤 0.727 g을 획득하였고, 그것은 methanol에 재용해 된 뒤 silica column(silica gel, 230~400 mesh, 2.5 cm×19cm)에 로딩되었다. 400 mL의 acetone:methanol:water (8:1:1, v/v/v)로 용출 시킨 뒤 처음 70 mL은 버리고 그 뒤, 15 mL마다 수집하여 총 21개의 fraction이 수집되었다. 모든 fraction은 acetone:methanol:water (8:1:1, v/v/v)를 전개용매로 사용한 TLC에 점적하여 분석한 결과 target compound는 fraction 6-9에 농축되어 있음을 확인할 수 있었다.

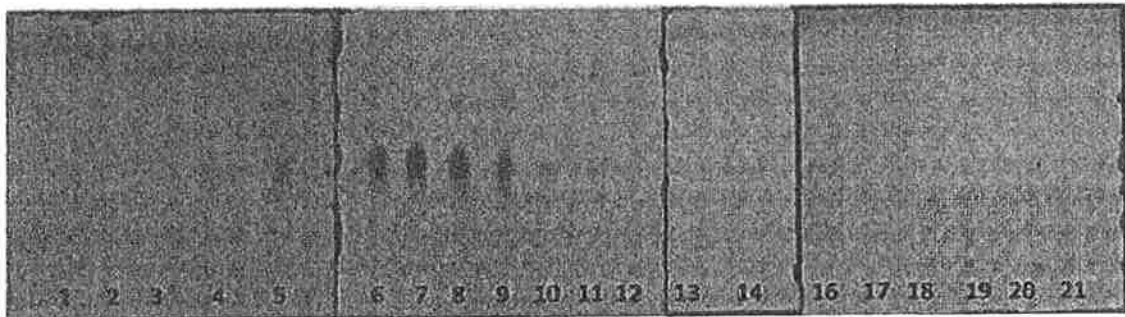


그림 58. Fraction H_{10-b}로부터 분리된 모든 fraction의 TLC

Fraction 6-9는 합쳐진 뒤 농축되고, methanol과 물 mixture로 재용해 된 뒤 acetonitrile:water (8:2, v/v)로 conditioning된 silica column(silica, 230~400mesh, 2.6 cm

×19 cm)에 로딩 되었다. 600 mL의 acetonitrile:water (8:2, v/v)은 용출용매로 사용되었고, 10 mL마다 받아 총 20개의 fraction을 획득하였다. 획득되어진 fraction은 TLC에 점적하였고, fraction 9-20번까지는 선명한 색을 보였다.

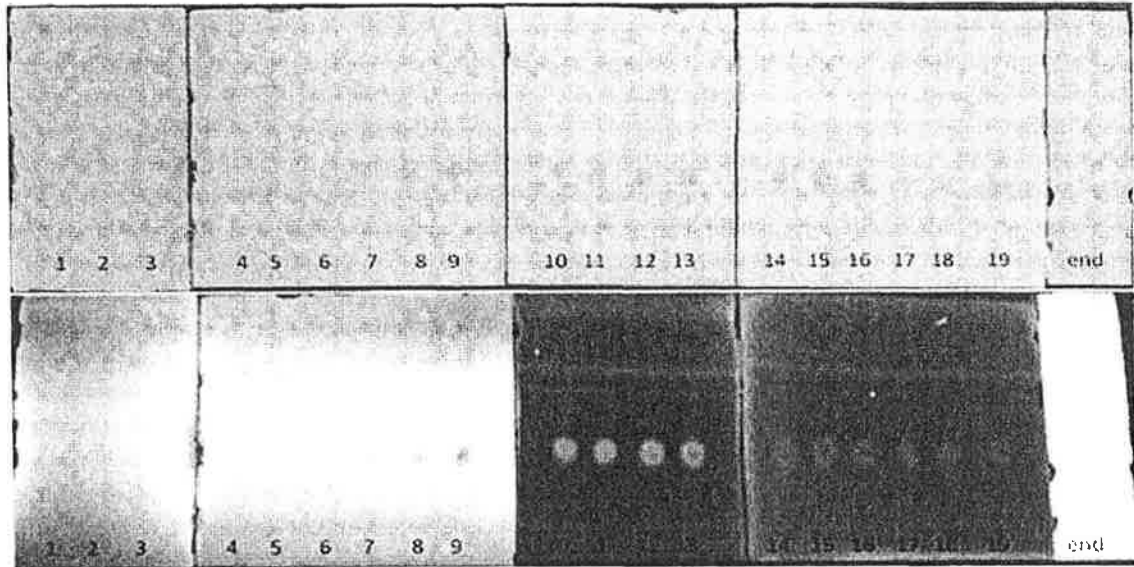


그림 59. Fraction H_{10-b-(6-9)}로부터 분리된 모든 fraction의 TLC

여기서 획득되어진 fraction 16-20은 합쳐진 뒤 농축되어 170.4 mg을 얻을 수 있었다 (Unknown compound 6).

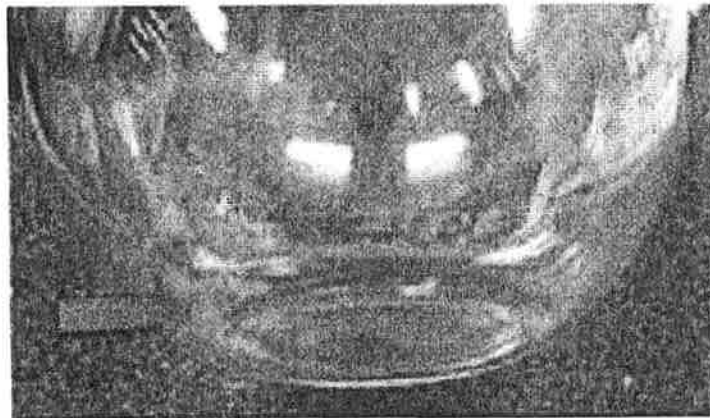


그림 60. Fraction H_{10-b-(6-9)-(16-20)}로부터 얻어진 물질

Fraction 15는 fraction 16-20과 같은 화합물을 포함하고 있으므로, 이것은 농축되어진 뒤 5 % methanol:water으로 재용해 된 후 HPLC-MS (LCMS-2010 Evolution, Shimadzu)로 분석되었다.

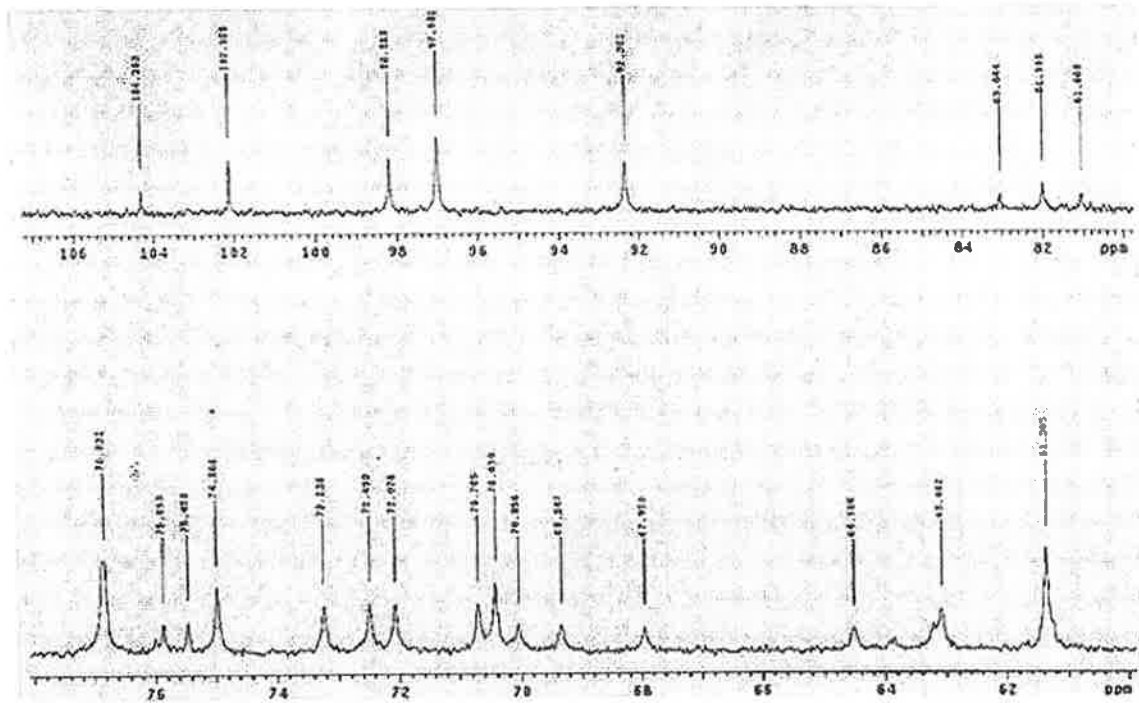


그림 63. Compound 6의 ^{13}C -NMR spectra-2

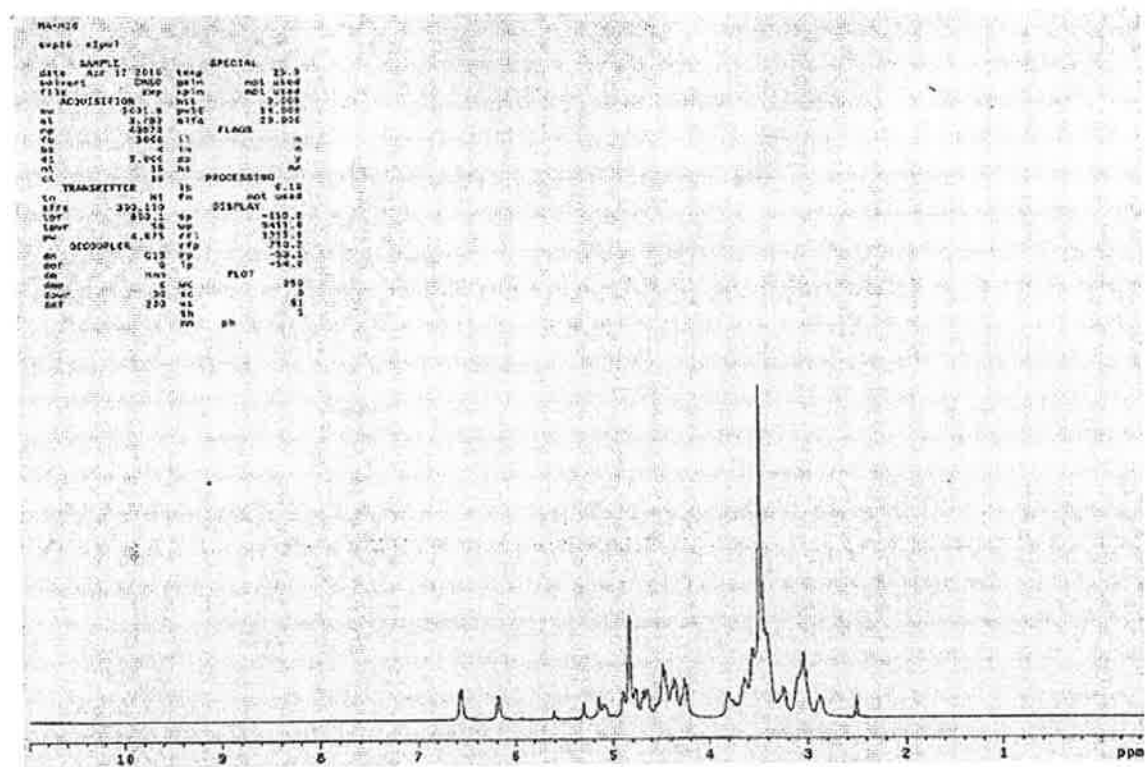


그림 64. Compound 6의 ^{13}C -NMR spectra-3

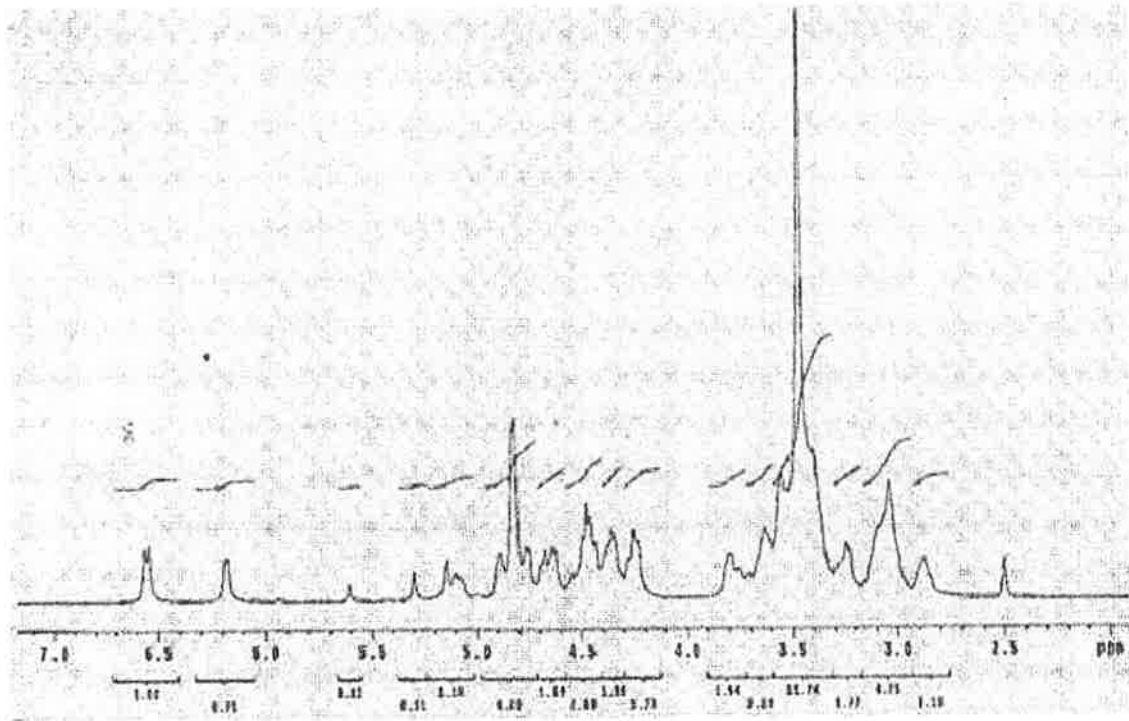


그림 65. Compound 6의 ^{13}C -NMR spectra-4

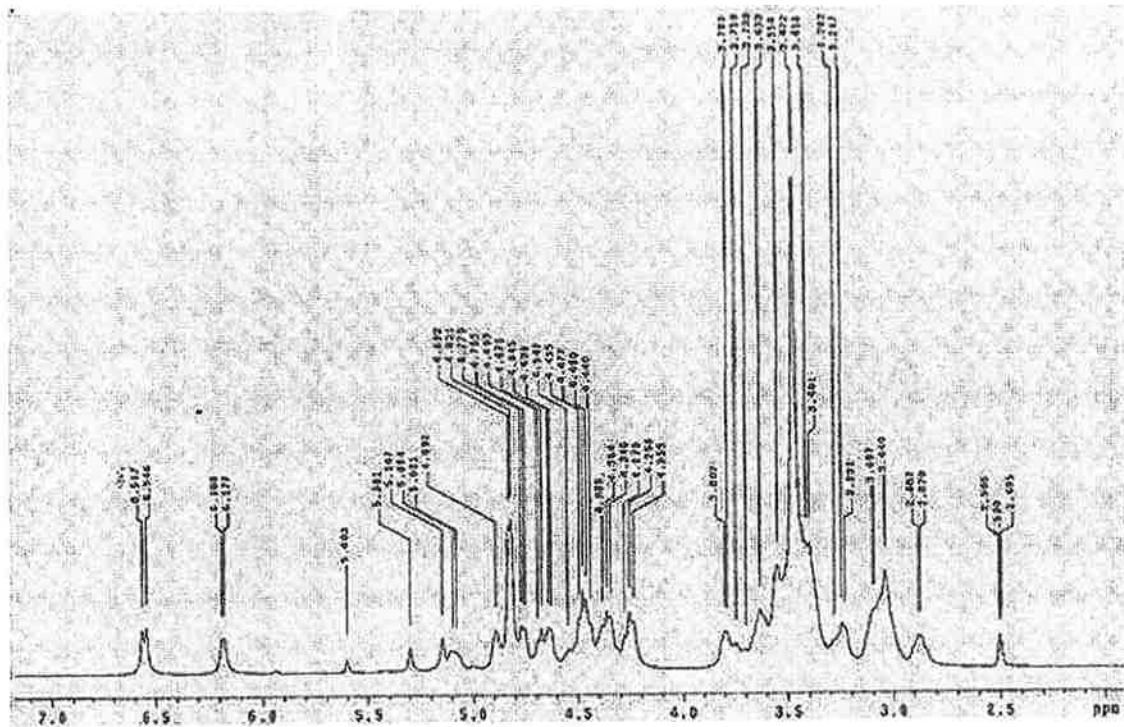


그림 66. Compound 6의 ^{13}C -NMR spectra-5

마. 살충물질에 대한 bioassay

점박이용애의 약제독성시험 방법으로 leaf disk법을 사용하였다. 강낭콩엽을 2×2 cm로 잘라 물에 적신 탈지면이 깔린 샐레에 놓고 그위에 점박이용애 암컷성충을 30마리씩 가는 붓으로 옮겨 놓았다. 30분정도 정착을 시킨 다음 추출물별로 샐레에서 25 cm 거리에서 hand spray로 엽편이 충분히 적셔질 정도로 5초동안 스프레이 하고 음건시켰다. 처리한 샐레는 상온에 보관하여 1, 3, 5일 후에 살비율을 조사하였다. 생사판별은 해부현미경하에서 붓으로 충체를 접촉하여 몸길이 정도를 이동하지 못하는 개체는 죽은 것으로 간주하였다.

목화진딧물은 유묘점정법을 사용하였는데 고추 묘에 미리 진딧물을 접종하여 정착된 유묘 잎의 진딧물수를 조사한 후 3반복으로 추출물을 hand spray로 살포하고 1, 3, 5일 후 살충율을 조사하였다.

벼멸구의 독성 시험은 벼 3주를 포트에 심어 벼멸구를 접종하여 벼멸구수를 조사한 후 3반복으로 추출물을 hand spray로 살포하고 1, 3, 5일 후 살충율을 조사하였다.

각 시료의 약량이 적어 200배로 희석하여 살포하였다.

표 36. 멸구슬추출 분획에 의한 점박이용애의 살충율

자재명	처리전 마리수	살충율(%)		
		1일	3일	5일
Compound 1 Melianone(CH ₂ Cl ₂) Melia 50 mg azedarach	95	17.9	26.3	33.7
Compound 4 Combaussolvedin Hexane 16 mg	143	18.9	23.8	36.4
Compound dissavere 6 H ₂ O 20 mg	140	12.1	27.1	32.9

멸구슬 추출 분획에 의한 점박이용애의 살충효과는 헥산추출물에서 5일째에 36.4%로 나타났으나 그 외의 추출물도 32.9 ~ 33.7%로 살충효과는 높지 않았다. 목화진딧물 역시 살포 1일후에 약간의 살충효과를 보였으나 이후 산자수의 증가로 인해 살충효과가 나타나지 않았다. 벼멸구는 헥산 추출물에서 5일째에 40%의 살충율을 보이고 물과 혼합된 추출물 역시 38.7%의 살충율을 보였다.

분리되어진 3가지 compound(compound 1,4,6)의 bioassay 결과 벼멸구점박이에 대한 살충율은 큰 차이점을 보이지 않았다. Wang, l(1993)의 보고에서도 cabbage worm (*Pierisrapae*L.)에 대한 melianone의 살충활성이 위 실험과 비슷한 결과를 보임을 알 수 있었다. Melianone, melianol, meliandiol 등은 cabbage worm의 섭식활동을 저해함을 보여 주었으며, M.Defagó (2006)에 의한 또 다른 연구는 *Xanthogaleruca luteola*에 있는 *Melia azedarach*의 antifeedant activities로 인해 해충이 굶어서 죽게됨을 보여주었다. *Melia azedarach*에서 나온 여러 물질들의 살충활성과 antifeedant는 여러 논문에서 보고된 바

있다(María et al., Wang et al., 2005; Huang et al., 1995; Isman et al., 1990; Nakatani et al., 1995). 그러므로 분리되어진 compound는 pest control programs에 이용하기에 충분히 잠재적인 가치가 있다고 판단되어진다.

표 37. 멀구슬추출 분획에 의한 목화진딧물의 살충율

자재명	처리전 마리수	살충율(%)		
		1일	3일	5일
Compound 1 Melianone(CH ₂ Cl ₂) Melia 50 mg azedarach	123	1.6	-	-
Compound 4 Combaussolvedin Hexane 16 mg	181	12.7	-	-
Compound dissavere 6 H ₂ O 20 mg	133	10.5	-	-

표 38. 멀구슬추출 분획에 의한 벼멸구의 살충율

자재명	처리전 마리수	살충율(%)		
		1일	3일	5일
Compound 1 Melianone(CH ₂ Cl ₂) Melia 50 mg azedarach	30	16.7	26.7	26.7
Compound 4 Combaussolvedin Hexane 16 mg	30	26.7	36.7	40.0
Compound dissavere 6 H ₂ O 20 mg	31	22.6	38.7	38.7

4. 결과요약

멀구슬나무의 성분으로 알려진 *Melia azedarach* Linn (Meliaceae)는 빠르게 자라는 낙엽성 나무로써 southwestern Asia와 northwestern India등 따뜻한 기온의 세계 여러곳에서 재배되고 있다. *Melia azedarach* 에 있는 살충물질은 오랜 기간동안 전세계 적으로 연구되고 있으며, 멀구슬 나무의 껍질이나 잎 등은 민간의약품으로도 사용되고 있는 실정이다. 이 연구에서는 멀구슬 나무의 열매, 잎, 껍질, 잎 줄기, 열매 줄기에서 TLC를 이용하여 살충효율이 높은 물질을 추출하여 생물 검정을 실시한 뒤, 살충효율이 높은 분획에서 *Melia azedarach*의 활성물질의 구조를 밝히는 것과 여러 계통의 제충국에서의 살충활성물질인 pyrethrins의 함량을 확인해보는 실험을 실행하였다. 멀구슬은 3.5 L of 70% EtOH/H₂O로 3번 추출하여 5 kg의 고체를 획득하였고, 추출물은 농축되어 ethanol 제거 후, 수용액층은

n-hexane, dichloromethane, ethyl acetate and n-butanol 에 의해 분배되었다. n-Hexane과 dichloromethane에서 추출된 추출물들은 silica column chromatography를 통해 각각 12개의 fraction과 11개의 fraction을 얻었다. 모든 fraction은 *Nilaparvata lugens* and *Tetranychusurticae* 에 대한 살충활성 test를 거쳤고, fractions H₂,H₃,H₈,H₉,H₁₀,H₁₁,H₁₂, C₂₋₁,C₂₋₂,andC₂₋₃는 특히 높은 살충활성을 보였다. Fraction C₂₋₂에서는 column chromatography와, preparative-HPLC 그리고 재결정을 통해 2가지의 compound를 발견하였고, UV, IR, LC-MS, ¹H-NMR 그리고 ¹³C-NMR에 의한 분석 결과 compound 1(Compound 1, C₃₀H₄₆O₄,MW:470.34)은 melianone, compound 2는 melianodiol(Compound 2, C₃₀H₄₈O₅,MW:488.70)로 추정되어진다. Fraction H₂에서는 column chromatography와 preparative-HPLC를 이용하여 살충활성 물질을 분리했고, GC-MS를 이용하여 확인하였다. 그 결과 1, 2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester (Compound 3, C₂₄H₃₈O₄, MW:390.28), olean-12-en-28-oicacid, 3-oxo-, methylester (Compound 4, C₃₁H₄₈O₃, MW:468.36) and olean-18-en-28-oicacid,3-oxo-,methylester (Compound 5, C₃₁H₄₈O₃, MW:468.36), 총 3개의 compound가 추정되어졌다. Fraction H₁₀에서도 column chromatography를 통하여 saccharide (Compound 6)를 분리하였다. 제충국은 국내 친환경 재배농가가 재배 이용하고 있는 3개 계통과 일본 등 국외에서 판매 또는 재배되고 있는 4개 계통, 총 7개 계통에 대하여 pyrethrins 함유량을 조사했으며, 그 중 3개 계통에서 1%에 가까운 함유량을 보였다. 멀구슬에서 분리 되어진 3가지 compound(compound 1,4,6)의 bioassay 결과 이들 추출물에 대한 살충효과는 전반적으로 낮게 나타났지만 분리된 compound를 통한 잠재적 효과는 연구할만한 가치가 있다고 생각되어지며, 제충국에서 높은 pyrethrin 함유량을 지닌 계통에 대해서는 pyrethrin 추출과 상용화에 대한 활발한 연구가 필요하다고 여겨진다.

3절. 제충국, 딸구슬 추출물의 주요 해충의 살충활성 검정

1. 서언

벼의 주요해충은 벼멸구와 흑명나방, 벼물바구미, 벼줄기굴파리, 애멸구, 흰등멸구 등으로 친환경 인증면적은 96,159ha이며, 배추의 주요 해충은 배추좀나방, 파밤나방, 배추흰나비 등이다. 딸기는 시설하우스에서 6,356 ha를 재배하고 있으며 그중에서 709 ha를 전남에서 재배하고 있는 겨울철 주요 작물중 하나이다(농림수산식품국, 2008).

벼멸구는 우리나라에서 월동하지 못하고 매년 중국 남부로부터 비래해 온다. 대체로 6~7월 사이에 저기압이 통과할 때 많은 양이 유아등에 채집되고 있으므로, 남서기류를 타고 이동해 오는 것으로 추정하고 있다(Dyck and Thomas, 1979). 벼멸구는 벼를 흡즙하여 완전회 고사시키는 피해뿐 아니라 바이러스 병까지 옮기는 것으로 알려져 있다(Ling, 1972). 벼물바구미는 우리나라에서 1988년 7월 경남 하동에서 처음으로 발견된 이후 같은 해에 시흥, 동해, 울주 등에서도 발생이 보고되었고 지금은 거의 전국적으로 발생하고 있다(Uhm et al., 1989). 월동처에서 겨울을 보낸 벼물바구미 성충은 4월 하순부터 활동을 시작하여 성충은 잎의 엽육을 갉아먹고 유충은 뿌리를 갉아먹어 분얼구가 적어지고 이삭수도 줄어들어 벼의 수량에 큰 지장을 주게 된다(Kim et al., 1990).

배추좀나방(*Plutella xylostella*)은 십자화과 작물에 대해 피해를 주는 해충으로 이른 봄부터 가을에 걸쳐 잎 면에 밝은 녹색의 작은 유충이 가해를 하여 불규칙한 구멍이 생긴다. 우리나라에서는 년 10-12세대를 경과하는 해충으로 이러한 세대 가운데 주로 성충, 유충, 번데기를 볼 수 있고, 개체수가 많은 것은 5~6월과 10~11월경이며, 여름철에는 개체수가 격감한다(Kim and Lee, 1991; Song, 1992).

딸기에는 90여종의 해충 발생이 보고되어 있으며(Alford, 1984), 그중 국내에서는 점박이용애와 목화진딧물의 발생과 피해가 높다(이 등, 2008b). 시설재배 딸기 포장은 야간 최저 온도 5℃와 주간 20℃를 유지하여 점박이용애가 휴면을 하지 않고 지속적으로 증가하게 되며(김 등 2001), 점박이용애는 재배 초기인 10월부터 발생하기 시작하여 2월 상순에는 심할 경우 96%의 피해엽육을 보이는(김 등, 2001) 딸기의 주요 해충이다. 특히 점박이용애는 세대가 짧고 산란수가 많기 때문에(Krisp 등, 1998) 방치하여 두면 딸기가 고사할 수 있기 때문에 유묘 때부터 방제를 해야 한다.

해충 천적중에 칠레이리용애는 식식성 용애류를 방제하는데 유용하게 사용할 수 있는 천적으로서(van Lenteren and Woets, 1988; Janssen and Sabelis, 1992; Kim et al., 2003), 딸기, 신선초, 제라니움, 시설 가지 등에서 점박이용애, *Tetranychus cinnabarinus*, 차용애의 밀도 억제효과를 확인한바 있다(문 등, 2006; Yangziqi et al., 1990, Opit et al., 2004, 김 등 1999). 그러나 칠레이리용애 방사에 의한 생물적 방제 만으로 점박이용애의 밀도 억제가 빠르게 이루어지지 않아 화학적인 방제와의 병행이 효과적이다(Heinz, 1998). 특히 천적 단독만으로는 해충 방제가 제대로 이루어지지 않을 경우 선택적 살충제를 사용하여(van Lenteren and Woets, 1988) 종합관리방안을 모색하기도 한다(안 등, 2004). 유기배, 딸기, 배추 재배 농가는 화학적인 선택성 약제를 사용할 수 없으므로 친환경 유기농자재 목록

공시에 의해 공시된 자재(대통령령 제19964호, 농림부령 제1555호) 등을 사용하고 있다.

식물추출물은 다양한 생물활성을 함유하고 있으면서(Wink, 1993), 포유류인 인축에는 해가 거의 없기 때문에 친환경 농업에서는 새로운 해충방제 대체 자재로 인식되고 있다(Anarson et al., 1989). 멀구슬은 Meliaceae과인데 Rutaceae과와 함께 limonoid기의 azadirachtin과 다른 terpenoids를 함유하며 이들은 몇 가지의 곤충 중에 잠재성이 있는 생장억제제이다(Prakash and Rao, 1997). Pyrethroid 화합물은 식물유래 살충제로서 가장 성공적으로 이용되어 왔다(Elliott et al., 1978). 제충국의 주요 성분은 pyrethrin I, II, cinerin I, II, jasmolin I, II으로(Head, 1966), pyrethrin:cinerin:jasmolin이 10:3:1비율로 이루어져 있다(Crombie, 1995). 이들 식물추출물에 대한 해충의 독성 시험은 많이 이루어 졌으나(Kim et al., 2005), 추출물을 원료로 한 유기목록 자재들의 천적에 미치는 영향 평가가 미흡하여 김 등(2000)에 의해 점박이용애와 긴털이리용애에 대한 영향 평가, 소형 포장에서의 여러 가지 친환경 자재들의 칠레이리용애를 비롯한 무당벌레, 온실가루이좀벌, 굴파리좀벌 등에 대한 영향 평가(이 등, 2008a) 를 비롯한 실내조건에서 친환경 농자재 63개 품목에 대한 직접접촉과 잔효접촉에 의한 시험(강 등, 2007) 등이 이루어지고 있는 실정이다. 따라서 본 시험은 벼, 배추, 딸기 유기재배 농가에서 주요해충을 방제하기 위하여 제충국과 멀구슬 추출물 시제품의 살충활성을 검정하고 천적의 독성을 평가하여 천적 방사 시 효율적인 방제 방법을 알아보고자 실시하였다.

2. 재료 및 방법

가. 제충국 추출 부위별 살충효과 검정

제충국의 잎, 꽃, 전초를 대상으로 추출하였으며 대상해충은 벼멸구로서 살충율을 조사하였다. 추출방법은 시료를 분말분쇄기로 간 이후, 시료 300g을 취하여 3배량의 에탄올과 메탄올(MeOH)을 가하여 상온에서 24시간 동안 추출하였다. 추출액을 Cheese cloth를 이용하여 1차 여과한 후 whatman 여과지(# 1)를 이용하여 감압여과하였다. 여과액을 Rotary evaporator를 이용하여 45℃에서 감압농축, 조추출물을 얻은 후 물로 용해하여 1% Solution을 조제하여 생물검정(Bioassay)을 하였다. 이들 생물검정 결과 살충효과가 인정된 시료를 1차 선별하여 10 kg의 시료를 취하여 다시 MeOH 추출을 실시한 후 용매분획을 실시하였다.

나. 추출방법에 따른 살충효과 검정

멀구슬은 건조하여 메탄올로 용매추출 하였으며, 제충국은 생초 용매추출, 열수 추출을 하였는데 이때 사용한 양은 물 1리터에 제충국 100그램을 사용하여 물의 양이 400ml, 100ml 남을 때까지 가열하였다. 생물검정은 목화진딧물과 복숭아혹진딧물(*Myzus persicae*)은 유묘 검정법을 사용하였는데 벼 또는 딸기 묘에 미리 진딧물을 접종하여 유묘 잎에 정착된 진딧물을 조사한 후 3반복으로 각 추출물을 hand spray로 살포하고 1일, 3일, 5일 후에 살충율을 조사하였다. 벼멸구는 벼가 식재된 포트에 벼멸구를 50마리 이상씩 접종하여 시험하였으며, 3반복으로 추출물을 hand spray로 살포하고 1, 3, 5일 후 살충율을 조사하였다. 점박이용애의

약제독성시험 방법으로 leaf disk법을 사용하였다. 암컷성충의 살비효과는 강낭콩엽을 2×2cm로 잘라 물에 적신 탈지면이 깔린 샐레에 놓고 그위에 점박이용에 암컷성충을 30마리씩 가는 붓으로 옮겨 놓았다. 30분정도 정착을 시킨 다음 추출물별로 샐레에서 25cm 거리에서 hand spray로 엽편이 충분히 적셔질 정도로 5초동안 스프레이 하고 음건시켰다. 처리한 샐레는 상온에 보관하여 1, 3, 5일 후에 살비율을 조사하였다. 생사판별은 해부현미경 하에서 붓으로 충체를 접촉하여 몸길이 정도를 이동하지 못하는 개체는 죽은 것으로 간주하였다.

다. 추출물에 대한 해충의 기피효과

강낭콩 잎을 가운데 엽맥을 중심으로 2×2cm로 잘라 추출물 액에 5초간 침지한 이후 30분 정도 음건하여 점박이용에 성충 30마리를 잎에 올려놓고 1일, 2일, 3일 후에 추출액 처리면과 무처리면에 존재하는 성충의 개체수를 확인하였다. 벼멸구는 추출액을 벼에 살포한 다음 살포하지 않은 벼와 함께 하나의 포트에 심고 벼멸구를 접종하여 점박이용애와 마찬가지로 방법으로 개체수를 확인하였다. 기피지수는 Wheeler와 Isman(2001)의 방법을 사용하였다.

$$\text{기피지수} = \frac{(C - T)}{(C + T)} * 100$$

(C: 무처리 잎에 있는 해충의 생충수, T: 처리한 잎에 있는 해충의 생충수)

라. 살포방법에 따른 해충 살충 효과 검정

제충국과 멀구슬 추출물을 이용하여 만든 시제품을 살포하여 점박이용애의 방제효과를 알아보기 위해, 전남 담양군 봉산면 박상오 유기재배 농가 포장을 사용하였다. 딸기 육보를 2007년 11월 5일 비닐하우스(8.2×80m=656m²) 3개 동에 정식하였다. 목화진딧물 방제를 위한 시제품 살포횟수는 각각 제충국+멀구슬, 멀구슬+제충국(2회 살포), 제충국+멀구슬+제충국, 제충국+제충국+멀구슬, 멀구슬+제충국+멀구슬, 멀구슬+멀구슬+제충국(3회 살포)을 1주간격으로 살포하였다. 시험구는 2008년 1월 24일에 난괴법 3반복으로 21개의 시험구를 작성하였으며(2×11m=22m²), 살포 1, 8, 15, 22, 30일 후에 밀도를 조사하였다. 진딧물 밀도는 딸기 잎 50개를 반복별로 채취하여 아이스박스에 보관하여 실험실에 가져온 후 해부현미경(10×)하에서 살아있는 성충 및 약충 수를 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 제충국 추출부위별 살충효과 검정

제충국의 추출 부위별 벼멸구 살충효과를 보면 건조한 꽃에서 5일째에 78.5%의 높은 살충율을 나타내었다. 전초를 사용한 경우도 69.4% 였으며 생초 꽃에서도 62.1%였다. 그러나 잎만을 가지고 사용한 경우 살충효과가 급격히 떨어져 42.2%에 불과하였다. 제충국을 이용한 해충방제용 생물농약을 만드는 경우 꽃만 가지고 사용하면 좋겠으나 꽃의 양이 많지 않기 때문에 가급적 전초를 가지고 사용하여야 할 것으로 보인다.

표 39. 제충국 추출 부위별 벼멸구 살충효과

추출부위	처리전	살충율(%)		
		1일	3일	5일
전초	237.7	31.9	51.2	69.4
꽃(건조)	357.0	47.4	59.1	78.5
꽃(생초)	157.0	22.8	33.3	62.1
잎	258.0	29.2	32.5	42.2

멸구슬과 제충국을 용매로 추출한 경우 벼멸구의 살충효과는 78.2%와 66.4%였다. 제충국을 열수로 추출하여 40% 농축한 경우 72.6%의 살충율을 보이기 때문에 가능하면 농축해서 사용하면 살충효과를 높일 수 있을 것으로 판단된다. 점박이용애에서도 열수로 추출하여 40% 농축한 경우 77.2%의 살충율을 나타내어 벼멸구와 비슷하게 나타났는데 생초를 바로 용매에 추출한 경우에는 벼멸구와 마찬가지로 효과가 떨어지기 때문에 가능하면 그늘에서 건조시켜 사용하는 것이 효과적일 것으로 판단되었다.

표 40. 벼멸구에 대한 제충국, 멸구슬 추출물 살충효과

종류	처리전 밀도	살비율(%)		
		1일	2일	3일
멸구슬 에탄올	63.0	25.3	45.5	78.2
제충국 에탄올	53.1	14.2	26.2	66.4
제충국(열수10%)	36.7	18.7	26.9	66.7
제충국(열수40%)	44.3	11.5	57.5	72.6

표 41. 점박이용애에 대한 제충국, 멸구슬 추출물 살비효과

종류	처리전 밀도	살비율(%)		
		1일	2일	3일
멸구슬 에탄올	58.0	34.8	47.5	56.1
제충국 에탄올	41.3	31.8	48.6	56.9
제충국(열수10%)	34.0	24.5	35.4	67.2
제충국(열수40%)	29.7	39.8	47.0	77.2

나. 추출 방법에 따른 살충효과 검증

멸구슬 분획별로 점박이용애의 부화율을 보면 에칠아세테이트와 수층 분획 추출물에서 9.8%로 가장 낮게 나타났으며 부탄올분획 추출물에서는 60.7%로 높아 효과가 거의 없었다.

표 42. 멀구슬 분획별 점박이용애 부화율

분 획	부 화 율(%)		
	3일후	5일후	7일후
30% Ethanol	0.0	1.7	18.3
hexane	0.0	1.8	24.3
CHCl ₃	0.0	28.5	49.6
EtoAc	0.0	1.4	9.8
H ₂ O	0.0	2.9	10.8
BuOH	0.0	51.0	60.7
무처리	2.6	70.8	96.8

또한 분획별로 점박이용애 산란수를 보면 무처리의 경우 3일 동안 매일 15.6~18.2개씩 산란하였는데 반해 수충은 0.4~2.0개, 헥산충이 1.8~4.8개 산란하여 산란수가 가장 적었다. 이들 분획층에 의한 결과로 보아 점박이용애의 차세대의 밀도를 크게 감소시킴으로써 급격한 밀도 증가로 인해 피해가 심하고 방제가 어려운 점박이용애 등과 같은 해충을 방제 할 수 있을 것으로 판단되었다.

표 43. 멀구슬 분획별 점박이용애 산란수

분 획	산 란 수 (개)		
	1일	2일	3일
30% Ethanol	5.1	9.1	5.0
hexane	4.8	2.2	1.8
CHCl ₃	7.2	9.4	4.0
EtoAc	7.2	5.7	2.6
H ₂ O	0.8	2.0	0.4
BuOH	5.9	7.7	3.3
무처리	15.6	18.2	16.8

목화진딧물은 상사화와 천남성 단독살포의 살충효과가 낮아 평가하기가 어려웠지만 혼합 살포한 경우 단독살포보다 효과가 높게 나타나 상사화나 천남성이 상승효과를 내는 보조제로 상용가능 함을 알 수 있었다.

벼멀구 역시 진딧물과 마찬가지로 단독살포시 상사화와 천남성의 살충효과가 17%로 낮지만 멀구슬과 혼합한 경우 100%의 살충효과를 보여 멀구슬의 보조제로서 역할이 인정 되었다.

표 44. 멀구슬 추출물에 상사화와 천남성 혼합시 목화진딧물 방제효과

추출물 혼합	방 제 가			
	1DAT	3DAT	5DAT	
멀구슬 100%	87.1	90.6	94.6	
상사화 100%	6.8	-	-	
천남성 100%	8.5	-	-	
멀구슬	상사화5%	81.5	90.2	95.5
	상사화10%	90.5	98.7	99.8
	상사화20%	73.3	94.4	97.4
	천남성5%	87.2	96.5	98.7
	천남성10%	69.1	92.1	98.1
	천남성20%	74.3	90.2	97.5

표 45. 멀구슬 추출물에 상사화와 천남성 혼합시 벼멸구 방제효과

추출물 혼합	방 제 가			
	1DAT	3DAT	5DAT	
멀구슬 100%	90.9	94.4	94.4	
상사화 100%	17.6	17.9	17.9	
천남성 100%	16.7	17.7	17.7	
멀구슬	상사화5%	100.0	100.0	100.0
	상사화10%	99.0	100.0	100.0
	상사화20%	98.5	99.2	100.0
	천남성5%	100.0	100.0	100.0
	천남성10%	100.0	100.0	100.0
	천남성20%	99.3	100.0	100.0

벼멸구 방제를 위해 멀구슬과 제충국을 중심으로 시제품을 만들어 살충효과를 조사한 결과, 멀구슬은 95.4%, 제충국은 89.4%로 살충효과가 아주 높았다. 이들 제품에 창포를 혼합한 결과 멀구슬+창포에서는 97.0%로 효과가 약간 올라갔으나 제충국+창포에서는 오히려 효과가 떨어져 72.7%로 낮게 나타났다. 창포는 asarone, β -asarone을 가지고 있어 토마토의 선충방제에 효과가 있는 것으로 알려져 있기 때문에 앞으로 선충 방제를 위한 시험을 추가 하면 좋은 방제 자재가 될 것으로 판단하고 있다. 고삼은 모기와 바퀴에 대해 기피효과가 있으며 당근뿌리혹선충의 생육을 저해하는 것으로 알려져 있어 단독으로 시험하여 보았다. 고삼추출 시제품은 벼멸구에 대해 87.4%의 살충율을 나타내어 효과가 인정되었으며 앞으로 멀구슬과 제충국에 혼합하여 벼멸구의 생육저해뿐만 아니라 선충의 생육저해 여부도 시험할 필요가 있다.

표 46. 버벌구 방제를 위한 시제품의 살충효과

시제품명	처리전	살충율(%)		
		1일	3일	5일
벌구슬	45.6	58.3	68.7	95.4
제충국	58.7	46.8	59.7	89.4
고삼	37.7	64.7	76.9	87.4
제충국+창포	36.3	35.2	57.7	72.7
벌구슬+창포	34.3	60.0	81.3	97.0
창포	31.3	31.9	47.1	55.9
창포+계면활성제	31.3	21.6	48.1	64.4

점박이용애에 대해서 벌구슬, 제충국, 고삼, 벌구슬+창포 추출물에서 95% 이상의 살비효과를 보여 우수하였으나 제충국+창포는 역시 효과가 떨어져 77.9%에 불과하였다. 창포는 석창포 등 종류가 다양하기 때문에 추후 추출방법이나 종을 달리하여 시험할 필요가 있었다.

