

최    증  
연구보고서

생명공학기법을 이용한 해송림 솔껍질  
각지벌레 방제기술개발

Biotechnological Development of Biocontrol Agents

for the Control of the Pine Bast Scale,

*Matsucoccus thunbergiana*

연 구 기 관

전남대학교 생물공학연구소

농림부행정자료실



0007606

농 릫 부

최 종  
연구보고서

생명공학기법을 이용한 해송림 솔껍질  
각지벌레 방제기술개발

Biotechnological Development of Biocontrol Agents  
for the Control of the Pine Bast Scale,  
*Matsucoccus thunbergianae*

연구기관

전남대학교 생물공학연구소

1999-165

농림부

농림부 자크실
등록번호: 1686
등록일: 2001년 12월 18일
출처:



# 최 종 보 고 서

1997년도 농림특정연구사업에 의하여 완료한 “생명 공학 기법을 이용한 해송림 솔껍질각지벌레 방제기술 개발”에 관한 연구의 최종보고를 별첨과 같이 제출합니다.

- 첨 부 : 1. 최종보고서 10부  
2. 최종보고서 디스켓 1매

1999년 12월 29일

주관연구기관 : 전남대학교

총괄연구책임자 : 정 기 철 (인)

주관연구기관장 : 전남대학교 총장 직인

농 립 부 장 관 귀 하



# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “생명공학기법을 이용한 해송림 솔껍질  
각지벌레 방제기술 개발”과제의 최종보고서로 제출합니다.

1999년 12월 29일

주관연구기관명 : 전남대학교

총괄연구책임자 : 정 기 철

연 구 원 : 지 연 태

연 구 원 : 김 규 진



# 요 약 문

## I. 제 목

생명공학기법을 이용한 해송림 솔껍질 깍지벌레 방제기술  
개발

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

우리 나라 산림 면적은 전국의 65%이상을 차지하고 있으며 국내의 대표적 수목인 소나무(*Pinus densiflora*)와 곰솔(*Pinus thunbergii*)은 전체 산림의 45%를 차지한다.

솔껍질깍지벌레(*Matsucoccus thunbergianae*)는 우리 나라 남부 및 서부 해안지대의 곰솔(海松)을 집중적으로 가해하나 소나무에도 피해를 입힌다. 본 해충은 년 1회 발생하며 3월 초순~5월 초순에 걸쳐 소나무 껍질 밑으로부터 교미 산란하기 위하여 외부로 출현하며 그 최성기는 3월 초순부터 4월 중순이다.

본 해충의 방제를 위한 여러 가지 방법이 시도되고 있으나 계속 피해 지역이 서북, 동북으로 확대되고 있어 문제로 간주되고 있다. 이들 해충에 대한 효율적인 방제 대책이 시급한 실정에 있다.

따라서 본 연구에서는 환경 친화적이며 효율적 방제대책 기술 개발을 목적으로 솔껍질깍지벌레 방제기술 개발을 위하여 생물농약개발 연구를 진행하였다.



### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 우리나라 전체 산림면적 646만ha의 약 45%인 293만ha를 점유하고있는 중요한 산림자원인 해송(곰솔, *Pinus thunbergii*) 및 소나무(*Pinus densiflora*)에 막대한 피해를 주고 있는 솔껍질깍지벌레(*Matsucoccus thunbergianae*)의 생물학적 방제를 위한 기술을 개발하기 위하여 제 1 세부과제에서는 솔껍질깍지벌레 특이적 병원성 미생물을 분리동정하고, 솔껍질깍지벌레가 서식하는 생태계의 미생물상을 규명하며 자연상태에서의 솔껍질깍지벌레의 미생물적 감염치사형태 및 원인을 규명한다.

아울러 제 2 세부과제에서는 솔껍질깍지벌레의 성장, 탈피, 변태에 관여하는 유약호르몬 에스테르가수분해효소(Juvenile hormone esterase, JHE)를 암호하는 cDNA를 클로닝하고 Baculovirus에서 발현한 후 JHE가 솔껍질깍지벌레의 성장에 미치는 영향을 조사하여 솔껍질깍지벌레의 생명공학적인 방제를 위한 기초자료로 활용한다.

제 3 세부과제에서는 솔껍질깍지벌레의 천적을 조사하고 이를 응용한 생물학적 방제기술 및 솔껍질깍지벌레 대량 사육 방안을 확립한다.

### Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

#### 1. 연구개발결과

##### 1) 제1세부과제

- (1) 솔껍질깍지벌레 암컷 성충으로부터 핵다각체 바이러스 봉입체(NPV

IBs)를 추출하고 검색한 결과 약  $10^5 \sim 10^6$  PIB/ml 존재하고 있음이 확인되었다.

- (2) NPV배양체계확립을 위해 솔껍질깍지벌레 정착 약충에 NPV를 감염시킨 결과 감염사실은 확인 되었으나 병원성은 인정되지 않았다.
- (3) 솔껍질깍지벌레 피해지역에서 채집된 솔껍질깍지벌레 애벌레 사체, 야외에서 병원성 미생물에 감염되어 죽은 곤충(나방, 파리, 매미, 사마귀, 바퀴벌레)으로부터 유효곤충미생물을 분리하였다. 생물검정을 통해 솔껍질 깍지벌레에 특이적으로 병원성을 나타내는 사상균은 *Syncephalastrum racemosum*으로, 비특이적으로 병원성을 나타내는 사상균은 *Gliocladium* sp.로 동정되었다.
- (4) 솔껍질깍지벌레 피해 임목의 미생물상을 규명하였다. 피해임목지의 삼림 토양에는 *Pseudomonas* sp. 와 *Bacillus* sp.를 주종으로 하는 세균이 약  $4.2 \sim 8.4 \times 10^8$ (cfu/g)정도 존재하고 사상균은 주로 *Trichoderma* sp. *Aspergillus* sp. *Stachybotrys* sp. 등으로서  $1 \sim 2 \times 10^6$  (conidia/g)정도로 존재하였다. 피해 임목의 줄기에는 *Trichoderma* sp. *Paecilomyces* sp. *Syncephalastrum racemosum*, *Gliocladium* sp. *Scopulariopsis* sp. *Stachybotrys* sp. *Alternaria* sp. 등이 다수 존재하였다.
- (5) 솔껍질깍지벌레 피해지 임목을 절단하여 25°C/RH 70% 생장상에서 솔껍질깍지벌레 제2 약충의 우화를 유도한 결과 약 2주일 후 암컷과 수컷으로 우화된 성충을 확인할 수 있었고 암컷성충으로부터 산란된 알 및 애벌레를 획득하였다.
- (6) 솔껍질깍지벌레 특이적 병원성 사상균 *Syncephalastrum racemosum* 및 *Gliocladium* sp. 포자를 솔껍질깍지벌레에 도포하여 이들 사상

균이 병원성을 나타냄을 확인하였다.

- (7) 솔껍질깍지벌레 병원성 사상균은 솔껍질깍지벌레의 각피를 통과할  
있는 각피 분해효소인 protease, lipase, chitinase를 생산하였다.

## 2) 제2세부과제

- (1) 곤충의 Juvenile hormone esterase(JHE) 유전자는 3개의 conserved domain을 가지고 있다.
- (2) 솔껍질깍지벌레(*Matsucoccus thunbergianae*)는 나비목의 JHE 유전자와 상동성을 갖는다.
- (3) Conserved domain의 nucleotide를 primer로 사용하였을 때 genomic DNA에서 unique band를 얻을 수 있다.
- (4) Cloned genomic DNA의 nucleotide의 길이는 762bp였다.
- (5) Clone No.1은 *Heliothis virescens*의 JHE 유전자와는 45.8%의 homology를 보였고 나비목 Colorado potato beetle의 JHE 유전자와는 45% homology를 보였다. 이러한 결과는 Clone No.1은 잠재적인 JHE 유전자로 사료된다.
- (6) PCR product중 440bp의 Clone No.3은 *E. coli*의 valyl-tRNA synthase와 71% 상동성을 보였다.
- (7) 솔껍질 깍지벌레의 JHE cDNA의 크기를 약 2.1kb였다.
- (8) Bac-N-Blue Vector에 JHE cDNA를 재조합 하였다.
- (9) Bac-N-Blue-JHE 재조합 plasmid DNA는 *S. frugiperda* IPLB-SF9 cell에서 발현시켜 SDS-PAGE로 확인하였다.