표 47. 점박이용애 방제를 위한 시제품의 살충효과

시제품명	처리전	살충율(%)		
		1일	3일	5일
벌구슬	135.7	89.7	95.7	99.8
제충국	168.4	88.7	95.7	98.8
고삼	63.0	85.2	91.4	96.9
제충국+창포	71.3	66.6	72.9	77.9
벌구슬+창포	101.0	90.9	95.5	97.6
창포	101.3	55.9	55.9	55.9
창포+계면활성제	74.0	43.3	49.0	57.4

벌구슬에 상승효과를 내기 위해 천남성과 상사화 추출물을 혼합하였을때 상사화 20%에 벌구슬 80%가 혼합되었을때 93.7%로 가장 높은 살충율을 나타내어 벌구슬 100%에서 90.4%보다 높게 나타나 상승효과가 인정되었다. 그러나 천남성과 벌구슬을 혼합한 경우 벌구슬 100% 일때 90.4% 보다 낮게 나타나 상승효과를 기대하기 어려웠다. 따라서 농가에서 자가제조하여 사용할 경우 상사화와 함께 사용하는 것이 점박이용애를 방제 하는데 효과적일 것으로 판단된다.

표 48. 멀구슬 추출물에 상사화와 천남성 혼합시 점박이응애 방제효과

추출물 혼합	방 제 가			
	1일	3일	5일	
멀구슬 100%	82.3	87.1	90.4	
상사화 100%	31.7	39.9	44.7	
천남성 100%	18.6	20.2	21.5	
멀구슬	상사화5%	65.3	75.3	78.7
	상사화10%	86.4	89.9	92.4
	상사화20%	85.2	89.8	93.7
	천남성5%	70.7	77.5	80.6
	천남성10%	58.0	67.9	75.7
	천남성20%	74.5	76.7	81.3

원예작물 난방제 해충인 담배거세미나방에 대해서는 제충국과 고삼, 멀구슬 시제품이 66.7%와 63.3%, 59.8%로 효과가 있었으며, 다른 시제품에서는 50% 이하의 살충율을 보였다. 하지만 효과가 있는 제충국과 고삼도 만족할 만한 결과는 아니었다. 담배거세미나방의 경우 목통, 속새, 오배자, 황련 추출물이 섭식저해 능력이 높은 것으로 나타나므로 이들 추출물과의 혼합 제품도 고려해 볼만하였다.

표 49. 담배거세미나방 방제를 위한 시제품의 살충효과

시제품명	처리전	살 충 율(%)		
		1일	3일	5일
멀구슬	30.0	48.9	59.8	59.8
제충국	30.0	35.6	45.8	66.7
고삼	30.0	56.7	60.0	63.3
제충국+창포	30.0	23.3	43.3	43.3
멀구슬+창포	30.0	43.3	50.0	50.0
창포	30.0	36.7	36.7	36.7
창포+계면활성제	30.0	30.0	30.0	30.0

배추좀나방은 멀구슬, 제충국, 고삼, 멀구슬+창포 시제품이 90%이상의 살충율을 나타냈으며 그중에서 멀구슬+창포의 효과가 98.4%로 가장 좋았다.

표 50. 배추좀나방 방제를 위한 시제품의 살충효과

시제품명	처리전	살충율(%)		
		1일	3일	5일
멀구슬	30.0	80.0	85.7	90.7
제충국	30.0	82.4	81.4	89.6
고삼	30.0	78.0	98.0	98.0
제충국+창포	30.0	36.0	76.0	78.0
멀구슬+창포	30.0	76.8	94.0	98.4
창포	30.0	42.5	44.3	44.0
창포+계면활성제	30.0	26.7	30.1	34.3

제충국 계통의 꽃을 에탄올과 에탄올+유화제, 물로 추출하여 점박이용애의 살비효과를 본 결과 에탄올로 추출한 0718계통 5일째에서 63.8%의 높은 살비율을 나타내었다. 에탄올에 유화제를 혼합하면 에탄올 단독으로 살포한 것 보다는 5일째에 살비율이 더 높아져 69.4%의 살비율을 나타내었다. 유화제 혼합의 경우 초기 1일째의 살비율은 에탄올 단독 추출액보다 살비율이 낮았지만 시간이 경과할수록 살비율이 높아져 유화제에 의한 잔류효과가 큰 원인인 것으로 판단된다. 물로 추출하면 에탄올보다 효과가 떨어져 1일째에 13.4~25.2%의 살비율을 나타내었는데 이후 살비율이 크게 증가하지 못하여 5일째에 23.3~39.9% 약간 증가할 뿐이었다. 따라서 물로 추출한 경우 피레스린 성분이 어느 정도는 추출되지만 양이 많지 않아 살포 이후 살충효과가 하락한 것으로 사료된다. 제충국 줄기를 용매별로 추출하였을때 에탄올에서는 0721계통이 5일째 42.7%, 0718이 40.8%를 나타내었으며 유화제를 혼합하여도 효과가 꽃보다는 더 낮아 54.6%와 57.5%를 나타내었다. 물로 추출한 것은 5일째에 15%를 넘지 못하여 약효가 떨어졌다. 천 등(2003)은 국화과 잡초를 메탄올로 추출하여 점박이용애에 대해 살비활성을 검정한 결과 고들빼기, 떡쑥, 쑥 등의 효과가 90% 이상으로 높다고 하였으나 *Chrysanthemum*인 감국은 25.6%로 아주 낮게 나타나 국화종류에 따라 살충활성의 차이가 큼을 알 수 있었다. 이러한 결과를 바탕으로 0721과 0718 계통이 우수함을 알 수 있었는데 특히 0718계통을 에탄올에 유화제를 첨가함으로써 우수한 결과를 얻을 수 있을 것으로 판단된다.

표 51. 제충국 꽃 종류와 추출방법별 점박이용에 살비효과

추출방법	제충국 계 통	처리전 마리수	살 비 율(%)		
			1일	3일	5일
에탄올	0704	273.0	26.9	37.9	39.2
	0721	257.5	22.3	38.8	51.4
	0710	355.0	8.8	27.9	43.3
	0718	343.5	23.6	33.6	63.8
	0706	388.5	9.6	27.1	45.0
에탄올+ 유화제5%	0704	125.0	15.9	34.4	49.9
	0721	308.0	12.4	26.6	51.1
	0710	277.0	13.1	20.8	39.4
	0718	191.0	16.1	49.6	69.4
	0706	293.0	8.8	21.7	35.5
물	0704	75.5	22.6	31.0	38.3
	0721	83.5	13.4	22.3	31.8
	0710	84.0	19.6	27.4	35.6
	0718	91.5	25.2	30.1	39.9
	0706	85.0	22.4	23.3	23.3

표 52. 제충국 줄기 종류와 추출방법별 점박이용에 살비효과

추출방법	제충국 계 통	처리전 마리수	살 비 율(%)		
			1일	3일	5일
에탄올	0704	282.0	14.7	30.3	33.9
	0721	244.5	11.2	26.0	42.7
	0710	278.0	10.9	25.5	32.9
	0718	268.5	20.9	33.0	40.8
	0706	270.0	9.1	11.8	13.5
에탄올+ 유화제5%	0704	268.0	13.7	22.3	33.1
	0721	193.5	19.2	30.6	54.6
	0710	181.0	17.0	27.3	35.8
	0718	253.0	26.7	41.5	57.5
	0706	255.0	11.2	25.1	34.9
물	0704	95.0	14.1	15.4	15.4
	0721	118.0	8.7	8.7	8.7
	0710	121.5	15.4	15.4	15.4
	0718	121.0	11.8	13.4	13.4
	0706	119.5	18.8	18.8	18.8

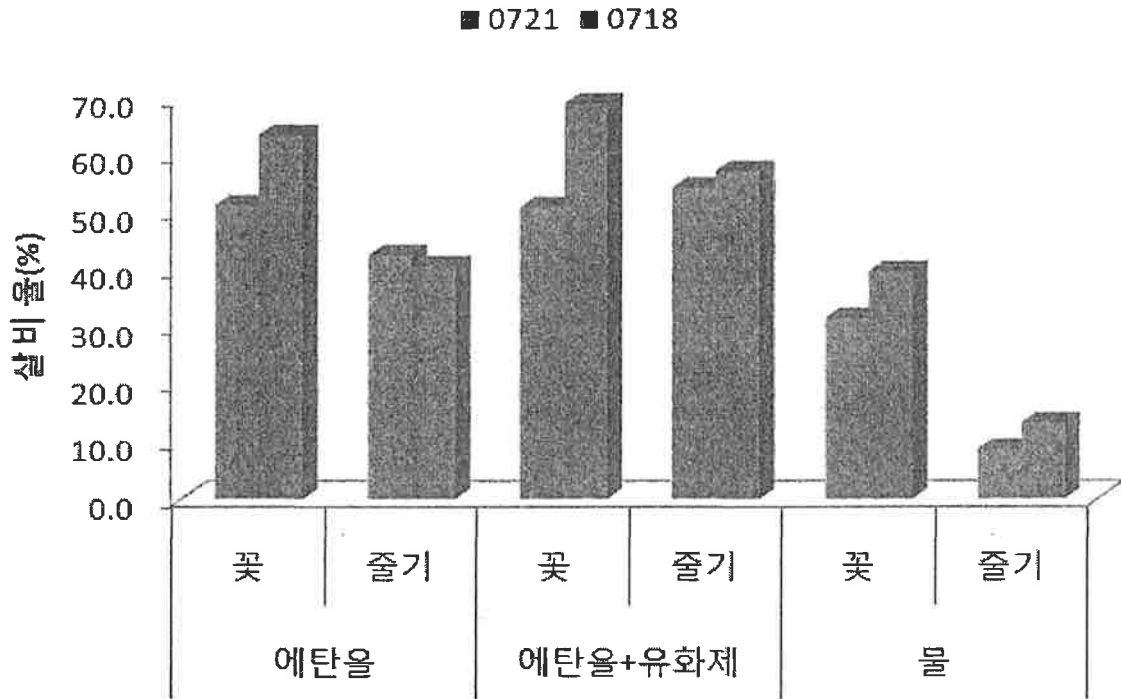


그림 67. 제충국 0718과 0121 계통의 추출부위 및 추출용매에 따른 점박이응애 살비율

제충국 꽃에 대한 벼멸구의 살충율을 보면, 에탄올로 추출한 것은 초기 살충율이 15~23.7% 이지만 시간이 경과할수록 증가폭이 크지 않았다. 0718계통은 5일째에 42.4%의 살충율을 나타내었으나 만족할 만한 결과는 아니었다. 유화제를 첨가하면 0718계통은 1일째부터 26.3%의 살충율을 나타내며 증가하여 5일째에 65.4%의 비교적 높은 살충율을 나타내었다. 벼멸구를 방제하는데 있어 65%의 살충율은 만족할만한 수준은 못되지만 이러한 결과를 바탕으로 보조제나 다른 추출방법 등을 개발한다면 더 우수한 결과가 나올 수 있을 것이라 판단된다. 특히 식물추출물은 농도에 따라 살충효과가 큰 차이가 있어 썩의 경우 0.2%에서 5.7%의 점박이응애 살충효과가 있지만 1%에서는 96.9%까지 높기 때문에(박 등, 2008), 제충국 역시 농도를 높인다면 좋은 결과가 나올 것으로 판단된다. 그러나 물로 추출한 경우에는 초기 10% 내외의 살충율을 5일째까지 그대로 유지하고 있어 벼멸구 방제용으로는 적합하지 않았다. 이러한 원인은 제충국은 자외선이나 산소, 물, 높은 온도에서 성분이 매우 불안정하기 때문으로 판단된다(Kasaj 등, 1999). 줄기 추출액은 0718계통을 에탄올 추출하여 유화제를 첨가한 경우 33.3%의 살충율을 나타내어 줄기 자체의 살충성분은 높지 않았다. 벼멸구 역시 점박이응애와 마찬가지로 0718계통이 0721보다 살충율이 더 높게 나타나 이 계통에 대한 심도 있는 재배법과 추출방법 등이 지속적으로 개발되어야 할 것이다.

표 53. 제충국 꽃 종류와 추출방법별 버벌구 살비효과

추출방법	제충국 계 통	처리전 마리수	살 충 율(%)		
			1일	3일	5일
에탄올	0704	36.5	15.0	21.9	31.5
	0721	32.0	17.9	22.5	27.1
	0710	31.0	16.0	20.3	28.7
	0718	40.0	23.7	23.7	42.4
	0706	38.5	18.9	20.1	28.0
	0704	39.5	22.7	27.8	36.3
에탄올+ 유화제5%	0721	47.0	19.0	30.9	41.6
	0710	34.0	17.5	23.5	27.8
	0718	42.5	26.3	41.8	65.4
	0706	51.0	22.3	31.4	38.3
	0704	48.3	13.0	13.5	13.5
물	0721	50.7	11.7	11.7	11.7
	0710	49.3	10.7	10.7	10.7
	0718	41.0	17.0	17.0	17.0
	0706	44.7	11.7	11.7	11.7

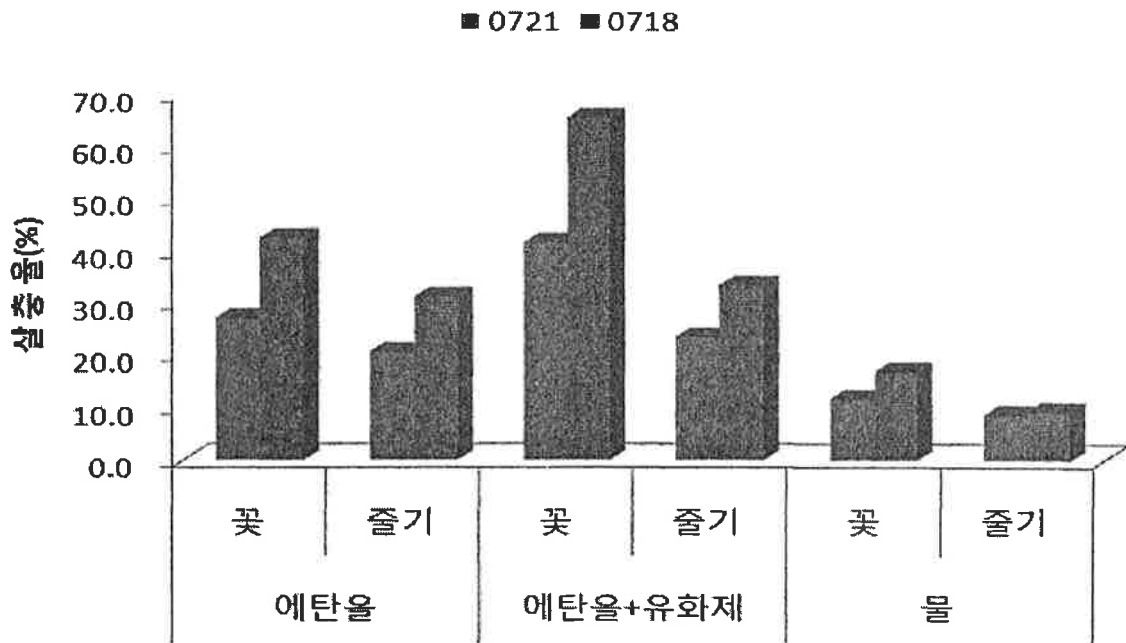


그림 68. 제충국 0718과 0121 계통의 추출부위 및 추출용매에 따른 버벌구 살충율

표 54. 제충국 줄기 종류와 추출방법별 버멸구 살비효과

추출방법	제충국 계 통	처리전 마리수	살 충 율(%)		
			1일	3일	5일
에탄올	0704	37.5	8.9	18.3	18.3
	0721	42.5	15.3	15.3	20.7
	0710	33.0	10.6	10.6	10.6
	0718	57.5	19.2	24.6	31.2
	0706	47.5	12.1	13.6	13.6
에탄올+ 유화제5%	0704	47.5	14.3	22.1	26.3
	0721	40.5	17.8	17.3	23.5
	0710	34.0	15.2	17.6	26.5
	0718	45.0	21.4	27.8	33.3
	0706	41.5	19.1	21.7	21.7
물	0704	40.3	26.8	12.0	12.0
	0721	42.7	8.7	8.7	8.7
	0710	41.7	9.5	9.5	9.5
	0718	40.0	9.4	9.4	9.4
	0706	40.7	10.0	10.0	10.0

표 55. 제충국 꽃 종류와 추출방법별 목화진딧물 살비효과

추출방법	제충국 계 통	처리전 마리수	살 충 율(%)		
			1일	3일	5일
에탄올	0704	239.0	-	-	-
	0721	473.0	14.5	3.6	-
	0710	372.0	2.3	-	-
	0718	470.5	5.3	2.5	-
	0706	472.5	4.8	2.0	-
에탄올+ 유화제5%	0704	328.5	10.9	4.6	1.1
	0721	290.0	53.6	39.1	6.4
	0710	298.5	14.7	3.3	-
	0718	295.5	11.3	6.9	0.1
	0706	256.0	16.3	-	-
물	0704	136.0	-	-	-
	0721	106.5	-	-	-
	0710	141.0	-	-	-
	0718	101.0	1.4	-	-
	0706	143.0	-	-	-

표 56. 제충국 줄기 종류와 추출방법별 목화진딧물 살비효과

추출방법	제충국 계 통	처리전 마리수	살 충 율(%)		
			1일	3일	5일
에탄올	0704	238.5	4.7	-3.8	-15.2
	0721	216.0	4.5	-6.2	-23.8
	0710	253.0	3.1	-4.0	-11.8
	0718	178.0	-7.3	-19.8	-39.7
	0706	164.5	2.7	-8.2	-23.2
에탄올+ 유화제5%	0704	351.5	12.3	6.7	-1.4
	0721	220.0	10.2	-7.0	-18.3
	0710	358.0	19.7	12.1	-1.1
	0718	365.5	12.2	7.2	-3.3
	0706	300.0	5.3	1.6	-9.4
물	0704	216.0	6.3	-16.4	-33.2
	0721	246.5	-3.7	-8.5	-21.9
	0710	196.0	-12.7	-53.0	-67.4
	0718	179.5	-13.2	-30.0	-40.7
	0706	76.5	-22.6	-95.6	-182.5

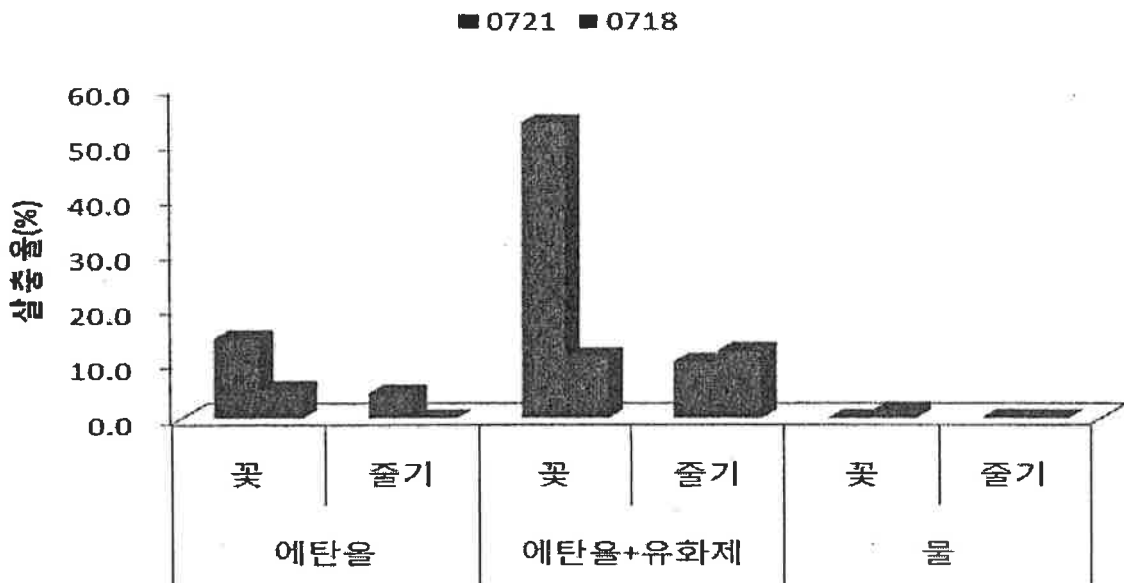


그림 69. 제충국 0718과 0121 계통의 추출부위 및 추출용매에 따른 목화진딧물 살충율

제충국 꽃에 대한 목화진딧물의 방제효과는 초기에는 어느 정도 유지되었으나 진딧물의 산자수가 증가하는 특성으로 인해 시간이 경과할수록 살충율은 하락하였다. 그러나 0721계통의 유화제 혼합의 경우 1일째에 53.6%까지 살충율이 증가하였으며 3일째에 39.1%를 유지

하여 이 계통을 이용하여 보조제를 추가하는 시험이 필요할 것으로 보이며 이 제품이 개발된다면 살포횃수나 살포간격에 대한 구체적인 방제체계법이 연구되어야 할 것이다. 물로 추출한 경우에는 꽃이나 줄기 모두 효과가 없었다. 따라서 제충국은 물 이외의 다른 용매로 추출하는 방법이 효과적일 것으로 판단되었다. 박 등(2008)도 20여종의 식물추출물을 복숭아 흑진딧물에 살포한 결과 고추씨와 겨자씨 추출물이 0.5% 농도에서 48.6%와 42.9%로 낮게 나타난다고 보고 한바 있어 진딧물의 방제를 효과적으로 하기 위한 살포 횃수나 농도를 결정할 필요가 있었다.

다. 추출물에 대한 해충의 기피효과

벼멸구에 대한 멸구슬과 제충국 시제품의 기피지수는 1일째에 52.2와 58.9로 나타났으나 3일째에는 17.8과 37.8로 급격히 떨어졌다. 점박이용애의 경우 더욱 낮아 1일째에 42.2와 48.9에 불과하였다. 김 등(2008b)은 벼멸구에 대한 식물추출물의 살충활성과 기피효과가 식물종과 부위에 따라 다양한 차이를 보여 상관관계가 성립되지 않는다고 보고하였는데, 본 실험에서도 살충효과는 나타나지만 기피효과는 높지 않게 나타남을 알 수 있었으며, 기피효과를 얻기 위해서는 남학슬 전체 부위, 캐슈나무 열매, 석류나무, 등나무 잎+줄기 추출물(김 등, 2008b)과 혼합하여 새로운 자재의 개발이 필요하다. 점박이용애는 caraway oil에 대해 92.2%의 기피효과를 보이며 그중에서 limonene 1,000 ppm에서 87.8%의 기피효과를 보이므로 시제품 제작에 첨가할 필요가 있었다.

표 57. 벼멸구에 대한 시제품의 기피지수

시제품	처리 전 마리수	기피지수		
		1일	2일	3일
멸구슬	90.0	52.2	22.2	17.8
제충국	90.0	58.9	33.3	37.8

표 58. 점박이용애에 대한 시제품의 기피지수

시제품	처리 전 마리수	기피지수		
		1일	2일	3일
멸구슬	90.0	42.2	22.2	17.8
제충국	90.0	48.9	33.3	27.8

3차 시제품에 대한 기피지수를 확인한 결과 벼멸구에 대해 1일째에 M80 시제품이 46.0으로 가장 높았으며 점박이용애는 33.3~35.6 정도로 높지 않았다. 목화진딧물은 M80과 J80 모두 1일째에는 33.3~37.8로 아주 높지는 않았으나 진딧물에 대한 결과로는 나쁘지 않다는 결론을 얻었다. 이들 3차 시제품은 포장 시험에서 효과가 높은 것으로 보아 기피효과는 그리 높지 않으나 직접 접촉에 의한 살충효과는 높은 것으로 판단되었다.

표 59. 주요해충에 대한 3차 시제품의 기피지수

시제품	해충	기피지수		
		1일	2일	3일
M80	점박이용애	33.3	35.6	17.8
	벼멸구	46.0	16.0	17.9
	목화진딧물	37.8	26.7	17.8
J80	점박이용애	28.8	0.0	4.4
	벼멸구	29.0	9.3	9.7
	목화진딧물	33.3	2.2	6.1

라. 살포방법에 따른 해충 살충 효과 검증

제충국과 멸구슬을 각각 먼저 살포하고 1주일 후에 멸구슬과 제충국을 살포한 결과(총 2회 살포) 목화진딧물의 밀도변화는 그림과 같다. 무처리에서 밀도는 지속적으로 유지되며 증가하고 있는데 멸구슬을 살포하고 제충국을 살포하면 1일째부터 밀도가 10% 이하로 떨어졌으며 이후 15일째까지 밀도가 점점 떨어지면서 억제가 되었다. 그러나 15일 이후에는 다시 밀도가 증가하여 22일 이후 다시 한번 밀도를 억제해줄 필요가 있었다. 제충국을 먼저 살포하고 멸구슬을 살포한 경우 1주일째에는 35%, 8일째에는 22%로 밀도 억제가 쉽지 않았으며 15일째에 밀도가 2%로 떨어지나 이후 다시 밀도가 증가하는 경향을 보여 제충국을 살포할 경우에는 밀도가 낮을때 사용하는 것이 바람직하며 멸구슬은 밀도의 고하에 관계없이 살포하여도 진딧물을 충분히 억제 시킬 것으로 판단되었다. pyrethrum 추출물은 자외선에 쉽게 분해될 수 있기 때문일 수도 있지만(Chen and Casida, 1969), 본 시험에서 멸구슬 보다 효과가 떨어지는 직접적인 원인인지는 알 수 없었다.

멸구슬이나 제충국을 먼저 살포하고 1주 간격으로 멸구슬이나 제충국을 1회 또는 2회 더 살포하는 결과(총 3회 살포), 멸구슬+멸구슬+제충국처리구와 멸구슬+제충국+멸구슬 처리구 모두 살포 1일째부터 밀도가 급격히 떨어져 22일째까지 낮은 밀도를 유지하였다. 특히 멸구슬을 2회 연속 살포하고 제충국을 1회 더 살포하면 22일째까지 진딧물의 밀도는 4% 낮게 유지되어 멸구슬의 우수성을 알 수 있었다. Azadirachtin은 neem과 멸구슬의 주요 성분으로서(Schmutterer, 1988, 1990) 곤충에 대해 섭식저해 효과와 함께 성충의 산란수를 감소시키며(Lowery and Isman, 1996), 포유동물에는 독성이 미약한 것으로 알려져 있다(Larson, 1990). 특히 멸구슬의 덜익은 열매는 *Triatoma infestans* 약충의 기피효과가 높다(Valladares 등, 1999)고 하여 멸구슬 살포로 인해 살충효과와 함께 기피효과까지 같이 작용한 것으로 판단된다. 그러나 식물추출물이던 농약이던 어떤 물질도 자주 사용하면 진딧물은 약제저항성을 획득하여 약효가 떨어지는 결과를 가져오므로 멸구슬을 2회 연속 사용하는 방법은 지양을 해야 할 것으로 보인다. 제충국+제충국+멸구슬과 제충국+멸구슬+제충국처리구에서의 진딧물 밀도는 서서히 떨어지는 경향을 보였으며 15일째까지 낮은 밀도를 유지하고 22일째에는 약간 증가하여 15%까지 올라갔다. 제충국이 초기에 진딧물 밀도억제를 쉽게 하지 못한

원인은 진딧물의 밀도가 높은 상태에서 제충국을 먼저 살포함으로써 초기의 밀도를 충분히 억제하지 못하고 2차로 제충국이나 멀구슬을 살포 하여도 효과를 발휘하지 못한 것으로 판단된다. 또한 pyrethrum 추출물은 자외선에 쉽게 분해될 수 있기 때문일 수도 있다(Chen and Casida, 1969). 따라서 제충국을 추출할 때에는 통풍조건을 시키고 5℃에서 음건시켜 놓으면 2년 동안은 pyrethrin 성분이 분해되지 않기(Morris 등, 2006) 때문에 초기부터 관리, 보관에 유의하면서 추출하면 자외선으로 인한 시료의 성분 분해를 막을 수 있을 것으로 기대되며, 제충국의 pyrethrin 성분은 저온과 고지대에서 농도가 높아지고(Muturi et al. 1969, Parlevliet 1970), 재배시에 칼리를 처리하면(Salardini et al. 1994) 꽃에서 농도가 높아 지므로 국내에서 재배 단지를 조성시에 이러한 점을 고려한다면 초기 살충력이 높은 제충국 재배가 가능할 것으로 보인다.

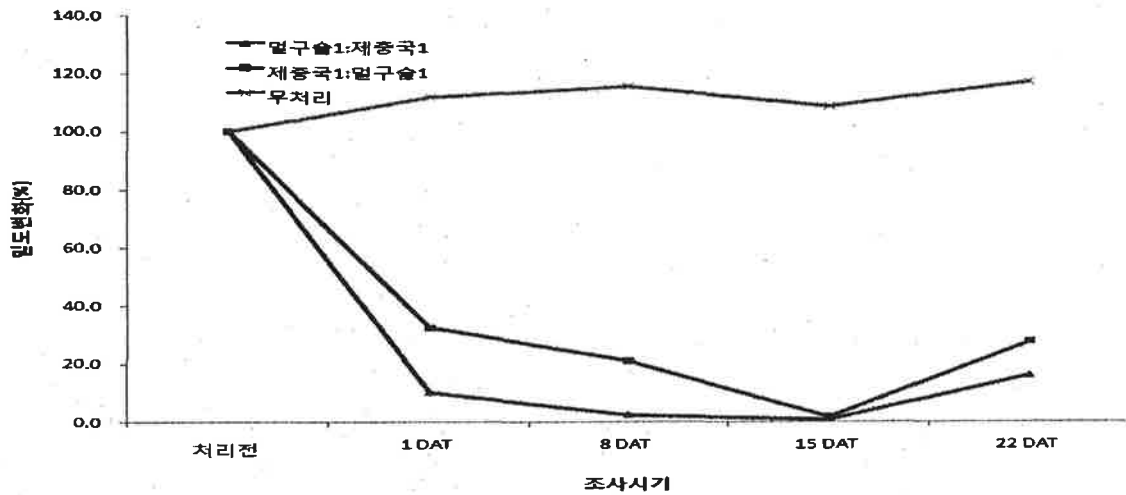


그림 70. 제충국과 멀구슬을 2회 살포시 목화진딧물의 밀도변화

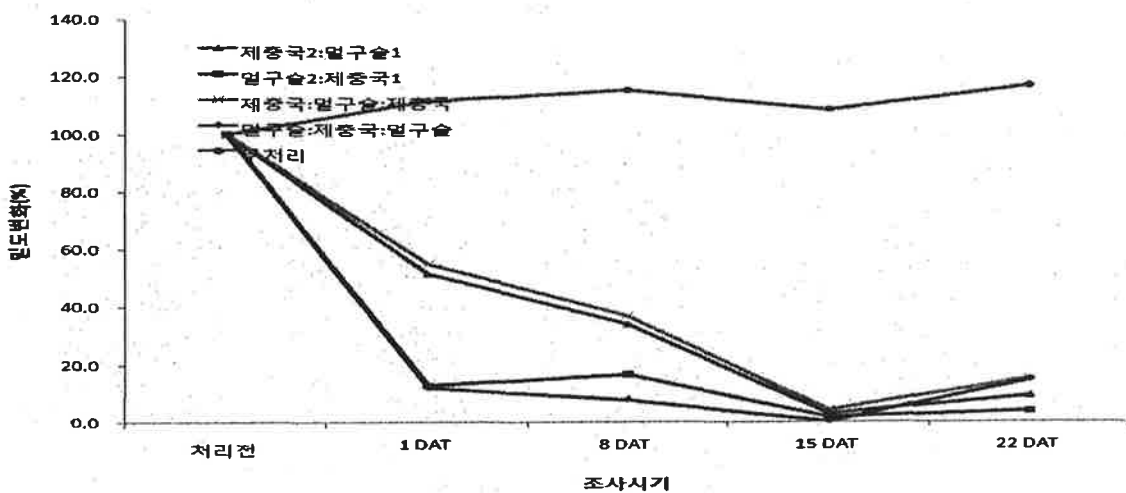


그림 71. 제충국과 멀구슬을 3회 살포시 목화진딧물 밀도변화

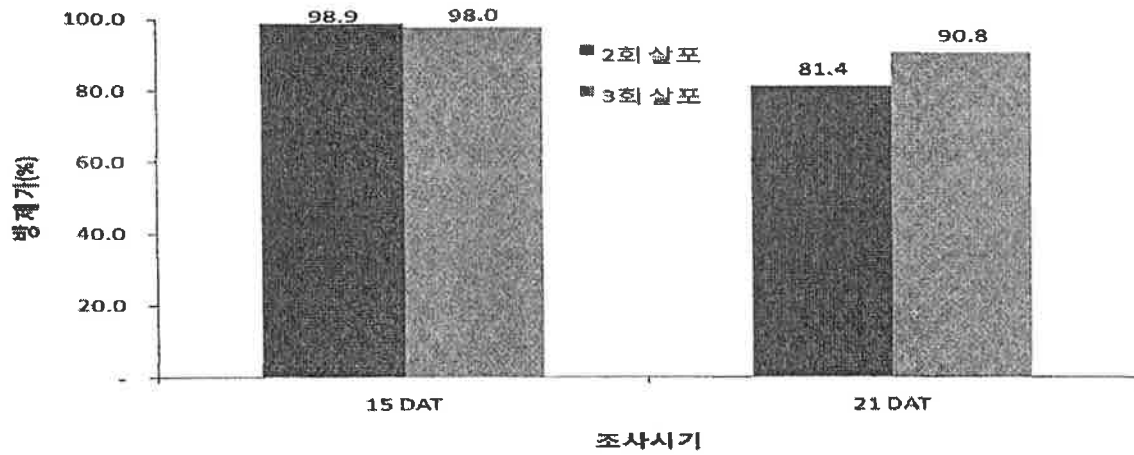


그림 72. 제충국과 멀구슬을 2회, 3회 살포시 목화진딧물 방제가

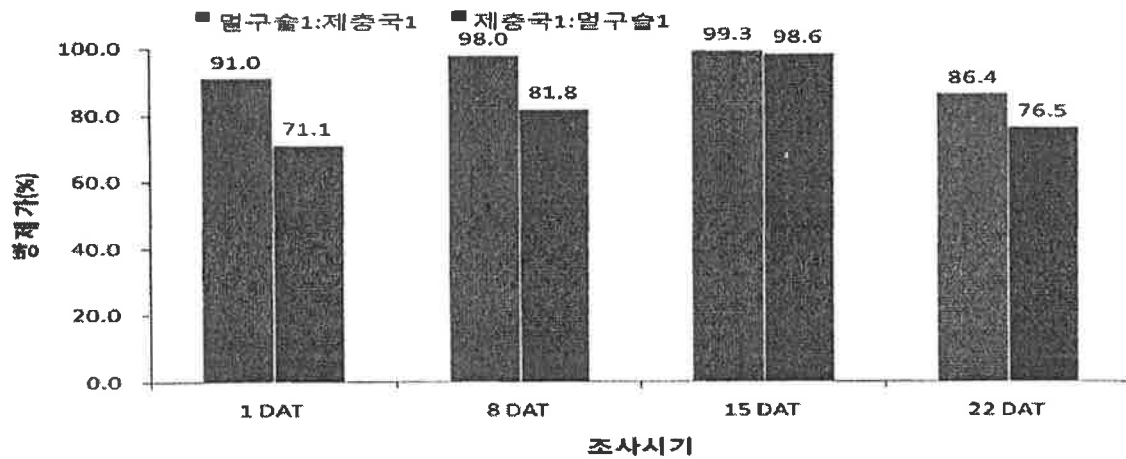


그림 73. 제충국과 멀구슬을 2회 살포시 살포 순위에 따른 목화진딧물 방제가

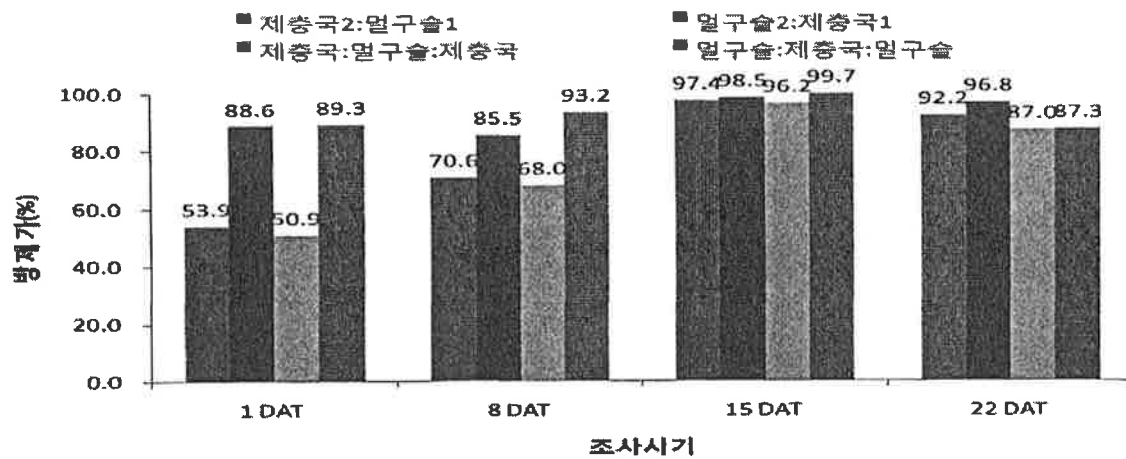


그림 74. 제충국과 멀구슬을 3회 살포시 살포 순위에 따른 목화진딧물 방제가

제충국과 멀구슬의 살포 조합에 의해 2회와 3회 살포시 목화진딧물의 방제가는 그림과 같다. 2회나 3회 살포시 15일째에는 98.9와 98.0으로 나타났으며 21일째에는 81.4와 90.8로 나타났다. 진딧물은 산자에 의해 후대를 증식하기 때문에 다른 곤충과 달리 밀도 증식의 속도가 월등히 빠르기 때문에 방제가 81.4가 생물농약으로서 아주 높은 수치이지만 농민의 입장에서 보면 만족하지 못할 수도 있기 때문에 진딧물의 방제를 위해서는 3회 살포하는 것이 바람직할 것으로 판단된다. 제충국과 멀구슬을 2회 살포할 경우 방제가는 그림과 같다. 멀구슬을 먼저 살포하면 1일째 방제가는 91이지만 제충국은 71.1로 매우 낮았다. 또한 3회 살포 시에도 제충국을 먼저 살포할 경우 방제가는 53.9와 50.9로 아주 낮으며 15일째에 가서야 96% 이상의 방제가가 나오며, 멀구슬은 1일째부터 방제가가 88.6과 89.3으로 높게 나와 이후 높은 방제가를 유지하기 때문에 멀구슬을 먼저 살포한 후 제충국이나 멀구슬을 1회씩 더 살포해주는 방제법이 타당할 것으로 판단된다.

마. 시제품의 딸기 해충에 대한 살충효과 검정

딸기 병해충을 동시에 방제하기 위한 기본 단계로 멀구슬과 제충국에 보조제를 첨가한 시제품을 각각 9개씩 제작하였다. 멀구슬이 주성분인 FKS와 제충국이 주성분인 FKB의 목화진딧물 방제효과는 30%를 넘지 못하였으며 시간이 경과 할수록 방제가는 떨어졌다.

표 60. 딸기 포장 병해충 방제 검정용 1차 시제품의 농도 비율

농 도 (%)				
멀구슬(FKS) 제충국(FKB)	황	황련	비누	알긴산
	16	16		20
	20	20		24
20			12	28
	24	24		32

배추좀나방 방제효과는 FKS-2가 40%였으며 제충국 주성분의 FKB-7이 33.3%로 전체적으로 효과적인 조합을 찾지 못하였다.

표 61. 병해충 동시 방제를 위한 1차 시제품별 배추좀나방 방제효과

추출물	방 제 가			추출물	방 제 가		
	1일	3일	5일		1일	3일	5일
FKS-1	15.0	28.3	33.3	FKB-1	8.3	18.3	18.3
FKS-2	23.3	36.7	40.0	FKB-2	1.7	10.0	10.0
FKS-3	20.0	31.7	31.7	FKB-3	1.7	16.7	25.0
FKS-4	11.7	16.7	18.3	FKB-4	1.7	15.0	21.7
FKS-5	6.7	25.0	31.7	FKB-5	1.7	16.7	20.0
FKS-6	18.3	21.7	21.7	FKB-6	10.0	21.7	31.7
FKS-7	21.7	28.3	28.3	FKB-7	13.3	25.0	33.3
FKS-8	15.0	21.7	21.7	FKB-8	6.7	15.0	25.0
FKS-9	21.7	28.3	35.0	FKB-9	10.0	11.7	20.0

표 62. 딸기 병해충 동시 방제를 위한 1차 시제품별 목화진딧물 방제효과

추출물	방 제 가			추출물	방 제 가		
	1일	3일	5일		1일	3일	5일
FKS-1	24.4	27.3	14.3	FKB-1	3.5	-	-
FKS-2	4.7	13.3	5.9	FKB-2	15.1	2.9	-
FKS-3	18.6	-	-	FKB-3	12.0	27.2	13.6
FKS-4	18.1	17.1	1.8	FKB-4	17.2	34.7	12.6
FKS-5	11.2	9.2	-	FKB-5	7.3	10.3	2.8
FKS-6	24.7	6.4	-	FKB-6	20.2	2.0	-
FKS-7	21.0	9.2	0.3	FKB-7	18.1	6.2	-
FKS-8	3.2	-	-	FKB-8	19.3	-	-
FKS-9	10.8	-	-	FKB-9	19.6	16.4	6.0

표 63. 딸기 병해충 동시 방제를 위한 1차 시제품별 점박이용애 방제효과

추출물	방 제 가			추출물	방 제 가		
	1일	3일	5일		1일	3일	5일
FKS-1	36.1	50.2	64.4	FKB-1	25.3	32.5	39.0
FKS-2	28.5	46.2	69.1	FKB-2	15.3	21.4	34.7
FKS-3	27.6	44.1	49.2	FKB-3	33.5	41.5	47.9
FKS-4	10.9	15.6	34.6	FKB-4	18.8	42.0	48.6
FKS-5	9.1	25.6	39.3	FKB-5	39.3	47.8	67.5
FKS-6	4.6	15.7	22.6	FKB-6	20.7	32.0	45.5
FKS-7	26.7	44.2	46.3	FKB-7	35.2	37.4	48.7
FKS-8	22.7	36.5	39.8	FKB-8	13.8	20.8	28.5
FKS-9	21.7	28.4	35.3	FKB-9	35.6	43.9	50.1

점박이용애에서는 FKS-2가 69.1%로 가장 높았으며 FKB-5번이 67.5%로 높게 나타났다. 이러한 결과를 바탕으로 멀구슬과 제충국을 주성분으로 하는 2차 시제품을 각각 1개씩 제작하여 시험한 결과, 멀구슬이 주성분인 FKP-1은 점박이용애는 처리 3일째부터 95.7%의 높은 살충효과를 보였으며 배추좀나방 역시 5일째에 73.3%의 살충효과를 보였으나 목화진딧물에 대해서는 35.1%가 낮은 편이었다. 제충국이 주성분인 FKP-2는 FKP-1보다 효과가 낮게 나타나 점박이용애는 5일째에 84.3%, 배추좀나방 41.7%, 목화진딧물은 3일째까지는 13.6%로 나타났으나 5일째에는 밀도가 더 늘어나 효과가 거의 없었다.

표 64. 2차 추출 시제품의 딸기 해충에 대한 방제효과

해충종류	FKP-1 방 제 가			FKP-2 방 제 가		
	1일	3일	5일	1일	3일	5일
점박이용애	75.2	95.7	96.1	52.9	77.5	84.3
배추좀나방	38.3	60.0	73.3	21.7	36.7	41.7
목화진딧물	16.2	27.1	35.1	18.5	13.6	-

표 65. 딸기 포장 병해충 방제 검정용 3차 시제품의 농도 비율

농 도 (%)				
멀구슬	황	황련	비누	제충국
35(M70)	10	35	13	40(J80)
40(M80)				45(J90)

2차 시제품 제작 결과 멀구슬과 제충국의 농도가 너무 낮다는 판단을 하여 농도를 더 높은 3차 시제품을 제작하였다. 이러한 결과 멀구슬이 주성분인 M80의 경우 목화진딧물의 방제

가는 5일째에 64%, 점박이용애 96.7%, 배추좀나방은 70%로 3가지 해충을 모두 방제 할 수 있는 농도까지 접근시켰으나, 제충국이 주성분인 J90은 점박이용애에서만 83.5%의 방제효과를 보이고 목화진딧물과 배추좀나방에 대해서는 26.9%와 38.3%로 낮게 나타났다. 이처럼 제충국은 수량이 낮아 생산단가가 높아 질수 있으므로 수량성을 높이며 노동력을 감소시키면서 pyrethrin 함량을 높이는 연구와 함께(Wandahwa 등, 1996), pyrethrin 함량이 높은 계통을 찾고자 하는 연구도 같이 이루어지고 있다(Purseglove, 1982).

표 66. 딸기 병해충 동시 방제를 위한 3차 시제품별 목화진딧물 방제효과

해충 및 추출물	방 제 가			
	1일	3일	5일	
목화진딧물	M-70	26.1	38.0	42.5
	M-80	29.7	49.1	64.0
	J-80	23.0	22.8	35.0
	J-90	17.8	18.4	36.9
점박이용애	M-70	51.5	70.1	77.6
	M-80	66.9	85.1	96.7
	J-80	12.8	21.2	47.1
	J-90	13.6	59.7	83.5
배추좀나방	M-70	23.3	35.0	43.3
	M-80	33.3	48.3	70.0
	J-80	20.0	25.0	25.0
	J-90	16.7	18.3	38.3

4. 결과요약

제충국의 추출 부위별 벼멸구 살충효과를 보면 건조한 꽃에서 5일째에 78.5%의 높은 살충율을 나타내었다. 전초를 사용한 경우도 69.4% 였으며 생초 꽃에서도 62.1%였다. 그러나 잎만을 가지고 사용한 경우 살충효과가 낮았다. 멸구슬과 제충국을 에탄올로 추출한 경우 벼멸구의 살충효과는 78.2%와 66.4%였다. 제충국을 열수로 추출하여 40% 농축한 경우 벼멸구 72.6%, 점박이용애 77.2%의 살충율을 보이기 때문에 농축해서 사용하면 살충효과를 높일 수 있었다.

멸구슬 분획별로 점박이용애의 부화율은 에칠아세테이트와 수층 분획 추출물에서 9.8%로 가장 낮게 나타났으며 부탄올분획 추출물에서는 60.7%로 높아 효과가 거의 없었다.

점박이용애 산란수는 무처리에 비해 산란수가 적어 식물추출물이 점박이용애의 차세대의 밀도를 크게 감소시킴으로써 방제 할 수 있었다. 농가에서 자가제조하여 사용할 경우 상사화와 멸구슬을 함께 사용하는 것이 점박이용애를 방제 하는데 효과적이었다.

멸구슬과 제충국의 시제품의 벼멸구 살충율은 멸구슬은 95.4%, 제충국은 89.4%로 살충 효과가 아주 높았다. 이들 제품에 창포를 혼합한 결과 멸구슬+창포에서는 97.0%로 효과가 약간 올라갔으나 제충국+창포에서는 오히려 효과가 떨어져 72.7%로 낮게 나타났다. 점박이

용애에 대해서 멀구슬, 제충국, 고삼, 멀구슬+창포 추출물에서 95% 이상의 살비효과를 보여 우수하였으나 제충국+창포는 역시 효과가 떨어져 77.9%로 낮았다. 원예작물 난방제 해충인 담배거세미나방에 대해서는 제충국과 고삼, 멀구슬 시제품이 66.7%와 63.3%, 59.8%로 효과가 있었으며, 다른 시제품에서는 50% 이하의 살충율을 보였다. 배추좀나방은 멀구슬, 제충국, 고삼, 멀구슬+창포 시제품이 90%이상의 살충율을 나타냈으며 그중에서 멀구슬+창포의 효과가 98.4%로 가장 좋았다.

제충국 계통의 꽃을 에탄올로 추출한 0718계통이 점박이용애에 대해 5일째에 63.8%의 높은 살비율을 나타내었다. 에탄올에 유화제를 혼합하면 에탄올 단독으로 살포한 것 보다는 5일째에 살비율이 더 높아져 69.4%의 살비율을 나타내었다. 물로 추출하면 에탄올이나 에탄올+유화제 추출보다 효과가 떨어져 낮은 살비율을 나타내었다. 제충국 잎을 용매별로 추출하였을때 꽃 추출물보다 살비율이 낮았다. 제충국 꽃에 대한 벼멸구의 살충율은 에탄올에 유화제를 첨가하면 5일째에 65.4%의 비교적 높은 살충율을 나타내었다.

제충국 꽃에 대한 목화진딧물의 방제효과는 초기에는 어느 정도 유지되었으나 진딧물의 산자수가 증가하는 특성으로 인해 시간이 경과할수록 살충율은 하락하였다. 0721계통에 유화제를 혼합하면 처리 1일째에 살충율이 53.6%이며, 3일째에 39.1%를 유지하였다.

벼멸구에 대한 멀구슬과 제충국 시제품의 기피지수는 1일째에 52.2와 58.9로 나타났으나 3일째에는 17.8과 37.8로 급격히 떨어졌다. 점박이용애의 경우 더욱 낮아 1일째에 42.2와 48.9에 불과하였다.

식물추출물을 2회 처리한 경우, 멀구슬을 먼저 살포하고 제충국을 살포하면 1일째부터 목화진딧물 밀도가 10% 이하로 떨어졌으며 이후 15일째까지 밀도가 점점 떨어지면서 억제가 되었다. 그러나 15일 이후에는 다시 밀도가 증가하여 22일 이후 다시 한번 밀도를 억제해줄 필요가 있었다. 제충국을 먼저 살포하고 멀구슬을 살포한 경우 1주일째에는 35%, 8일째에는 22%로 밀도 억제가 쉽지 않았으며 15일째에 밀도가 2%로 떨어지나 이후 다시 밀도가 증가하였다. 식물추출물을 3회 살포한 경우, 멀구슬+멀구슬+제충국처리구와 멀구슬+제충국+멀구슬 처리구 모두 살포 1일째부터 밀도가 급격히 떨어져 22일째까지 낮은 밀도를 유지하였다. 특히 멀구슬을 2회 연속 살포하고 제충국을 1회 더 살포하면 22일째까지 진딧물의 밀도는 4% 낮게 유지되었다. 제충국+제충국+멀구슬과 제충국+멀구슬+제충국처리구에서의 진딧물 밀도는 서서히 떨어지는 경향을 보였으며 15일째까지 낮은 밀도를 유지하고 22일째에는 약간 증가하여 15%까지 올라갔다.

제충국과 멀구슬의 살포 조합에 의해 2회와 3회 살포시 목화진딧물의 방제가는 15일째에는 98.9와 98.0, 21일째에는 81.4와 90.8로 나타났다. 멀구슬을 먼저 살포하면 1일째 방제가는 91이지만 제충국은 71.1로 매우 낮았으며, 제충국을 먼저 살포할 경우 1일째 방제가는 53.9~50.9이지만 멀구슬은 방제가가 88.6과 89.3높게 나타나 멀구슬을 먼저 살포한 후 제충국이나 멀구슬을 1회씩 더 살포해주는 방제체계가 우수하였다.

2차 시제품 제작 결과 멀구슬과 제충국의 농도가 너무 낮아 농도를 더 높인 3차 시제품을 제작하였다. 이러한 결과 멀구슬이 주성분인 M80의 경우 목화진딧물의 방제가는 5일째에 64%, 점박이용애 96.7%, 배추좀나방은 70%로 3가지 해충을 모두 방제 할 수 있었다.

4절. 친환경 해충 방제용 제충국, 멀구슬의 제품화

1. 서언

병해충 방제를 위한 과도한 농약사용은 생태계 파괴뿐만 아니라 환경오염 등의 문제를 일으키고 있기 때문에 최근에는 광범위한 살충효과를 보이면서 대신 환경에는 큰 영향을 주지 않는 대체농약을 탐색하려는 연구가 활발히 이루어지고 있다 (Saxena, 1989; Schmutterer, 1980). 그 중에서 식물성 농약은 살충제, 곤충 기피제 및 섭식저해제로서 성공적으로 개발되고 이용되어져 오고 있다. 식물유래 제품을 살충제로 가장 성공적으로 이용한 것은 pyrethroid 화합물이었다. 오늘날까지도 이들 식물체의 건조된 꽃의 분말은 살충제로서 판매되고 있다. 이들 식물들의 살충활성에 관여하는 6가지 terpenoid esters (pyrethrins)의 화학구조를 규명한 후에 많은 합성 유사제품들이 특허화되거나 시판되어 왔으며 그 합성 pyrethroids는 대조 천연화합물보다 더 높은 활성을 보였음을 밝힌 바 있다(Elliott, 1977). Meliaceae과와 Rutaceae과로부터 limonoid기의 azadirachtin과 또 다른 terpenoids는 몇 가지의 곤충종에 대해 잠재적 생장억제제로 알려지고 있다. Nicotine과 normicotine은 Nicotiana속의 몇 가지 구성성분이 되며 살충제로서 상업적으로 이용되어지고 있다. 그 중 *N. rustica*는 상업적 공급원으로서 대표적인 물질이다. 그 밖의 다른 nicotine의 천연 유사품은 유의적인 살충특성을 갖는 것으로 보여 왔는데 그 하나인 anabasine 또는 neonicotine은 러시아에 관목인 *Anabasis aphylla*에서 추출하여 하나의 살충제로서 생산되어져 왔다. 특히 5'-methyl normicotine은 효과적인 살충제로 증명되어 왔다(Schmutterer, 1980). 곤충 방제는 급속한 치사를 일으킨 것과 다른 수단에 의해 이루어질 수 있다. 어떤 식물은 곤충기피제 또는 곤충 섭식행위, 탈피 그리고 산란을 변형시키는데 작용하는 많은 화합물들을 생산한다 (우원식, 1996). 대부분의 곤충 기피제는 terpenen-4-ol과 같은 휘발성 terpenoid계들이다. 다른 terpenoid계들은 유인제(attractants)로 작용할 수 있다. 몇 가지 경우에 있어서 같은 terpenoid는 더 많은 유용한 곤충을 유인하는 반면 어떤 원치 않은 곤충들을 퇴출시킬 수 있다(Schmutterer, 1988). 이 외에도 alkaloids, flavonoids, saponin, phenol 등으로 대별되는 화합물에서도 살충활성을 보이는 것으로 보고되고 있다(Huff, 1980).

식량 생산에 있어서 해충으로부터 작물을 보호하기 위해서는 농약의 사용은 불가피하므로 인간과 생물 생태계에 심각한 부작용을 일으키는 유기합성 농약을 대체할 수 있는 새로운 친환경 해충 방제제의 개발이 필요하다. 식물 추출물을 이용한 해충 방제 이용확대를 위해 식물추출 살충제의 제형에 필요한 물질들의 안정성을 검정과 식물에 미치는 약해 등 제품화를 위한 시험을 실시하였다.

2. 재료 및 방법

가. 시판제품 효과 검정

시중에서 유통 판매하고 있는 제충국 제품 4가지를 수집하여 벼 및 원예작물의 주요해충인 벼멸구, 점박이용애, 복숭아혹진딧물, 배추좀나방, 담배거세미나방을 대상으로 유묘에 접종

하여 제품의 추천농도로 살포하였다. 벼멸구는 벼, 점박이응애는 강낭콩, 복숭아혹진딧물은 고추, 배추좀나방, 담배거세미는 배추에 접종 48시간 후에 사전밀도를 조사하고 5반복 실시하였다.

나. 시제품의 약해 시험

제충국과 멀구슬을 이용하여 만든 시제품을 가지고 벼, 배추, 딸기를 대상으로 50, 100, 200배로 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.

다. 시제품의 살충효과 검정

시제품은 멀구슬나무 열매와 제충국 전초를 주원료로 하여 건조-분쇄-에탄올에 침지-여과 과정을 통해 추출한 각 추출물에 유화제 농도를 3, 5, 10%로 달리하여 제작하였다. 대상해충은 전남농업기술원에서 누대사육중인 벼멸구를 대상으로 유묘에 유충을 접종하여 5반복으로 실시하였다.

라. 천적에 대한 독성 검정

제충국과 멀구슬의 천적에 미치는 영향을 조사하였다. 포식성천적인 칠레이리응애, 아규레이퍼이리응애, 오이이리응애, 긴털이리응애, 지중해이리응애의 직접독성은 점박이응애 알을 먹이로 공급한 딸기엽 절편(2×2cm)에 20마리씩 성충을 접종하고 바닥에 탈지면을 깔고 물을 공급하여 성충이 도망가지 못하도록 막을 만들고 30분정도 정착을 시킨 다음, 추출물 농도 별로 샤페에서 25cm 거리에서 hand spray로 엽편이 충분히 적셔질 정도로 5초 동안 스프레이 하고 음건시켰다. 살비율은 1, 3일후에 조사하였으며 5반복 시험하였다. 잔류독성은 딸기 잎에 5일, 3일, 1일전, 당일에 미리 시제품을 살포하고 여기에 칠레이리응애 30마리씩 3반복으로 접종하여 상온에 보관하였으며 점박이응애 알을 먹이로 공급하여 주며, 처리 24시간 후 살비수를 해부현미경(10×)하에서 조사하였다. 유럽애꽃노린재는 CO₂에 의해 마취된 성충 40마리를 희석된 약액에 10초간 침지하고, 티슈를 이용 습기를 제거하였다. 건조된 성충은 점박이응애 알을 부화시킨 딸기가 식재된 사각 사육용기(7×20cm)에 옮겨두고, 1, 3일째에 살충율을 조사하였다.

기생성 천적인 진디벌과 가루이천적인 좀벌류, 황온좀벌, 온실가루이좀벌은 머미에 추출물을 살포한 후 머미에서 우화되어 나오는 성충수를 7일째에 세어 우화율을 조사하였는데 5반복으로 시험하였다.

마. 시제품 보조제의 살충효과 검정

보조제의 점박이응애와 복숭아혹진딧물의 살충효과를 알아보기 위해 TKS, 80-TW, NP-7, 살충비누, 카테킨을 구입하였으며 생물검정법에 의해 살충율을 구하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 시판제품 효과 검증

시중에서 판매하고 있는 제충국 제품을 수집하여 주요 해충에 대한 살충효과를 보기 위하여 유묘검정을 실시한 결과 벼멸구는 Pyrethrum extract 제품에서 70%로 효과를 나타냈으나 제충국(1), 제충국(2), 제충국(청비) 등 다른 제품에서는 50% 내외의 살충율을 보여 효과가 떨어졌다. 점박이용애도 Pyrethrum extract에서 75.5%의 살충율을 보였으며 제충국(2)에서는 61.6%로 약간 낮았으나 다른 제품은 효과가 떨어져 벼멸구와 비슷한 경향이였다.

표 67. 제충국 제품별 벼멸구 살충효과

자재명	처리 전	살 충 율(%)		
		1일	3일	5일
제충국(1)	136.0	44.6	49.9	49.9
제충국(2)	113.0	44.8	53.5	53.5
제충국(청비)	231.7	41.1	45.8	45.8
Pyrethrum-Extract	125.6	56.4	68.7	70.0

표 68. 제충국 제품별 점박이용애 살비효과

자재명	처리전	살 비 율(%)		
		1일	3일	5일
제충국(1)	136.0	21.9	30.8	35.5
제충국(2)	113.0	41.8	56.3	61.6
제충국(청비)	231.7	32.7	41.7	42.5
Pyrethrum-Extract	217.3	63.0	71.9	75.5

반면에 배추좀나방은 제충국(2)에서 93.3%로 아주 우수한 효과를 나타냈으나 다른 제품은 70%정도의 살충율을 보여 친환경 제품으로서 배추좀나방에 사용할 수 있을 것으로 판단 된다. 복숭아혹진딧물은 제충국(2)에서 92.3%의 높은 살충율을 보였으며 다른 제품에서도 제충국(1)을 제외하고는 60~70%정도의 비교적 양호한 살충효과를 나타냈다.

표 69. 제충국 제품별 배추좀나방 살충효과

자재명	처리전	살충율(%)		
		1일	3일	5일
제충국(1)	30.0	63.3	63.3	70.0
제충국(2)	30.0	90.0	93.3	93.3
제충국(청비)	30.0	56.7	73.3	73.3
Pyrethrum-Extract	30.0	73.3	73.3	76.7

표 70. 제충국 제품별 복숭아혹진딧물 살충효과

자재명	처리전	살충율(%)		
		1일	3일	5일
제충국(1)	102.0	32.1	24.5	21.4
제충국(2)	112.3	96.8	94.8	92.3
제충국(청비)	137.0	89.7	53.0	63.6
Pyrethrum-Extract	79.7	94.7	83.8	78.1

담배거세미나방은 제충국(청비)에서 효과가 높아 80%를 나타냈으나 다른 제품에서는 약간 낮은 효과를 보여 같은 제충국이라도 제품에 따라 해충에 대한 살충효과가 다르게 나타나 보조제 성분을 달리하거나 시제품을 제작할 때 목표해충을 정하여 시험함으로써 보다 나은 제품이 나올 것으로 판단되었다.

표 71. 제충국 제품별 담배거세미나방 살충효과

자재명	처리전	살충율(%)		
		1일	3일	5일
제충국(1)	30.0	40.0	66.7	66.7
제충국(2)	30.0	53.3	60.0	63.3
제충국(청비)	30.0	80.0	80.0	80.0
Pyrethrum-Extract	30.0	66.7	73.3	73.3

나. 시제품의 약해 시험

벼, 배추, 딸기를 대상으로 식물추출물 이용 시제품을 희석농도 50, 100, 200배로 각각 살포하여 3일, 6일, 9일 후의 약해 증상을 농촌진흥청 농업과학기술 연구조사분석기준(2003년)에 의하여 조사한 결과 모든 제품에서 50배 희석액에서 1정도의 약해가 나타났다. 이 결과로 보아 시제품들은 100배 이상으로 사용해야 할 것으로 판단된다.

표 72. 시제품의 약해시험

시제품명	살포배수	약해정도		
		벼	배추	딸기
멸구슬	50배	1	1	1
	100배	0	0	0
	200배	0	0	0
제충국	50배	1	1	1
	100배	0	0	0
	200배	0	0	0
고삼	50배	1	1	1
	100배	0	0	0
	200배	0	0	0
제충국+창포	50배	1	1	1
	100배	0	0	0
	200배	0	0	0
멸구슬+창포	50배	1	1	1
	100배	0	0	0
	200배	0	0	0
창포	50배	1	1	1
	100배	0	0	0
	200배	0	0	0
창포+계면활성제	50배	1	1	1
	100배	0	0	0
	200배	0	0	0

다. 시제품의 살충효과 검정

멸구슬을 이용한 시제품을 제작하는데 유화제 농도를 달리하여 벼멸구 방제효과를 검정한 결과 3% 농도에서는 89.9%, 5%에서 95%, 10% 첨가 시 89.1%로 농도에 따른 살충율의 변화는 크지 않았다. 따라서 멸구슬에 넣는 유화제의 양은 3%만 넣어도 충분할 것으로 판단되었다. 본 시제품은 벼멸구 방제제로 이용할 수 있으며 멸구슬나무 열매와 차를 각각 건조-분쇄-에탄올에 침지-여과 과정을 통해 추출한 추출물을 9:1 비율로 혼합한 액을 90% 첨가하여 주성분으로 하고 첨가제로서 지방산에 수산화칼륨 0.2%, lecithin 50% 넣어 만든 살충비누를 3% 이상 보조성분으로 하는 벼멸구 방제제 조성물을 제조하였다. 기존 식물추출물은 멸구슬 열매에 TDE7과 OA1019 물질을 혼합하여 사용하였으나 이는 친환경재배에 부적합하지만, 본 시험에서는 환경친화적인 보조성분을 혼합하므로써 기존 추출물과 같이 벼멸구에 대해 90%이상의 살충효과를 가지며 독성이 낮고 인체에 안전하며 토양 및 수질 오염 문제가 없어 친환경 쌀을 재배하는 농가에서 고품질 쌀을 생산하는데 기여할 것으로 기대된다.

표 73. 멀구슬 시제품의 유화제 농도에 따른 벼멸구 방제 효과

유화제농도(%)	처리전 마리수	살충율(%)		
		1일	3일	5일
3	53.0	65.4	83.0	89.9
5	49.3	75.7	85.1	95.3
10	42.7	71.1	82.0	89.1

한편 제충국의 경우에도 멀구슬 열매와 같은 방법으로 주성분만 제충국을 넣고 제작하여 검정한 결과 유화제 농도에 따라 76.7~84.4%로 높지 않았다.

표 74. 제충국 시제품의 유화제 농도에 따른 벼멸구 포장 방제 효과

유화제농도(%)	처리전 마리수	살충율(%)		
		1일	3일	5일
3	53.3	77.5	83.7	84.4
5	43.0	69.8	71.3	76.7
10	50.0	80.7	84.0	84.0

라. 천적에 대한 독성 검정

칠레이리용애에 대한 제충국 멀구슬의 독성을 보면 1일째에 살충율은 12.9%와 18.0%였으나 점점 올라가 5일째에는 38.9%와 45.0%까지 증가하였다. 잔류독성을 보면 살포 1일째에 칠레이리용애를 접종하면 제충국은 96.7%가 생존하였으며 이후 생존율이 점점 떨어져 5일째에 81.1%의 생존율을 보였다. 3일째에 접종한 경우 1일째에는 100% 생존하였으며 5일째에 88.9%가 생존하였다. 그러나 멀구슬은 살포1일째에는 87.8%가 생존하다가 5일째에 70%까지 떨어졌다. 3일째 접종한 경우 94.8%가 생존하여 5일째에 77.8%가 생존하였다. 국제생물방제 협회(IOBC) 기준은 생존율 40%이하의 경우 천적에 약간의 영향을 주는 물질로 평가하는데, 이 기준을 적용할 경우 제충국과 멀구슬은 칠레이리용애에 대해 약간의 영향만 주는 것으로 판단되지만 본 시험의 결과에서는 제충국 보다는 멀구슬이 천적에 미치는 영향이 약간 더 높은 것으로 판단되므로 천적과 함께 살포할 경우에는 반드시 멀구슬을 살포한 이후에 천적을 방사하는 체계처리가 이루어져야 할 것이다(김 등, 2009).

표 75. 칠레이리용애에 대한 제충국 멸구슬의 독성

추출물	처리전 마리수	살충율(%)		
		1일	3일	5일
제충국	30.0	12.9±3.00	22.2±2.28	38.9±1.78
멸구슬	30.0	18.0±4.01	29.6±3.00	45.0±5.06

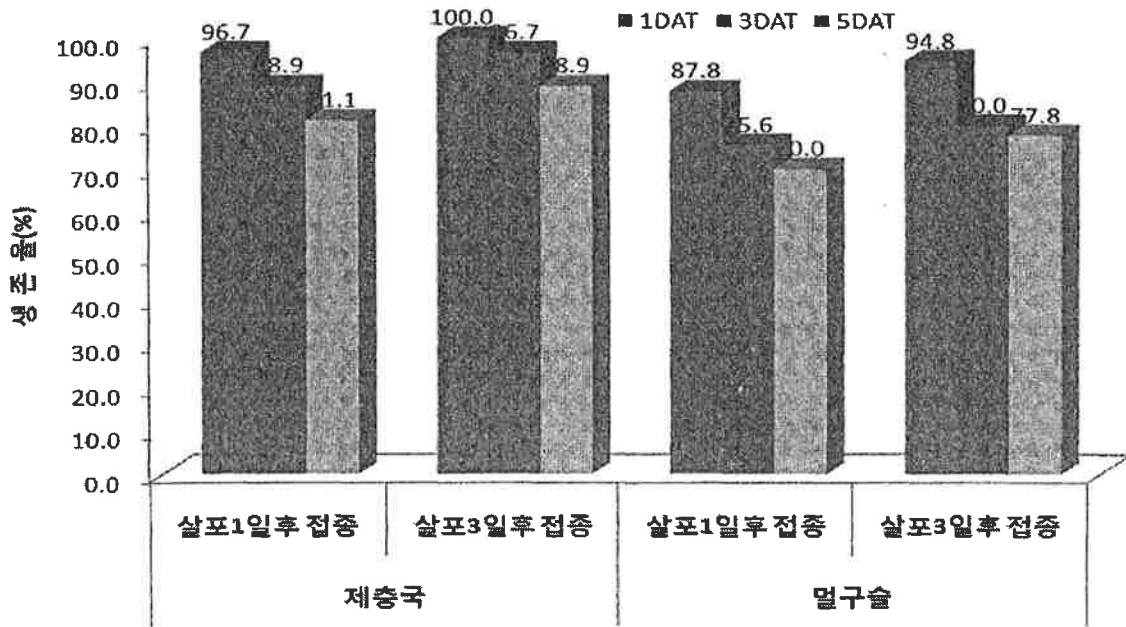


그림 75. 제충국과 멸구슬 잔류에 의한 칠레이리용애의 생존율

표 76. 아쿠레이퍼이리용애에 대한 제충국 멸구슬의 독성

추출물	처리전 마리수	살충율(%)	
		1일	3일
제충국	40.0	25.0±3.33	40.0±2.93
멸구슬	40.0	41.7±8.66	46.7±6.04

표 77. 오이이리용애에 대한 제충국 멸구슬의 독성

추출물	처리전 마리수	살충율(%)	
		1일	3일
제충국	40.0	15.0±4.06	31.7±4.69
멸구슬	40.0	33.3±9.34	46.7±7.29

표 78. 긴털이리응애에 대한 제충국 멀구슬의 독성

추출물	처리전 마리수	살충율(%)	
		1일	3일
제충국	40.0	16.7±5.84	30.0±5.61
멀구슬	40.0	20.0±3.61	35.0±3.01

표 79. 지중해이리응애에 대한 제충국 멀구슬의 독성

추출물	처리전 마리수	살충율(%)	
		1일	3일
제충국	40.0	23.3±1.99	33.3±1.77
멀구슬	40.0	26.7±3.84	40.0±2.93

아큐레이퍼이리응애에 대해서는 1일째에 제충국은 25%, 멀구슬은 41.7%의 살비율을 보였으며 3일째에 40%와 46.7%로 나타나 칠레이리응애보다 감수성이 더 높은 것으로 판단되었다. 오이이리응애 역시 3일째에 제충국과 멀구슬에서 각각 31.7%, 46.7%였으며 긴털이리응애는 30.0%, 35%, 지중해이리응애는 33.3%와 40.0%를 나타내어 이들 이리응애류는 제충국과 멀구슬에 대해 비슷한 감수성을 보여주었다. neem 추출물은 많은 종류의 천적 성충이나 알에는 영향이 없거나 미미하여(Schumutterer, 1997), 긴털이리응애에 대해 20.0%, 점박이응애의 성충 살비율은 97.7%, 부화율은 각각 100%, 52.8%로서 해충에 대한 독성이 더 높다는 보고가 있으며(김 등, 2000), 강 등(2007)은 친환경 농자재가 칠레이리응애에 미치는 영향을 조사하여 독성이 높은 자재 8종과 낮은 자재 10종을 선별하면서 친환경 자재 사용시 칠레이리응애의 독성 평가가 이루어져야한다고 보고한바 있는데, 본 시험에서 이들 이리응애류는 제충국과 멀구슬에 대해 비교적 안전함을 알 수 있었다.

애꽃노린재에 대한 멀구슬과 제충국의 살충율은 1일째에 25.8%, 38.3% 였으며 3일째에 68.2%와 54.2%로 아주 높게 나타났다. 고삼과 창포, 멀구슬과 제충국에 창포를 혼합한 경우 역시 65% 내외의 아주 높은 살충율을 나타내어 애꽃노린재를 방사하는 곳에서 제충국과 멀구슬 사용은 아주 조심해야 할 것이다.

표 80. 애꽃노린재에 대한 제충국 멀구슬의 독성

추출물 종류	처리전 마리수	살충율(%)	
		1일	3일
제충국 80%+유화제 5%	40.0	38.3	54.2
멀구슬 80%+유화제 5%	40.0	25.8	68.2
고삼 80%+유화제 5%	40.0	14.2	65.4
제충국 80%+ 창포 20%	40.0	17.5	64.8
멀구슬 80%+ 창포 20%	40.0	5.0	65.6
창포 에탄올 추출	40.0	8.3	64.0
창포 80%+유화제 10%	40.0	13.3	65.4

표 81. 쌀좁알벌에 대한 제충국 멀구슬의 독성

추출물 종류	머미수	우화율(%)	
		5일	7일
제충국 80%+유화제 5%	320.0	23.2	57.5
멀구슬 80%+유화제 5%	320.0	17.2	53.3
고삼 80%+유화제 5%	320.0	19.8	62.9
제충국 80%+ 창포 20%	320.0	17.8	64.4
멀구슬 80%+ 창포 20%	320.0	19.9	71.0
창포 에탄올 추출	320.0	22.0	64.6
창포 80%+유화제 10%	320.0	19.5	64.6

표 82. 싸리진디벌에 대한 제충국 멀구슬의 독성

추출물	처리전 마리수	우화율(%)		
		1일	3일	5일
제충국	90.0	22.2±1.33	53.3±6.87	54.4±10.71
멀구슬	90.0	12.2±4.65	16.7±4.40	35.6±8.13

표 83. 어비진디벌에 대한 제충국 멀구슬의 독성

추출물종류	머미수	우화율(%)	
		3일	7일
제충국 80%+유화제 5%	90.0	9.5	41.1
멀구슬 80%+유화제 5%	90.0	13.7	28.9
고삼 80%+유화제 5%	90.0	14.0	32.2
제충국 80%+창포 20%	90.0	12.7	45.6
멀구슬 80%+창포 20%	90.0	13.3	46.7
창포 에탄올 추출	90.0	20.1	42.2
창포 80%+유화제 10%	90.0	19.7	43.3
무처리	90.0	55.1	90.2

표 84. 콜레마니진디벌에 대한 제충국 멀구슬의 독성

추출물종류	머미수	우화율(%)	
		3일	7일
제충국 80%+유화제 5%	90.0	9.5	41.1
멀구슬 80%+유화제 5%	90.0	13.7	43.3
고삼 80%+유화제 5%	90.0	11.0	36.7
제충국 80%+창포 20%	90.0	40.0	41.1
멀구슬 80%+창포 20%	90.0	13.7	45.6
창포 에탄올 추출	90.0	2.0	65.6
창포 80%+유화제 10%	90.0	14.7	48.9
무처리	90.0	45.8	95.4

표 85. 황온잠벌에 대한 제충국 멀구슬의 독성

추출물종류	머미수	우화율(%)	
		3일	7일
제충국 80%+유화제 5%	93.0	29.5	41.1
멀구슬 80%+유화제 5%	90.0	23.3	43.3
고삼 80%+유화제 5%	96.0	31.5	32.8
제충국 80%+창포 20%	96.0	20.0	29.0
멀구슬 80%+창포 20%	96.7	29.7	30.8
창포 에탄올 추출	89.3	39.3	44.0
창포 80%+유화제 10%	88.0	40.7	46.2
무처리	90.4	63.1	85.7

쌀좁알벌의 우화율은 제충국과 멀구슬에서 57.5%와 53.3%로 비교적 높았으며 멀구슬과 창포 혼합제품에서는 71.1%의 높은 우화율을 나타내어 기생성 천적에 대해서 이들 추출물의 독성은 높지 않은 것으로 판단된다. 싸리진디벌에서 제충국은 54.4%, 멀구슬은 35.6%의 우화율을 나타내어 멀구슬은 천적과 같이 사용시 주의를 요하였다. 어비진디벌은 제충국은 41.1%, 멀구슬에서 28.9%의 우화율을 나타내어 이들 기생성진디벌은 멀구슬에 대해 감수성이 높은 것으로 나타났다. 그러나 콜레마니진디벌은 제충국과 멀구슬처리시 41.1%와 43.3%로 나타나 어비진디벌이나 싸리진디벌보다는 멀구슬에 대한 감수성이 약한 것으로 나타나 진딧물 방제시에 멀구슬과 콜레마니진디벌을 혼용하여 사용한다면 더욱 높은 방제효과를 가져 올 수 있을 것으로 판단된다. 유 등(2006)은 특정 친환경 자재의 경우 온실가루이좀벌과 콜레마니진디벌에 대해 생존율이 0%이거나 잔효독성도 강하게 나타나므로 식물추출물 제품도 독성영향 평가가 이루어 져야 한다고 언급한 바 있는 것처럼 본 시험에서도 나타난 결과와 같이 고농도 살포시 주의 할 필요가 있다. 황온좀벌은 콜레마니진디벌과 같은 우화율을 나타내었는데 멀구슬을 황온좀벌에 살포한 경우 우화율이 낮아 담배가루이가 발생하는 포장에서 황온좀벌의 방사시에는 반드시 멀구슬 살포 이후 하여야 할 것으로 판단되었다. 온실가루이좀벌은 황온좀벌보다 더 높아 61.8%와 53.3%의 우화율을 보여 이들 추출물에 대해 안전한 것으로 판단된다. 온실가루이좀벌은 폴리브텐이 함유된 친환경농자재를 살포할 경우 우화율이 아주 낮으며 콜레마니진디벌은 무처리에서도 22%의 낮은 우화율을 보인다는 보고(유 등 2006)와 비교할 때 본시험의 기생천적의 우화율은 아주 낮지는 않은 것으로 보인다. 일반적으로 생물농약은 포식성과 기생성 천적에 영향이 적은 것으로 알려져 있는데(Schmutterer & Singh, 1995; Schmutterer 1997, Charleston 등 2005), 기생성 천적인 *Diadegma mollipla*는 두가지 다른 님 제제를 배추에 살포할 경우 각각의 제제를 구별할 수 있으며(Akol 등 2003), 프루텔고치벌은 neem 제제를 배추좀나방이 발생하기 전에 먼저 살포하거나 배추좀나방의 피해를 받은 후에 살포하거나 효과가 비슷하다는 보고(Charleston 등, 2005)가 있어 기생 천적들은 실제 포장에서 이들 추출물에 대해 낮은 독성을 보일 것으로 판단된다.

표 86. 온실가루이좀벌에 대한 제충국 멀구슬의 독성

추출물종류	머미수	우화율(%)	
		3일	7일
제충국 80%+유화제 5%	93.5	39.5	61.8
멀구슬 80%+유화제 5%	95.2	43.7	53.3
고삼 80%+유화제 5%	84.0	43.0	51.3
제충국 80%+ 창포 20%	85.3	40.0	55.9
멀구슬 80%+ 창포 20%	81.3	34.3	41.6
창포 에탄올 추출	77.7	43.3	55.6
창포 80%+유화제 10%	76.7	41.0	54.4
무 처리	95.2	65.8	89.4

마. 시제품 보조제의 살충효과 검증

제충국과 멀구슬의 시제품을 제작하는데 필요한 보조제를 선별하기 위해 보조제의 점박이용애에 대한 살비율과 복숭아혹진딧물에 대한 살충율을 시험한 결과는 표 87와 88이다. NP-7은 점박이용애에 대해 1일, 3일, 5일 제 모두 48.7%의 살비율을 보여 초기에만 살충효과가 있는 것으로 판단되나 시험 자재 중에서는 가장 높은 살비율을 나타냈다. TKS와 80-TW 역시 3일째부터 39.3%와 30.9%의 살비율을 나타내어 이들을 보조제로 사용할 수 있을 것으로 판단되나 살충비누와 카테킨은 9.3%와 8.5%로 낮은 수준이었다. 이와 같은 결과는 복숭아혹진딧물에서도 유사하였으나 80-TW의 살충율이 1일째에 38.6%로 가장 높았다. 따라서 시제품을 제작 시 대상 해충에 따라 보조제의 농도나 종류를 다르게 투입할 필요가 있었다.

표 87. 점박이용애에 대한 시제품 보조제의 살비효과

보조자재	처리전 마리수	살 비 율(%)		
		1일	3일	5일
Tks	87.7	29.0	39.3	39.3
80-TW	89.3	29.7	30.9	30.9
NP-7	93.0	48.7	48.7	48.7
살충비누	146.3	7.4	9.3	9.3
카테킨	94.0	8.5	8.5	8.5

표 88. 복숭아혹진딧물에 대한 시제품 보조제의 살충효과

보조자재	처리전 마리수	살 충 율(%)		
		1일	3일	5일
Tks	126.7	24.2	17.8	6.4
80-TW	78.3	38.6	31.3	24.3
NP-7	72.0	24.3	18.7	7.9
살충비누	107.7	11.4	4.6	-
카테킨	88.7	-	-	-

표 89. 시제품 생산기간별 점박이용애 살충효과

주요성분	생산기간	방제가		
		1일	3일	5일
제충국	12개월	23.7	53.2	65.9
	6개월	24.0	51.6	66.5
	1개월	22.2	54.0	71.7
멀구슬	12개월	57.9	77.6	84.3
	6개월	63.7	74.8	85.6
	1개월	74.5	84.1	90.5

제충국과 멀구슬이 주요 성분으로 되어 있는 시제품을 보관 기간에 따라 살충율의 변화를 확인한 결과 점박이용애의 경우 12개월과 1개월 보관한 제품 모두 65.9~71.7%로 차이가 크지 않았으며 멀구슬은 84.3~90.5%로 약간 차이가 있었다. 그러나 목화진딧물은 반대의 현상이 나타나 제충국은 12개월 보관시 61.4%로 낮지만 1개월 보관 제품은 84.5%로 높았으며 멀구슬은 보관 기간에 관계없이 90% 내외의 살충효과를 보였다. 따라서 이들 시제품은 햇빛에 노출 시키지 않은 이상 최소 12개월은 사용할 수 있을 것으로 판단된다.

표 90. 시제품 생산기간별 목화진딧물 살충효과

주요성분	생산기간	방제가		
		1일	3일	5일
제충국	12개월	36.3	49.2	61.4
	6개월	30.5	52.9	73.8
	1개월	68.7	79.1	84.5
멀구슬	12개월	69.5	80.4	89.5
	6개월	62.5	81.4	90.3
	1개월	55.2	77.3	90.7

4. 결과요약

시중에서 판매하고 있는 제충국 제품을 수집하여 해충에 대한 살충효과 검정 결과, 벼멸구는 70%, 점박이응애 75.5%, 배추좀나방 93.3%, 복숭아혹진딧물 92.3%, 담배거세미나방 80%를 나타냈으나 제품에 따른 살충효과는 해충별로 차이가 많았다.

벼, 배추, 딸기를 대상으로 식물추출물 이용 시제품을 희석농도 50, 100, 200배로 각각 살포하여 3일, 6일, 9일 후의 약해 증상을 조사한 결과 모든 제품에서 50배 희석액에서 1정도의 약해가 나타났다.

멸구슬을 이용한 시제품을 제작할 때는 유화제를 3%만 넣어도 벼멸구에 89.9%의 방제효과가 나타났다. 제충국의 경우 유화제 농도 3~10%에서 76.7~84.4%로 살충율이 높지 않았다.

칠레이리응애에 대한 제충국 멸구슬의 접촉독성은 5일째에 38.9%와 45.0%까지 증가하였다. 잔류독성은 5일째에 제충국은 81.1%, 멸구슬은 70%가 생존하여 천적과 함께 살포할 경우에는 반드시 멸구슬을 살포한 이후에 천적을 방사하는 체계처리가 이루어져야 할 것이다.

아큐레이퍼이리응애는 칠레이리응애보다 감수성이 더 높았으며, 이리응애류인 오이이리응애, 긴털이리응애, 지중해이리응애는 30~46.7%의 살충율로 제충국과 멸구슬에 대해 비슷한 감수성을 보여주었다. 애꽃노린재에 대한 멸구슬과 제충국의 살충율은 3일째에 68.2%와 54.2%로 아주 높게 나타나 애꽃노린재를 방사하는 곳에서 제충국과 멸구슬 사용은 아주 조심해야 할 것이다. 콜레마니진디벌은 감수성이 가장 약한 것으로 나타나 진딧물 방제시에 멸구슬과 콜레마니진디벌을 혼용하여 사용할 수 있었다. 멸구슬을 황온좀벌에 살포한 경우 우화율이 낮아 담배가루이가 발생하는 포장에서 황온좀벌의 방사시에는 반드시 멸구슬 살포 이후 하여야 할 것으로 판단되었다. 온실가루이좀벌은 황온좀벌보다 더 높아 61.8%와 53.3%의 우화율을 보여 이들 추출물에 대해 안전하였다.

제충국과 멸구슬의 시제품을 제작하는데 필요한 보조제 선발자재 중 NP-7은 점박이응애에 대해 48.7% 살충효과를 나타내었으나 보조제에 따른 목화진딧물의 살충율은 80-TW가 38.6%로 나타나 해충에 따라 보조제의 농도나 종류를 다르게 투입할 필요가 있었다. 시제품은 햇빛에 노출 시키지 않은 이상 최소 12개월은 사용할 수 있었다.

5절. 제충국, 멀구슬 추출 시제품 이용 해충 방제 매뉴얼 개발

1. 서언

유기농업 시스템은 해충, 병 및 잡초로 인한 손실을 최소화하는 방식으로 수행되어야 한다. 환경에 잘 적응된 작물과 품종의 이용, 균형된 시비프로그램, 높은 생물적 활성을 지닌 비옥한 토양, 적합한 윤작, 같이 심기, 녹비 등에 초점을 맞추어야 하며, 생육 및 발달은 자연적 방식으로 이루어져야 한다.

잡초, 해충, 병 등은 그들의 발달을 제한하는 억제 재배기술, 예를 들면 적절한 윤작, 녹비, 균형 시비프로그램, 초기 묘상의 준비, 멀칭, 기계적 제어 및 해충 발달주기의 제어 등에 의해 관리되어야 한다. 또한 해충과 해충방제는 해충의 생태적 요구도에 관한 이해를 통해 그를 차단함으로써 조절되어야 한다.

해충, 병 및 잡초 관리를 위해 이용되는 물질은 그 지역의 식물, 동물, 및 미생물로부터 얻어진 것으로 농장에서 준비한 경우에 허용된다. 또한 열처리에 의한 잡초방제 및 해충, 병 및 잡초관리를 위한 물리적 방제는 허용되어진다. 이때 해충과 병을 방제하기 위한 토양의 열소독은 적절한 윤작 또는 토양의 재생이 불가능한 환경에서는 제한되어지나, 인증단체에 의해 경우에 따라 허가될 수 있다.