3) 제3세부과제

- (1) 솔껍질깍지벌레의 천적으로서 곤충류는 Coleoptera 11種, Dermaptera 2種, Hemiptera 7種, Hymenoptera 9種 등 4目 7科 29種이 조사되었으며 이들 중 Coleoptera의 *Coccinella septerypunctata*(칠성무당벌레), *Chilocorus urbidus* (홍점박이무당벌레), *Chilocorus ruwanae* (무당벌레), *Chilocorus kuwanae* (애홍점박이무당벌레), Hemiptera의 *Sphedenoletes impressicillis* (다리무늬침노린재), Hymenoptera의 *Camponotus obscuripes* (홍가슴개미), *Brachyponera chinensis* (왕침개미), *Vespa carbo flavofasciata* (말벌) 등이 발생빈도가 높거나 발생량은 많은種들이었다.
- (2) 무척추동물군 거미류에 있어서는 總 10科 27種이 조사되었는데 Arypoidae科 8種, Agelenidae科 1種, Atypidae科 1種, Lcosidae科 5種, Oxyopidae科 1種, Pisauridae科 3種, Sslticidae科 3種, Thomosidae科 3種, Theridiidae科 1種, Tetragnathidase科 2種이 조사되었으며 이들 중 Argipoidase科的 *Argiope bruennichii* (긴호랑거미), *Nephila clavata* (무당거미), *Argiope amoena* (호랑거미), *Neossciona nautica* (집왕거미), *Araneus fuscocoloratus* (먹왕거미), Lycosidae科的 *Paradisa pseudoannulata* (들늑대거미), *Oxyopes seratus* (낮포스라소니거미), *Dolomedes sulfureus* (황닷거미) 등이 발생량이 많거나 발생빈도가 높은種들이었다.
- (3) 척추동물의 천적으로서 조류(鳥類)에 있어서는 總 2目 6科 10種이 조사되었으며 Muscicapidae科 2種, Motacillidae科 1種, Paridae科 4種, Laniidae科 1種, Sturnidae 1種, Corvidae 1種이 조사되었는데 이들 중 Muscicapidae科的 *Paradoxornis webbiana*(붉은머리오목눈

이), Paridae科的 *Parus majay*(박새), Laniidae科的 *Lanius bucephalus bucephalus*(때까치)등이 출현빈도가 높은 종들이었다.

- (4) 본 연구의 계획 이외의 조사에서 전북 고창지역의 일부에서 솔껍질 깍지벌레의 집단피해가 해송림 곰솔에서 소나무(적송)쪽으로의 기주 이동현상이 관찰되었는데 이후 적송피해의 확산이 문제될 것으로 보였다.

## 2. 활용에 대한 건의

본 연구를 통하여 얻어진 솔껍질 깍지벌레의 생물학적 방제를 위한 제반 기술 및 가장 핵심 사항인 솔껍질 깍지벌레 특이적 병원성 사상균 *Syncephalastrum racemosum*을 획득하고 이의 병원성을 확인한 점은 솔껍질 깍지벌레의 환경 친화적 미생물 농약 개발을 위한 귀중한 미생물 자원을 확보하였다는 점에서 그 의의가 매우 크다고 생각한다.

JHE 연구에서 얻어진 Clone No.1은 솔껍질 깍지벌레의 putative JHE 유전자로서 차후 이를 발현시켜 단백질을 생산하여 생물학적 방제에 이용할 수 있을 것이다. 또한 솔껍질깍지벌레의 호르몬에 의한 변태조절기작 (hormonal control mechanism)을 밝히는데 지표로 사용될 수 있고, cloned JHE gene은 매미목 곤충의 JHE 유전자 screening과 발현 기작을 규명하는데 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

솔껍질깍지벌레는 년 1회 발생하여 부화 후 두꺼운 솔껍질 밑에서 활동하다가 5월 중·하순경 기온이 24~25℃이상 상승하면 하면(夏眠)에 들어가는 생리적 특성 때문에 일반적으로 손쉽게 활용할 수 있는 약제 방제가 비교적 어려운 문제점을 가지고 있다. 이와 같은 관점에서 천적을 활용한

생물학적 방제가 어떠한 해충에서보다 요구되는 실정이다. 본 연구 결과는 무척추동물의 곤충류 4목과 7과 29種이 조사되었고, 이중 비교적 발생량이나 발생빈도가 높은 천적들이 규명되었으므로 이들을 활용할 수 있는 기초자료가 마련되었으며, 본 자료는 이들 곤충류 천적을 이용한 솔껍질깍지벌레의 생물학적 방제계획을 수립하는데 활용될 수 있을 것이다. 또한 무척추동물군 거미류 10과 27種이 조사되었고, 이들 중 발생량이 많거나 발생빈도가 높은 種들의 솔껍질깍지벌레의 천적으로 이용할 수 있는 기초자료가 마련되었으므로 이들을 이용한 생물적 방제에 활용할 수 있을 것이며, 척추동물의 천적으로서 조류 6과 10種이 조사되었으므로 솔껍질깍지벌레의 방제를 위하여 이들 조류의 보호로서 솔껍질깍지벌레의 밀도를 낮추는데 활용될 수 있을 것이다.