관행농법 시스템으로부터의 모든 장비는 유기적으로 재배되어지는 지역에 사용되기 전에 깨끗이 세척되어지고, 잔여물이 없어야 하며, 합성 살충제의 사용을 금지하고 있다. 또한 합성 성장조절제의 이용도 금지되며, 합성염료는 유기산물의 외관을 돋보이게 할 목적으로 사용될 수 없다. 뿐만 아니라 유전적으로 변형된 생물체나 산물의 이용은 금지된다.

최근까지 해충의 방제는 유기합성 농약을 위주로 방제가 이루어지고 있으며 이러한 유기합성 농약의 계속적인 사용은 해충의 약제 저항성은 물론 천적상의 파괴, 잠재해충의 key pest화, 인축 독성, 환경오염 등 심각한 문제를 야기하고 있다. 이러한 유기합성 농약 중심의 해충 방제의 부작용을 최소화하기 위하여 해충 종합관리라는 새로운 개념의 전략이 선진 농업국을 중심으로 점진적으로 증대되어 오고 있는 실정이다(Griswold and Trumble, 1985; Greenberg *et al.*, 2001). 최근 FTA 협상 확대로 외국산 농산물의 수입이 증가할것으로 예상됨으로 우리 농산물의 경쟁력 확보를 제고하기 위해서는 친환경적 해충 종합관리가 요구된다. 농림부는 최근 화학비료와 농약사용량을 오는 2004년까지 30%, 2010년까지 50% 줄여나갈 계획이라고 밝혔다. 농림부는 친환경농업의 핵심기술로 지력(地力) 강화를 통해 농작물 생육을 높이고 해충발생을 억제하는 종합관리 시스템(INM, IPM)을 활용, 99년 현재 각각 84만2천t과 2만2천t에 달하는 화학비료, 농약 사용량을 2004년까지 61만4천t, 1만5천t 규모로 줄여나갈 계획을 발표한 바 있다. 더구나 Green Round 협약에 따른 환경 오염의 방지와 자연 생태계의 보호에 적극 동참하는 차원에서 유기합성 농약이 초래하는 부작용을 해소할 수 있는 무공해천연 생물학적 병충해 방제 시스템의 구축이 절실히 요구되고 있어 주요 해충에 대한 포장에서의 방제 체계에 대한 시험을 실시하였다.

2. 재료 및 방법

가. 시제품의 해충별 살충효과

포장 검정에 사용된 시제품은 (주)팜스코리아에서 제작하여 제 3세부과제에서 유묘를 통한 실내검정에서 선발된 제충국+창포, 멀구슬+살충비누, 멀구슬+창포로 만든 제품을 이용하였다. 벼멸구를 대상해충으로 전남농업기술원 친환경연구소 포장에서 구획을 나누어 7월 28일에 사전밀도를 조사하였다. 살포농도는 500배이며 7일, 10일, 14일 간격으로 1, 3회 살포하였다. 각 시험구별 벼멸구 살충효과는 약제 처리 후 5일, 22일, 30일, 38일, 44일에 조사하였으며, 3반복 실시하였다.

배추좀나방을 효과적으로 방제하기 위해 농업기술원 친환경연구소 시험포장에 2008년 8월 29일에 배추를 식재하였으며 정식 1주일부터 1회 살포, 7일 간격 3회살포, 10일 간격 3회 살포, 7일 간격 5회 살포구를 두어 주기적으로 제충국과 멀구슬의 시제품을 살포하였으며, 조사는 살포 1일, 7일, 14일, 21일, 28일, 35일째에 살아있는 배추좀나방의 수를 배추 20포기에서 조사하였다.

나. 벼물바구미에 대한 시제품 입제의 살충효과

벼의 생육 초기 주요해충인 벼물바구미와 굴파리류를 방제하기 위해 (주)팜스코리아에서 입제로 제형화하여 정식하루 전에 유묘상자 당 20g, 40g, 80g씩 살포하고 10일째에 피해엽율을 30주씩 3반복으로 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 시제품의 해충별 포장 살충효과

목화진딧물에 대한 멀구슬과 고삼추출물의 살충율은 2:1의 비율에서 5일째에 85.9%를 나타내었으며 1:1과 1:2 비율에서는 73.2%와 68.5%로 낮게 나타났다. 멀구슬과 창포 혼합물에서는 1:1 비율에서 83.5%, 1:2 비율에서 75.7%, 2:1 비율에서는 58.1%로 나타나 혼합 비율에 따른 살충효과는 큰 차이가 있었다. 이러한 경향은 벼멸구에서도 마찬가지로 나타났으나 벼멸구, 담배저세미나방에서는 예상했던 만큼의 살충효과가 나타나지 않아 벼멸구는 멀구슬:창포 1:1에서 47.9%, 담배저세미나방에서는 멀구슬:고삼 2:1비율에서 25%였다.

표 91. 멀구슬과 추출물 혼합 시제품의 목화진딧물 방제효과

추출물	혼합비율	처리전 마리수	살충율(%)		
			1일	3일	5일
멀구슬+고삼	1:1	179.3	4.5	71.3	73.2
	1:2	193.0	21.2	62.3	68.5
	2:1	178.7	32.1	84.7	85.9
멀구슬+창포	1:1	160.0	42.5	76.0	83.5
	1:2	181.3	29.3	74.1	75.7
	2:1	163.0	31.2	57.4	58.1

표 92. 멀구슬과 추출물 혼합 시제품의 벼멸구 방제효과

추출물	혼합비율	처리전 마리수	살충율(%)		
			1일	3일	5일
멀구슬+고삼	1:1	39.3	11.7	24.0	25.4
	1:2	37.3	9.4	30.4	30.4
	2:1	44.3	16.9	36.4	37.6
멀구슬+창포	1:1	51.3	28.4	42.6	47.9
	1:2	39.0	6.6	24.3	24.3
	2:1	40.3	18.4	37.8	37.8

표 93. 멀구슬과 추출물 혼합 시제품의 담배거세미나방 방제효과

추출물	혼합비율	처리전 마리수	살충율(%)		
			1일	3일	5일
멀구슬+고삼	1:1	20.0	5.0	18.3	18.3
	1:2	20.0	1.7	18.3	20.0
	2:1	20.0	11.7	20.0	25.0
멀구슬+창포	1:1	20.0	1.7	13.3	15.0
	1:2	20.0	11.7	16.7	18.3
	2:1	20.0	15.0	18.3	18.3

표 94. 멀구슬과 추출물 혼합 시제품의 배추좀나방 방제효과

추출물	혼합비율	처리전 마리수	살충율(%)		
			1일	3일	5일
멀구슬+고삼	1:1	20.0	23.3	45.0	50.0
	1:2	20.0	21.7	48.3	51.7
	2:1	20.0	21.7	50.0	58.3
멀구슬+창포	1:1	20.0	16.7	40.0	45.0
	1:2	20.0	15.0	36.7	41.7
	2:1	20.0	25.0	88.3	90.0

배추좀나방의 경우 멀구슬:창포 2:1 비율에서 90%로 아주 높게 나타났으나 다른 혼합 비율에서는 41~58% 내외의 낮은 살충율을 나타내었다. 점박이용애에서는 멀구슬과 고삼 혼합물이 80% 이상의 높은 살충율을 나타냈으며 1:1 비율에서 90.4%로 가장 높았다. 멀구슬과 창포 혼합물에서는 2:1 비율에서 86.5%로 가장 높았으나 1:1과 1:2 비율에서는 70% 이하여서 점박이용애의 방제를 위해서는 멀구슬에 고삼을 추가할 경우 살충효과가 높음을 알 수 있었다.

표 95. 멀구슬과 추출물 혼합 시제품의 점박이용애 방제효과

추출물	혼합비율	처리전 마리수	살충율(%)		
			1일	3일	5일
멀구슬+고삼	1:1	127.7	72.5	87.8	90.4
	1:2	107.7	65.0	70.8	82.7
	2:1	172.3	62.0	74.1	80.0
멀구슬+창포	1:1	133.7	52.0	60.6	69.5
	1:2	128.7	48.5	64.4	65.9
	2:1	133.7	63.5	84.5	86.5

나. 시제품의 포장 방제 체계

제충국과 멀구슬을 이용하여 (주)팜스코리아에서 제작한 시제품을 가지고 유묘검정에서 선발된 제충국+창포, 멀구슬+살충비누, 멀구슬+창포로 만든 시제품을 가지고 살포횟수에 따른 벼멸구의 일자별 생충수를 조사한 결과, 1회 살포에 있어서는 모든 시제품에서 22일 후에는 급격히 밀도가 늘어나는 경향이었으나 3회 살포 시에는 38일 까지 낮은 밀도를 유지하였다. 또한 살포 간격별로는 제충국+창포혼합 추출물은 7일 간격으로 살포한 경우는 3회 살포 후 3주까지 밀도를 억제시키며, 이들 시제품 모두 10일 간격으로 3회 처리한 경우에는 38일째까지 밀도를 억제시켰다. 그러나 14일 간격으로 3회 살포할 때는 살포간격이 길어서 38일 후에는 밀도가 급격히 높아졌다.

표 96. 시제품의 살포횟수별 벼멸구 밀도변화

처리내용	살포 횟수	처리전 마리수	생충수(마리)/20주				
			5일	22일	31일	38일	43일
제충국+창포	1	60.2	2.3	35.5	48.0	59.0	187.9
	3	58.3	0.3	16.2	27.4	5.3	89.7
멀구슬+살충비누	1	57.3	2.2	46.4	51.0	46.3	178.9
	3	57.8	0.6	39.0	17.8	1.0	72.7
멀구슬+창포	1	65.4	1.2	24.1	45.1	49.6	110.3
	3	58.8	0.6	31.7	20.0	6.4	102.5
무처리		56.3	54.3	49.7	54.7	47.7	160.7

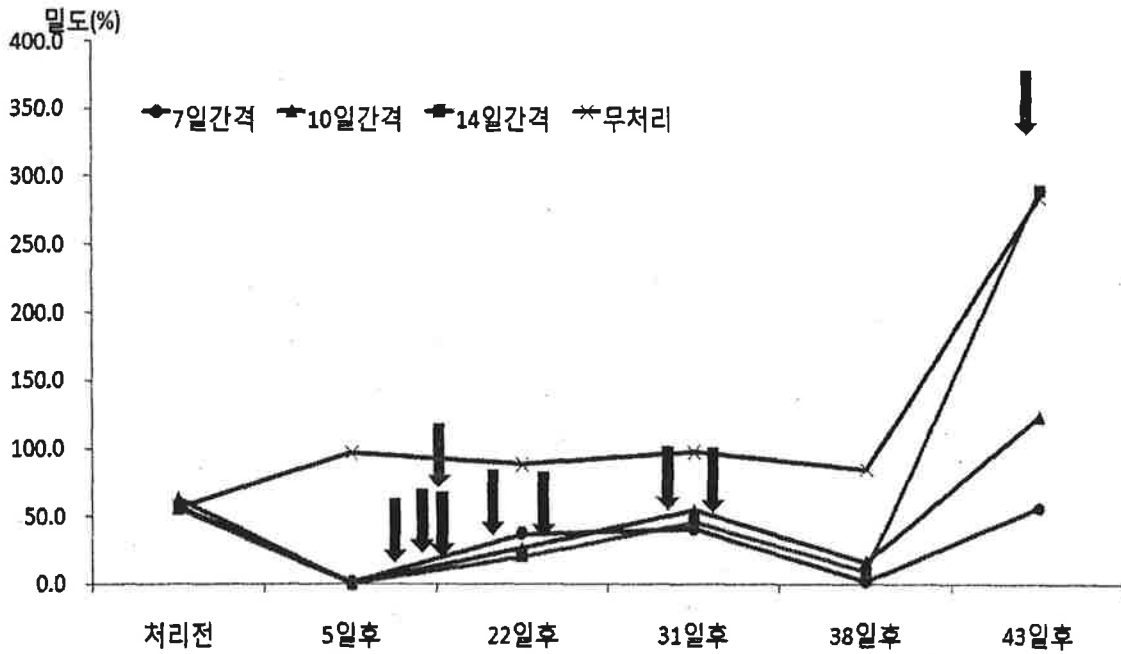


그림 76. 제충국+창포 혼합 시제품에 의한 버멸구 밀도 변화

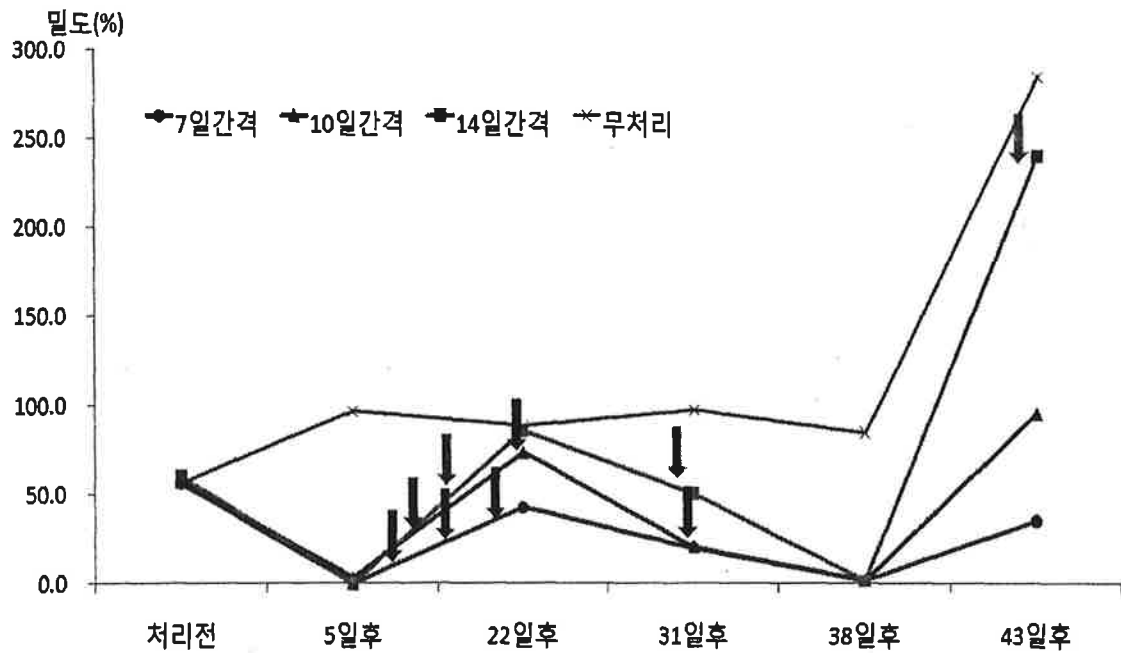


그림 77. 멀구슬+살충비누 혼합 시제품에 의한 버멸구 밀도 변화

멀구슬+살충비누와 멀구슬+창포를 혼합한 시제품에서도 제충국에 창포를 혼합한 결과와 비슷하게 1주일 간격으로 3회 살포한 경우가 밀도를 낮추어 주는데 효과가 있었다.

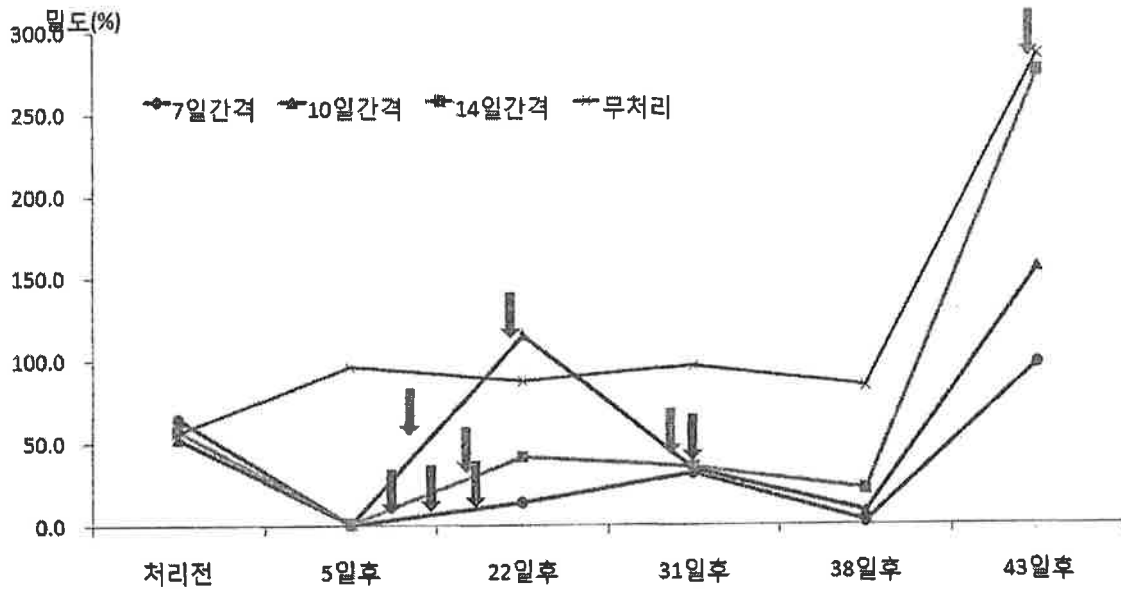


그림 78. 멀구슬+창포 시제품에 의한 버벌구 밀도 변화

제충국과 멀구슬 추출 시제품을 가지고 살포 31일 후의 버벌구 방제효과를 조사한 결과 멀구슬에 살충비누를 혼합한 시제품에서 7일과 10일 간격으로 살포한 때 80% 이상의 효과를 보였으나 14일 간격은 60% 이하로 낮아져 최소한 7~10일 간격으로 3회를 살포해야 버벌구의 밀도를 억제할 수 있을 것으로 판단된다. 멀구슬에 창포를 혼합한 경우에는 7일 간격으로 살포한 때 80% 이상의 효과를 보였으나 10일과 14일에서는 약간 떨어졌다. 제충국에 창포를 혼합한 시제품에서는 살포간격에 관계없이 방제가가 다른 시제품에 비하여 떨어졌다.

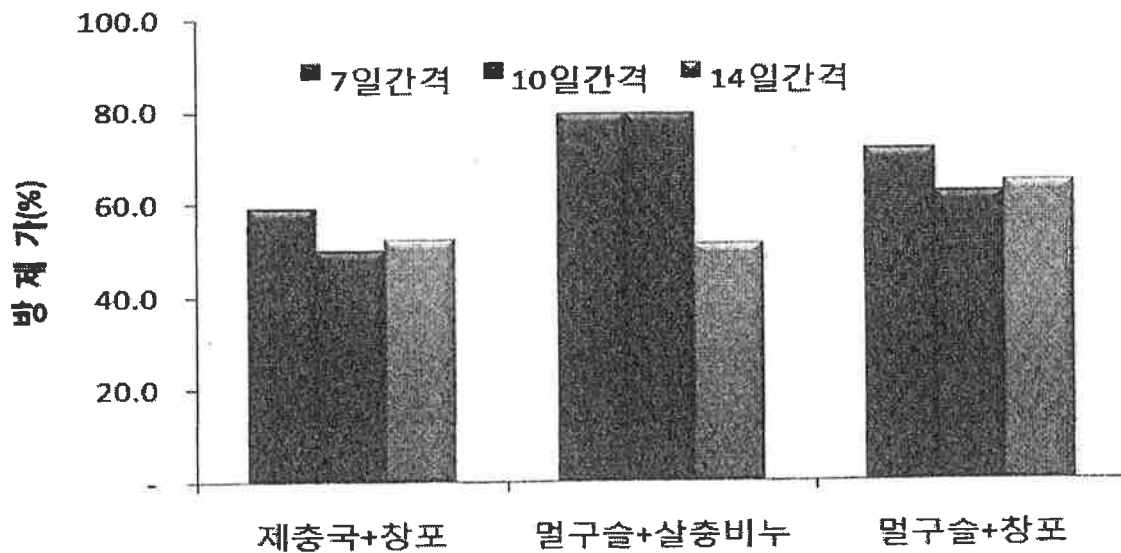


그림 79. 제충국과 멀구슬 살포 31일 후의 버벌구 방제효과

제충국과 유화제 혼합 시제품의 배추좀나방에 대한 살충율을 검정한 결과, 1회 살포시에는 1일째에 51.1%로 낮았으며 7일 이후에도 밀도가 억제되지 못하고 21일째부터는 서서히 떨어져서 34일째에는 36.7%까지 낮아졌다. 7일 간격으로 3회 살포한 경우 초기의 밀도 억제는 낮았지만 21일째에는 91.1%까지 올라가 효과를 보여 주었으며 28일째에 98.9%로 밀도가 억제되었으나 이후 새로운 유충의 발생으로 살충율이 서서히 떨어지기 시작하였다. 10일 간격으로 살포한 경우 살포 간격이 너무 커서 살충율은 서서히 증가하지만 효과적이지 못하여 34일째에 84.4%를 나타내었다. 이러한 상황에서는 이미 배추의 피해가 많이 나타나 상품 가치가 떨어지므로 효과적인 살포방법으로 볼 수 없었다. 7일 간격으로 5회 살포하면 살충율이 서서히 증가하여 34일째에 100%를 나타낸다. 그러나 이 방법은 살포 횟수가 많기 때문에 방제비용이 많이 들게 되어 농가에서 사용하도록 추천하기에는 무리가 있을 것으로 판단된다. 따라서 21일째의 살충율로 보았을 때 제충국은 7일 간격 3회 살포하는 것이 경제적인 측면에서 타당할 것으로 판단되었다. 배추좀나방은 한방식물 추출물 중에 누리장나무, 거문누리장나무, 목향, 우방자, 인진, 전호, 백지, 현호색 등에 대해 유충의 직접 독성보다는 섭식저해활성에 의한 살충효과가 높은 편이다(권 등, 1994). 그러나 제충국은 섭식저해보다는 직접 접촉에 의한 녹다운(Knock down)에 의해 살충효과가 나타나기 때문에 (Head, 1966), 제충국을 효과적으로 활용하기 위해서는 주 성분의 농도를 높일 수 있는 추출 방법 개발이 필요하겠다.

표 97. 제충국과 유화제 혼합 시제품의 살포방법에 따른 배추좀나방 방제효과

살포횟수 및 간격	처리전 마리수	살충율(%)					
		1일	7일	14일	21일	28일	34일
1회	30.0	51.1	55.6	55.6	50.8	38.7	36.7
3회 7일	30.0	46.7	48.9	73.3	91.1	98.9	91.1
3회 10일	30.0	44.4	46.7	48.9	65.6	72.2	84.4
5회 7일	30.0	44.4	46.7	71.1	90.0	92.2	100.0

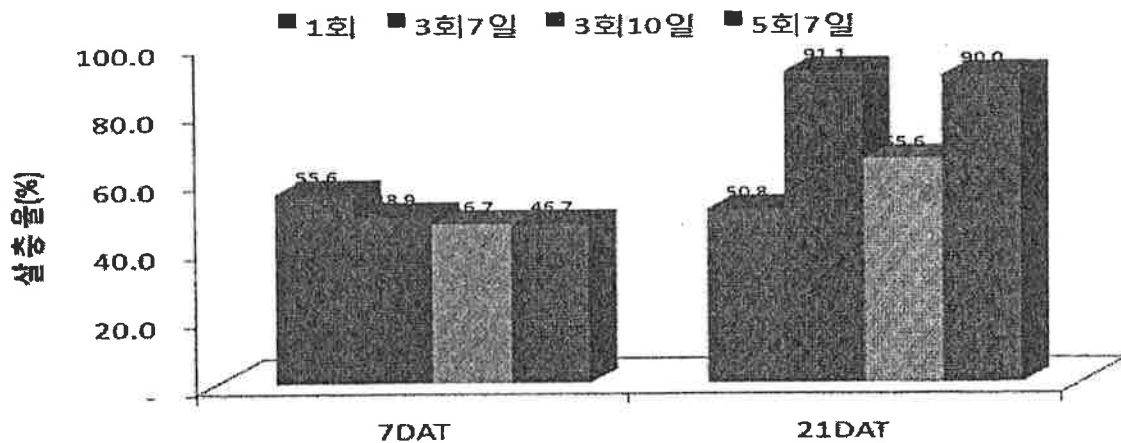


그림 80. 제충국 살포횟수 및 간격에 따른 배추좀나방의 살충율 변화

표 98. 멀구슬과 유화제 혼합 시제품의 살포방법에 따른 배추좀나방 방제효과

살포횟수 및 간격	처리전 마리수	살충율(%)					
		1일	7일	14일	21일	28일	34일
1회	30.0	70.0	96.7	96.7	86.7	75.6	65.5
3회 7일	30.0	73.3	96.7	100.0	100.0	100.0	84.7
3회 10일	30.0	73.3	96.7	97.8	97.8	100.0	95.4
5회 7일	30.0	74.4	96.7	100.0	100.0	100.0	100.0

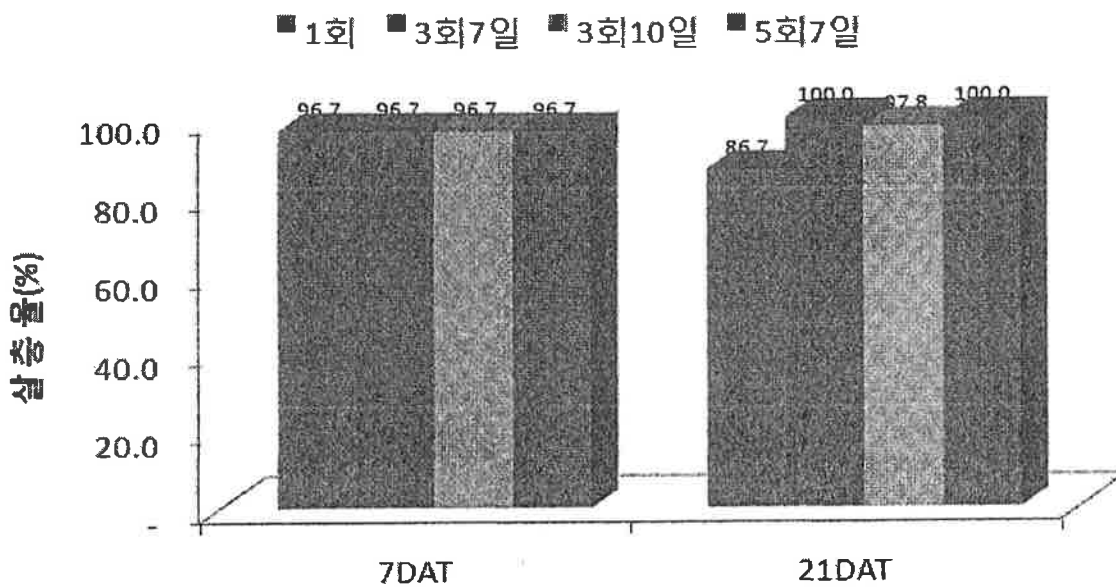


그림 81. 멀구슬 살포횟수 및 간격에 따른 배추좀나방의 살충율 변화

멀구슬과 유화제 혼합 시제품의 배추좀나방 방제효과를 보면, 멀구슬을 살포하면 1일째에 70%이상의 살충율을 나타내었다. 1회만 살포한 경우 7일째와 14일째까지 96.7%의 높은 살충율을 보여 주었으며 이후 약효가 떨어져 86.7%, 75.6%, 65.5%까지 지속적으로 하락하였다. 7일 간격으로 3회 살포할 경우 14일째부터 100%의 살충율을 나타내어 28일째까지 100%를 유지하였다. 10일 간격으로 살포한 경우에도 7일째부터 살충율이 올라가기 시작하여 28일째에 100%를 나타내었다. 34일째에는 95.4%로 약간 내려갔으나 7일 간격으로 살포시 84.7%보다는 높게 나타났다. 5회 살포 시에 7일 이후 34일째까지 100%의 살충율을 나타내어 가장 우수하였다. 멀구슬 처리 역시 21일째를 기준으로 7일 간격 3회 살포나 5회 살포가 같은 결과를 보이기 때문에 약제 저항성 유발 등을 고려하여 3회만 살포하는 방법을 추천하고자 한다. 박 등(2008)은 식물 추출물 중에 배추좀나방에 대해 살충효과가 50% 이상인 것은 고추씨와 황련이라고 보고하였는데 제충국과 멀구슬은 다른 추출물에 비해 살충효과가 더 높은 것으로 판단되며 이들을 친환경 재배 농가에 제공한다면 많은 도움을 줄 수 있을 것으로 보인다.

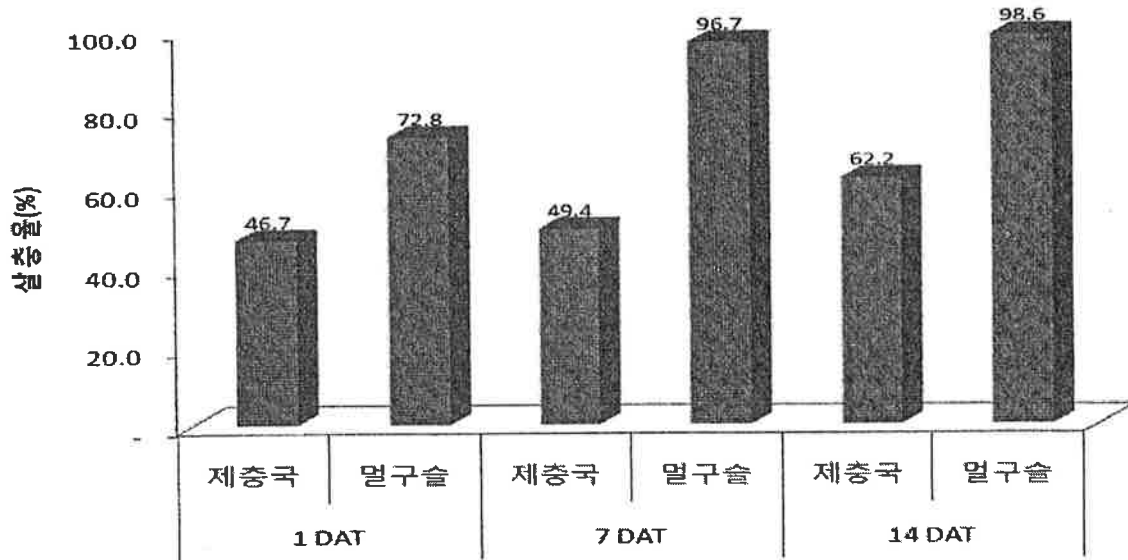


그림 82. 제충국과 멀구슬의 배추좀나방에 대한 초기 살충율 비교

제충국과 멀구슬의 배추좀나방에 대한 초기 살충율을 보면, 제충국은 1일째에 46.7%, 7일째에 49.4%, 14일째에 62.2%로 초기의 살충율이 높지 않았다. 반면 멀구슬의 경우 1일째부터 72.8%로 높았으며 7일째에는 96.7%까지 올라갔다. 김 등(2009)은 딸기 점박이용애를 방제하기 위해서는 제충국을 먼저 살포하면 15일 이후 밀도가 다시 증가하며, 멀구슬을 먼저 살포하면 초기에 점박이용애의 밀도가 급격히 떨어져 30일째까지 낮은 밀도가 유지되므로 멀구슬을 먼저 살포하고 제충국이나 멀구슬을 교호로 1회 더 살포하는 처리가 효과적이라고 보고한바 있어, 본 시험에서도 배추좀나방을 방제하기 위해서는 멀구슬을 먼저 살포하고 이후 제충국을 살포하는 체계가 바람직할 것으로 판단된다.

표 99. 고삼과 유화제 혼합 시제품의 살포방법에 따른 배추좀나방 방제효과

살포횟수 및 간격	처리전 마리수	살충율(%)					
		1일	7일	14일	21일	28일	34일
1회	30.0	37.8	37.8	30.5	30.1	28.8	27.5
3회 7일	30.0	35.6	48.9	54.4	72.2	85.6	80.1
3회 10일	30.0	36.7	40.0	40.0	56.7	72.2	82.2
5회 7일	30.0	33.3	35.6	54.4	66.7	85.6	97.8

고삼을 단독으로 살포할 경우, 1회 살포시 1일째에 37.8%로 아주 낮았는데 이후 약효가 떨어지면서 점점 떨어졌다. 7일 간격으로 살포한 경우에 21일째에 72.2%로 살충율이 나왔으나 다른 추출물에 비해 높지는 않았다.

표 100. 제충국과 고삼과 유화제 혼합 시제품의 살포방법에 따른 배추좀나방 방제효과

살포횟수 및 간격	처리전 마리수	살충율(%)					
		1일	7일	14일	21일	28일	34일
1회	30.0	46.7	46.7	48.9	40.5	40.1	38.1
3회 7일	30.0	41.1	41.0	58.9	71.1	81.1	70.4
3회 10일	30.0	41.1	41.1	41.1	65.6	75.6	83.5
5회 7일	30.0	33.3	33.3	46.7	75.6	80.0	95.6

제충국에 고삼을 혼합한 경우 기대했던 만큼의 상승효과가 나타나지 않았다. 1회 살포시에 1일째에 46.7%의 살충율에서 크게 벗어나지 못하고 14일째에 48.9%를 기점으로 34일째에는 38.1%까지 떨어졌다. 7일 간격 3회 살포한 경우 21일째에 71.1%로 높았으며 28일째에 81.1%까지 상승하지만 34일째에는 다시 70.4%로 하락하였다. 10일 간격 3회 살포의 경우 14일까지 41.1%로 살충율이 아주 낮았다. 7일 간격으로 5회 살포하면 14일째부터 살충율이 증가하여 34일째에 95.6%까지 올라갔다. 그러나 살충율의 증가 속도가 너무 늦어 효과적인 방제를 하기에는 미흡하다는 판단을 하였다.

표 101. 멀구슬과 고삼과 유화제 혼합 시제품의 살포방법에 따른 배추좀나방 방제효과

살포횟수 및 간격	처리전 마리수	살충율(%)					
		1일	7일	14일	21일	28일	34일
1회	30.0	89.3	96.7	100.0	90.4	88.4	81.0
3회 7일	30.0	94.4	100.0	100.0	100.0	100.0	94.1
3회 10일	30.0	94.4	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
5회 7일	30.0	91.1	94.4	100.0	100.0	100.0	100.0

멀구슬과 고삼을 혼합하여 살포하면 초기부터 높은 상승효과를 보였다. 1일째에 89.3%~94.4%까지 살충율이 증가하였으며 모든 처리구에서 7일째에 94.4% 이상 100%까지 살충율을 나타내었다. 따라서 배추좀나방을 방제하기 위해서는 멀구슬 단독으로 제품화하거나 또는 멀구슬에 고삼을 혼합함으로써 우수한 친환경 농자재가 될 수 있을 것으로 판단된다.

표 102. 창포와 유화제 혼합 시제품의 살포방법에 따른 배추좀나방 방제효과

살포횟수 및 간격	처리전 마리수	살충율(%)					
		1일	7일	14일	21일	28일	34일
1회	30.0	18.9	18.9	18.9	15.4	13.4	12.2
3회 7일	30.0	23.3	26.7	48.9	58.9	67.8	60.1
3회 10일	30.0	15.6	18.9	20.0	31.1	43.3	52.2
5회 7일	30.0	22.2	32.2	53.3	64.4	82.2	93.3

표 103. 창포, 효력증진제와 유화제 혼합 시제품의 살포방법에 따른 배추좀나방 방제효과

살포횟수 및 간격	처리전 마리수	살충율(%)					
		1일	7일	14일	21일	28일	34일
1회	30.0	14.4	14.4	14.4	26.7	15.6	15.6
3회 7일	30.0	23.3	23.3	37.8	58.9	50.4	45.1
3회 10일	30.0	23.3	23.3	25.6	47.8	47.8	60.0
5회 7일	30.0	14.4	14.4	27.8	63.3	63.3	73.3

창포에 대한 배추좀나방의 방제효과는 그리 높지 않아 1일째에 18.9%~23.3%의 낮은 살충율을 나타내었다. 이러한 경향은 14일, 21일째까지 지속되어 단독으로는 사용하기 어려울 것으로 판단된다. 창포에 효력증진제를 추가하여도 결과는 마찬가지로 나타났다.

표 104. 제충국과 창포와 유화제 혼합 시제품의 살포방법에 따른 배추좀나방 방제효과

살포횟수 및 간격	처리전 마리수	살충율(%)					
		1일	7일	14일	21일	28일	34일
1회	30.0	22.2	30.0	33.3	30.1	29.8	29.8
3회 7일	30.0	31.1	36.7	57.8	74.4	85.6	80.0
3회 10일	30.0	37.8	40.0	40.0	55.6	68.9	82.2
5회 7일	30.0	30.0	33.3	56.7	70.0	86.7	96.7

제충국에 창포를 혼합한 제품 역시 고삼을 혼합한 시제품과 마찬가지로 뚜렷한 상승효과를 볼 수 없었다. 그러나 멀구슬과 혼합한 경우에는 고삼을 혼합한 제품보다 살충율이 약간 떨어졌지만 멀구슬 단독 처리보다는 높게 나타났다. 처리 1일째에 88%이상으로 단독처리시

74% 보다 10% 이상의 살충효과가 있었으며 7일 간격 3회 처리시 14일째부터 98.9%의 살충율을 보이고 21일째에는 100%를 나타냈다. 배추좀나방을 neem 추출물 제품에 노출 시킬 경우 산란 기피 효과는 없으며 살충효과는 70~74% 정도이며 섭식기피 효과가 빠르게 나타난다고 보고되어 있으며(Liang 등, 2002), 황 등(2009)도 멀구슬과 고삼을 혼합한 제품이 배추좀나방에 대해 95% 이상의 높은 살충력을 보인다고 보고한바 있어, 배추좀나방 방제를 위해서는 neem과 비슷한 살충 성분이 있는 멀구슬을 이용하는 것이 바람직할 것으로 보인다. 따라서 7일 간격으로 3회 처리하는 경우 멀구슬 단독으로 제품을 만들 수도 있으며 이에 더하여 고삼이나 창포를 혼합함으로써 더욱 우수한 농자제가 될 수 있음을 알 수 있었다.

표 105. 멀구슬과 창포와 유화제 혼합 시제품의 살포방법에 따른 배추좀나방 방제효과

살포횟수 및 간격	처리전 마리수	살충율(%)					
		1일	7일	14일	21일	28일	34일
1회	30.0	88.9	96.7	96.7	90.4	88.4	80.1
3회 7일	30.0	88.9	90.0	98.9	100.0	100.0	94.5
3회 10일	30.0	87.8	98.9	98.9	100.0	100.0	100.0
5회 7일	30.0	88.2	96.7	100.0	100.0	100.0	100.0

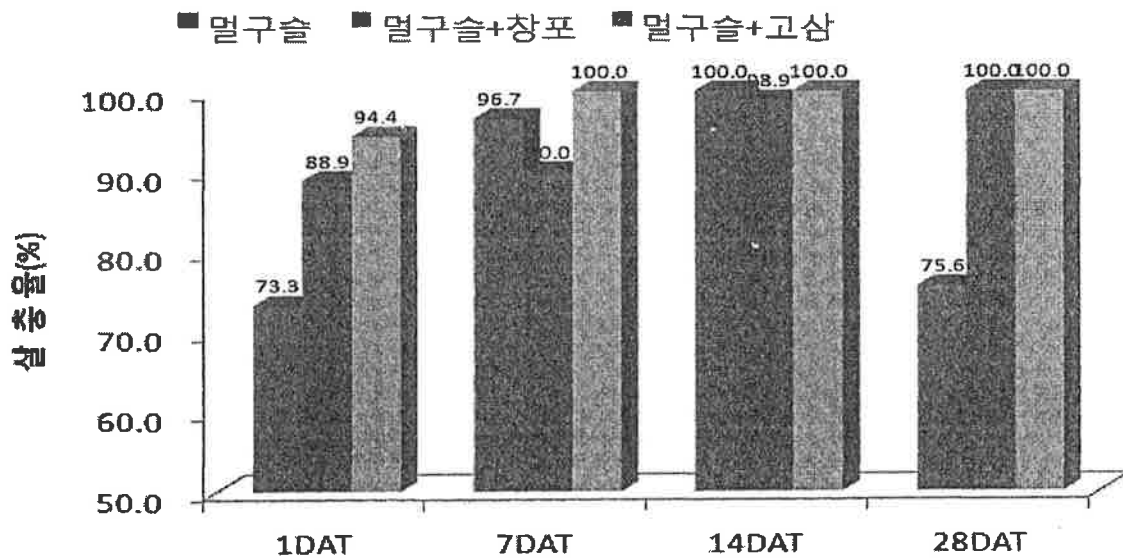


그림 83. 멀구슬과 혼합시제품의 배추좀나방에 대한 살충율 변화

다. 벼물바구미에 대한 시제품 입제의 살충효과

벼물바구미에 대한 제충국과 멀구슬 입제의 살충효과는 표 106과 같다. 제충국을 200배로 처리한 경우 벼 육묘상자 당 80g 처리구에서 11.7%로 가장 낮은 피해율을 나타내었다.

제충국을 300배로 처리한 경우 20g에서는 28.3%, 40g에서는 25.6%, 80g에서는 16.1%의 피해엽율을 보였다. 따라서 제충국을 입제로 제형화 하기 위해서는 200배로 제작하여 상자 당 80g은 처리하여야 효과적이며 방제가는 77.1이 되었다. 멀구슬 입제는 200배로 희석하여 20g, 40g, 80g 처리시 각각 9.3, 4.7, 2.2%의 낮은 피해엽율을 나타냈다. 또한 300배 희석제에서도 20g에서는 17.7%로 높게 나타났으나 40g과 80g 처리에서는 8.3%와 4.6%로 낮게 나타났다. 방제가로 보아도 멀구슬 300배 80g 처리구에서 81.3, 200배 희석의 40g과 80g 처리구에서 각각 88.4와 94.4로 아주 높게 나타나 이러한 결과를 바탕으로 벼물바구미 방제용 입제 제형화를 하였다.

표 106. 벼물바구미에 대한 제충국과 멀구슬 입제의 살충효과

입제 농도	반 복	살포약량 및 피해엽율		
		20g	40g	80g
제충국 200배	1	17.9	18.7	10.3
	2	23.7	20.6	10.8
	3	26.3	14.9	14.1
	평균	22.6	18.0	11.7
제충국 300배	1	22.6	23.4	15.4
	2	32.3	30.6	14.8
	3	30.1	22.6	18.3
	평균	28.3	25.6	16.1
멀구슬 200배	1	8.6	6.1	0.0
	2	7.7	3.6	2.8
	3	11.6	4.5	3.8
	평균	9.3	4.7	2.2
멀구슬 300배	1	18.8	6.2	5.6
	2	21.5	9.0	5.3
	3	12.6	9.5	3.1
	평균	17.7	8.3	4.6
무처리	42.4	45.8	40.5	40.9

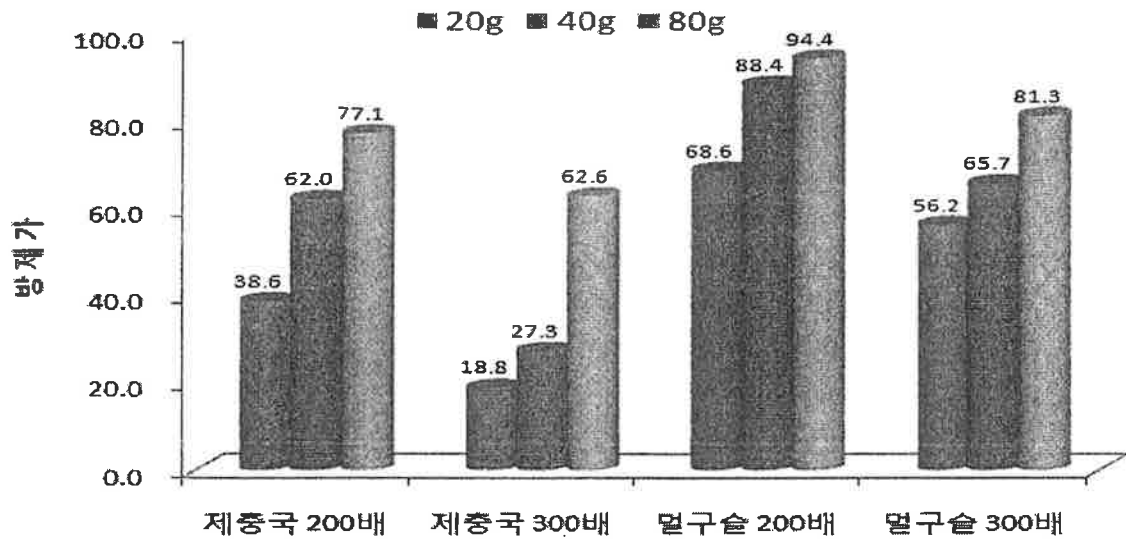


그림 84. 제충국 멀구슬 입제의 벼물바구미에 대한 방제가

표 107. 굴파리류에 대한 제충국과 멀구슬 입제의 살충효과

입제 농도	반 복	살포약량 및 피해엽율		
		20g	40g	80g
제충국 200배	1	16.8	6.9	2.6
	2	12.2	11.4	7.0
	3	13.0	7.7	6.0
	평균.	14.0	8.7	5.2
제충국 300배	1	19.6	15.8	6.3
	2	18.1	17.4	11.0
	3	17.9	16.6	8.3
	평균.	18.5	16.6	8.5
멀구슬 200배	1	5.0	2.8	0.0
	2	4.8	1.8	0.0
	3	11.7	3.4	3.8
	평균.	7.2	2.7	1.3
멀구슬 300배	1	10.1	8.5	4.7
	2	9.7	7.1	4.9
	3	10.2	7.9	3.3
	평균.	10.0	7.8	4.3
무처리	22.8	23.9	20.7	23.8

굴파리류에 대한 제충국과 멀구슬 입제의 방제효과를 보면, 제충국 200배 희석 20g 처리에서는 14.0%의 피해엽율을 나타내었으며 40g은 8.7%, 80g은 5.2%로 낮게 나타났다. 300배 희석액의 20g과 40g 처리에서는 각각 18.5와 16.6%로 높은 피해엽율을 보였으며 80g에서는 8.5%로 이 수치는 200배 40g의 결과와 유사하였다. 멀구슬 입제의 200배 희석에서는 피해

엽율이 아주 낮아 40g과 80g 처리에서는 2.7%와 1.3%의 낮은 피해를 보였다. 300배 역시 10.0%, 7.8%, 4.3%로 제충국 200배 희석액보다 더 낮게 나타났다. 방제가에서도 200배 80g에서는 72.4이지만 300배 40g은 80.5로 월등히 높으며 200배 20g도 78.1로 제충국입제 처리보다 높기 때문에 굴파리류의 방제에는 벼물바구미와 마찬가지로 멀구슬을 이용하는 것이 좋을 것으로 판단된다.

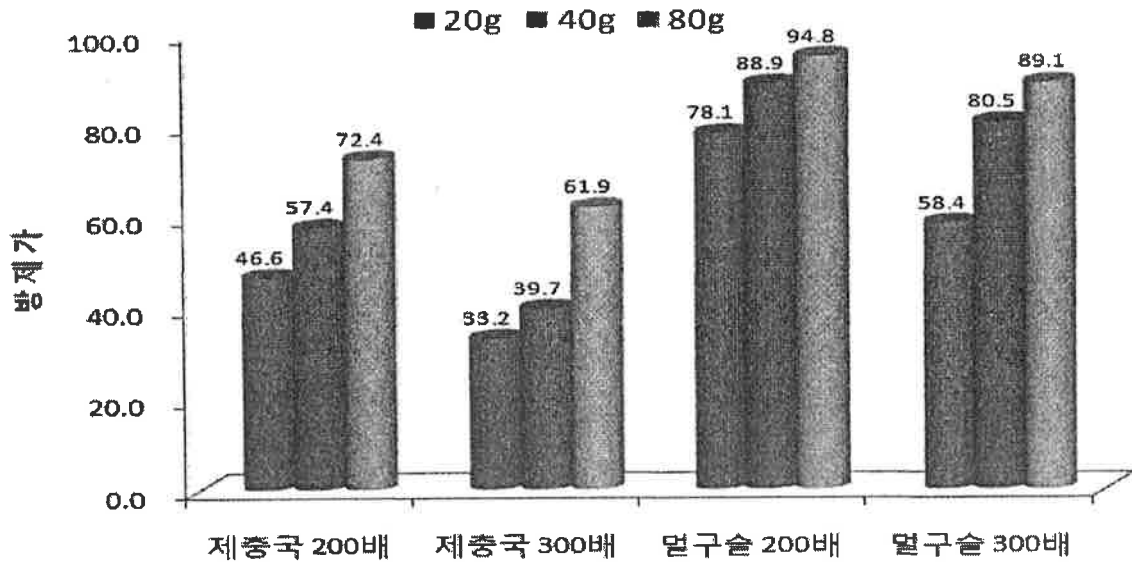


그림 85. 제충국 멀구슬 입제의 굴파리류에 대한 방제가

표 108. 입제제형의 성분

주요성분	주요성분	생 산 방 법		
		제형	중량제	비고
제충국	7	조립식	Bentonite+Talc	붕괴형(PE)
	7	흡착식	Zeolite	비붕괴형(PS)
멀구슬	7	조립식	Bentonite+Talc	붕괴형(ME)
	7	흡착식	Zeolite	비붕괴형(MS7)
	10	흡착식	Zeolite	붕괴형(MS10)

표 109. 제충국, 멀구슬 입제 제형의 점박이용애에 대한 살충율(7일)

자재명	처리전 마리수	살 충 율(%)		
		3일	5일	10일
PS	30.0	18.9	40.0	55.6
PE	30.0	33.3	53.3	61.1
MS	30.0	25.6	44.4	52.2
ME7	30.0	16.7	48.9	65.6
ME10	30.0	33.3	62.2	76.7

멀구슬과 제충국 입제를 시제품화 하여 점박이용애에 대한 살충효과를 조사하여본 결과 점박이용애가 발생하기 7일전과 3일전에는 제충국 주성분이 들어 있는 PE의 경우 61.1%와 74.4%의 방제효과가 있었으며 멀구슬 주성분의 경우 ME10에서 각각 76.7%와 71.1%로 두 추출물 모두 비슷한 방제가를 나타내었다. 그러나 1일전에 혼화처리한 경우 제충국추출물 입제는 62.2%와 65.6%였으며 멀구슬 역시 64.4%와 67.1%로 나타났으나 멀구슬의 성분이 10%로 첨가된 ME10은 85.6%로 다른 처리에 비해 월등히 높은 살충효과를 나타내어 ME10을 시제품으로 만드는게 타당하다는 결론을 얻었으며 처리 당일 점박이용애가 발생할 경우 1일 전이나 3, 7일 전보다 약효가 크지 않기 때문에 이 시제품은 최소 1일전에 살포하는 것이 효과를 볼 수 있다는 결론을 얻었다.

표 110. 제충국, 멀구슬 입제 제형의 점박이용애에 대한 살충율(3일)

자재명	처리전 마리수	살충율(%)		
		3일	5일	10일
PS	30.0	3.3	34.4	56.7
PE	30.0	27.8	56.7	74.4
MS	30.0	2.2	30.0	57.8
ME7	30.0	10.0	44.4	71.1
ME10	30.0	33.3	48.9	71.1

표 111. 제충국, 멀구슬 입제 제형의 점박이용애에 대한 살충율(1일)

자재명	처리전 마리수	살충율(%)		
		3일	5일	10일
PS	30.0	14.4	53.3	65.6
PE	30.0	35.6	56.7	62.2
MS	30.0	6.7	43.3	64.4
ME7	30.0	11.1	40.0	67.1
ME10	30.0	25.6	66.7	85.6

표 112. 제충국, 멀구슬 입제 제형의 점박이용애에 대한 살충율(당일)

자재명	처리전 마리수	살충율(%)		
		3일	5일	10일
PS	30.0	12.2	32.2	45.6
PE	30.0	15.6	45.6	66.7
MS	30.0	15.6	35.6	56.7
ME7	30.0	2.2	21.1	45.6
ME10	30.0	8.9	35.6	55.6

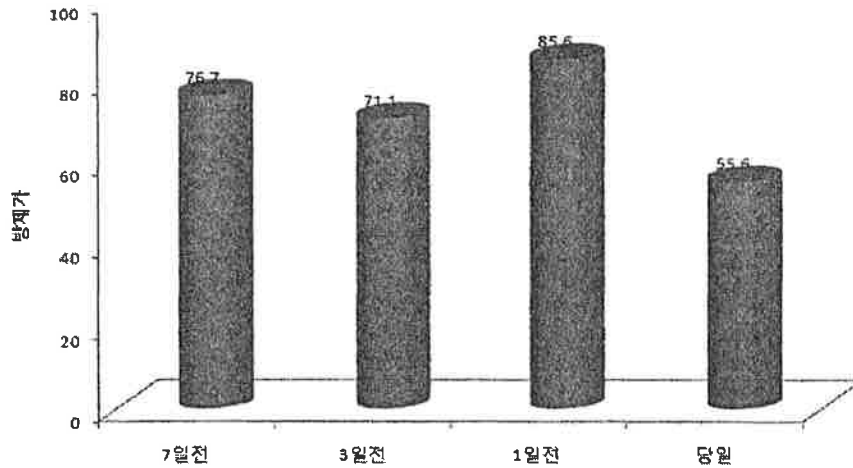


그림 86. 멀구슬 ME10 입제의 처리시기별 접박이용애의 방제효과

라. 딸기 병해충 동시 방제를 위한 포장 시험

유묘검정결과 멀구슬 주성분이 함유된 FKS가 전체적으로 효과가 좋아 포장 검정용 실시하였다. 포장검정은 1주간격으로 3회 연속 살포하였으며 매주 살포하기 전에 밀도를 조사하고 이후에 시제품을 살포하였다. 목화진딧물에 대해 500배로 3회 살포한 경우 1일째의 방제효과는 높지 않았으나 2회 살포 이후인 9일째부터는 방제가가 노게 나타나 14일째에 FKS-5는 91.2%까지 방제가 되었으며 21일째에는 95.2%까지 방제가 되었다. FKS-1, 2 역시 21일째에 90% 이상이었으며 FKS-3을 제외하고 모두 80% 이상의 방제효과를 보여 목화진딧물을 방제하기 위해서는 최소 3회 살포하여야 함을 알 수 있었다. 1,000배로 살포한 경우에는 FKS-7, 8은 21일째까지 77.4%, 74.9%로 어느 정도 방제를 하였으나 다른 처리에서는 방제가가 현저히 떨어져 이들 시제품의 살포농도는 최소 500배는 되어야 할 것으로 판단되었다.

표 113. 딸기 포장에서 목화진딧물에 대한 1차 시제품의 방제효과(500배)

시제품	방 제 가				
	1일	7일	9일	14일	21일
FKS-1	32.9	63.8	70.6	85.0	92.2
FKS-2	44.4	49.4	54.4	83.9	90.0
FKS-3	15.0	37.0	38.8	44.3	57.6
FKS-4	26.2	66.2	67.1	84.3	83.1
FKS-5	24.5	59.7	68.8	91.2	95.2
FKS-6	25.0	70.0	75.0	75.0	80.0
FKS-7	26.9	68.1	69.8	77.3	81.3
FKS-8	36.8	42.7	46.4	61.8	80.9
FKS-9	21.8	60.8	64.2	62.0	84.8

표 114. 딸기 포장에서 목화진딧물에 대한 1차 시제품의 방제효과(1000배)

시제품	방 제 가				
	1일	7일	9일	14일	21일
FKS-1	0.8	-	-	9.9	34.1
FKS-2	20.4	-	24.7	34.8	54.9
FKS-3	6.2	-	16.0	21.7	23.4
FKS-4	19.7	19.5	34.2	34.0	40.8
FKS-5	16.4	10.4	34.0	52.9	66.1
FKS-6	50.0	60.0	60.0	70.0	64.0
FKS-7	0.3	12.8	19.3	37.2	50.1
FKS-8	51.3	66.5	73.3	72.2	77.4
FKS-9	49.1	41.4	46.3	60.6	74.9

표 115. 딸기 포장에서 점박이용애에 대한 1차 시제품의 방제효과(500배)

시제품	방 제 가				
	1일	7일	9일	14일	21일
FKS-1	58.7	75.9	75.6	86.5	92.2
FKS-2	82.8	84.5	86.1	94.9	96.7
FKS-3	65.2	54.5	56.6	68.4	76.8
FKS-4	66.3	83.5	84.3	92.0	92.7
FKS-5	81.1	90.7	92.6	97.7	98.7
FKS-6	25.0	70.0	75.0	75.0	80.0
FKS-7	57.9	82.4	83.3	87.4	89.5
FKS-8	59.2	62.6	65.0	75.0	87.7
FKS-9	55.0	78.5	80.6	79.7	91.4

점박이용애에 대해서 500배로 3회 살포한 경우 FKS-5는 7일째부터 90.7%의 높은 방제 효과를 보이며 21일째까지 95% 이상의 높은 살충효과를 보여주었다. 목화진딧물과 마찬가지로 FKS-3은 21일째에 76.8%로 방제효과가 떨어졌으며 다른 처리구는 80% 이상의 방제 효과를 나타내었다. 1,000배 살포한 경우 21일째에 FKS-2는 89.1%까지 방제가 가능하여 목화진딧물처럼 방제효과가 현저히 떨어지지 않는 것으로 보이나 동시 방제제 개념에서 다른 해충 방제까지 감안 한다면 1,000배 살포는 지양해야 할 것으로 판단되었다.

표 116. 딸기 포장에서 점박이용애에 대한 1차 시제품의 방제효과(1000배)

시제품	방 제 가				
	1일	7일	9일	14일	21일
FKS-1	63.7	73.6	71.8	84.5	88.0
FKS-2	71.9	76.2	81.0	86.3	89.1
FKS-3	39.9	56.4	58.2	66.2	75.3
FKS-4	57.0	75.4	78.5	85.2	88.6
FKS-5	78.6	80.2	85.5	91.0	88.4
FKS-6	25.0	70.0	75.0	75.0	80.0
FKS-7	48.1	72.7	73.8	79.6	82.0
FKS-8	43.8	44.7	49.0	63.9	76.4
FKS-9	45.5	72.3	74.3	73.0	76.3

표 117. 딸기 포장에서 목화진딧물에 대한 3차 시제품의 방제효과

시제품		방 제 가		
		1일	7일	14일
500배	M70	17.8	72.0	70.0
	M80	43.2	98.2	98.2
	J80	9.9	54.6	55.1
	J90	37.6	71.9	61.8
1000배	M70	2.4	48.6	48.7
	M80	15.3	69.2	63.0
	J80	21.1	20.3	31.4
	J90	35.4	35.4	41.6

표 118. 딸기 포장에서 점박이용애에 대한 3차 시제품의 방제효과

시제품		방 제 가		
		1일	7일	14일
500배	M70	64.6	88.8	94.0
	M80	69.7	98.7	99.3
	J80	63.5	88.9	93.7
	J90	66.4	85.9	90.0
1000배	M70	47.4	79.3	75.9
	M80	61.5	87.4	80.3
	J80	49.7	48.8	43.1
	J90	45.6	60.9	72.7

표 119. 딸기 포장에서 잭빛곰팡이병에 대한 3차 시제품의 방제효과(500배)

시제품	이병과율(%)			방제가		
	7일	14일	21일	7일	14일	21일
M70	19.3	27.7	22.5	52.8	30.8	60.4
M80	19	19.9	18.3	53.7	50.4	67.8
J80	29.7	27.5	29.7	27.6	31.3	47.8
J90	18.7	27.5	26	54.5	31.2	54.2
무처리	31.2	54.2	56.8	-	-	-

3차 시제품인 M80 목화진딧물에 대한 포장 방제효과는 500배에서 1일째에 43.2%, 7일째에 98.2%, 14일째에 98.2%로 7일 이후부터 약효가 지속적으로 유지되고 있었다. 그러나 1000배에서는 63%로 약효가 높지 않았다. 점박이용애 역시 3차 시제품에서 4종 모두 14일째까지 90% 이상의 방제가를 나타내었으며 M80은 7일째에 98.7%, 14일째에 99.3%의 높은 방제가를 나타내었다. 잭빛곰팡이병의 방제효과는 1000배에서 M70, M80, J80이 21일째에 50% 내외의 방제가를 나타내었다. 500배에서는 M70과 M80에서 21일째에 60% 이상의 방제가를 보였으며 J90은 21일째에 54.2%로 낮아 멀구슬이 함유된 M80이 제충국이 함유된 시제품보다 진딧물과 점박이용애, 잭빛곰팡이병 모두에 효과가 우수하게 나타나 병해충 동시 방제제로 사용할 수 있었다.

표 120. 딸기 포장에서 잭빛곰팡이병에 대한 3차 시제품의 방제효과(1000배)

시제품	이병과율(%)			방제가		
	7일	14일	21일	7일	14일	21일
M70	32.2	37.3	27.3	36.6	36.8	51.9
M80	25.3	26.7	27.0	50.1	54.8	52.5
J80	40.5	30.1	27.6	20.3	49.0	51.4
J90	25.2	39.0	39.0	50.4	34.0	31.4
무처리	34.0	31.4	56.8	-	-	-

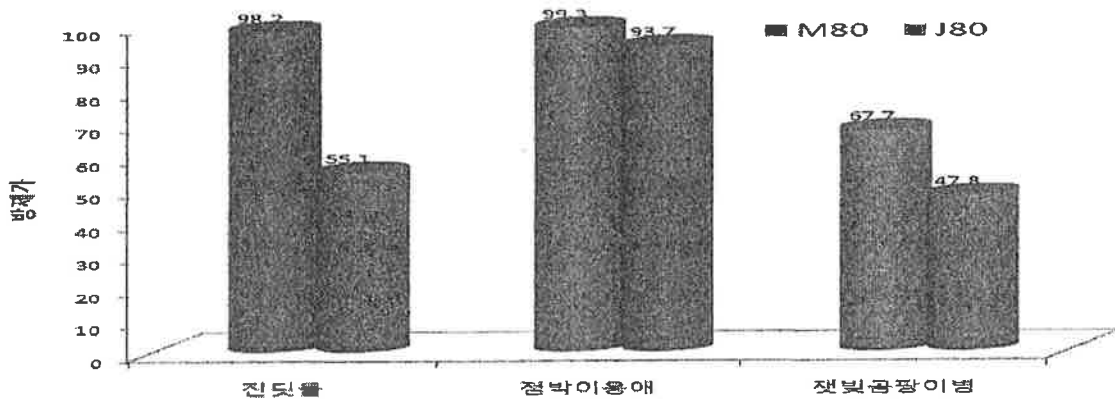


그림 87. 3차 시제품 처리에 의한 병해충 동시 방제 효과

4. 결과요약

목화진딧물에 대한 멀구슬과 고삼추출물의 살충율은 2:1의 비율에서 5일째에 85.9%를 나타냈고 멀구슬과 창포 혼합물에서는 1:1 비율에서 83.5% 나타나 혼합 비율에 따른 살충 효과는 큰 차이가 있었다. 배추좀나방은 멀구슬:창포 2:1 비율에서 90%로 아주 높게 나타났으며, 점박이용애에서는 멀구슬과 고삼 혼합물이 80% 이상의 높은 살충율을 나타냈으며 1:1 비율에서 90.4%로 가장 높았다.

제충국+창포, 멀구슬+살충비누, 멀구슬+창포 시제품의 벼멸구의 방제효과를 조사한 결과, 1회 살포시 22일 후에 급격히 밀도가 증가하지만, 3회 살포 시에는 38일 까지 낮은 밀도를 유지하였다. 시제품은 1주일 간격으로 3회 살포한 경우 살포 3주후까지 밀도를 억제시켰으나 14일 간격으로 살포시에는 억제시키지 못하였다.

제충국과 유화제 혼합 시제품의 배추좀나방에 대한 살충율을 검정한 결과, 1회 살포시에는 밀도가 억제되지 못하고 7일 간격으로 3회 살포한 경우 초기의 밀도 억제는 낮았지만 21일째에는 91.1%까지 올라가 효과를 보여 주었다.

멀구슬 살포하면 1회만 살포한 경우 14일째까지 96.7%의 높은 살충율을 보여 주었으며 이후 약효가 떨어진다. 7일 간격으로 3회 살포할 경우 14일째부터 100%의 살충율을 나타내어 28일째까지 100%를 유지하였다.

제충국은 살포 7일째에 49.4%, 멀구슬 96.7%로 높기 때문에 배추좀나방을 방제하기 위해서는 멀구슬을 먼저 살포하고 이후 제충국을 살포하는 체계가 바람직할 것으로 판단된다.

제충국에 고삼을 혼합한 경우 상승효과가 나타나지 않았으나, 멀구슬과 고삼을 혼합하여 살포하면 초기부터 높은 상승효과를 보여 7일째에 94.4~100%까지 살충율을 나타냈다.

벼물바구미에 대한 제충국과 멀구슬 입제의 살충효과 검정시험에서, 제충국을 200배로 처리한 경우 벼 육묘상자 당 80g 처리구에서 11.7%로 가장 낮은 피해엽율을 나타내었다. 멀구슬 입제는 200배로 희석하여 20g, 40g, 80g 처리시 각각 9.3, 4.7, 2.2%의 낮은 피해엽율을 나타냈다. 굴파리류에 피해엽율은 제충국 200배 80g처리에서 5.2%, 멀구슬 1.3%로 아주 낮게 나타났다. 멀구슬과 제충국 입제를 시제품화하여 점박이용애에 대한 살충효과를 조사하여본 결과 점박이용애가 발생하기 7일전과 3일전에 처리하면 70% 내외의 방제가를 나타내었으나 멀구슬 입제를 1일전에 살포하면 85.6%로 높은 살충효과를 나타냈다.

3차 시제품인 M80을 7일 간격 3회 살포시 목화진딧물에 대한 포장 방제효과는 14일째에 98.2%, 점박이용애는 99.3%의 높은 방제가를 나타내었다. 잣빛곰팡이병은 21일째에 60% 이상의 방제가를 보여 딸기에서 병해충 동시 방제제로 사용할 수 있었다.

6절. 시제품의 독성시험결과

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 활성성분인 멀구슬과 기타 추출물의 경우 제형에 따라 포장에서 나타나는 활성의 차이가 크게 나타날 수 있으므로 정밀한 독성시험이 요구되는 분야이다. 본 연구팀에서는 멀구슬을 기본으로 효과가 우수한 시제품 2개를 선별하여 독성시험을 (주) 경농에 의뢰하였으며 이 결과를 바탕으로 지적재산권 확보 및 유기농자재로 등록할 계획이다.

2. 멀구슬 입제 시제품의 독성시험

가. 급성 경구 독성

제 출 문

시험물질 : 멀구슬 입제

시험제목 : 멀구슬 입제의 급성경구독성시험

상기시험은 농약의 등록기준(농촌진흥청고시 제 2010 - 3호)에 준하여 실시하였음.

2010년 04월 21일

(주) 경 농 중앙연구소장 황 인 천 (인)

시험제목 : 멀구슬 입제의 급성경구독성시험

시험물질 : 멀구슬 입제

시험목적 : 멀구슬 입제에 대한 급성경구독성 정보를 얻기 위하여 실시하였다.

시험방법 : 농약의 등록기준(농촌진흥청고시 제 2010 - 3호)에 준하여 실시하였다.

시험일정

- 시험계획서 승인일 : 2010년 02월 19일
- 동물입수일 : 2010년 03월 22일
- 검역순화기간 : 2010년 03월 22일 ~ 2010년 03월 30일(8일간)
- 시험물질투여일 : 2010년 03월 30일
- 부검일 : 2010년 04월 13일
- 보고서 제출일 : 2010년 04월 21일

시험의뢰자

- 명 칭 : 전라남도농업기술원
- 소재지 : 전라남도 나주시 산포면 206-7번지
☎ 061 - 330 - 2541
- 의뢰책임자 : 원장 박 민 수

시험기관

- 명 칭 : (주) 경 농 중앙연구소 독성연구
- 소재지 : 경북 경주시 구황동 226번지
- 대표자 및 운영책임자 : 소장 황 인 천

시험관계자

- 시험책임자 : 김 진
- 소 속 : (주) 경 농 중앙연구소 독성연구

본 시험은 시험책임자의 책임 하에 하기의 각 시험담당자가 실시하고 시험성적의 종합 평가를 시험책임자가 중심이 되어 실시하였다.

- 동물관리책임자 : 이 승 재
- 시험담당자 : 이 승 재, 유 성 민, 권 보 원, 허 완
- 동물실험실 : (주) 경농 중앙연구소 일반동물실

시험물질보관

본 시험에 사용한 시험물질은 당 연구소 시험물질 보관고에 보관하였으며 물질번호 (KN1004)를 부여받았다.

시험자료보관

본 시험의 시험기초자료 및 관계시험성적서는 당 연구소 자료보관실에 보관하였다.

- 시험기초자료(문서류) : 독성연구 연구실
- 시험계획서, 최종보고서(원본) : 독성연구 연구실
- 자료보관기간 : 5년
- 자료보관책임자 : (주) 경 농 중앙연구소 독성연구 연구원 유 성 민

시험결과 평가에 참여한 연구자 성명 및 날인(또는 서명)

2010년 04월 21일

- 동물관리책임자 : 이 승 재 (인)
- 시험책임자 : 김 진 (인)

목 차

1. 요약

2. 시험물질

3. 재료 및 방법

- 가) 시험계
- 나) 사육환경
- 다) 투여약량 수준설정 및 약제조제
- 라) 시험물질의 투여
- 마) 관찰 및 조사항목
- 바) LD₅₀치 산출

4. 결과 및 고찰

- 가) 치사동물 및 LD₅₀값
- 나) 일반중독증상
- 다) 체중변화
- 라) 부검소견

부표

- 개체별 체중기록 용지
- 임상증상 관찰 내용 및 코드별 임상증상 표
- 임상증상 관찰기록 용지
- 개체별 부검기록 용지

1. 요약

멀구슬 입제에 대한 급성경구독성을 마우스(ICR계통)를 이용하여 1회 경구처리한 후 2주간 치사수, 일반증독증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰 조사한 결과는 다음과 같다.

- 시험물질을 수컷과 암컷 모두 기초시험 투여약량인 2,500mg/kg를 투여한 결과 암컷 2개체가 치사하였다.
- 시험기간 동안 임상증상은 투여 후 1일차에 암컷 1개체는 치사하였고, 다른 1개체는 자발감소 및 지각증세를 보이다 투여 후 2일차에 치사하였다.
- 체중의 변화는 음성대조군과 비교하여 시험 전 기간에 걸쳐 유의차 없이 증가하는 경향을 보였다.
- 약제투여와 관련한 육안적 부검소견에서 내부장기에 대한 특이한 영향은 없었다.

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

2. 시험물질

- 명 칭 : 딸구슬 입제
- 시료번호 : KN1004
- Lot 번호 : -
- 시료제출사 : 전라남도농업기술원
- 입 수 일 : 2010년 03월 11일
- 시 료 량 : 1.5kg × 1EA
- 시험물질의 특성 : 고상 결정, 회색
- 시험의뢰자 : 전라남도농업기술원 원장 박 민 수

3. 재료 및 방법

가) 시험계

- 동물종(계통) : Mouse(ICR계)

- 공급원

명 칭 : (주) 엠제이 엘티디

주 소 : 서울 금천구 가산동 371-28 우림라이온스빌딩 C동 305호

☎ 02 - 2026 - 0071

대 표 : 정 기 원

- 시험계의 선택사유

농촌진흥청고시 제 2010 - 3호 농약의 독성시험기준과 방법에 마우스를 사용하도록 되어 있으며 ICR계통은 농약의 경구독성시험에 널리 사용되고 있어 기초자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과의 해석 및 평가에 이용하는 것이 용이하다.

- 주령 및 체중범위

구 분	수 컷	암 컷
입수시 주령(wks)	4주령	4주령
입수시 체중(g)	21.9(21 - 23)	19.3(18 - 20)
투여시 주령(wks)	5주령	5주령
투여시 체중(g)	30.2(29 - 31)	25.8(24 - 27)

- 순화 및 검역

동물을 입수한 후 암·수 각 입수동물의 20마리를 검역하고, 나머지 동물은 동물실험실 사육환경 하에서 8일간 순화시키면서, 피모 및 건강상태를 확인한 후 건전한 개체를 선별하여 시험에 이용하였다.

나) 사육환경

○ 사육환경

본 실험의 환경은 온도 $21 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 20\%$, 조도 500 ~ 600Lux, 조명시간 12시간(오전 8시 ~ 오후 8시)의 조건에서 사료와 음수를 공급하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

○ 사육상자

순화 및 시험기간 중 폴리카보네이트 사육상자(270×220×130mm)에 버드나무 깔집((주)엠제이엘티디, 한국)을 깔아 암·수 각각 5마리씩 사육유지 하였다.

○ 사료 및 음용수

사료 및 음수의 급여방법 : 사료는 실험동물용 고형사료(수퍼피드(주), 한국)를 자유 섭식시켰으며, 음수는 상수도수를 자유섭수시켰다.

다) 투여약량 수준설정 및 약제조제

○ 투여약량 설정

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

○ 투여약량 수준별 실험동물수

실험동물수는 농약의 등록기준(농촌진흥청고시 제 2010 - 3호)에서와 같이 암·수 각 5마리를 이용하였고, 개체식별은 등부에 picric acid를 이용하여 일련번호로 표시하였다.

○ 대조구의 설정

시험물질이 증류수에 잘 현탁되므로 증류수 대조군만을 두었다.

○ 용매의 선택 및 시험물질의 조제

시험물질이 증류수에 잘 현탁되므로 용매는 증류수를 사용하였고, 시험물질의 조제는 시험물질을 곱게 마쇄한 뒤 12,500mg 칭량한 후 증류수로 50ml까지 volume up하여 조제하였다.

○ 투여액량의 설정

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

라) 시험물질의 투여

○ 사료의 절식

투여개시 3 - 4시간 전부터 절식을 시킨 후 투여 1 - 2시간 후 사료 급이를 재개 하였다.

○ 투여경로 및 투여방법

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

마) 관찰 및 조사항목

○ 일반중독증상 및 치사동물

투여당일은 자주 관찰하였으며, 익일부터는 매일 1회씩 일반중독증상을 관찰하였고 (임상증상 관찰기록 용지, KNC/SOP/MAM/106 양식 1), 치사된 동물은 발견 즉시 꺼내서 부검을 실시하였다.

○ 체중측정

시험에 이용된 모든 동물에 대하여 투여 당일부터 D1, D3, D7, D10, D14일째 개체별 체중을 측정하고(개체별 체중기록 용지, KNC/SOP/MAM/108 양식1), 그 결과를 Excel Program을 이용하여 통계 처리하여 분석하였다.

○ 부검

시험기간 종료 후 살아있는 개체를 CO₂ 가스로 마취시킨 후 부검하여 내부장기의 육안적 이상유무를 확인하고, 그 결과를 개체별 부검기록 용지(KNC/SOP/MAM/025 양식1)에 기록하였다.

바) LD₅₀치 산출

○ 시험 종료 후 Probit Program을 이용하여 LD₅₀치를 산출하였다.

4. 결과 및 고찰

가) 치사동물 및 LD₅₀값

이상의 시험결과로 본 시험의 시험물질인 밀구슬 입제는 기초시험 약량인 2,500mg/kg를 투여한 결과 암컷 2개체가 치사하였다.

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

나) 일반중독증상

시험기간 동안 임상증상은 투여 후 1일차에 암컷 1개체는 치사하였고, 다른 1개체는 자발감소 및 지각중세를 보이다 투여 후 2일차에 치사하였다.

다) 체중변화

시험에 이용된 동물의 D0, D1, D3, D7, D10, D14일째의 개체별 체중기록은 부표와 같다. 이 결과로 보아 약제투여군은 음성대조군과 비교하여 유의성 없이 대체로 증가하는 경향을 보였다.

라) 부검소견

시험 종료 후 생존한 전 개체에 대한 부검소견은 부표와 같다. 육안적 부검 결과 전 개체에서 특이한 소견은 관찰되지 않았다.

개체별 체중기록 용지

시험구분 : 급성경구독성시험

동물종(계통) : Mouse(ICR)

물질번호 : -

투여량 : - mg/kg

시험물질 : 증류수(D.W.)

사육 상자 번호	성별 동물 번호	투여후 경과일(DAT)					
		D0 (3/30)	D1 (3/31)	D3 (4/2)	D7 (4/6)	D10 (4/9)	D14 (4/13)
♂ 1	♂ 1	29	30	29	31	33	34
	♂ 2	30	31	30	32	34	35
	♂ 3	29	29	29	31	33	35
	♂ 4	29	29	29	31	34	36
	♂ 5	29	30	30	31	33	35
평 균		29.2	29.8	29.4	31.2	33.4	35.0
± 표준편차		± 0.45	± 0.84	± 0.55	± 0.45	± 0.55	± 0.71
♀ 1	♀ 1	25	25	25	26	26	29
	♀ 2	23	24	25	26	26	27
	♀ 3	23	22	23	24	24	23
	♀ 4	23	22	23	23	26	27
	♀ 5	22	23	23	24	22	24
평 균		23.2	23.2	23.8	24.6	24.8	26.0
± 표준편차		± 1.10	± 1.30	± 1.10	± 1.34	± 1.79	± 2.45

KNC/SOP/MAM/108 양식 1

개체별 체중기록 용지

시험구분 : 급성경구독성시험

동물종(계통) : Mouse(ICR)

물질번호 : KN1004

투여량 : 2,500 mg/kg

시험물질 : 멀구슬 입제

사육 상자 번호	성별 동물 번호	투여후 경과일(DAT)					
		D0 (3/30)	D1 (3/31)	D3 (4/2)	D7 (4/6)	D10 (4/9)	D14 (4/13)
♂ II	♂ 1	31	32	33	34	36	39
	♂ 2	30	32	33	34	35	37
	♂ 3	31	31	33	35	38	41
	♂ 4	30	31	31	33	34	36
	♂ 5	29	29	30	31	33	34
평 균		30.2	31.0	32.0	33.4	35.2	37.4
± 표준편차		± 0.84	± 1.22	± 1.41	± 1.52	± 1.92	± 2.70
♀ II	♀ 1	24	20	21	24	25	26
	♀ 2	27	25	28	27	28	29
	♀ 3	25	D1	-	-	-	-
	♀ 4	26	23	D2	-	-	-
	♀ 5	27	26	27	27	27	27
평 균		25.8	23.5	25.3	26.0	26.7	27.3
± 표준편차		± 1.30	± 2.65	± 3.79	± 1.73	± 1.53	± 1.53

임상증상 관찰 내용 및 코드별 임상증상 표

A. 사망 또는 빈사 상태

코드	임상증상
A1	사후발견
A2	적발도살
A3	사고사망
A4	빈사혼수

B. 활동 및 체위 상태

B1	자발감소
B2	자발증가
B3	복와
B4	횡와
B5	배와
B6	원배위

C. 보행 상태

C1	보행실조
C2	마비보행
C3	경련
C4	진전
C5	선회
C6	전도
C7	회전

D. 정서 및 반응 상태

D1	세안
D2	흥분
D3	지각증가
D4	지각감소
D5	촉반소실
D6	정반소실

E. 영양 및 외피 상태

E1	빈삭
E2	오염
E3	외음
E4	입모
E5	탐모
E6	외상
E7	외부팽윤

F. 눈과 주변 상태

코드	임상증상
F1	안구 도출
F2	유루(낭적은 미포함)
F3	안지(장액성, 점액성,농성)
F4	안구 혼탁
F5	백내장
F6	각막 혼탁
F7	안방폐색
F8	축동
F9	산동

G. 코의 분비물 상태

G1	혈성
G2	장액성
G3	점액성
G4	포말성(회백색을 띠)

H. 피부 상태

H1	부종
H2	빈혈
H3	발적
H4	수포
H5	농도
H6	피난(수포, 농포가 터짐)
H7	가피
H8	인견
H9	백반
H10	반흔
H11	색소침착

I. 호흡 상태

I1	이상호흡
I2	부정호흡
I3	빈호흡
I4	호흡완화
I5	심호흡
I6	천호흡
I7	이상비음

J. 뇨 상태

J1	적색뇨
J2	황색뇨
J3	혈뇨

K. 분변 상태

K1	설사
K2	연변
K3	분갈색
K4	분소립
K5	분소량
K6	혈변

L. 기타 상태

L1	체온저하
L2	유연
L3	쇄약

M. 기타 외관 상태

M1	출혈
M2	복수
M3	정소 이상
M4	사경
M5	발바닥 이상
M6	이빨 결손
M7	이빨 이상

N. 특이증상 없음

N	정상상태
-	관찰내용 없음

A부터 N순서로 관찰하여 임상증상 관찰기록 용지에 코드로 기록함.

임상증상 관찰기록 용지

시험구분 : 급성경구독성시험
 물질번호 : -
 시험물질 : 증류수(D.W.)

동물종(계통) : Mouse(ICR)
 투여량 : - mg/kg

날짜	성별 및 동물번호				
	♂ 1	♂ 2	♂ 3	♂ 4	♂ 5
(3/30)	N	N	N	N	N
(3/31)	N	N	N	N	N
(4/1)	N	N	N	N	N
(4/2)	N	N	N	N	N
(4/5)	N	N	N	N	N
(4/6)	N	N	N	N	N
(4/7)	N	N	N	N	N
(4/8)	N	N	N	N	N
(4/9)	N	N	N	N	N
(4/12)	N	N	N	N	N
(4/13)	N	N	N	N	N

임상증상 관찰기록 용지

시험구분 : 급성경구독성시험

동물종(계통) : Mouse(ICR)

물질번호 : -

투여량 : - mg/kg

시험물질 : 증류수(D.W.)

날짜	성별 및 동물번호				
	♀ 1	♀ 2	♀ 3	♀ 4	♀ 5
(3/30)	N	N	N	N	N
(3/31)	N	N	N	N	N
(4/1)	N	N	N	N	N
(4/2)	N	N	N	N	N
(4/5)	N	N	N	N	N
(4/6)	N	N	N	N	N
(4/7)	N	N	N	N	N
(4/8)	N	N	N	N	N
(4/9)	N	N	N	N	N
(4/12)	N	N	N	N	N
(4/13)	N	N	N	N	N

임상증상 관찰기록 용지

시험구분 : 급성경구독성시험

동물종(계통) : Mouse(ICR)

물질번호 : KN1004

투여량 : 2,500 mg/kg

시험물질 : 멀구슬 입제

날짜	성별 및 동물번호				
	♂ 1	♂ 2	♂ 3	♂ 4	♂ 5
(3/30)	N	N	N	N	N
(3/31)	N	N	N	N	N
(4/1)	N	N	N	N	N
(4/2)	N	N	N	N	N
(4/5)	N	N	N	N	N
(4/6)	N	N	N	N	N
(4/7)	N	N	N	N	N
(4/8)	N	N	N	N	N
(4/9)	N	N	N	N	N
(4/12)	N	N	N	N	N
(4/13)	N	N	N	N	N

임상증상 관찰기록 용지

시험구분 : 급성경구독성시험

동물종(계통) : Mouse(ICR)

물질번호 : KN1004

투여량 : 2,500 mg/kg

시험물질 : 멀구슬 입제

날짜	성별 및 동물번호				
	♀ 1	♀ 2	♀ 3	♀ 4	♀ 5
(3/30)	N	N	N	N	N
(3/31)	N	N	A1	B1, D4	N
(4/1)	N	N	-	A1	N
(4/2)	N	N	-	-	N
(4/5)	N	N	-	-	N
(4/6)	N	N	-	-	N
(4/7)	N	N	-	-	N
(4/8)	N	N	-	-	N
(4/9)	N	N	-	-	N
(4/12)	N	N	-	-	N
(4/13)	N	N	-	-	N

개체별 부검기록 용지

시험구분 : 급성경구독성시험

동물종(계통) : Mouse(ICR)

물질번호 : -

투여량 : - mg/kg

시험물질 : 증류수(D.W.)

부검소견	동물번호 및 성별									
	♂1	♂2	♂3	♂4	♂5	♀1	♀2	♀3	♀4	♀5
부검시 체중(g)	34	35	35	36	35	29	27	23	27	24
Sacrifice(S) / Decedents(D)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
기형관찰	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
<u>외부소견</u>	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
외관 상태 불량 입 주위 혈흔 혈루증 항문 및 생식기 주위 털변색(황갈색으로)										
<u>내부소견</u>	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Lungs 울혈 (congestion)										
Liver 암색 변화(dark)										
Spleen 암색 반점										
암색 변화										
창백										
종대										
Kidney 암색 변화										
수질부위 탈변색										
Stomach 창백, 황, 갈색										
액상 내용물										
가스 충전										
확장, 팽창										
Small 창백/황색 액상 내용물										
Intestines 확장										
Caecum 황색 액상 내용물										
팽창										
Large 창백/황색 액상 내용물										
Intestines										
Urinary 방광 뇨 충전										
Tract										

Key : + 증상 관찰됨, N 정상

개체별 부검기록 용지

시험구분 : 급성경구독성시험

동물종(계통) : Mouse(ICR)

물질번호 : KN1004

투여량 : 2,500 mg/kg

시험물질 : 멀구슬 입제

부검소견	동물번호 및 성별									
	♂1	♂2	♂3	♂4	♂5	♀1	♀2	♀3	♀4	♀5
부검시 체중(g)	39	37	41	36	34	26	29	25	23	27
Sacrifice(S) / Decedents(D)	S	S	S	S	S	S	S	D	D	S
기형관찰	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
<u>외부소견</u> 외관 상태 불량 입 주위 혈흔 혈루증 항문 및 생식기 주위 탈변색(황갈색으로)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
<u>내부소견</u> Lungs 울혈 (congestion) Liver 암색 변화(dark) Spleen 암색 반점 암색 변화 창백 종대 Kidney 암색 변화 수질부위 탈변색 Stomach 창백, 황, 갈색 액상 내용물 가스 충만 확장, 팽창 Small Intestines 창백/황색 액상 내용물 확장 Caecum 황색 액상 내용물 팽창 Large Intestines 창백/황색 액상 내용물 Urinary Tract 방광 뇨 충만	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

Key : + 증상 관찰됨, N 정상

나. 급성 경피 독성

제 출 문

시험물질 : 멀구슬 입제

시험제목 : 멀구슬 입제의 급성경피독성시험

상기시험은 농약의 등록기준(농촌진흥청고시 제 2010 - 3호)에 준하여 실시하였음.

2010년 04월 21일

(주) 경 농 중앙연구소장 황 인 천 (인)

시험제목 : 멀구슬 입제의 급성경피독성시험

시험물질 : 멀구슬 입제

시험목적 : 멀구슬 입제에 대한 급성경피독성 정보를 얻기 위하여 실시하였다.

시험방법 : 농약의 등록기준(농촌진흥청고시 제 2010 - 3호)에 준하여 실시하였다.