따라서 금후 본 연구를 통하여 개발된 생물자원 및 기술을 기반으로하여 솔껍질깍지벌레 병원성 미생물 및 천적 생물의 대량 배양 및 생산체계 확립 기술 개발과 아울러 피해지 산림 현장에의 적용 등의 연구가 이뤄지도록 정부 차원에서의 대대적 계획수립 및 강력한 추진 정책이 실행되어야 할 것이다.

## SUMMARY

### I. Title

Biotechnological Development of Biocontrol Agents for the Control of the Pine Bast Scale, *Matsucoccus thunbergiana*e

### II. Objectives and Significances

The black pine bast scale, *Matsucoccus thunbergiana*e, causes severe damage to the black pines of southern and western coastal areas of Korea. The insect also attacks red pines in the north-western areas. Especially, it now occurs at Kochang and Puan, Chonbuk province. It has one generation a year, coming out of the pine bark to mate and lay eggs from early March to early May. Especially, its peak time is from late March to mid-April. Although various kinds of methods have been tried to control the insect pest, the infested areas and damages are still spreading and serious in the part of north-western and north-eastern of the country.

Thus, it is urgently required to develop the integrated pest management system to control the insect pest on the point of view of effectiveness and environmental pollution.

In this study, we will develop the biological agents for the

control of the pine bast scale, *Matsucoccus thunbergiana*, with consideration of the unique life cycle of the insect pest.

### III. Scope and Contents of the Research

### IV. Results and Applications

Sub-Research	Objectives	Scope and content of the research
1st Sub-Research	Biological control of pine bast scale with insect-pathogenic microorganisms.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Isolation and identification of insect-pathogenic microorganisms from the insect and forest soil.</li> <li>2. Microflora examination of infested pine and forest soil.</li> <li>3. Experimental infection of pathogen and determine their potential in biological control of pests.</li> </ol>
2nd Sub-Research	Full length cDNA cloning and characterization of juvenile hormone esterase (JHE) gene.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Full length cDNA cloning of JHE gene.</li> <li>2. Characterization of JHE gene.</li> </ol>
3rd Sub-Research	Determination of natural enemies and establishment of mass cultures system of the insects.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Investigation of the natural enemies on the insects in the invertebrate and vertebrate animals.</li> <li>2. Development of mass rearing methods of the pine bast scale</li> </ol>



## 1. Results of the Research

### 1) 1st Sub-Research

- (1) Nuclear polyhedrovirus inclusion bodies (NPV IBs) of *M. thunbergianae* were isolated from female adults and the IBs number were counted at  $10^5 \sim 10^6$ /ml, approximately.
- (2) When the *M. thunbergianae* NPV IBs were infected in the larval stage, the presence of IBs were indicated but not found its pathogenicity.
- (3) Potential insect-pathogenic microorganisms were isolated from the forest soil and cadavers of pine bark scale, moth, fly, cicada, mantis, cockroach and also identified. The Zygomycetes, *Syncephalastrum racemosum* was the most potential pathogen to the insect pine bark scale specifically. The Deuteromycetes, *Gliocladium* sp. showed also pathogenesis on them.
- (4) The microflora of the forest soils and infested pine trees was examined. The main forest inhabiting soil bacteria were identified *Pseudomonas* sp. and *Bacillus* sp. and they were counted as approximately  $4.2 \sim 8.4 \times 10^8$  viable cells per grams of soil samples. The main fungi were identified as *Trichoderma* sp. *Aspergillus* sp. and their counts were  $1 \sim 2 \times 10^6$  conidia per grams of soil samples. The fungal species, *Trichoderma* sp. , *Paecilomyces* sp. , *Syncephalastrum* sp. , *Gliocladium* sp. ,

*Scopulariopsis* sp. , *Stachybotrys* sp. and *Alternaria* sp. were isolated from the infested black pine trees and identified.