시험일정

- 시험계획서 승인일 : 2010년 02월 19일
- 동물입수일 : 2010년 03월 22일
- 검역순화기간 : 2010년 03월 22일 ~ 2010년 03월 30일(8일간)
- 시험물질투여일 : 2010년 03월 30일
- 부검일 : 2010년 04월 13일
- 보고서 제출일 : 2010년 04월 21일

시험의뢰자

- 명 칭 : 전라남도농업기술원
- 소재지 : 전라남도 나주시 산포면 206-7번지
☎ 061 - 330 - 2541
- 의뢰책임자 : 원장 박 민 수

시험기관

- 명 칭 : (주) 경 농 중앙연구소 독성연구
- 소재지 : 경북 경주시 구황동 226번지
- 대표자 및 운영책임자 : 소장 황 인 천

시험관계자

- 시험책임자 : 김 진
- 소 속 : (주) 경 농 중앙연구소 독성연구

본 시험은 시험책임자의 책임 하에 하기의 각 시험담당자가 실시하고 시험성적의 종합 평가를 시험책임자가 중심이 되어 실시하였다.

- 동물관리책임자 : 이 승 재
- 시험담당자 : 이 승 재, 유 성 민, 권 보 원, 허 완
- 동물실험실 : (주) 경농 중앙연구소 일반동물실

시험물질보관

본 시험에 사용한 시험물질은 당 연구소 시험물질 보관고에 보관하였으며 물질번호 (KN1004)를 부여받았다.

시험자료보관

본 시험의 시험기초자료 및 관계시험성적서는 당 연구소 자료보관실에 보관하였다.

- 시험기초자료(문서류) : 독성연구 연구실
- 시험계획서, 최종보고서(원본) : 독성연구 연구실
- 자료보관기간 : 5년
- 자료보관책임자 : (주) 경 농 중앙연구소 독성연구 연구원 유 성 민

시험결과 평가에 참여한 연구자 성명 및 날인(또는 서명)

2010년 04월 21일

- 동물관리책임자 : 이 승 재 (인)
- 시험책임자 : 김 진 (인)

목 차

1. 요약

2. 시험물질

3. 재료 및 방법

가) 시험계

나) 사육환경

다) 투여약량 수준설정 및 약제조제

라) 시험물질의 투여

마) 관찰 및 조사항목

바) LD₅₀치 산출

4. 결과 및 고찰

가) 치사동물 및 LD₅₀값

나) 일반중독증상

다) 체중변화

라) 부검소견

부표

- 개체별 체중기록 용지
- 임상증상 관찰 내용 및 코드별 임상증상 표
- 임상증상 관찰기록 용지
- 개체별 부검기록 용지

1. 요약

밀구슬 입제에 대한 급성경피독성을 랫드(SD계통)를 이용하여 1회 경피 처리한 후 2주간 치사수, 일반중독증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰 조사한 결과는 다음과 같다.

- 시험물질을 수컷과 암컷 모두 기초시험 투여약량인 2,000mg/kg를 투여한 결과 수컷과 암컷 모두 전체 시험기간 동안 치사 개체는 발견되지 않았다.
- 시험기간 동안 특이한 임상증상은 관찰되지 않았다.
- 체중의 변화는 음성대조군과 비교하여 시험 전 기간에 걸쳐 유의차 없이 증가하는 경향을 보였다.
- 약제투여와 관련한 육안적 부검소견에서 내부장기에 대한 특이한 영향은 없었다.

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

2. 시험물질

- 명 칭 : 밀구슬 입제
- 시료번호 : KN1004
- Lot 번호 : -
- 시료제출사 : 전라남도농업기술원
- 입 수 일 : 2010년 03월 11일
- 시 료 량 : 1.5kg × 1EA
- 시험물질의 특성 : 고상 결정, 회색
- 시험의뢰자 : 전라남도농업기술원 원장 박 민 수

3. 재료 및 방법

가) 시험계

- 동물종(계통) : Rat(SD계)
- 공급원
명 칭 : (주) 엠제이 엘티디
주 소 : 서울 금천구 가산동 371-28 우림라이온스빌딩 C동 305호
☎ 02 - 2026 - 0071
대 표 : 정 기 원

○ 시험계의 선택사유

농촌진흥청고시 제 2010 - 3호 농약의 독성시험기준과 방법에 랫드를 사용하도록

되어 있으며 SD계통은 농약의 경피독성시험에 널리 사용되고 있어 기초 자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과의 해석 및 평가에 용이하다.

○ 주령 및 체중범위

구 분	수 컷	암 컷
입수시 주령(wks)	7주령	7주령
입수시 체중(g)	194.9(183 - 205)	148.6(142 - 155)
투여시 주령(wks)	8주령	8주령
투여시 체중(g)	239.0(235 - 243)	174.2(168 - 184)

○ 순화 및 검역

동물을 입수한 후 암·수 각 입수동물의 20마리를 검역하고, 나머지 동물은 동물실험실 사육환경 하에서 8일간 순화시키면서, 피모 및 건강상태를 확인한 후 건전한 개체를 선별하여 시험에 이용하였다.

나) 사육환경

○ 사육환경

본 실험의 환경은 온도 $21 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 20\%$, 조도 500 - 600Lux, 조명시간 12시간(오전 8시 ~ 오후 8시)의 조건에서 사료와 음수를 공급하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

○ 사육상자

순화 및 시험기간 중 폴리카보네이트 사육상자(420×260×180mm)에 버드나무 깔집((주)엠제이엘티디, 한국)을 깔아 암·수 각각 5마리씩 사육유지 하였다.

○ 사료 및 음용수

사료 및 음수의 급여방법 : 사료는 실험동물용 고형사료(수퍼피드(주), 한국)를 자유 섭식시켰으며, 음수는 상수도수를 자유 섭수시켰다.

다) 투여약량 수준설정 및 약제조제

○ 투여약량 설정

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

○ 투여약량 수준별 실험동물수

실험동물수는 농약의 농약의 등록기준(농촌진흥청고시 제 2010 - 3호)에서와 같이 암·수 각 5마리를 이용하였고, 개체 식별은 표리에 유성펜을 이용하여 일련번호로 표시하였다.

○ 대조구의 설정

시험물질이 증류수에 잘 현탁되므로 증류수 대조군만을 두었다.

○ 용매의 선택 및 시험물질의 조제

시험물질이 증류수에 잘 현탁되므로 용매는 증류수를 사용하였고, 시험물질의 조제는 시험물질을 곱게 마쇄한 뒤 20,000mg을 칭량한 후 증류수로 50ml까지 volume up하여 조제하였다.

○ 투여액량의 설정

투여액량은 시험에 이용되는 랫드의 체중과 약액 투여량을 고려하여 투여약량 수준 별로 모두 5ml/kg(b.w.)으로 설정하였다.

라) 시험물질의 투여

○ 사료의 절식

경피독성시험의 투여 경로 상 절식시간은 따로 두지 않았다.

○ 투여경로 및 투여방법

시험개시 하루 전 약제처리를 위한 시험동물의 등 부위를 동물용 제모기를 이용하여 체표면적의 약 10%를 제모한 다음 4×5cm 크기의 임상용 거즈에 조제된 시험물질을 골고루 도포한 후 약제유실을 방지하기 위하여 탄력밴드(Coban™; 3M, 미국)와 의료용 반창고(Transpore™; 3M, 미국)로 고정시켜 주었다. 약제처리 24시간이 경과한 후 도포물을 제거하고, 피부에 남아 있는 시험물질을 증류수를 이용하여 잘 닦아 주었다.

마) 관찰 및 조사항목

○ 일반중독증상 및 치사동물

투여당일은 자주 관찰하였으며, 익일부터는 매일 1회씩 일반중독증상을 관찰하였고 (임상증상 관찰기록 용지, KNC/SOP/MAM/106 양식 1), 치사된 동물은 발견 즉시 꺼내서 부검을 실시하였다.

○ 체중측정

시험에 이용된 모든 동물에 대하여 투여 당일부터 D1, D3, D7, D10, D14일째 개체별 체중을 측정하고(개체별 체중기록 용지, KNC/SOP/MAM/108 양식1), 그 결과를 Excel Program을 이용하여 통계 처리하여 분석하였다.

○ 부검

시험기간 종료 후 살아있는 개체를 CO₂ 가스로 마취시킨 후 부검하여 내부 장기의 육안적 이상 유무를 확인하고, 그 결과를 개체별 부검기록 용지(KNC/SOP/MAM/025 양식1)에 기록하였다.

바) LD₅₀치 산출

○ 시험 종료 후 Probit Program을 이용하여 LD₅₀치를 산출하였다.

4. 결과 및 고찰

가) 치사동물 및 LD₅₀값

이상의 시험결과로 본 시험의 시험물질인 멀구슬 입제는 기초시험 약량인 2,000mg/kg를 투여한 결과 수컷과 암컷 모두 전체 시험기간 동안 치사 개체는 발견되지 않았다.

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

나) 일반중독증상

시험기간 동안 특이한 임상증상은 관찰되지 않았다.

다) 체중변화

시험에 이용된 동물의 D0, D1, D3, D7, D10, D14일째의 개체별 체중기록은 부표와 같다. 이 결과로 보아 약제투여군은 음성대조군과 비교하여 유의성 없이 대체로 증가하는 경향을 보였다.

라) 부검소견

시험 종료 후 생존한 전 개체에 대한 부검소견은 부표와 같다. 육안적 부검 결과 전 개체에서 특이한 소견은 관찰되지 않았다.

개체별 체중기록 용지

시험구분 : 급성경피독성시험

동물종(계통) : Rat(SD)

물질번호 : -

투여량 : - mg/kg

시험물질 : 증류수(D.W.)

사육 상자 번호	성별 동물 번호	투여후 경과일(DAT)					
		D0 (3/30)	D1 (3/31)	D3 (4/2)	D7 (4/6)	D10 (4/9)	D14 (4/13)
♂ I	♂ 1	243	249	259	279	299	306
	♂ 2	248	246	255	272	287	294
	♂ 3	249	248	258	285	302	315
	♂ 4	226	230	237	247	270	275
	♂ 5	241	244	252	273	287	303
평 균		241.4	243.4	252.2	271.2	289.0	298.6
± 표준편차		± 9.24	± 7.73	± 8.93	± 14.50	± 12.63	± 15.18
♀ I	♀ 1	182	184	188	199	215	225
	♀ 2	183	184	192	202	212	219
	♀ 3	174	183	188	203	208	218
	♀ 4	177	180	186	197	203	210
	♀ 5	172	173	178	186	194	205
평 균		177.6	180.8	186.4	197.4	206.4	215.4
± 표준편차		± 4.83	± 4.66	± 5.18	± 6.80	± 8.26	± 7.89

KNC/SOP/MAM/108 양식 1

개체별 체중기록 용지

시험구분 : 급성경피독성시험

동물종(계통) : Rat(SD)

물질번호 : KN1004

투여량 : 2,000 mg/kg

시험물질 : 멀구슬 입제

사육 상자 번호	성별 동물 번호	투여후 경과일(DAT)					
		D0 (3/30)	D1 (3/31)	D3 (4/2)	D7 (4/6)	D10 (4/9)	D14 (4/13)
♂ II	♂ 1	243	257	262	281	306	310
	♂ 2	238	244	250	275	294	305
	♂ 3	236	242	245	263	277	278
	♂ 4	235	245	249	264	285	294
	♂ 5	243	251	256	270	292	292
평 균		239.0	247.8	252.4	270.6	290.8	295.8
± 표준편차		± 3.81	± 6.14	± 6.66	± 7.57	± 10.80	± 12.46
♀ II	♀ 1	184	186	186	199	204	210
	♀ 2	168	172	167	177	191	195
	♀ 3	168	173	175	186	195	196
	♀ 4	172	173	176	187	194	200
	♀ 5	179	189	183	186	200	210
평 균		174.2	178.6	177.4	187.0	196.8	202.2
± 표준편차		± 7.09	± 8.20	± 7.44	± 7.84	± 5.17	± 7.36

KNC/SOP/MAM/108 양식 1

임상증상 관찰 내용 및 코드별 임상증상 표

A. 사망 또는 빈사 상태		F. 눈과 주변 상태		J. 뇨 상태	
코드	임상증상	코드	임상증상	코드	임상증상
A1	사후발견	F1	안구 도출	J1	적색뇨
A2	적발도살	F2	유루(낭적은 미포함)	J2	황색뇨
A3	사고사망	F3	안지(장액성, 점액성,농성)	J3	혈뇨
A4	빈사혼수	F4	안구혼탁	K. 분변 상태	
B. 활동 및 체위 상태		F5	백내장	K1	설사
B1	자발감소	F6	각막혼탁	K2	연변
B2	자발증가	F7	안방폐색	K3	분갈색
B3	복와	F8	축동	K4	분소립
B4	횡와	F9	산동	K5	분소량
B5	배와	G. 코의 분비물 상태		K6	혈변
B6	원배위	G1	혈성	L. 기타 상태	
C. 보행 상태		G2	장액성	L1	체온저하
C1	보행실조	G3	점액성	L2	유연
C2	마비보행	G4	포말성(회백색을 띠)	L3	쇄약
C3	경련	H. 피부 상태		M. 기타 외관 상태	
C4	진전	H1	부종	M1	출혈
C5	선회	H2	빈혈	M2	복수
C6	전도	H3	발적	M3	정소 이상
C7	회전	H4	수포	M4	사경
D. 정서 및 반응 상태		H5	농도	M5	발바닥 이상
D1	세안	H6	피난(수포, 농포가 터짐)	M6	이빨 결손
D2	흥분	H7	가피	M7	이빨 이상
D3	지각증가	H8	인견	N. 특이증상 없음	
D4	지각감소	H9	백반	N	정상상태
D5	촉반소실	H10	반흔	-	관찰내용 없음
D6	정반소실	H11	색소침착		
E. 영양 및 외피 상태		I. 호흡 상태		A부터 N순서로 관찰하여 임상증상 관찰기록 용지에 코드로 기록함.	
E1	빈식	I1	이상호흡		
E2	오염	I2	부정호흡		
E3	외음	I3	빈호흡		
E4	입모	I4	호흡완화		
E5	탐모	I5	심호흡		
E6	외상	I6	천호흡		
E7	외부팽윤	I7	이상비음		

임상증상 관찰기록 용지

시험구분 : 급성경피독성시험

동물종(계통) : Rat(SD)

물질번호 : -

투여량 : - mg/kg

시험물질 : 증류수(D.W.)

날짜	성별 및 동물번호				
	♂ 1	♂ 2	♂ 3	♂ 4	♂ 5
(3/30)	N	N	N	N	N
(3/31)	N	N	N	N	N
(4/1)	N	N	N	N	N
(4/2)	N	N	N	N	N
(4/5)	N	N	N	N	N
(4/6)	N	N	N	N	N
(4/7)	N	N	N	N	N
(4/8)	N	N	N	N	N
(4/9)	N	N	N	N	N
(4/12)	N	N	N	N	N
(4/13)	N	N	N	N	N

KNC/SOP/MAM/106 양식 1

임상증상 관찰기록 용지

시험구분 : 급성경피독성시험
 물질번호 : -
 시험물질 : 증류수(D.W.)

동물종(계통) : Rat(SD)
 투여량 : - mg/kg

날짜	성별 및 동물번호				
	♀1	♀2	♀3	♀4	♀5
(3/30)	N	N	N	N	N
(3/31)	N	N	N	N	N
(4/1)	N	N	N	N	N
(4/2)	N	N	N	N	N
(4/5)	N	N	N	N	N
(4/6)	N	N	N	N	N
(4/7)	N	N	N	N	N
(4/8)	N	N	N	N	N
(4/9)	N	N	N	N	N
(4/12)	N	N	N	N	N
(4/13)	N	N	N	N	N

KNC/SOP/MAM/106 양식 1

임상증상 관찰기록 용지

시험구분 : 급성경피독성시험

동물종(계통) : Rat(SD)

물질번호 : KN1004

투여량 : 2,000 mg/kg

시험물질 : 멀구슬 입제

날짜	성별 및 동물번호				
	♂ 1	♂ 2	♂ 3	♂ 4	♂ 5
(3/30)	N	N	N	N	N
(3/31)	N	N	N	N	N
(4/1)	N	N	N	N	N
(4/2)	N	N	N	N	N
(4/5)	N	N	N	N	N
(4/6)	N	N	N	N	N
(4/7)	N	N	N	N	N
(4/8)	N	N	N	N	N
(4/9)	N	N	N	N	N
(4/12)	N	N	N	N	N
(4/13)	N	N	N	N	N

KNC/SOP/MAM/106 양식 1

임상증상 관찰기록 용지

시험구분 : 급성경피독성시험

동물종(계통) : Rat(SD)

물질번호 : KN1004

투여량 : 2,000 mg/kg

시험물질 : 멀구슬 입제

날짜	성별 및 동물번호				
	♀ 1	♀ 2	♀ 3	♀ 4	♀ 5
(3/30)	N	N	N	N	N
(3/31)	N	N	N	N	N
(4/1)	N	N	N	N	N
(4/2)	N	N	N	N	N
(4/5)	N	N	N	N	N
(4/6)	N	N	N	N	N
(4/7)	N	N	N	N	N
(4/8)	N	N	N	N	N
(4/9)	N	N	N	N	N
(4/12)	N	N	N	N	N
(4/13)	N	N	N	N	N

KNC/SOP/MAM/106 양식 1

개체별 부검기록 용지

시험구분 : 급성경피독성시험

동물종(계통) : Rat(SD)

물질번호 : -

투여량 : - mg/kg

시험물질 : 증류수(D.W.)

부검소견	동물번호 및 성별									
	♂1	♂2	♂3	♂4	♂5	♀1	♀2	♀3	♀4	♀5
부검시 체중(g)	306	294	315	275	303	225	219	218	210	205
Sacrifice(S) / Decedents(D)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
기형관찰	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
<u>외부소견</u> 외관 상태 불량 입 주위 혈흔 혈루증 항문 및 생식기 주위 털변색(황갈색으로)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
<u>내부소견</u>	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Lungs 울혈(congestion)										
Liver 암색 변화(dark)										
Spleen 암색 반점										
Kidney 암색 변화										
Stomach 수질부위 탈변색										
Small 창백, 황, 갈색										
Intestines 액상 내용물										
Caecum 가스 충전										
Small 확장, 팽창										
Intestines 창백/황색 액상 내용물										
Caecum 확장										
Large 황색 액상 내용물										
Intestines 팽창										
Urinary 창백/황색 액상 내용물										
Tract 방광 뇨 충전										

Key : + 증상 관찰됨, N 정상

KNC/SOP/MAM/025 양식 1

개체별 부검기록 용지

시험구분 : 급성경피독성시험

동물종(계통) : Rat(SD)

물질번호 : KN1004

투여량 : 2,000 mg/kg

시험물질 : 멀구슬 입제

부검소견	동물번호 및 성별									
	♂1	♂2	♂3	♂4	♂5	♀1	♀2	♀3	♀4	♀5
부검시 체중(g)	310	305	278	294	292	210	195	196	200	210
Sacrifice(S) / Decedents(D)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
기형관찰	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
<u>외부소견</u>	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
외관 상태 불량										
입 주위 혈흔										
혈루증										
항문 및 생식기 주위										
털변색(황갈색으로)										
<u>내부소견</u>	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Lungs 울혈(congestion)										
Liver 암색 변화(dark)										
암색 반점										
Spleen 암색 변화										
창백										
종대										
Kidney 암색 변화										
수질부위 탈변색										
Stomach 창백, 황, 갈색										
액상 내용물										
가스 충전										
확장, 팽창										
Small 창백/황색 액상 내용물										
Intestines 확장										
Caecum 황색 액상 내용물										
팽창										
Large 창백/황색 액상 내용물										
Intestines										
Urinary 방광 뇨 충전										
Tract										

Key : + 증상 관찰됨, N 정상

다. 잉어에 대한 급성 독성

제 출 문

시험물질 : 멀구슬 입제

시험제목 : 멀구슬 입제의 잉어에 대한 급성독성시험

상기시험은 농약의 등록시험기준과 방법(농촌진흥청고시 제2010-3호)에 준하여 실시하였음.

2010년 04월 21일

(주) 경 농 중앙연구소장 황 인 천 (인)

시험제목 : 멀구슬 입제의 잉어에 대한 급성독성시험

시험물질 : 멀구슬 입제

시험목적 : 멀구슬 입제의 잉어에 대한 급성독성 정보를 얻기 위하여 실시하였다.

시험방법 : 농약의 등록시험기준과 방법(농촌진흥청고시 제 2010-3호)에 준하여 실시하였다.

시험일정

- 시험계획서 승인일 : 2010년 02월 19일
- 순화기간 : 2009년 08월 27일 - 2010년 04월 02일
- 시험물질 투여일 : 2010년 04월 05일
- 최종보고서 제출일 : 2010년 04월 21일

시험의뢰자

- 명 칭 : 전라남도농업기술원
- 소재지 : 전라남도 나주시 산포면 206-7번지
☎ 061 - 330 - 2541
- 의뢰책임자 : 원장 박 민 수

시험기관

- 명 칭 : (주) 경 농 중앙연구소 독성연구
- 소재지 : 경북 경주시 구황동 226번지
- 대표자 및 운영책임자 : 소 장 황 인 천

시험관계자

- 시험책임자 : 김 진
- 소 속 : (주) 경 농 중앙연구소 독성연구

본 시험은 시험책임자의 책임 하에 하기의 각 시험담당자가 실시하고 시험성적의 종합평가를 시험책임자가 중심이 되어 실시하였다.

- 시험생물 관리 책임자 : 이 승 재
- 시험담당자 : 이 승 재, 유 성 민, 권 보 원, 허 완

시험물질의 보관

본 시험에 사용한 시험물질은 당 연구소 시험물질 보관고에 보관하였으며 시료번호 (KN1004)를 부여받았다.

시험자료의 보관

본 시험의 시험기초자료 및 관계시험성적서는 당 연구소 자료보관실에 보관하였다.

- 시험기초자료 (문서류) : 독성연구 연구실

- 시험계획서, 최종보고서(원본) : 독성연구 연구실
- 자료보관기간 : 5년
- 자료보관책임자 : (주) 경 농 중앙연구소 독성연구 연구원 유 성 민

시험결과 평가에 참여한 연구자 성명 및 날인(또는 서명)

2010년 04월 21일

○ 시험생물 관리 책임자 : 이 승 재 (인)

○ 시험책임자 : 김 진 (인)

목 차

1. 요 약

2. 시험물질

3. 재료 및 방법

가) 시험계

나) 시험용기

다) 시험용수

라) 처리방법

마) LC₅₀ 산출법

바) 관찰 및 조사항목

4. 결과 및 고찰

가) 생사수 및 LC₅₀값

나) 일반 증독증상

첨부자료

○ 수질검사성적

○ 부표 1. 누적 치사수

○ 부표 2. 일반 증독증상

1. 요약

밀구슬 입제의 잉어에 대한 급성독성 정도를 알아보기 위해 96시간동안 생사수, 일반 증독증상을 관찰하고, 체중 및 전장과 시험수의 수질조사를 한 결과는 다음과 같다.

농도 (mg/L)	시험어류수 (마리)	누적치사수 (마리)			
		24h	48h	72h	96h
10.0	10	0	0	0	0

- 일반 증독증상으로 투여 후 24시간째에 1마리에서 평형상실이 관찰되었으나, 48시간째에 회복하였다.
- pH는 평균 7.2(최저 6.7 ~ 최고 7.5)이었고, DO는 평균 6.8(최저 6.4 ~ 최고 7.1)였다.
- 실험기간 중 평균 수온은 20.8°C(최저 20.7°C ~ 최고 20.8°C)이었다.

이상의 결과 본 시험물질의 48시간 및 96시간 LC₅₀(mg/L)은 > 10.0mg/L 으로 독성 분류상 어독성 III급이었다.

2. 시험물질

- 명 칭 : 밀구슬 입제
- 시료번호 : KN1004
- Lot 번호 : -
- 시료제출사 : 전라남도농업기술원
- 입 수 일 : 2010년 03월 11일
- 시 료 량 : 1.5kg × 1EA
- 시험물질의 특성 : 고상 결정, 희색
- 시험의뢰자 : 전라남도농업기술원 원장 박 민 수

3. 재료 및 방법

가) 시험계

- 시험어종 : 잉어(*Cyprinus carpio*)
- 공 급 원
 - 명 칭 : 경상북도 수산자원개발연구소 민물고기연구센터
 - 주 소 : 경상북도 울진군 근남면 행곡리 228번지
 - ☎ 054 - 783 - 9413

○ 시험계의 선택사유

농촌진흥청고시 제 2010 - 3호 농약의 독성시험기준과 방법에 급성 어독성시험의 경우 시험 어류는 잉어 등을 사용하도록 되어 있으며, 잉어는 농약의 어독성시험에 널리 사용되고 있어 기초자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과의 해석 및 평가에 용이하다.

○ 순화 및 사육

본 시험의 환경은 실내에서 물의 순화, 여과를 시킬 수 있는 유리 수조 장치를 이용하였고, 시험용수는 지하수를 이용하여 수온 20 ~ 24°C, 조도 200 ~ 500Lux의 범위 내에서 2주간 사육, 순화하였다. 사료는 일반 관상어용 사료((주)제일사료, 한국)를 1일 1~2회 급이 하였다.

나) 시험용기

원통형의 유리제품 12L 용기((φ 24×30cm)를 사용하였다.

다) 시험용수

시험용수는 지하수를 24시간 이상 정체시켰다가 사용하였으며, 수온의 조절은 항온 수조 내에 시험용 유리 수조를 넣고 22±2°C로 시험기간 동안 유지시켰다. 각 농도별 시험용수는 각각 10L를 사용하였다.

라) 처리방법

○ 시험농도 설정

기초시험 농도인 10.0mg/L로 시험을 수행하였다.

○ 시험약제의 조제

시험물질을 곱게 마쇄한 뒤 200.0mg을 칭량한 후 증류수로 20ml까지 volume up하면서 강하게 교반하여 stock solution을 조제하였다. 처리는 stock solution 10ml을 10L시험 용기에 처리하였다.

○ 시험 어류의 절식

실험개시부터 실험 종료 시까지 먹이 급여를 중단하였다.

○ 시험 어류의 크기 및 수

잉어의 크기는 전장 5cm 이하의 것으로 선별하였으며, 수조 당 시험 어류수는 10마리를 수용하였다.

○ 산소공급

실험기간 중(2010년 04월 07일) 수조 내에 10분간 폭기를 하였다.

○ 대조구 설정

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

마) LC₅₀ 산출법

실험 종료 후 조사된 생사수를 토대로 Probit Program(US EPA, 1985)을 이용하여 각 조사시간대별 LC₅₀치 및 95% 신뢰한계를 산출하였다.

바) 관찰 및 조사항목

○ 일반 중독증상 및 생사수

처리당일은 30분, 1시간, 2시간, 4시간 그 이후에는 24, 48, 72, 96시간 간격으로 일반중독증상 및 생사수를 관찰 조사하였다.

○ DO, pH 및 수온측정

시험물질의 처리 당일부터 24h, 48h, 72h, 96h에 용존산소량(DO), pH 및 수온을 각각의 시험농도별 용기로부터 측정하였다.

○ 체중 및 전장측정

시험에 이용된 처리군과 음성대조군의 시험 어류에 대하여 실험 종료 시 체중과 전장을 측정하였다.

4. 결과 및 고찰

약 제	LC ₅₀ (mg/l)		체 중 (g)	전 장 (cm)	중독증상
	48hrs	96hrs			
멀구슬 입제	> 10.0	> 10.0	0.7±0.1	4.1±0.2	평형상실
PCP-Na염	0.14 (0.13 ~ 0.14)*	0.14 (0.13 ~ 0.14)	0.9±0.2	4.3±0.3	-
음성대조군	-	-	0.5±0.1	3.9±0.3	-

* 95% 신뢰한계

가) 생사수 및 LC₅₀값

이상의 시험결과로 본 시험의 시험물질인 멀구슬 입제는 기초시험 농도인 10.0mg/L에서 전 실험기간 동안 치사개체가 발견되지 않았다. 따라서 본 약제의 반수치사농도(LC₅₀)은 48, 96시간 모두에서 >10.0mg/L로 독성분류상 어독성 III급이었다.

나) 일반 중독증상

일반 중독증상으로 투여 후 24시간째에 1마리에서 평형상실이 관찰되었으나, 48시간째에 회복하였다.

첨부자료

수 질 검 사 성 적

시험물질 : 멸구슬 입제

		투여직후	48hrs	96hrs
DO	시험물질	7.1	6.8	6.4
	PCP-Na염 양성대조구	10.7	9.6	6.2
	음성대조구	13.2	8.0	7.2
pH	시험물질	7.5	7.4	6.7
	PCP-Na염 양성대조구	7.9	7.6	7.2
	음성대조구	7.5	7.5	6.9
Temp.	시험물질	20.8	20.8	20.8
	PCP-Na염 양성대조구	20.2	20.9	20.9
	음성대조구	20.8	20.8	20.8

부표 1. 누적 치사수

Nominal concentration (mg/L)	Number of fish tested	Cumulative number of dead fish			
		24hours	48hours	72hours	96hours
Control	10	0	0	0	0
10.0	10	0	0	0	0

부표 2. 일반 중독증상

Nominal concentration (mg/L)	Symptoms of Intoxication			
	24hours	48hours	72hours	96hours
Control	NOR*(10)	NOR(10)	NOR(10)	NOR(10)
10.0	LOE(1), NOR(9)	NOR(10)	NOR(10)	NOR(10)

() : Number of fish

* Abbreviation of observable symptoms of intoxication

NOR : Normal

SUR : Fish mainly at the surface

BOT : Fish mainly at the bottom

LOE : Loss of equilibrium

HEM : Hemorrhage

VDE : Vertebral deformation

AOM : Attached other substance in the fin

- : Could not observed because of 100% mortality

3. 멀구슬 함유 액상 시제품의 독성 시험

가. 급성 경구 독성

제 출 문

시험물질 : 황련·멀구슬·황·비눗물 액상

시험제목 : 황련·멀구슬·황·비눗물 액상의 급성경구독성시험

상기시험은 농약의 등록기준(농촌진흥청고시 제 2010 - 3호)에 준하여 실시하였음.

2010년 04월 21일

(주) 경 농 중앙연구소장 황 인 천 (인)

시험제목 : 황련·말구슬·황·비눗물 액상의 급성경구독성시험

시험물질 : 황련·말구슬·황·비눗물 액상

시험목적 : 황련·말구슬·황·비눗물 액상에 대한 급성경구독성 정보를 얻기 위하여 실시하였다.

시험방법 : 농약의 등록기준(농촌진흥청고시 제 2010 - 3호)에 준하여 실시하였다.

시험일정

- 시험계획서 승인일 : 2010년 02월 19일
- 동물입수일 : 2010년 03월 22일
- 검역순화기간 : 2010년 03월 22일 ~ 2010년 03월 30일(8일간)
- 시험물질투여일 : 2010년 03월 30일
- 부검일 : 2010년 04월 13일
- 보고서 제출일 : 2010년 04월 21일

시험의뢰자

- 명 칭 : 전라남도농업기술원
- 소재지 : 전라남도 나주시 산포면 206-7번지
☎ 061 - 330 - 2541
- 의뢰책임자 : 원장 박 민 수

시험기관

- 명 칭 : (주) 경 농 중앙연구소 독성연구
- 소재지 : 경북 경주시 구황동 226번지
- 대표자 및 운영책임자 : 소장 황 인 천

시험관계자

- 시험책임자 : 김 진
- 소 속 : (주) 경 농 중앙연구소 독성연구

본 시험은 시험책임자의 책임 하에 하기의 각 시험담당자가 실시하고 시험성적의 종합평가를 시험책임자가 중심이 되어 실시하였다.

- 동물관리책임자 : 이 승 재
- 시험담당자 : 이 승 재, 유 성 민, 권 보 원, 허 완
- 동물실험실 : (주) 경농 중앙연구소 일반동물실

시험물질보관

본 시험에 사용한 시험물질은 당 연구소 시험물질 보관고에 보관하였으며 물질번호(KN1003)를 부여받았다.

시험자료보관

본 시험의 시험기초자료 및 관계시험성적서는 당 연구소 자료보관실에 보관하였다.

- 시험기초자료(문서류) : 독성연구 연구실
- 시험계획서, 최종보고서(원본) : 독성연구 연구실
- 자료보관기간 : 5년
- 자료보관책임자 : (주) 경 농 중앙연구소 독성연구 연구원 유 성 민

시험결과 평가에 참여한 연구자 성명 및 날인(또는 서명)

2010년 04월 21일

- 동물관리책임자 : 이 승 재 (인)

- 시험책임자 : 김 진 (인)

목 차

1. 요약

2. 시험물질

3. 재료 및 방법

- 가) 시험계
- 나) 사육환경
- 다) 투여약량 수준설정 및 약제조제
- 라) 시험물질의 투여
- 마) 관찰 및 조사항목
- 바) LD₅₀치 산출

4. 결과 및 고찰

- 가) 치사동물 및 LD₅₀값
- 나) 일반중독증상
- 다) 체중변화
- 라) 부검소견

부표

- 개체별 체중기록 용지
- 임상증상 관찰 내용 및 코드별 임상증상 표
- 임상증상 관찰기록 용지
- 개체별 부검기록 용지

1. 요약

황련·멀구슬·황·비눗물 역상에 대한 급성경구독성을 마우스(ICR계통)를 이용하여 1회 경구처리한 후 2주간 치사수, 일반증독증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰 조사한 결과는 다음과 같다.

- 시험물질을 수컷과 암컷 모두 기초시험 투여약량인 5,000mg/kg를 투여한 결과 수컷과 암컷 모두 전체 시험기간 동안 치사 개체는 발견되지 않았다.
- 시험기간 동안 특이한 임상증상은 관찰되지 않았다.
- 체중의 변화는 음성대조군과 비교하여 시험 전 기간에 걸쳐 유의차 없이 증가하는 경향을 보였다.
- 약제투여와 관련한 육안적 부검소견에서 내부장기에 대한 특이한 영향은 없었다.

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

2. 시험물질

- 명 칭 : 황련·멀구슬·황·비눗물 액상
- 시료번호 : KN1003
- Lot 번호 : -
- 시료제출사 : 전라남도농업기술원
- 입 수 일 : 2010년 03월 11일
- 시 료 량 : 500ml × 1EA
- 시험물질의 특성 : 액상 불투명, 어둔운 회주황색
- 시험의뢰자 : 전라남도농업기술원 원장 박 민 수

3. 재료 및 방법

가) 시험계

- 동물종(계통) : Mouse(ICR계)
- 공급원

명 칭 : (주) 엠제이 엘티디

주 소 : 서울 금천구 가산동 371-28 우림라이온스빌딩 C동 305호

☎ 02 - 2026 - 0071

대 표 : 정 기 원

- 시험계의 선택사유

농촌진흥청고시 제 2010 - 3호 농약의 독성시험기준과 방법에 마우스를 사용하도록 되어 있으며 ICR계통은 농약의 경구독성시험에 널리 사용되고 있어 기초자료가 충분히 축적 되어 있으므로 시험결과 해석 및 평가에 이용하는 것이 용이하다.

- 주령 및 체중범위

구 분	수 컷	암 컷
입수시 주령(wks)	4주령	4주령
입수시 체중(g)	21.9(21 - 23)	19.3(18 - 20)
투여시 주령(wks)	5주령	5주령
투여시 체중(g)	29.0(26 - 30)	22.2(21 - 23)

- 순화 및 검역

동물을 입수한 후 암·수 각 입수동물의 20마리를 검역하고, 나머지 동물은 동물 실험실 사육환경 하에서 8일간 순화시키면서, 피모 및 건강상태를 확인한 후 건전한 개체를 선별하여 시험에 이용하였다.

나) 사육환경

○ 사육환경

본 실험의 환경은 온도 $21 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 20\%$, 조도 500 ~ 600Lux, 조명시간 12시간(오전 8시 ~ 오후 8시)의 조건에서 사료와 음수를 공급하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

○ 사육상자

순화 및 시험기간 중 폴리카보네이트 사육상자(270×220×130mm)에 버드나무 깔집((주)엠제이엘티디, 한국)을 깔아 암·수 각각 5마리씩 사육유지 하였다.

○ 사료 및 음용수

사료 및 음수의 급여방법 : 사료는 실험동물용 고형사료(수퍼피드(주), 한국)를 자유 섭식시켰으며, 음수는 상수도수를 자유섭수시켰다.

다) 투여약량 수준설정 및 약제조제

○ 투여약량 설정

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

○ 투여약량 수준별 실험동물수

실험동물수는 농약의 등록기준(농촌진흥청고시 제 2010 - 3호)에서와 같이 암·수 각 5마리를 이용하였고, 개체식별은 등부에 picric acid를 이용하여 일련번호로 표시하였다.

○ 대조구의 설정

시험물질이 증류수에 잘 현탁되므로 증류수 대조군만을 두었다.

○ 용매의 선택 및 시험물질의 조제

시험물질이 증류수에 잘 현탁되므로 용매는 증류수를 사용하였고, 시험물질의 조제는 시험물질을 25,000mg 칭량한 후 증류수로 50ml까지 volume up하여 조제하였다.

○ 투여액량의 설정

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

라) 시험물질의 투여

○ 사료의 절식

투여개시 3 - 4시간 전부터 절식을 시킨 후 투여 1 - 2시간 후 사료 급여를 재개 하였다.

○ 투여경로 및 투여방법

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

마) 관찰 및 조사항목

○ 일반중독증상 및 치사동물

투여당일은 자주 관찰하였으며, 익일부터는 매일 1회씩 일반중독증상을 관찰하였고 (임상증상 관찰기록 용지, KNC/SOP/MAM/106 양식 1), 치사된 동물은 발견 즉시 꺼내서 부검을 실시하였다.

○ 체중측정

시험에 이용된 모든 동물에 대하여 투여 당일부터 D1, D3, D7, D10, D14일째 개체별 체중을 측정하고(개체별 체중기록 용지, KNC/SOP/MAM/108 양식1), 그 결과를 Excel Program을 이용하여 통계 처리하여 분석하였다.

○ 부검

시험기간 종료 후 살아있는 개체를 CO₂ 가스로 마취시킨 후 부검하여 내부장기의 육안적 이상유무를 확인하고, 그 결과를 개체별 부검기록 용지(KNC/SOP/MAM/025 양식1)에 기록하였다.

바) LD₅₀치 산출

○ 시험 종료 후 Probit Program을 이용하여 LD₅₀치를 산출하였다.

4. 결과 및 고찰

가) 치사동물 및 LD₅₀값

이상의 시험결과로 본 시험의 시험물질인 황련·밀구슬·황·비눗물 액상은 기초시험 약량인 5,000mg/kg를 투여한 결과 수컷과 암컷 모두 전체 시험기간 동안 치사 개체는 발견되지 않았다.

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

나) 일반중독증상

시험기간 동안 특이한 임상증상은 관찰되지 않았다.

다) 체중변화

시험에 이용된 동물의 D0, D1, D3, D7, D10, D14일째의 개체별 체중기록은 부표와 같다. 이 결과로 보아 약제투여군은 음성대조군과 비교하여 유의성 없이 대체로 증가하는 경향을 보였다.

라) 부검소견

시험 종료 후 생존한 전 개체에 대한 부검소견은 부표와 같다. 육안적 부검 결과 전 개체에서 특이한 소견은 관찰되지 않았다.

개체별 체중기록 용지

시험구분 : 급성경구독성시험

동물종(계통) : Mouse(ICR)

물질번호 : -

투여량 : - mg/kg

시험물질 : 증류수(D.W.)

사육 상자 번호	성별 동물 번호	투여후 경과일(DAT)					
		D0 (3/30)	D1 (3/31)	D3 (4/2)	D7 (4/6)	D10 (4/9)	D14 (4/13)
♂ 1	♂ 1	29	30	29	31	33	34
	♂ 2	30	31	30	32	34	35
	♂ 3	29	29	29	31	33	35
	♂ 4	29	29	29	31	34	36
	♂ 5	29	30	30	31	33	35
평 균		29.2	29.8	29.4	31.2	33.4	35.0
± 표준편차		± 0.45	± 0.84	± 0.55	± 0.45	± 0.55	± 0.71
♀ 1	♀ 1	25	25	25	26	26	29
	♀ 2	23	24	25	26	26	27
	♀ 3	23	22	23	24	24	23
	♀ 4	23	22	23	23	26	27
	♀ 5	22	23	23	24	22	24
평 균		23.2	23.2	23.8	24.6	24.8	26.0
± 표준편차		± 1.10	± 1.30	± 1.10	± 1.34	± 1.79	± 2.45

KNC/SOP/MAM/108 양식 1

개체별 체중기록 용지

시험구분 : 급성경구독성시험

동물종(계통) : Mouse(ICR)

물질번호 : KN1003

투여량 : 5,000 mg/kg

시험물질 : 황련·말구슬·황·비눗물 혼합액제

사육 상자 번호	성별 동물 번호	투여후 경과일(DAT)					
		D0 (3/30)	D1 (3/31)	D3 (4/2)	D7 (4/6)	D10 (4/9)	D14 (4/13)
♂ II	♂ 1	30	30	30	33	34	35
	♂ 2	30	30	31	35	37	39
	♂ 3	29	27	27	29	29	30
	♂ 4	26	30	30	33	34	36
	♂ 5	30	31	31	35	36	38
평 균		29.0	29.6	29.8	33.0	34.0	35.6
± 표준편차		± 1.73	± 1.52	± 1.64	± 2.45	± 3.08	± 3.51
♀ II	♀ 1	22	23	23	24	26	28
	♀ 2	21	22	22	22	22	24
	♀ 3	22	22	23	24	24	26
	♀ 4	23	24	24	25	25	28
	♀ 5	23	24	24	25	26	27
평 균		22.2	23.0	23.2	24.0	24.6	26.6
± 표준편차		± 0.84	± 1.00	± 0.84	± 1.22	± 1.67	± 1.67

KNC/SOP/MAM/108 양식 1

임상증상 관찰 내용 및 코드별 임상증상 표

A. 사망 또는 빈사 상태

코드	임상증상
A1	사후발견
A2	적발도살
A3	사고사망
A4	빈사혼수

B. 활동 및 체위 상태

B1	자발감소
B2	자발증가
B3	복와
B4	횡와
B5	배와
B6	원배위

C. 보행 상태

C1	보행실조
C2	마비보행
C3	경련
C4	진전
C5	선회
C6	전도
C7	회전

D. 정서 및 반응 상태

D1	세안
D2	흥분
D3	지각증가
D4	지각감소
D5	촉반소실
D6	정반소실

E. 영양 및 외피 상태

E1	빈삭
E2	오염
E3	외음
E4	입모
E5	탐모
E6	외상
E7	외부팽윤

F. 눈과 주변 상태

코드	임상증상
F1	안구 도출
F2	유루(낭적은 미포함)
F3	안지(장액성, 점액성,농성)
F4	안구혼탁
F5	백내장
F6	각막혼탁
F7	안방폐색
F8	축동
F9	산동

G. 코의 분비물 상태

G1	혈성
G2	장액성
G3	점액성
G4	포말성(회백색을 띠)

H. 피부 상태

H1	부종
H2	빈혈
H3	발적
H4	수포
H5	농도
H6	피난(수포, 농포가 터짐)
H7	가피
H8	인건
H9	백반
H10	반흔
H11	색소침착

I. 호흡 상태

I1	이상호흡
I2	부정호흡
I3	빈호흡
I4	호흡완화
I5	심호흡
I6	천호흡
I7	이상비음

J. 뇨 상태

코드	임상증상
J1	적색뇨
J2	황색뇨
J3	혈뇨

K. 분변 상태

K1	설사
K2	연변
K3	분갈색
K4	분소립
K5	분소량
K6	혈변

L. 기타 상태

L1	체온저하
L2	유연
L3	쇄약

M. 기타 외관 상태

M1	출혈
M2	복수
M3	정소 이상
M4	사경
M5	발바닥 이상
M6	이빨 결손
M7	이빨 이상

N. 특이증상 없음

N	정상상태
-	관찰내용 없음

A부터 N순서로 관찰하여 임상증상 관찰기록 용지에 코드로 기록함.

임상증상 관찰기록 용지

시험구분 : 급성경구독성시험

동물종(계통) : Mouse(ICR)

물질번호 : -

투여량 : - mg/kg

시험물질 : 증류수(D.W.)

날짜	성별 및 동물번호				
	♂ 1	♂ 2	♂ 3	♂ 4	♂ 5
(3/30)	N	N	N	N	N
(3/31)	N	N	N	N	N
(4/1)	N	N	N	N	N
(4/2)	N	N	N	N	N
(4/5)	N	N	N	N	N
(4/6)	N	N	N	N	N
(4/7)	N	N	N	N	N
(4/8)	N	N	N	N	N
(4/9)	N	N	N	N	N
(4/12)	N	N	N	N	N
(4/13)	N	N	N	N	N

KNC/SOP/MAM/106 양식 1

임상증상 관찰기록 용지

시험구분 : 급성경구독성시험

동물종(계통) : Mouse(ICR)

물질번호 : -

투여량 : - mg/kg

시험물질 : 증류수(D.W.)

날짜	성별 및 동물번호				
	♀ 1	♀ 2	♀ 3	♀ 4	♀ 5
(3/30)	N	N	N	N	N
(3/31)	N	N	N	N	N
(4/1)	N	N	N	N	N
(4/2)	N	N	N	N	N
(4/5)	N	N	N	N	N
(4/6)	N	N	N	N	N
(4/7)	N	N	N	N	N
(4/8)	N	N	N	N	N
(4/9)	N	N	N	N	N
(4/12)	N	N	N	N	N
(4/13)	N	N	N	N	N

KNC/SOP/MAM/106 양식 1

임상증상 관찰기록 용지

시험구분 : 급성경구독성시험

동물종(계통) : Mouse(ICR)

물질번호 : KN1003

투여량 : 5,000 mg/kg

시험물질 : 황련 · 멀구슬 · 황 · 비눗물 혼합액제

날짜	성별 및 동물번호				
	♂ 1	♂ 2	♂ 3	♂ 4	♂ 5
(3/30)	N	N	N	N	N
(3/31)	N	N	N	N	N
(4/1)	N	N	N	N	N
(4/2)	N	N	N	N	N
(4/5)	N	N	N	N	N
(4/6)	N	N	N	N	N
(4/7)	N	N	N	N	N
(4/8)	N	N	N	N	N
(4/9)	N	N	N	N	N
(4/12)	N	N	N	N	N
(4/13)	N	N	N	N	N

KNC/SOP/MAM/106 양식 1

임상증상 관찰기록 용지

시험구분 : 급성경구독성시험

동물종(계통) : Mouse(ICR)

물질번호 : KN1003

투여량 : 5,000 mg/kg

시험물질 : 황련 · 멀구슬 · 황 · 비눗물 혼합액제

날짜	성별 및 동물번호				
	♀ 1	♀ 2	♀ 3	♀ 4	♀ 5
(3/30)	N	N	N	N	N
(3/31)	N	N	N	N	N
(4/1)	N	N	N	N	N
(4/2)	N	N	N	N	N
(4/5)	N	N	N	N	N
(4/6)	N	N	N	N	N
(4/7)	N	N	N	N	N
(4/8)	N	N	N	N	N
(4/9)	N	N	N	N	N
(4/12)	N	N	N	N	N
(4/13)	N	N	N	N	N

KNC/SOP/MAM/106 양식 1

개체별 부검기록 용지

시험구분 : 급성경구독성시험

동물종(계통) : Mouse(ICR)

물질번호 : -

투여량 : - mg/kg

시험물질 : 증류수(D.W.)

부검소견	동물번호 및 성별									
	♂1	♂2	♂3	♂4	♂5	♀1	♀2	♀3	♀4	♀5
부검시 체중(g)	34	35	35	36	35	29	27	23	27	24
Sacrifice(S) / Decedents(D)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
기형관찰	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
외부소견	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
외관 상태 불량 입 주위 혈흔 혈루증 항문 및 생식기 주위 털변색(황갈색으로)										
내부소견	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Lungs 울혈(congestion)										
Liver 암색 변화(dark)										
암색 반점										
Spleen 암색 변화										
창백										
종대										
Kidney 암색 변화										
수질부위 탈변색										
Stomach 창백, 황, 갈색										
액상 내용물										
가스 충전										
확장, 팽창										
Small 창백/황색 액상 내용물										
Intestines 확장										
Caecum 황색 액상 내용물										
팽창										
Large 창백/황색 액상 내용물										
Intestines										
Urinary 방광 뇨 충전										
Tract										

Key : + 증상 관찰됨, N 정상

KNC/SOP/MAM/025 양식 1

개체별 부검기록 용지

시험구분 : 급성경구독성시험

동물종(계통) : Mouse(ICR)

물질번호 : KN1003

투여량 : 5,000 mg/kg

시험물질 : 황련·말구슬·황·비눗물 혼합액제

부검소견	동물번호 및 성별									
	♂1	♂2	♂3	♂4	♂5	♀1	♀2	♀3	♀4	♀5
부검시 체중(g)	35	39	30	36	38	28	24	26	28	27
Sacrifice(S) / Decedents(D)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
기형관찰	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
외부소견 외관 상태 불량 입 주위 혈흔 혈루증 항문 및 생식기 주위 털변색(황갈색으로)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
내부소견	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Lungs 율혈(congestion)										
Liver 암색 변화(dark)										
암색 반점										
Spleen 암색 변화										
창백										
종대										
Kidney 암색 변화										
수질부위 탈변색										
Stomach 창백, 황, 갈색										
액상 내용물										
가스 충전										
확장, 팽창										
Small 창백/황색 액상 내용물										
Intestines 확장										
Caecum 황색 액상 내용물										
팽창										
Large 창백/황색 액상 내용물										
Intestines										
Urinary 방광 뇨 충전										
Tract										

Key : + 증상 관찰됨, N 정상

KNC/SOP/MAM/025 양식 1

나. 급성 경피 독성

제 출 문

시험물질 : 황련·멀구슬·황·비눗물 액상

시험제목 : 황련·멀구슬·황·비눗물 액상의 급성경피독성시험

상기시험은 농약의 등록기준(농촌진흥청고시 제 2010 - 3호)에 준하여 실시하였음.

2010년 04월 21일

(주) 경 농 증양연구소장 황 인 천 (인)

시험제목 : 황련·멀구슬·황·비눗물 액상의 급성경피독성시험

시험물질 : 황련·멀구슬·황·비눗물 액상

시험목적 : 황련·멀구슬·황·비눗물 액상에 대한 급성경피독성 정보를 얻기 위하여 실시하였다.

시험방법 : 농약의 등록기준(농촌진흥청고시 제 2010 - 3호)에 준하여 실시하였다.

시험일정

- 시험계획서 승인일 : 2010년 02월 19일
- 동물입수일 : 2010년 03월 22일
- 검역순화기간 : 2010년 03월 22일 ~ 2010년 03월 30일(8일간)
- 시험물질투여일 : 2010년 03월 30일
- 부검일 : 2010년 04월 13일
- 보고서 제출일 : 2010년 04월 21일

시험의뢰자

- 명 칭 : 전라남도농업기술원
- 소재지 : 전라남도 나주시 산포면 206-7번지
☎ 061 - 330 - 2541
- 의뢰책임자 : 원장 박 민 수

시험기관

- 명 칭 : (주) 경 농 중앙연구소 독성연구
- 소재지 : 경북 경주시 구황동 226번지
- 대표자 및 운영책임자 : 소장 황 인 천

시험관계자

- 시험책임자 : 김 진
- 소 속 : (주) 경 농 중앙연구소 독성연구

본 시험은 시험책임자의 책임 하에 하기의 각 시험담당자가 실시하고 시험성적의 종합 평가를 시험책임자가 중심이 되어 실시하였다.

- 동물관리책임자 : 이 승 재
- 시험담당자 : 이 승 재, 유 성 민, 권 보 원, 허 완
- 동물실험실 : (주) 경농 중앙연구소 일반동물실

시험물질보관

본 시험에 사용한 시험물질은 당 연구소 시험물질 보관고에 보관하였으며 물질번호 (KN1003)를 부여받았다.

시험자료보관

본 시험의 시험기초자료 및 관계시험성적서는 당 연구소 자료보관실에 보관하였다.

- 시험기초자료(문서류) : 독성연구 연구실
- 시험계획서, 최종보고서(원본) : 독성연구 연구실
- 자료보관기간 : 5년
- 자료보관책임자 : (주) 경 농 중앙연구소 독성연구 연구원 유 성 민

시험결과 평가에 참여한 연구자 성명 및 날인(또는 서명)

2010년 04월 21일

- 동물관리책임자 : 이 승 재 (인)

- 시험 책임자 : 김 진 (인)

목 차

1. 요약

2. 시험물질

3. 재료 및 방법

가) 시험계

나) 사육환경

다) 투여약량 수준설정 및 약제조제

라) 시험물질의 투여

마) 관찰 및 조사항목

바) LD₅₀치 산출

4. 결과 및 고찰

가) 치사동물 및 LD₅₀값

나) 일반중독증상

다) 체중변화

라) 부검소견

부표

○ 개체별 체중기록 용지

○ 임상증상 관찰 내용 및 코드별 임상증상 표

○ 임상증상 관찰기록 용지

○ 개체별 부검기록 용지

1. 요약

황련·멸구슬·황·비눗물 액상에 대한 급성경피독성을 랫드(SD계통)를 이용하여 1회 경피 처리한 후 2주간 치사수, 일반중독증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰 조사한 결과는 다음과 같다.

- 시험물질을 수컷과 암컷 모두 기초시험 투여약량인 4,000mg/kg를 투여한 결과 수컷과 암컷 모두 전체 시험기간 동안 치사 개체는 발견되지 않았다.
- 시험기간 동안 임상증상은 투여 후 1일차에 수컷 3개체와 암컷 전개체에서 발적이 관찰되다가 투여 후 2일차부터 가피가 관찰되기 시작하였다. 투여 후 6일차에 수컷은 정상으로 회복하였고, 암컷은 투여 후 7일차에 정상으로 회복하였다.
- 체중의 변화는 음성대조군과 비교하여 시험 전 기간에 걸쳐 유의차 없이 증가하는 경향을 보였다.
- 약제투여와 관련한 육안적 부검소견에서 내부장기에 대한 특이한 영향은 없었다.

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

2. 시험물질

- 명 칭 : 황련·멸구슬·황·비눗물 액상
- 시료번호 : KN1003
- Lot 번호 : -
- 시료제출사 : 전라남도농업기술원
- 입 수 일 : 2010년 03월 11일
- 시 료 량 : 500ml × IEA
- 시험물질의 특성 : 액상 불투명, 어둡은 회주황색
- 시험의뢰자 : 전라남도농업기술원 원장 박 민 수

3. 재료 및 방법

가) 시험계

- 동물종(계통) : Rat(SD계)
- 공급원

명 칭 : (주) 엠제이 엘티디

주 소 : 서울 금천구 가산동 371-28 우림라이온스빌딩 C동 305호

☎ 02 - 2026 - 0071

대 표 : 정 기 원

○ 시험계의 선택사유

농촌진흥청고시 제 2010 - 3호 농약의 독성시험기준과 방법에 랫드를 사용하도록 되어 있으며 SD계통은 농약의 경피독성시험에 널리 사용되고 있어 기초 자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과의 해석 및 평가에 용이하다.

○ 주령 및 체중범위

구 분	수 컷	암 컷
입수시 주령(wks)	7주령	7주령
입수시 체중(g)	194.9(183 - 205)	148.6(142 - 155)
투여시 주령(wks)	8주령	8주령
투여시 체중(g)	241.4(233 - 251)	174.6(164 - 182)

○ 순화 및 검역

동물을 입수한 후 암·수 각 입수동물의 20마리를 검역하고, 나머지 동물은 동물실험실 사육환경 하에서 8일간 순화시키면서, 피모 및 건강상태를 확인한 후 건전한 개체를 선별하여 시험에 이용하였다.

나) 사육환경

○ 사육환경

본 실험의 환경은 온도 $21 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 20\%$, 조도 500 ~ 600Lux, 조명시간 12시간(오전 8시 ~ 오후 8시)의 조건에서 사료와 음수를 공급하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

○ 사육상자

순화 및 시험기간 중 폴리카보네이트 사육상자(420×260×180mm)에 버드나무 깔집((주)엠제이엘티디, 한국)을 깔아 암·수 각각 5마리씩 사육유지 하였다.

○ 사료 및 음용수

사료 및 음수의 급여방법 : 사료는 실험동물용 고품사료(수퍼피드(주), 한국)를 자유 섭식시켰으며, 음수는 상수도수를 자유 섭식시켰다.

다) 투여약량 수준설정 및 약제조제

○ 투여약량 설정

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

○ 투여약량 수준별 실험동물수

실험동물수는 농약의 등록기준(농촌진흥청고시 제 2010 - 3호)에서와 같이 암·수 각 5마리를 이용하였고, 개체 식별은 포리에 유성펜을 이용하여 일련번호로 표시하였다.

- 대조구의 설정

시험물질이 증류수에 잘 현탁되므로 증류수 대조군만을 두었다.

- 용매의 선택 및 시험물질의 조제

시험물질이 증류수에 잘 현탁되므로 용매는 증류수를 사용하였고, 시험물질의 조제는 시험물질 40,000mg을 칭량한 후 증류수로 50ml까지 volume up하여 조제하였다.

- 투여액량의 설정

투여액량은 시험에 이용되는 랫드의 체중과 약액 투여량을 고려하여 투여약량 수준 별로 모두 5ml/kg(b.w.)으로 설정하였다.

라) 시험물질의 투여

- 사료의 절식

경피독성시험의 투여 경로 상 절식시간은 따로 두지 않았다.

- 투여경로 및 투여방법

시험개시 하루 전 약제처리를 위한 시험동물의 등 부위를 동물용 제모기를 이용하여 체표면적의 약 10%를 제모한 다음 4×5cm 크기의 임상용 거즈에 조제된 시험물질을 골고루 도포한 후 약제유실을 방지하기 위하여 탄력밴드(Coban™; 3M, 미국)와 의료용반창고(Transpore™; 3M, 미국)로 고정시켜 주었다. 약제처리 24시간이 경과한 후 도포물을 제거하고, 피부에 남아 있는 시험물질을 증류수를 이용하여 잘 닦아 주었다.

마) 관찰 및 조사항목

- 일반중독증상 및 치사동물

투여당일은 자주 관찰하였으며, 익일부터는 매일 1회씩 일반중독증상을 관찰하였고(임상증상 관찰기록 용지, KNC/SOP/MAM/106 양식 1), 치사된 동물은 발견 즉시 꺼내서 부검을 실시하였다.

- 체중측정

시험에 이용된 모든 동물에 대하여 투여 당일부터 D1, D3, D7, D10, D14일째 개체별 체중을 측정하고(개체별 체중기록 용지, KNC/SOP/MAM/108 양식1), 그 결과를 Excel Program을 이용하여 통계 처리하여 분석하였다.

- 부검

시험기간 종료 후 살아있는 개체를 CO₂ 가스로 마취시킨 후 부검하여 내부 장기의 육안적 이상 유무를 확인하고, 그 결과를 개체별 부검기록 용지(KNC/SOP/MAM/025 양식1)에 기록하였다.

바) LD₅₀치 산출

- 시험 종료 후 Probit Program을 이용하여 LD₅₀치를 산출하였다.

4. 결과 및 고찰

가) 치사동물 및 LD₅₀값

이상의 시험결과로 본 시험의 시험물질인 황련·멀구슬·황·비눗물 액상은 기초시험 약량인 4,000mg/kg를 투여한 결과 수컷과 암컷 모두 전체 시험기간 동안 치사 개체는 발견되지 않았다.

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

나) 일반중독증상

시험기간 동안 임상증상은 투여 후 1일차에 수컷 3개체와 암컷 전개체에서 발적이 관찰되다가 투여 후 2일차부터 가피가 관찰되기 시작하였다. 투여 후 6일차에 수컷은 정상으로 회복하였고, 암컷은 투여 후 7일차에 정상으로 회복하였다.

다) 체중변화

시험에 이용된 동물의 D0, D1, D3, D7, D10, D14일째의 개체별 체중기록은 부표와 같다. 이 결과로 보아 약제투여군은 음성대조군과 비교하여 유의성 없이 대체로 증가하는 경향을 보였다.

라) 부검소견

시험 종료 후 생존한 전 개체에 대한 부검소견은 부표와 같다. 육안적 부검 결과 전 개체에서 특이한 소견은 관찰되지 않았다.

개체별 체중기록 용지

시험구분 : 급성경피독성시험

동물종(계통) : Rat(SD)

물질번호 : -

투여량 : - mg/kg

시험물질 : 증류수(D.W.)

사육 상자 번호	성별 동물 번호	투여후 경과일(DAT)					
		D0 (3/30)	D1 (3/31)	D3 (4/2)	D7 (4/6)	D10 (4/9)	D14 (4/13)
♂ 1	♂ 1	243	249	259	279	299	306
	♂ 2	248	246	255	272	287	294
	♂ 3	249	248	258	285	302	315
	♂ 4	226	230	237	247	270	275
	♂ 5	241	244	252	273	287	303
평 균		241.4	243.4	252.2	271.2	289.0	298.6
± 표준편차		± 9.24	± 7.73	± 8.93	± 14.50	± 12.63	± 15.18
♀ 1	♀ 1	182	184	188	199	215	225
	♀ 2	183	184	192	202	212	219
	♀ 3	174	183	188	203	208	218
	♀ 4	177	180	186	197	203	210
	♀ 5	172	173	178	186	194	205
평 균		177.6	180.8	186.4	197.4	206.4	215.4
± 표준편차		± 4.83	± 4.66	± 5.18	± 6.80	± 8.26	± 7.89

KNC/SOP/MAM/108 양식 1

개체별 체중기록 용지

시험구분 : 급성경피독성시험

동물종(계통) : Rat(SD)

물질번호 : KN1003

투여량 : 4,000 mg/kg

시험물질 : 황련·말구슬·황·비눗물 혼합액제

사육 상자 번호	성별 동물 번호	투여후 경과일(DAT)					
		D0 (3/30)	D1 (3/31)	D3 (4/2)	D7 (4/6)	D10 (4/9)	D14 (4/13)
♂ II	♂ 1	240	242	254	265	291	304
	♂ 2	233	244	245	252	268	275
	♂ 3	240	244	257	267	296	305
	♂ 4	243	243	258	275	294	310
	♂ 5	251	248	260	287	310	327
평 균		241.4	244.2	254.8	269.2	291.8	304.2
± 표준편차		± 6.50	± 2.28	± 5.89	± 12.93	± 15.17	± 18.75
♀ II	♀ 1	168	170	173	183	188	193
	♀ 2	182	186	189	197	207	208
	♀ 3	177	177	180	191	204	214
	♀ 4	182	184	188	201	210	219
	♀ 5	164	167	177	187	189	194
평 균		174.6	176.8	181.4	191.8	199.6	205.6
± 표준편차		± 8.23	± 8.35	± 6.95	± 7.29	± 10.36	± 11.72

KNC/SOP/MAM/108 양식 1

임상증상 관찰 내용 및 코드별 임상증상 표

A. 사망 또는 빈사 상태

코드	임상증상
A1	사후발견
A2	적발도살
A3	사고사망
A4	빈사혼수

B. 활동 및 체위 상태

B1	자발감소
B2	자발증가
B3	복와
B4	횡와
B5	배와
B6	원배위

C. 보행 상태

C1	보행실조
C2	마비보행
C3	경련
C4	진전
C5	선회
C6	전도
C7	회전

D. 정서 및 반응 상태

D1	세안
D2	흥분
D3	지각증가
D4	지각감소
D5	촉반소실
D6	정반소실

E. 영양 및 외피 상태

E1	빈사
E2	오염
E3	외음
E4	입모
E5	탐모
E6	외상
E7	외부팽윤

F. 눈과 주변 상태

코드	임상증상
F1	안구 도출
F2	유루(낭적은 미포함)
F3	안지(장액성, 점액성,농성)
F4	안구혼탁
F5	백내장
F6	각막혼탁
F7	안방폐색
F8	축동
F9	산동

G. 코의 분비물 상태

G1	혈성
G2	장액성
G3	점액성
G4	포말성(회백색을 띠)

H. 피부 상태

H1	부종
H2	빈혈
H3	발적
H4	수포
H5	농도
H6	피난(수포, 농포가 터짐)
H7	가피
H8	인건
H9	백반
H10	반흔
H11	색소침착

I. 호흡 상태

I1	이상호흡
I2	부정호흡
I3	빈호흡
I4	호흡완화
I5	심호흡
I6	천호흡
I7	이상비음

J. 뇨 상태

코드	임상증상
J1	적색뇨
J2	황색뇨
J3	혈뇨

K. 분변 상태

K1	설사
K2	연변
K3	분갈색
K4	분소립
K5	분소량
K6	혈변

L. 기타 상태

L1	체온저하
L2	유연
L3	쇄약

M. 기타 외관 상태

M1	출혈
M2	복수
M3	정소 이상
M4	사경
M5	발바닥 이상
M6	이빨 결손
M7	이빨 이상

N. 특이증상 없음

N	정상상태
-	관찰내용 없음

A부터 N순서로 관찰하여 임상증상 관찰기록 용지에 코드로 기록함.

임상증상 관찰기록 용지

시험구분 : 급성경피독성시험

동물종(계통) : Rat(SD)

물질번호 : -

투여량 : - mg/kg

시험물질 : 증류수(D.W.)

날짜	성별 및 동물번호				
	♂1	♂2	♂3	♂4	♂5
(3/30)	N	N	N	N	N
(3/31)	N	N	N	N	N
(4/1)	N	N	N	N	N
(4/2)	N	N	N	N	N
(4/5)	N	N	N	N	N
(4/6)	N	N	N	N	N
(4/7)	N	N	N	N	N
(4/8)	N	N	N	N	N
(4/9)	N	N	N	N	N
(4/12)	N	N	N	N	N
(4/13)	N	N	N	N	N

KNC/SOP/MAM/106 양식 1

임상증상 관찰기록 용지

시험구분 : 급성경피독성시험

동물종(계통) : Rat(SD)

물질번호 : -

투여량 : - mg/kg

시험물질 : 증류수(D.W.)

날짜	성별 및 동물번호				
	♀1	♀2	♀3	♀4	♀5
(3/30)	N	N	N	N	N
(3/31)	N	N	N	N	N
(4/1)	N	N	N	N	N
(4/2)	N	N	N	N	N
(4/5)	N	N	N	N	N
(4/6)	N	N	N	N	N
(4/7)	N	N	N	N	N
(4/8)	N	N	N	N	N
(4/9)	N	N	N	N	N
(4/12)	N	N	N	N	N
(4/13)	N	N	N	N	N

KNC/SOP/MAM/106 양식 1

임상증상 관찰기록 용지

시험구분 : 급성경피독성시험

동물종(계통) : Rat(SD)

물질번호 : KN1003

투여량 : 4,000 mg/kg

시험물질 : 황련·말구슬·황·비눗물 혼합액제

날짜	성별 및 동물번호				
	♂ 1	♂ 2	♂ 3	♂ 4	♂ 5
(3/30)	N	N	N	N	N
(3/31)	N	N	H3	H3	H3
(4/1)	N	N	N	H3	H3
(4/2)	N	N	N	H7	H7
(4/5)	N	N	N	N	N
(4/6)	N	N	N	N	N
(4/7)	N	N	N	N	N
(4/8)	N	N	N	N	N
(4/9)	N	N	N	N	N
(4/12)	N	N	N	N	N
(4/13)	N	N	N	N	N

KNC/SOP/MAM/106 양식 1

임상증상 관찰기록 용지

시험구분 : 급성경피독성시험

동물종(계통) : Rat(SD)

물질번호 : KN1003

투여량 : 4,000 mg/kg

시험물질 : 황련·멀구슬·황·비눗물 혼합액제

날짜	성별 및 동물번호				
	♀ 1	♀ 2	♀ 3	♀ 4	♀ 5
(3/30)	N	N	N	N	N
(3/31)	H3	H3	H3	H3	H3
(4/1)	H7	H3, H7	H7	H3	H3, H7
(4/2)	H7	H3, H7	H7	H3, H7	H3, H7
(4/5)	N	H7	H7	N	H7
(4/6)	N	N	N	N	N
(4/7)	N	N	N	N	N
(4/8)	N	N	N	N	N
(4/9)	N	N	N	N	N
(4/12)	N	N	N	N	N
(4/13)	N	N	N	N	N

KNC/SOP/MAM/106 양식 1

개체별 부검기록 용지

시험구분 : 급성경피독성시험

동물종(계통) : Rat(SD)

물질번호 : -

투여량 : - mg/kg

시험물질 : 증류수(D.W.)

부검소견	동물번호 및 성별									
	♂1	♂2	♂3	♂4	♂5	♀1	♀2	♀3	♀4	♀5
부검시 체중(g)	306	294	315	275	303	225	219	218	210	205
Sacrifice(S) / Decedents(D)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
기형관찰	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
<u>외부소견</u>	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
외관 상태 불량										
입 주위 혈흔										
혈루증										
항문 및 생식기 주위										
털변색(황갈색으로)										
<u>내부소견</u>	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Lungs 울혈(congestion)										
Liver 암색 변화(dark)										
암색 반점										
Spleen 암색 변화										
창백										
종대										
Kidney 암색 변화										
수질부위 탈변색										
Stomach 창백, 황, 갈색										
액상 내용물										
가스 충전										
확장, 팽창										
Small 창백/황색 액상 내용물										
Intestines 확장										
Caecum 황색 액상 내용물										
팽창										
Large 창백/황색 액상 내용물										
Intestines										
Urinary 방광 노 충전										
Tract										

Key : + 증상 관찰됨, N 정상

KNC/SOP/MAM/025 양식 1

개체별 부검기록 용지

시험구분 : 급성경피독성시험

동물종(계통) : Rat(SD)

물질번호 : KN1003

투여량 : 4,000 mg/kg

시험물질 : 황련·말구슬·황·비눗물 혼합액제

부검소견	동물번호 및 성별									
	♂1	♂2	♂3	♂4	♂5	♀1	♀2	♀3	♀4	♀5
부검시 체중(g)	304	275	305	310	327	193	208	214	219	194
Sacrifice(S) / Decedents(D)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
기형관찰	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
<u>외부소견</u>	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
외관 상태 불량										
입 주위 혈흔										
혈루증										
항문 및 생식기 주위										
털변색(황갈색으로)										
<u>내부소견</u>	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Lungs										
울혈(congestion)										
Liver										
암색 변화(dark)										
암색 반점										
Spleen										
암색 변화										
창백										
종대										
Kidney										
암색 변화										
수질부위 탈변색										
Stomach										
창백, 황, 갈색										
액상 내용물										
가스 충전										
확장, 팽창										
Small Intestines										
창백/황색 액상 내용물										
확장										
Caecum										
황색 액상 내용물										
팽창										
Large Intestines										
창백/황색 액상 내용물										
Urinary Tract										
방광 노 충전										

Key : + 증상 관찰됨, N 정상

KNC/SOP/MAM/025 양식 1

다. 잉어에 대한 급성 독성

제 출 문

시험물질 : 황련·멀구슬·황·비눗물 액상

시험제목 : 황련·멀구슬·황·비눗물 액상의 잉어에 대한 급성독성시험

상기시험은 농약의 등록시험기준과 방법(농촌진흥청고시 제2010-3호)에 준하여 실시하였음.

2010년 04월 21일

(주) 경 농 증양연구소장 **황 인 천** (인)

시험제목 : 황련·말구슬·황·비눗물 액상의 잉어에 대한 급성독성시험

시험물질 : 황련·말구슬·황·비눗물 액상

시험목적 : 황련·말구슬·황·비눗물 액상의 잉어에 대한 급성독성 정보를 얻기 위하여 실시하였다.

시험방법 : 농약의 등록시험기준과 방법(농촌진흥청고시 제 2010-3호)에 준하여 실시하였다.

시험일정

- 시험계획서 승인일 : 2010년 02월 19일
- 순화기간 : 2009년 08월 27일 ~ 2010년 04월 02일
- 시험물질 투여일 : 2010년 04월 05일
- 최종보고서 제출일 : 2010년 04월 21일

시험의뢰자

- 명 칭 : 전라남도농업기술원
- 소재지 : 전라남도 나주시 산포면 206-7번지
☎ 061 - 330 - 2541
- 의뢰책임자 : 원장 박 민 수

시험기관

- 명 칭 : (주) 경 농 중앙연구소 독성연구
- 소재지 : 경북 경주시 구황동 226번지
- 대표자 및 운영책임자 : 소 장 황 인 천

시험관계자

- 시험책임자 : 김 진
- 소 속 : (주) 경 농 중앙연구소 독성연구

본 시험은 시험책임자의 책임 하에 하기의 각 시험담당자가 실시하고 시험성적의 종합평가를 시험책임자가 중심이 되어 실시하였다.

- 시험생물 관리 책임자 : 이 승 재
- 시험담당자 : 이 승 재, 유 성 민, 권 보 원, 허 완

시험물질의 보관

본 시험에 사용한 시험물질은 당 연구소 시험물질 보관고에 보관하였으며 시료번호 (KN1003)를 부여받았다.

시험자료의 보관

본 시험의 시험기초자료 및 관계시험성적서는 당 연구소 자료보관실에 보관하였다.

- 시험기초자료 (문서류) : 독성연구 연구실
- 시험계획서, 최종보고서(원본) : 독성연구 연구실
- 자료보관기간 : 5년
- 자료보관책임자 : (주) 경 농 증양연구소 독성연구 연구원 유 성 민

시험결과 평가에 참여한 연구자 성명 및 날인(또는 서명)

2010년 04월 21일

- 시험생물 관리 책임자 : 이 승 재 (인)

- 시험책임자 : 김 진 (인)

목 차

1. 요약

2. 시험물질

3. 재료 및 방법

가) 시험계

나) 시험용기

다) 시험용수

라) 처리방법

마) LC₅₀ 산출법

바) 관찰 및 조사항목

4. 결과 및 고찰

가) 생사수 및 LC₅₀값

나) 일반 증독증상

첨부자료

- 수질검사성적
- 부표 1. 누적 치사수
- 부표 2. 일반 증독증상

1. 요약

황련·멸구슬·황·비눗물 액상의 잉어에 대한 급성독성 정도를 알아보기 위해 96시간 동안 생사수, 일반 증독증상을 관찰하고, 체중 및 전장과 시험수의 수질조사를 한 결과는 다음과 같다.

농도 (mg/L)	시험어류수 (마리)	누적치사수 (마리)			
		24h	48h	72h	96h
10.0	10	0	0	0	0

- 일반 증독증상으로 특이한 증상은 관찰되지 않았다.
- pH는 평균 7.2(최저 6.7 ~ 최고 7.5)이었고, DO는 평균 6.7(최저 6.1 ~ 최고 7.4)였다.
- 실험기간 중 평균 수온은 20.8°C(최저 20.7°C ~ 최고 20.8°C)이었다.

이상의 결과 본 시험물질의 48시간 및 96시간 LC₅₀(mg/L)은 > 10.0mg/L 으로 독성 분류상 어독성 III급이었다.

2. 시험물질

- 명 칭 : 황련·멸구슬·황·비눗물 액상
- 시료번호 : KN1003
- Lot 번호 : -
- 시료제출사 : 전라남도농업기술원
- 입 수 일 : 2010년 03월 11일
- 시 료 량 : 500ml × 1EA
- 시험물질의 특성 : 액상 불투명, 어두운 회주황색
- 시험의뢰자 : 전라남도농업기술원 원장 박 민 수

3. 재료 및 방법

가) 시험계

- 시험어종 : 잉어(*Cyprinus carpio*)
- 공 급 원
 - 명 칭 : 경상북도 수산자원개발연구소 민물고기연구센터
 - 주 소 : 경상북도 울진군 근남면 행곡리 228번지
 - ☎ 054 - 783 - 9413

○ 시험계의 선택사유

농촌진흥청고시 제 2010 - 3호 농약의 독성시험기준과 방법에 급성 어독성시험의 경우 시험 어류는 잉어 등을 사용하도록 되어 있으며, 잉어는 농약의 어독성시험에 널리 사용되고 있어 기초자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과의 해석 및 평가에 용이하다.

○ 순화 및 사육

본 시험의 환경은 실내에서 물의 순화, 여과를 시킬 수 있는 유리 수조 장치를 이용하였고, 시험용수는 지하수를 이용하여 수온 20 ~ 24°C, 조도 200 ~ 500Lux의 범위 내에서 2주간 사육, 순화하였다. 사료는 일반 관상어용 사료((주)제일사료, 한국)를 1일 1~2회 급여하였다.

나) 시험용기

원통형의 유리제품 12L 용기((φ 24×30cm)를 사용하였다.

다) 시험용수

시험용수는 지하수를 24시간 이상 정체시켰다가 사용하였으며, 수온의 조절은 항온 수조 내에 시험용 유리 수조를 넣고 22±2°C로 시험기간 동안 유지시켰다. 각 농도별 시험용수는 각각 10L를 사용하였다.

라) 처리방법

○ 시험농도 설정

기초시험 농도인 10.0mg/L로 시험을 수행하였다.

○ 시험약제의 조제

시험물질 200.0mg을 칭량한 후 증류수로 20ml까지 volume up하면서 강하게 교반하여 stock solution을 조제하였다. 처리는 stock solution 10ml을 10L시험 용기에 처리하였다.

○ 시험 어류의 절식

실험개시부터 실험 종료 시까지 먹이 급여를 중단하였다.

○ 시험 어류의 크기 및 수

잉어의 크기는 전장 5cm 이하의 것으로 선별하였으며, 수조 당 시험 어류수는 10마리를 수용하였다.

○ 산소공급

실험기간 중(2010년 04월 07일) 수조 내에 10분간 폭기를 하였다.

○ 대조구 설정

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

마) LC₅₀ 산출법

실험 종료 후 조사된 생사수를 토대로 Probit Program(US EPA, 1985)을 이용하여 각 조사시간대별 LC₅₀치 및 95% 신뢰한계를 산출하였다.

바) 관찰 및 조사항목

○ 일반 중독증상 및 생사수

처리당일은 30분, 1시간, 2시간, 4시간 그 이후에는 24, 48, 72, 96시간 간격으로 일반중독증상 및 생사수를 관찰 조사하였다.

○ DO, pH 및 수온측정

시험물질의 처리 당일부터 24h, 48h, 72h, 96h에 용존산소량(DO), pH 및 수온을 각각의 시험농도별 용기로부터 측정하였다.

○ 체중 및 전장측정

시험에 이용된 처리군과 음성대조군의 시험 어류에 대하여 실험 종료 시 체중과 전장을 측정하였다.

4. 결과 및 고찰

약 제	LC ₅₀ (mg/l)		체 중 (g)	전 장 (cm)	중독증상
	48hrs	96hrs			
황련·멀구슬·황·비눗물 액상	> 10.0	> 10.0	0.6±0.1	4.0±0.3	-
PCP-Na염	0.14 (0.13 ~ 0.14)*	0.14 (0.13 ~ 0.14)	0.9±0.2	4.3±0.3	-
음성대조군	-	-	0.5±0.1	3.9±0.3	-

* 95% 신뢰한계

가) 생사수 및 LC₅₀값

이상의 시험결과로 본 시험의 시험물질인 황련·멀구슬·황·비눗물 액상은 기초시험 농도인 10.0mg/L에서 전 실험기간 동안 치사개체가 발견되지 않았다. 따라서 본 약제의 반수치사농도(LC₅₀)은 48, 96시간 모두에서 >10.0mg/L로 독성분류상 어독성 III급이었다.

나) 일반 중독증상

일반 중독증상으로 특이한 증상은 관찰되지 않았다.

첨부자료

수질 검사 성적

시험물질 : 황련·멀구슬·황·비눗물 액상

		투여직후	48hrs	96hrs
DO	시험물질	6.8	6.5	6.1
	PCP-Na염 양성대조구	10.7	9.6	6.2
	음성대조구	13.2	8.0	7.2
pH	시험물질	7.5	7.4	6.7
	PCP-Na염 양성대조구	7.9	7.6	7.2
	음성대조구	7.5	7.5	6.9
Temp.	시험물질	20.8	20.8	20.8
	PCP-Na염 양성대조구	20.2	20.9	20.9
	음성대조구	20.8	20.8	20.8

부표 1. 누적 치사수

Nominal concentration (mg/L)	Number of fish tested	Cumulative number of dead fish			
		24hours	48hours	72hours	96hours
Control	10	0	0	0	0
10.0	10	0	0	0	0

부표 2. 일반 중독증상

Nominal concentration (mg/L)	Symptoms of Intoxication			
	24hours	48hours	72hours	96hours
Control	NOR(10)	NOR(10)	NOR(10)	NOR(10)
10.0	NOR(10)	NOR(10)	NOR(10)	NOR(10)

() : Number of fish

* Abbreviation of observable symptoms of intoxication

NOR : Normal

SUR : Fish mainly at the surface

BOT : Fish mainly at the bottom

LOE : Loss of equilibrium

HEM : Hemorrhage

VDE : Vertebral deformation

AOM : Attached other substance in the fin

- : Could not observed because of 100% mortality

4. 결과요약

멸구슬 입제에 대해 급성경구독성을 마우스(ICR계통)를 이용하여 1회 경구처리한 후 2주간 치사수, 일반중독증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰 조사한 결과, 반수치사약량(LD₅₀)은 > 2,500mg/kg으로 독성분류상 저독성으로 확인되었다. 육안적 부검 결과 전 개체에서 특이한 소견은 관찰되지 않았다. 급성경피독성을 랫드(SD계통)를 이용하여 1회 경피 처리한 후 2주간 치사수, 일반중독증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰 조사한 결과, 반수치사약량(LD₅₀)은 > 2,000mg/kg으로 독성분류상 저독성으로 확인되었다. 잉어에 대한 급성독성 시험 결과, 48시간 및 96시간 LC₅₀(mg/L)은 > 10.0mg/L 으로 독성분류상 어독성 III급이었다.

황련·멸구슬·황·비눗물 액상에 대한 급성경구독성을 마우스(ICR계통)를 이용하여 1회 경구처리한 후 2주간 치사수, 일반중독증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰 조사한 결과, 반수치사약량(LD₅₀)은 > 5,000mg/kg으로 저독성으로 확인되었다. 급성경피독성을 랫드(SD계통)를 이용하여 1회 경피 처리한 후 2주간 치사수, 일반중독증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰 조사한 결과 반수치사약량(LD₅₀)은 > 4,000mg/kg으로 저독성으로 확인되었다. 잉어에 대한 급성독성 정도를 알아보기 위해 96시간동안 생사수, 일반 중독증상을 관찰하고, 체중 및 전장과 시험수의 수질조사를 한 결과, 일반 중독증상으로 특이한 증상은 관찰되지 않았으며, 48시간 및 96시간 LC₅₀(mg/L)은 > 10.0mg/L 으로 독성분류상 어독성 III급이었다.

4장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1절. 목표달성도

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 1차년도의 연구 개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도

연구개발 목표	평 가		목표 달성도 (%)	참조부문 (제 3 장)
	평가의 착안점	평가의 척도(%)		
○ 제충국 살충효과 우수 품종선발	○ 살충물질 함량과 꽃수량	10	100	1절
○ 제충국 영양체 번식 기술 확립	○ 번식 효율성	10	100	1절
○ 추출물의 대량생산	○ 추출용매별 수율 구명	15	100	2절
○ 추출물 살충활성증진	○ 보조제에 의한 살충율 증진 검정	15	100	3절
○ 추출물 살충활성	○ 벼 해충에 대한 살충활성 구명	15	100	3절
○ 추출물 제품화	○ 제형 방법별 살충율 검정	20	100	4절
○ 방제 매뉴얼 개발	○ 벼 해충의 방제 매뉴얼 개발	15	100	5절

2. 제 2차년도 연구 개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도

연구개발 목표	평 가		목표 달성도 (%)	참조부문 (제 3 장)
	평가의 착안점	평가의 척도(%)		
○ 제충국 채종기술 확립	○ 종자 채종 방법 체계화	10	100	1절
○ 제충국 재배 기술 확립	○ 정제식밀도 구명	10	100	1절
○ 시제품 활성물질 분리	○ 각 분획별 활성물질 분리	15	100	2절
○ 시제품 살충활성	○ 배추 해충에 대한 살충 활성 검정	15	100	3절
○ 시제품의 살충력 보전	○ 보조제 및 보존 방법에 따른 검정	15	100	3절
○ 추출물 제품화	○ 제형 방법별 살충을 검정	20	100	4절
○ 방제메뉴얼 개발	○ 배추 해충의 방제 메뉴얼 개발	15	100	5절

3. 제 3차년도 연구 개발 목표와 평가의 착안점 및 달성도

연구개발 목표	평 가		목표 달성도 (%)	참조부문 (제 3 장)
	평가의 착안점	평가의 척도(%)		
○ 제충국 우수 품종 등록	○ 품종 등록 출원 유무	10	100	1절
○ 제충국 대규모 생산 단지 조성	○ 단지 조성 유무	10	100	1절
○ 추출물 살충활성	○ 딸기 해충에 대한 살충 활성 검정	15	100	3절
○ 포장 방제가 정립	○ 딸기의 포장 방제가 검정	15	100	4절
○ 방제메뉴얼 개발	○ 딸기 해충의 방제 메뉴얼 개발	15	100	5절
○ 살충활성 물질 분리	○ 살충활성 물질의 성분 구명	20	100	2절
○ 농가현장실증	○ 농가 만족도 검정	15	100	5절

2절. 관련분야에의 기여도

식량 생산에 있어서 농약의 사용은 필요악으로서 해충으로부터 작물을 보호하기 위해서는 농약의 사용은 불가피하므로 인간과 생물 생태계에 심각한 부작용을 일으키는 유기합성 농약을 대체할 수 있는 새로운 농약의 개발이 필요하다. 해충방제를 위한 유기합성 농약의 광범위한 사용과 연용은 약제 저항성해충의 출현을 야기하였으며, 이에 대응하여 갈수록 약효가 강하고 지속적인 새로운 유기합성 농약이 개발되어 왔으나 인축에 대한 독성, 식품에 대한 잔류 독성, 유용동식물의 파괴, 잠재해충의 발생 등의 부작용은 사회적인 문제로 대두 되었을 뿐만 아니라, 농약의 잔류독성으로 인한 토양 및 수질 등의 환경오염의 심각성도 날로 가속화되고 있는 실정이다. 이러한 유기합성 농약을 대체할 수 있는 새로운 농약의 개발이 필요한 시점에 등장한 것이 저공해성 천연물 농약, 즉 식물추출물이다. 세계 농약의 20%를 생물농약으로 대체하자는 “리우환경회의 협약” 이후 세계적으로 새로운 천연생물 농약을 개발하여 생물자원 이용성을 확대하자는 움직임이 뚜렷해지고 있는 것이다. 식물체로부터 유래하는 유용물질은 해충에 대한 살충효과, 기피효과 및, 효소저해 활성 물질들로서 부작용이 없고 막대한 시간과 비용이 투자되어야 하는 화학합성농약의 개발에 비해 저투입 개발이 가능하다는 장점을 지니고 있다. 국내 농약시장은 1997년에 7,700억원이며 그 중 생물농약은 13억원에 불과하다. 그러나 2004년에는 유기합성농약을 50% 줄여야 하며 이런 추세 라면 2010년에는 생물농약시장은 천2백억원대의 시장이 형성될 것으로 보인다. 본 연구에서는 1) 제충국의 형태적 특성과 재배방법을 통한 대량 증식과 생물농약 원료 단지를 조성하였다. 2) 멀구슬의 살충성분 분석 결과 1, 2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester (Compound 3, $C_{24}H_{38}O_4$, MW:390.28), olean-12-en-28-oicacid,3-oxo-,methylester(Compound 4, $C_{31}H_{48}O_3$, MW:468.36) and olean-18-en-28-oicacid,3-oxo-,methylester (Compound 5, $C_{31}H_{48}O_3$, MW:468.36) 총 3개의 compound가 추정되었다. 3) 친환경 농업을 하기 위해 가장 필요한 병해충 방제제 개발을 통해 친환경 인증 면적을 더욱 높일 수 있도록 하였다. 또한 이들 제품의 특성을 확인하여 친환경 농가에서 마음 놓고 사용할 수 있도록 급성경구, 경피독성 및 잉어에 대한 독성까지 확인하였다.

1. 기술적 측면에서의 기여도

본 연구를 통하여 개발된 식물추출물 제형은 주용 해충의 방제 법을 확립하는데 기초를 세웠다. 국내에서 원자재를 재배 생산함으로써 고부가가치화로 연결될 수 있는 가능성이 높고 기술력 제공으로 특성화된 재가공 원료나 고부가가치제품으로 가공되어 수요처를 확대하는 결과를 갖게 됨으로써 환경오염 방지 및 응용연구를 확대할 수 있을 것이다. 농업선진국인 미국, 일본, 네덜란드 등과 경쟁하여 향후 “우리나라의 자원”을 최대한 활용할 수 있는 관련기술의 개발로 연결될 것이다. 우리만의 추출기술 노하우를 개발시켜 중국 등에서 crude 추출물을 이용한 개발대상국의 해충방제방법을 대체할 수 있다. 벼와 배추, 딸기의 주요 해충인 진딧물, 점박이응애, 배추좀나방 방제제로서 멀구슬나무 열매를 건조-분쇄-에탄올에 침지-여과 과정을 통해 추출한 추출물을 9:1 비율로 혼합한 액을 90% 첨가

하여 주성분으로 하고 첨가제로서 지방산에 벗짚 잿물과 난황 레시틴을 함유하여 만든 액상 살충비누를 10%~50% 넣어 만든 액상 살충비누를 5~10% 보조성분으로 추출물이 500배액에서 95%이상의 살충효과 나타나며, 제충국에 TDE7과 OA1019 물질을 혼합하여 사용하는데 이는 친환경재배에 부적합하므로 벗짚 잿물과 난황 레시틴을 함유한 유화제를 사용함으로써 기존 추출물과 같이 점박이용애, 진딧물에 대해 95%, 배추좀나방에 대해 80%이상의 살충효과를 보이고 있으며, 벼 친환경 해충 방제를 위해 모내기 직전 육묘상자에 멀구슬 입제를 일정량 살포함으로써 초기해충인 벼물바구미와 벼잎굴파리, 벼줄기굴파리, 벼에잎굴파리 등을 방제하고자 멀구슬액을 제오라이트에 분사하여 입제화시킨 후 고령토로 코팅처리함으로써 입제의 지속성을 유지시켜 벼의 초기 해충을 방제하는 기술과 병해충 동시에 방제하기 위한 기술등의 발전이 이루어짐으로써 유기농업을 할 수 있는 조건이 더 다양해 질 수 있다.

2. 학문적 측면에서의 기여도

제충국과 멀구슬을 이용한 친환경 방제제 개발은 자연의 구성원인 식물체를 이용하기 때문에 합성농약처럼 잔류독성이나 인축에 대한 해가 훨씬 적은 장점이 있으며 또한 햇빛의 자외선에 쉽게 분해가 되기 때문에 환경 오염이나 농산물의 안정성 제고에도 도움을 줄 수 있다.

본 연구를 통해 '제충국 계통의 특성 및 추출물 방법에 따른 주요 해충의 살충활성 검정'과 '제충국, 멀구슬 추출물의 천적에 대한 독성 및 배추좀나방 방제 효과'에 대한 논문을 한국 유기농업학회에 제출하였으며 산업재산권으로 '벼물바구미 방제용 멀구슬 열매 추출 조성물(출원 번호 10-2007-0109294)'과 '벼물바구미 방제용 멀구슬 열매 추출 조성물'과 딸기 병해충 동시 방제용 멀구슬열매 추출 조성물'에 관한 특허를 청구할 예정이다.

3. 경제·산업적 측면에서의 기여도

2004년 현재 전 세계에 등록된 생물농약은 276여종으로 알려져 있는데, 이 중에서 살충제가 172종(62%), 살균제가 49종(18%), 살선충제가 4종(1.4%), 제초제가 16종(6%), 식물생장조절제와 기타가 각각 14종(5%)과 21종(7.6%)이며 이들의 대부분은 전량 외국의 농약 회사에서 수입되어 현장에서 사용되는 고품이 및 점박이용애 방제용 농약의 수입대체 효과는 막대할 것이다. 또한 유기농자재로 등록되어 있는 자재들의 원료 대부분은 수입에 의존하고 있는 실정으로 국내에 원료 단지를 만들어 대량 구매가 이루어 질 수 있도록 한다면 대체작물로서의 가치 또한 크다 하겠다. 전 세계적으로 식물추출물에 의한 해충의 기피효과, 섭식저해, 곤충생장조절에 관련하여 알려진 시료는 866여종이다. 선충에 대해서는 150여종, 응애류는 30여종, 두더지나 쥐에 대해서 33여종이 알려져 있다. 이 중에서 식물의 살충활성을 나타내는 화학성분의 생물학적 특성이나 분자구조식 등은 260여종에서 밝혀져 있다. 국내 기술로 개발된 특화된 기술 우위성을 선점하고 농산물의 가격 및 품질 경쟁력을 높일 수 있는 제품의 개발로 농민의 소득증대에 기여할 것이다. 생물농약은 순수 국내기술로 만들어진 것이므로 외국으로부터의 기술도입이 필요 없고 싼값으로 대량생산할 수 있는 장점이 있다.

경제성으로는 기존의 살충제에 비해 생산단가가 저렴하다. 이를 전체적인 생산기술과 경제적인 면에서 비교할 때는 기존의 것보다 10-20배의 절감 효과가 있다. 국내시장은 물론 환경규제가 엄격한 선진국으로의 수출전망도 밝다고 볼 수 있다. 특히 멀구슬 입제 개발로 인해 국내 식물인 멀구슬나무 이용에 의한 수입대체 효과는 20억원으로 추정되며 유기재배는 2,500ha에 사용 시 3억의 매출과 함께, 노동력 78% 절감 (약제살포 시간 180분/ha → 40분)을 가져올 것으로 예상되며 생물농약 원료 생산단지 구축을 위해 2009년도에 전라남도농업기술원에서 멀구슬 묘목 3,000주를 이미 분양하였으며 제충국 역시 2만주를 2010년도에 분양하였다.

5장. 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1절. 기업화 추진방향

멸구슬나무 열매를 입제화시킴으로써 벼물바구미 94.4%, 벼굴파리류는 94.8%까지 방제할 수 있는데, 지금까지 벼물바구미를 방제하기 위해서는 이앙 후 유제를 사용하였으나 이번에 개발된 제품은 이앙당일 상자당 80g씩 뿌려줌으로써 방제에 드는 노동력을 78% 절감하는 이점을 가지고 있다. 또한 딸기에서 점박이용애는 멸구슬 추출물을 3회 살포하여 방제하면 98% 방제효과가 나오며 진딧물은 멸구슬과 제충국을 교호로 살포하여 93.8%의 방제가 가능하다. 잣빛곰팡이병은 황련추출물을 딸기 개화 후 14일 이내에 7일 간격으로 3회 살포하면 62%의 방제 효과가 나타난다는 결과를 바탕으로 멸구슬에 황련과 황을 일정 비율로 혼합하여 제품을 개발하였는데 500배로 7일 간격 3회 살포함으로써 점박이용애 93%, 복숭아혹진딧물 92%, 잣빛곰팡이병 61% 방제가 가능하며, 병해충 단독방제 했을 때와 동일한 방제효과와 함께 살포횟수 감소에 따른 노동력과 방제비용을 절감하여 생산비를 절감하는 성과를 얻었다. 이번에 개발된 제품에 대한 경구독성, 경피독성, 어독성을 평가하여 독성이 없어 유기목록 공시자재로 등록할 계획이며 특허출원을 하여 지적재산권을 확보하며 (주)팜스코리아에 기술이전하여 농가에 조기 보급될 수 있도록 할 계획이다.

2절. 교육 지도 홍보 계획

본 연구에서 얻은 결과를 바탕으로 영농활용과 대농민 교육자료로 활용하였으며 앞으로 지속적인 홍보도 병행할 계획이다. 교육은 전남 시군의 농업대학과 농업기술원의 농업생명대학, 마이스터대학 벼 재배반 등에 2008년부터 년 10회 이상의 교육 과정을 통해 벼멸구 방제용 멸구슬 제형과 벼물바구미 방제용 입제에 대한 성적을 강의하였으며 딸기 병해충 동시 방제에 관련한 자료는 홍보를 마친 상태이다. 이들의 홍보 내용을 보면 친환경 벼물바구미 방제자재 개발, 친환경 벼물바구미 방제자재 개발, 제충국으로 친환경 농업 실천, 친환경 천연살충제 원료식물 제충국 보급, 딸기농사 쉬워진다, 벼물바구미 방제용 '친환경 제제' 2종 개발, 농기원 천연살충제 제충국 확대보급 등이다. 앞으로도 이들 결과는 농민 교육에 지속적으로 사용할 계획이다.

3절. 지식재산권 확보 계획

본 연구에서 얻은 결과를 바탕으로 3건의 생물 농약을 개발하였으며 이들 '벼멸구 방제용 멸구슬 열매 추출 조성물(출원번호 10-2007-0109294)'과 '벼물바구미 방제용 멸구슬 열매 추출 조성물'과 딸기 병해충 동시 방제용 멸구슬열매 추출 조성물'에 관한 특허를 청구할 예정이다. 벼멸구는 해마다 중구에서 날아와 벼에 막대한 피해를 주는 해충이며 멸구슬은 전남 해안 지방을 중심으로 자생하는 나무로서, 멸구슬의 잎·수피·가지·과실·종자추출물은 해충에 대해 기피작용, 섭식저해, 살충, 성장저해 등의 영향을 보이는 것으로 알려져 있다. 멸구슬에

벚꽃잎, 난황레시틴을 넣어 만든 액상 살충비누를 혼합 한 제제는 벼멸구에 대해 95.3%의 살충율을 보이는 우수한 생물약제이다.

벼물바구미는 야산에서 월동 한 후 5월 중하순부터 논으로 이동하여 성충은 엽맥을, 유충은 뿌리를 갉아먹기 때문에 분얼이 억제되고 피해가 심할 때에는 생육이 정지되게 하는 벼줄기굴파리와 함께 벼 생육초기의 주요 해충이다. 지금까지 벼물바구미를 방제하기 위해서는 이앙 후 유제를 사용하였으나 이번에 개발된 제품은 이앙당일 상자당 80g씩 뿌려줌으로써 방제에 드는 노동력을 78% 절감하는 이점을 가지고 있다. 본 연구 결과 멀구슬나무 열매를 입체화시킴으로써 벼물바구미 94.4%, 벼굴파리류는 94.8%까지 방제할 수 있었다. 또한 딸기 병해충 중에 가장 방제가 어려운 점박이용애와 진딧물 그리고 잣빛곰팡이병을 동시에 방제하는 자재를 개발하였는데, 점박이용애는 멀구슬 추출물을 3회 살포하여 방제하면 98% 방제효과가 나오며 진딧물은 멀구슬과 제충국을 교호로 살포하여 93.8%의 방제가 가능하다. 잣빛곰팡이병은 황련추출물을 딸기 개화 후 14일 이내에 7일 간격으로 3회 살포하면 62%의 방제 효과가 나타난다는 기존의 결과를 바탕으로 병과 해충이 단독으로 발생한 경우에는 문제가 없지만 동시에 발생하였을 때 방제하기 위한 친환경 자재이다. 멀구슬에 황련과 황을 일정 비율로 혼합하여 제품을 개발하였는데 500배로 7일 간격 3회 살포함으로써 점박이용애 93%, 복숭아혹진딧물 92%, 잣빛곰팡이병 61% 방제가 가능하며, 병해충 단독방제 했을 때와 동일한 방제효과와 함께 살포횟수 감소에 따른 노동력과 방제비용을 절감하여 생산비를 절감하는 성과를 얻었다.

이번 연구에서 개발된 제품에 대한 경구독성, 경피독성, 어독성을 평가하여 독성이 없어 유기목록 공시자재로 등록할 예정이며, 특허출원을 하여 지적재산권을 확보하며 친환경자재 회사에 기술이전하여 농가에 조기 보급할 계획이다.

4절. 추가연구, 타 연구 활용 계획

3년으로 계획된 본 연구에서 제충국과 멀구슬을 이용하여 벼와 딸기, 배추의 주요 해충을 방제하는 기술은 정립되었다. 그러나 해충 특성상 한 가지 방제 자재만 가지고 해충을 방제하게 되면 약제 저항성에 노출되기 쉬우며 약제저항성이 유발되면 다른 식물 추출물 역시 방제 효과가 떨어지게 되는 어려움이 있다. 또한 온실에서의 해충종류는 진딧물과 응애류 외에도 온실가루이, 담배가루이, 총채벌레 등이 상존하고 있기 때문에 이들 해충도 같이 방제하기 위한 자재의 개발이 필요하다.

따라서 식물체에 있는 식물오일을 이용하는 방법이 있는데 방향성 식물체들은 화장품, 향료, 세제를 비롯한 의약품 및 식품산업 등을 포함한 다양한 산업들에서 활용되고 있다. 꿀풀과에 속하는 속들로 잘 알려진 *Micromeria*, *Origanum* 그리고 *Nepeta* 등은 전형적인 지중해성 식물체들이다. 특히, *Nepeta racemosa*, *Origanum vulgare* 그리고 *Micromeria fruticosa* 등은 주로 터키 동부 Anatolia 지역에 분포한 야생 한약재들이다. 이들 식물에서 추출된 정유는 온실가루이 등 난방제 해충에 도움을 줄 수 있을 것으로 판단되므로 미생물제와 오일 등을 혼합한 병해충 방제 자재를 지속적으로 개발할 필요가 있겠다.

6장. 연구개발과정에서 수집한 해외 과학 기술 정보

1절. 호주 유기농업 현장 방문

1. 출장목적

- 친환경 자재를 이용한 호주의 유기농업 현황 파악
- 해충 방제를 위한 친환경 자재 사용과 제충국 종자 수집

2. 출장기간 : 2008. 2. 12 ~ 2. 18(6박 7일)

3. 출 장 자 : 김선곤, 김도익

4. 기술 정보내용

- 호주 친환경 농업 현황 파악, 친환경 농자재 이용방법과 제조방법
- 천적 활용 친환경 농산물 인증현황
- 제충국이용 주요 해충 자재 현황 파악 및 제충국 종자 수집

가. 애들레이드 대학교(www.adelaide.edu.au)

- 애들레이드 대학은 4개 캠퍼스 (Roseworthy, Waite, Thebarton, North Terrace)로 구성되어 있고 그 중 Waite 캠퍼스가 가장 큰 농업 관련 연구 complex이며, 국가 연구기관 및 민간 연구기관이 모여있음
- 면담자는 곤충학과 교수인 Dr. Michael Keller, SARDI 연구원인 Dr. Peter Taverne, AWRI 포도재배 전문가 Dr. Sally-Jean Bell 등이었다.
- 천적, 농약 대체물질 및 잡초 IPM 연구현황 청취 및 온실 관찰하였으며 포도의 IPM 연구현황을 청취하였다.
- 대학 연구실과 국가기관인 SARDI (South Australian Research and Development Institute), CSIRO, 국가 및 민간 연구기관 연합체인 CRC (Cooperative Research Center)의 농업연구 분야, 민간연구소인 AWRI (Australian Wine Research Institute) 등이 동일 캠퍼스 내에 자리하여 상호 유기적으로 연구 수행하고 있으며 Brassica IPM의 중추적 역할을 담당하며, 천적연구가 활발하였다. 이들은 또한 감귤류, custard apple 등의 해충방제용 살충제 대체물질로 paraffin oil 연구 중이었다.

나. CSIRO 곤충연구소(www.ento.csiro.au)

- 현황 : 국내에 7개, 해외에 5개의 연구소 시험장을 운영하고 있으며, 캔버라의 본소에는 Environmental Management, Plant Protection, Crop Product Protection, Bio-industry, Biosecurity 등 5개의 연구부가 있음
- 수행 내용은 곤충 관련 연구현황 청취 및 곤충 표본관 관찰과 책자 및 자료 수집 : 연구보고서 등 6종

- 국립 연구기관인 CSIRO의 21개 business unit 중 하나로 농업인 컨설팅 및 자료 제공은 유료이며, 전체 예산의 30~50%는 외부 자금이였다. 3개 층으로 구성된 곤충 표본관에는 11,000,000점 이상이 수집되어 있으며, 저장 곡물 보호부에서는 phosphine의 이용법 (SIRPFLO[®])을 개발하였고, MB 대응으로 ethyl formate (ERANOL[®]), carbonyl sulfide 등을 상품화하고 있으며, 이들은 저장해충 관리에 특히 관심이 많았다. 저장해충을 관리할 때 합성 피레스로이드 대신 천연 제충국을 사용하기도 하며 제충국과 다른 보조제를 사용하여 제품을 만들기도 하였다. 또한 Bt 유전자를 이용하는 연구가 활발하였으며, 곤충병원 미생물 (Green Guard[®]), 곤충기생 선충을 상품화하고 있었다. 또한 온실가루이 생물적 방제를 위한 온실가루이좀벌 연구를 진행 중인데 호주에서 발생하는 silver whitefly는 우리나라에서 문제되는 담배가루이로 biotype B는 세계 각국에서 해충으로 인식되고 있으며 목화 채소류 및 콩류에서 발생한다. 호주는 1994년 이후 유입되어 지금은 퀸즈랜드 등 여러 지역에서 심각한 피해를 유발하고 있어 호주에 자생하는 온실가루이를 수집 분류 동정하며(약 150여종), 온실가루이좀벌을 대량 사육하여 야외포장에 방출 재포획 등의 방법을 통해 온실가루이의 방제능력을 연구 중이다.

5. 출장성과 및 활용방안

- 호주에서는 미생물 농약 개발이 자유로워 배추좀나방 방제용 기생성 천적인 *Diadegma* 도입·정착시킨 이래 장미의 진딧물 방제를 위하여 *Aphidius rosae* 방사·정착, 굽벵이류 방제를 위한 곤충기생성 선충 개발, *Metarhizium*, *Beuveria*, *Zoopthora* 등을 이용한 미생물 살충제 상품화 (BioCane[®], GreenGuard[®] 등), 목초지 문제잡초에 대한 생물적 방제 : paterson's curse (국화과 다년생 잡초)에 root weevil, crown weevil, flea beetle 등을 이용한 방제를 하고 있었다. 우리나라에서도 이러한 정보를 습득하여 적용할 수 있도록 공동 연구등을 하는 기회가 있으면 좋을 것 같다.
- 호주의 타스메니아주에서는 제충국을 대량으로 재배하고 있는데 이들은 재배한 제충국을 공동으로 구매하여 한 공장에서 추출을 하고 있다. 전남 지역에 제충국 단지를 조성하는데 이번 여행이 도움이 될것으로 보이며, 호주의 추출 노하우를 배울수는 없겠지만 케냐등 다른 나라에서 제충국 추출 수율을 높이는 기술을 빨리 습득하여 우리 지형과 기후에 맞는 제충국 품종을 선발하면 좋겠다.
- 제충국과 멀구슬을 이용한 생물농약 개발에 필요한 자료 수집
- 친환경 재배를 위한 해충 방제법중 식물 추출물 이용 가능성 확인
- 호주에서 재배 되는 제충국 종자 확보로 국내 적응성 검토

7장. 참고 문헌

- Ahn, J-W., Choi, S-U., and Lee, C-O. 1994. Cytotoxic limonoids from *Melia azedarach* var. Japonica. *Phytochemistry*. 36:1493-1496.
- Akol, A.M., P.G.N. Njagi, S. Sithanantham, J.M. Mueke. 2003. Effects of two neem insecticides on the attractiveness, acceptability and suitability of diamond back moth larvae to the parasitoid, *Diadegma mollipla* (Holmgren) (Hym., Ichneumonidae). *J. Appl. Entomol.* 127:325-331.
- Alford, D.V. 1984. A colour atlas of fruit pests - their recognition, biology and control. Wllfe publishing Ltd, London. UK.
- Arnason, J.T., B. J. R. Philogene, P. Morand, K. Imrie, S.Iyengar, F. Duval, C. Soucy-Breau, J.V. Scaiano, N. H. Werstiuk, B. hadspieler and A. E. R. Downe. 1989. Naturally occurring and synthetic thiopenes as photoactivated insecticides. Pp. 164-172. In *Insecticides of Plant Origin*. (eds. J. T. Arnason, B. J. R. Philogene and P. Morand) ACS symposium series no. 387, American Chemical Society, Washington, DC.
- Bae, S. H. and M.D. Pathak. 1966. A mirid bug *Cyrtorhinus lividipenus* Reuter, a predator of the eggs and nymphs of the brown planthopper. *IRRI NewsL* 15:33-36
- Bohnenstengel, F.I., V. Wray, L. Witte, R.P. Srivastava, P. Proksh. 1999. Insecticidal meliacarpins (C-serolimonoids) from *Melia azedarach*. *Phytochemistry*. 50 :977-982.
- Breuer M, Ce Loof A. In:Kleeberg H, Zebitz CPW, editors. 2000. Practive oriented results on use and production of neem ingredients and pheromones VIII. Giessen: Druk and Graphic:23
- Brewer, J. and J. Parlevliet. 1969. Incompatibility as a new method for identification of pyrethrum clones. *Euphytica* 18(3): 320-325.
- Cecilia Carpinella, Carlos Ferrayoli, Graciela Valladares, Maria Defago, Sara Palacios. 2002. Potent limonoid insect antifeedant from *Melia azedarach*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66(8):1732-1736.
- Charleston D., R. Kfir, M. Dicke, L.E.M. Vet. 2005. Impact of botanical pesticides derived from *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* on the biology of two parasitoid species of the diamond back moth. *Biol. Contemp.* 33: 131-142.
- Chen, Y.I., and J.E. Casida. 1969. Photodecomposition of pyrethrin I, allethrin, phthathrin, and dimethrin. *J. Agri. Chem.* 17:208-215.
- Coria, C., W. Almiron, et al. 2008. Larvicide and oviposition deterrent effects of fruit and leaf extracts from *Melia azedarach* L. on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera : Culicidae). *Bioresource Technology*. 99(8):3066-3070.

- Crombie, L. 1995. Chemistry of pyrethrins. In: Casida, J.E., Quistad, G.B.(Eds.), Pyrethrum Flowers: Production, Chemistry, Toxicology and Uses. Oxford university Press, New York. pp108-122.
- Defag, M., G. Valladares, E. Banchio, C. Carpinella, S. Palacios. 2006. Insecticide and antifeedant activity of different plant parts of *Melia azedarach* on *Xanthogaleruca luteola*. *Fitoterapia*.77:500-505.
- Defagó, M., G. Valladares, E. Banchio, C. Carpinella, S. Palacios. 2006. Insecticide and antifeedant activity of different plant parts of *Melia azedarach* on *Xanthogaleruca luteola*. *Fitoterapia*. 77:500-505.
- DELHAYE, R. J. 1956. [PRELIMINARY NOTE ON THE FLORAL BIOLOGY AND CONTROLLED FERTILIZATION OF PYRETHRUM, CHRYSANTHEMUM CINERARIAEFOLIUM (TREV.) BOCC.] *Bul. Agr. Congo Belge* 47: 1327-1343.
- Dyck, V.A. and B. Thomas. 1979. The brown planthopper problem. Brown Planthopper. Threat to rice production inAsia. *IRRI*. 3-17.
- Ekong D.E.U., Fakunle C.O., Fasina A.K., Okogun J.I. 1969. The meliacins (limonoids). Nimbolin A and B, two new meliacin cinnamates from *Azadirachta indica* L. and *Melia azedarach* L. *J. chem.. Soc., Chem. Commun.* pp.1166-1167.
- Elliott, M., James, N.F. and C. Potter. 1978. The future pyrethroids in insect control. *Ann. Res. Ent.* 23:443-469.
- Fulton, D., R. Clark, et al. Effects of plant population on pyrethrins yield of pyrethrum,(*Tanacetum cinerariifolium*) in Tasmania.
- Goncalves, S., M. A. Goncalves, et al. 2008. Insecticidal activity of leaf extracts from *Drosophyllum lusitanicum* against *Liriomyza trifolii* (Burgess) (Diptera: Agromyzidae). *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*. 83(5):653-657.
- Greenberg S.M. Sappington T.W. Legaspi B.C. Jr. Liu T.X. Setamou M. 2001. Feeding and life history of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) on different host plants. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 94: 566-575.
- Griswold M.J. Trumble J.T. 1985. Consumption and utilization of celery, *Apium graveolens*, by the beet armyworm *Spodoptera exigua*. *Entomol. Exp. Appl.* 38: 73-79.
- Haque, S., A. H. A. Farooqi, et al. 2007. Effect of ethrel, chlormequat chloride and paclobutrazol on growth and pyrethrins accumulation in *Chrysanthemum cinerariaefolium* *Vis. Plant Growth Regulation* 51(3): 263 - 269.
- Head,S.W. 1966. A study of the insecticidal constituents in *Chrysanthemum cinerariaefolium*. *Pyrethrum Post.* 8:32-37.

- Heinz, K. 1998. Dispersal and dispersion of aphids (Homoptera: Aphididae) and selected natural enemies in spatially subdivided greenhouse environments. *Environ. Entomol.* 27:109-1038.
- Hitmi, A., C. Barthomeuf, et al. 1999. Rapid mass propagation of *Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis. by callus culture and ability to synthesise pyrethrins. *Plant Cell Reports* 19: 156 - 160.
- Huang R. C., Okamura H., Iwagawa T., Nakatani M. 1994. The structures of azedarachins, limonoid antifeedants from Chinese *Melia azedarach* L. *Bull. Chem. Soc.* 67:2468-2472.
- Huang, R. C.; Zhou, J. B.; Suenaga, H.; Takezaki, K.; Tadera, T.; Nakatani, M. 1995. Insect antifeedant property of limonoids from Okinawan and Chinese *Melia azedarach* L. and from *Melia toosendan* (Meliaceae). *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 59:1755-1757.
- Huff, R. K. 1980. The synthesis of 3-(2,2-dichloro vinyl)-1-methylcyclo- propane-1,2-dicarboxylic acid. *Pestici. Sci.* 11:141-147.
- Isman, M. B. 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu. Rev. Entomol.* 51: 45-66
- Isman, M. B.; Koul, O.; Luczynski, A.; Kaminski, J. 1990. Insecticidal and antifeedant bioactivities of neem oils and their relationship to azadirachtin content. *J. Agric. Food Chem.* 38:1406-1411.
- Itokawa, H., Qiao, Z-S., Hirobe, C., and Takeya, K. 1995. Cytotoxic limonoids and tetranortriterpenoids from *Melia azedarach*. *Chem. Pharm. Bull.* 43:1171-1175.
- Janssen, A., and M.W. Sabelis. 1992. Phytoseiid life-histories, local predator-prey dynamics and strategies for control of tetranychid mites. *Exp. Appl. Acarol.* 14:233-250.
- Kasaj, D., A. Rieder, L. Krenn, and B. Kopp. 1999. Separation and quantitative analysis of natural pyrethrins by high-performance liquid chromatography. *Chromatographia.* 50(9/10):607-610.
- Kim, D.I., J. D. Park, S.G. Kim, H. Kuk, M. S. Jang and S. S. Kim. 2005. Screening of some crude plant extracts for their acaricidal and insecticidal efficacies. *J. Asia-Pacific Entomol.* 8(1):93-100.
- Kim, D.S., C.E. Jung, S.Y. Kim, H.Y. Chun, and J.H. Lee. 2003. Regulation of spider mite populations by predacious mite complex in an unsprayed apple orchard. *Kor. J. Appl. Entomol.* 42(3): 257-262.
- Kim, M.H. and S.C. Lee. 1991. Biodynamics of diamond-back moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Korean J. Appl. Entomol.* 30:169-173.

- Kim, Y.H., Y.M. Choi., G.S. Lim and Y.D. Chang. 1990. Occurrence of rice water weevil, *Lissorhoptrus oryzophilus*, by feeding scars on the leaves of weeds in the overwintering sites. Research Report RDA. 32:7-11.
- Koh, S. H., J. J. Ahn, J. S. Im, C.E. Jung, S. H. Lee and J. H. Lee. 2009. Monitoring of acaricide resistance of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) from Korean apple orchards. J. Asia-Pacific Entomol. 12:15-21.
- Krisp, O.E., A. Witul, P.E.L. Willems and M. Dicke. 1998. Intrinsic rate of population increase of the spider mite *Tetranychus urticae* on the ornamental crop gerbera: Intraspecific variation in host plant and herbivore. Entomol. Exper. Appl. 89:159-168.
- Larson R.O. 1990. Commercialization of the neem extract Margosan-O in a USDA collaboration, pp. 23~28. in neem's potential in pest management programs, eds. by J.C. Locke and R.H. Lawson. Proceedings of the USDA neem workshop. United States Department of Agriculture, Agricultural Research Services, Beltsville, MD.
- Ling, K.C. 1972. Rice virus diseases, International Rice Research Institute, Los Banos. Philippines. 134pp.
- Lowery D.T. and M.B. Isman. 1996. Inhibition of aphid(Homoptera; Aphididae) reproduction by neem seed oil and azadirachtin. J. Econ. Entomol. 89(3): 602~607.
- Maciel, M.V., S.M. Morais, C.M.L. Bevilaqua, A.L.F. Camurca-Vasconcelos, C.T.C. Costa, C.M.S. Castro. 2006. Ovicidal and larvicidal activity of *Melia azedarach* extracts on *Haemonchus contortus*. Veterinary Parasitology. 140:98 - 104
- María C. Carpinella, María T. Defago, Graciela Valladares, Sara M. Palacios. Antifeedant and Insecticide Properties of a Limonoid from *Melia azedarach* (Meliaceae) with Potential Use for Pest Management.
- María C. Carpinella, Mónica Miranda, BSc, Walter R. Almirón, Carlos G. Ferrayoli, Francisco Ludueña Almeida, Sara M. Palacios. 2007. In vitro pediculicidal and ovicidal activity of an extract and oil from fruits of *Melia azedarach* L. *Jam Acad Dermatol.* 56(2):250-256.
- Morris, S.E., N.W. Davies, P.H. Brown, and T. Groom. 2006. Effect of drying conditions on pyrethrins content. *Industrial Crop and Products.* 231:9~14.
- Muturi S.N., J.E. Parlevliet, J.G. Brewer. 1969. Ecological requirements of *Pyrethrum*: A general review. *Pyrethrum Post.* 10:24-28.
- Nakatani M., Huang R.C., Okamura H., Iwagawa T. 1998. Tadera K. degraded limonoids from *Melia azedarach*. *Phytochemistry.* 49:1773-1776.
- Nakatani M., Huang R.C., Okamura H., Naoki H., Iwagawa T. 1994. Limonoid antifeedants from Chinese *Melia azedarach*. *Phytochemistry.* 36: 39-41.

- Nakatani, M.; Huang, R. C.; Okamura, H.; Iwagawa, T.; Tadera, K.; Naoki, H. 1995. Three new antifeeding Meliacarpinins from Chinese *Melia azedarach* Linn. *Tetrahedron*. 51:11731-11736.
- Napal, G. N. D., M. C. Carpinella, et al. 2009. Antifeedant activity of ethanolic extract from *Flourensia oolepis* and isolation of pinocembrin as its active principle compound. *Bioresource Technology*. 100(14):3669-3673.
- Ochi, M., and Kotsuki, H., Sendain. 1976. A new limonoid from *Melia azedarach* L. var. *Japonica* Makino. *Tetrahedron Lett*. 33:2877-2880.
- Opit, G.P., J.R. Nechols and D.C. Margolies. 2004. Biological control of two spotted spider mites, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae), using *Physeilus persimilis* Athias-Henriot (Acari: Phytoseidae) on ivy geranium : Assessment of predator release ratios. *Biological Control*. 29: 445-452.
- Park, J.H., K.Y. Ryu, H. J. Jee, B.M. Lee and H.G. Gho. 2008. Evaluation of insecticidal activity of plant extracts against three insect pests. *Korean j. Appl. Entomol*. 47(1): 59-64.
- Parlevliet J. E. 1970. The effect of rainfall and altitude on the yield of pyrethrins from pyrethrum flowers in Kenya. *Pyrethrum Post*. 10:20-25.
- Parlevliet, J. 1974. The genetic variability of the yield components in the Kenyan pyrethrum population. *Euphytica* 23(2): 377-384.
- Prakash A. and J. Rao. 1997. Botanical pesticides in agriculture. CRC Press.. p 461.
- Purseglove. J.W. 1982. Tropical crops. Dicotyledons. Longman. New York.
- Roy, S., A. Mukhopadhyay, et al. 2009. Antifeedant and insecticidal activity of *Clerodendron infortunatum* Gaertn. (Verbinaceae) extract on tea mosquito bug, *Helopeltis theivora* Waterhouse (Hetoraptera : Miridae). *Researchon Crops*. 10(1):152-158.
- Salardini A.A., K.S.R. Chapman, r.J. Holloway. 1994. Effect of potassium fertilization of pyrethrum(*Tanacenum cinerariaefolium*) on yields, pyrethrins concentration in dry achenes and potassium concentration in soil and plant tissues. *Aust. J. Agri. Res*. 45:647-656.
- Saxena, R. C. 1989. Insecticides from neem. In insecticides of plant origin (J. T. Arnason, B. J. R. Philogene and P. Morand, eds.). ACS Symp. Ser. No. 387. Am. Chem. Soc. Washington, D.C., pp.110-135.
- Schmutterer H. 1990. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. *Annu. Rev. Entomol*. 35: 271~297
- Schmutterer H. 1997. Side-Effects of neem (*Azadirachta indica*) products on insect pathogens and natural enemies of spider mites and insects. *J. Appl. Entomol*. 121: 121~128

- Schmutterer H. and R.P. Singh. 1995. List of insects susceptible to neem products. In the neem tree. Source of unique natural products for integrated pest management. Medicine. Industry and other purpose, eds. by Schmutterer, H. Weinheim. New York, Basel, Cambridge, Tokyo : VCH Publisher.
- Schmutterer, H. 1980. Natural pesticides from the neem tree. Proc. 1st Int. Neem Conf. pp 33-259.
- Schmutterer, H. 1988. Potential of azadirachtin-containing pesticides for integrated pest control in developing and industrialized countries. J. Insect Physiol. 34:713-719.
- Seffrin, R., E. C. Costa, et al. 2008. Feeding behavior of *Diabrotica speciosa* adults on Meliaceae aqueous extracts. Ciencia Rural. 38(8):2115-2118.
- Sengottayan Senthil Nathan, Kim Sehoon. 2006. Effects of *Meli aazedarach* L. extract on the teak defoliator *Hyblaea puera* cramer (Lepidoptera : Hyblaeidae). Crop Protection. 25:287-291.
- Shanghai Science and Technologic Publisher and Shougakukan in: The Dictionary of Chinese Drugs. 1958. Shougakukan, Tokyo:602.
- Singh, S. and J. Sharma. 1989. Genetic improvement of pyrethrum. TAG Theoretical and Applied Genetics 78(6): 841-846.
- SMITH. F. G. 1958. BEEKEEPING OPERATIONS IN TANGANYIKA, 1949-1957. Bee World 39: 29-36.
- Song. S.S. 1992. Resistance of diamond-back moth *Plutella xylostella* L. against the pyrethroids. Korean. J. Appl. Entomol. 31:338-344.
- Takeya K., Qiao Z-S, Hirobe C., Itokawa H. 1996. Cytotoxic azadirachtin-type limonoids from *Melia azedarach*. Phytochemistry. 42:709-712.
- Thijssen, R. 1997. Natural insecticide pyrethrum. LEISA-LEUSDEN- 13: 22-23.
- Uhm, K.B., Y.I. Lee, Y.H. Kim, K.M. Choi and K.S. You. 1989. Studies on the future dispersion of the rice water weevil, *Lissorhoptrus oryzophilus*, in Korea. Research Report RDA. 31:23-28.
- Valladares G.R., D. Ferreyra, M.T. Defago, M.C. Carpinella, S. Palacios. 1999. Effects of *Melia azedarach* on *Triatoma infestans*. Fitoterapia. 70:421-424.
- van Lenterenm R.G. and J.W. Woets. 1988. Biological and integrated pest control in greenhouses. Ann. Rev. Entomol. 33: 239-269.
- Wachsman, M. B., V. Castilla, and C. E. Coto. 1998. Inhibition of foot and mouth disease virus (FMDV) uncoating by a plant-derived peptide isolated from *Melia azedarach* L leaves. Archives of Virology. 143:581-590.

- Wandahwa, P., E. Van Ranst, and P. Van Damme. 1996. Pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis) cultivation in west Kenya: origin, ecological conditions and management. *Industrial Crops and Products*. 5:307-322.
- Wang Wenlu, Chiu Shin-Foon. 1993. Studies on the insecticidal principles and biological activities of *Melia azedarach* L. *Journal of South China Agriculture University*. 14(3),pp.64-69.
- Wang Yuan-Lan, He Ping, Cao Fu-Xiang. 2005. The effect of alcohol extracts from *Melia azedarach* fruit on the feeding behavior of *Spodoptera litura* Larvae. *Nonwood Forest Research*. 23(1):30-32.
- Wheeler D. A. and M. B. Isman. 2001. Antifeedant and toxic of *Trichilla americana* extract against the larvae of *Spodoptera litura*. *Entomologia Experimentals et Applicata*. 98: 9-16.
- Wink, M. 1993. Production and application of phytochemicals from an agricultural perspective. Pp.171-213. In *Phytochemistry and Agriculture*. (eds. Van T. A. Beek and H. Breteler) vol.34. Clarendon, Oxford, UK.
- Yang Ji-an, Ma Yu-hua, Su Yin-quan, Ye Gui-sheng. 2004. Review and prospect of research and development in Chinaberry tree. *Journal of Northwest Forestry University*. 19(1):115-118.
- Yangziqi, F.T., H. Cao and F. Chen. 1990. Field plot release of of *Phytoseiulus persimilis* for controlling *Tetranychus kanzawai* in egg plant and common beans. *Chinese J. Biological Control*. 6: 88-89.
- 강명기, 강은진, 이희진, 이대홍, 석희봉, 김다아, 길미라, 서미자, 유용만, 윤영남. 2007. 실내 조건에서 친환경농자재가 포식성 칠레이리온애, *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae)에 미치는 영향. *한용곤지*. 46(1): 87-95.
- 권오경, 이희삼, 성기석, 김영구, 최병열. 1994. 너삼잎으로부터 벼멸구 살충성분 분리동정. *농시논문집* 36:366-369.
- 김도익, 김선곤, 강범용, 김진섭, 김상수, 2009, 전남지역 유기 딸기재배지에서 제충국과 멸구슬 추출물을 이용한 점박이용애 방제 및 천적에 대한 독성. *한국유기농업학회*. 17(2):211-226
- 김도익, 백채훈, 박종대, 김상수, 김선곤. 2000. 점박이용애와 긴털이리온애에 대한 *NeemAzal-T/S*의 독성. *한용곤지*. 39(1): 53-58.
- 김삼규, 진준호, 임춘근, 허장현, 조세열. 2009. 주요해충에 대한 식물추출물의 살충력 평가. *농약과학회지* 13(3),165-170
- 김연국, 이종진, 최만영. 2008. 벼멸구에 대한 식물추출물의 살충활성과 기피효과. *Korean J. Appl. Entomol*. 47(1):65-74

- 김연국, 이종진, 최만영. 2008b. 벼멸구에 대한 식물추출물의 살충활성과 기피효과. 한용곤지. 47(1): 65-74.
- 김용현, 김정환, 박상구. 2001. 비닐하우스 재배달기에서 점박이용애의 발생. 한국곤충학회지. 31(2):139-142.
- 김용현, 김정환, 한만위. 1999. 신선초에서 칠레이리용애에 의한 차용애의 생물적 방제 예비 실험. 한용곤지. 38(2): 151-155.
- 농림수산식품국. 2008. 2007 채소류 생산실적. p156
- 문형철, 임주탁, 김 주, 류 정, 고복래, 김대향, 황창연. 2006. 시설가지에서 칠레이리용애를 이용한 점박이용애 밀도억제효과. 한용곤지. 45(2):173-177.
- 박종호, 류경열, 지형진, 이병모, 고현관. 2008. 식물추출물의 채소류 주요 해충에 대한 살충력 평가. 한용곤지. 47(1):59-64.
- 안기수, 이소영, 이기영, 이영수, 김길하. 2004. 칠레이리용애에 대한 농약의 선택독성과 장미에서 천적과 농약의 혼용에 의한 점박이용애의 방제효과. 한용곤지. 43(1):71-79.
- 우원식. 1996. 천연물화학 연구법. 서울대학교. 455pp
- 유용만, 강은진, 서미자, 강명기, 이희진, 김다아, 길미라, 윤영남. 2006. 실내조건에서 친환경 농자재가 기생성 천적 곤충에 미치는 영향. 한용곤지. 45(2): 227-234.
- 이대홍, 강은진, 강명기, 이희진, 석희봉, 서미자, 유용만, 윤영남. 2008a. 소형 포장에서 친환경 농자재가 천적곤충에 미치는 영향. 한용곤지. 47(1) : 75-86.
- 이대홍, 조창욱, 박초롱, 이희진, 강은진, 석희봉, 서미자, 김황용, 김용현, 유용만, 윤영남. 2008b. 딸기재배 하우스에서 발생하는 해충의 환경친화적 종합적 방제를 위한 로드맵. 한용곤지. 47(3):273-286.
- 천상욱, 김도익, 최용수. 2003. 수종의 국화과 식물의 지상부 추출물로부터 살충 및 항균활성 연구. 한국잡초학회. 23(2):81-91.
- 황인천, 김진, 김형민, 김도익, 김선곤, 김상수, 장철. 2009. 멀구슬과 고삼을 원료로 한 식물추출물의 주요해충과 천적에 대한 독성. 한국응용곤충학회. 48(1):87~94.