- (5) The infested pine tree branches were cut in early winter and were incubated in the growth chamber at 25°C/HR 70% condition for induced hatching of the second instar nymph, into adult male and female. As a result of induced hatching experiments, the female adults deposit approximately 250 eggs in a single white cottony ovisac.
- (6) The toxicity of entomopathogenic fungi isolated from the cadavers of insects and pine tree barks were bioassayed against *M. thunbergianae* second instar nymph and adult insects. The fungi *Syncephalastrum racemosum* and *Gliocladium* sp. were showed insect-pathogenic activity.
- (7) The entomopathogenic fungi *Syncephalastrum racemosum* and *Gliocladium* sp. produced cuticle-degrading enzymes, protease, lipase and chitinase, in culture.

## 2) 2nd Sub-Research

- (1) Insect juvenile hormone esterase(JHE) gene has contained of three conserved domains.
- (2) The JHE gene sequence of the Homoptera *Matsucoccus thunbergianae* has homology with that of Lepitoptera insects.
- (3) When the primer of the nucleotide of conserved domains was used, unique band obtained from the genomic DNA.
- (4) The length of cloned genomic DNA was 762bp.

- (5) The clone No.1's JHE gene showed homology of 45.8% and 45.0% with that of the Lepidoptera *Heliothis virescens* and Colorado potato beetle, respectively. Thus, this results show that the clone No.1 seems to be JHE gene tentatively.
- (6) The clone No.3 consisted of 440bp nucleotide of PCR products showed 71% of homology with valyl-tRNA synthase of *E. coli*.
- (7) The length of JHE cDNA of *M. thunbergiana* was about 2.1kb.
- (8) Cloned JHE cDNA was inserted in Bac-N-Blue Vector and then was expressed in *S. frugiperda* IPLB-SF9 cell and then confirmed SDS-PAGE

### 3) 3rd Sub-Research

- (1) The natural enemies of *M. thunbergiana* were surveyed total 29 species 7 family 4 order in a predatory insects. In insects, Coleoptera 11 species, Dermaptera 2 species, Hemiptera 7 species, Hymenoptera 9 species were investigated. Among them, high frequency and population density were *Coccinella septempunctata*, *Chilocorus urbidus*, *Chilocorus ruwanae*, *Chilocorus kuwanae* of Coleoptera, *Sphedonolestes impressicillis* of Hemiptera, *Camponotus obscuripes*, *Brachyponera chinensis*, and *Vespa carbo flavofasciata* of Hymenoptera.
- (2) In spiders, Araneidae 8 species, Agelenidae 1 species, Atypidae 1 species, Lcosidae 5 species, Oxyopidae 1 species, Pisauridae 3 species, Ssilticidae 3 species, Thomosidae 3

species, Theridiidae 1 species and Tetragnathidae 2 species were investigated, which high frequency and population density were *Argiope bruennichii*, *Nephila clavata*, *Argiope amoena*, *Neosscona nautica*, *Araneus fuscocoloratus* of Argipoidae, *Paradisa pseudoannulata*, *Oxyopes seratus*, *Dolomedes sulfureus* of Lycosidae.

(3) Two order, 6 family, 10 species of birds were observed *Paradoxornis webbiana* of Muscicapidae, *Parus majay* of paridae, and *Lanius bucephaius bucephalus* of Laniidae were frequently observed.

(4) The black pine bast scale is a major pest in *Pinus thunbergii* but it is now observed host alternation into *Pinus densiflora* in the infested part of Kochang and Puan, Chonbuk province.

## 2. Prospectives of the Research

The newly isolated pine bast scale insect-pathogenic *Syncephalastrum racemosum* and *Gliocladium* sp. would be developed as an effective microbial insecticide for the control of the *Matsucoccus thunbergianae*. Thus, futher research and development for the mass production of the fungi and application of the microbial insecticide in the infested forest area should be followed.

Recently, the host alteration of the pine scale insect occurs in a small area in the northwest coastal area, we should have increasing concern that it will eventually spread into the vast natural growing

areas of Korean native red pine. So, biological control methods of the serious scale insects should be prepared in advance.

# CONTENTS

SUMMARY(in Korean) .....	2
SUMMARY .....	9
CONTENTS .....	16
CONTENTS(in Korean) .....	18
Chapter 1. Introduction .....	20
Chapter 1. Background of the Research .....	20
Chapter 2. Purpose and Contents of the Research .....	25
Chapter 2. Insect-pathogenic Microorganism for the Control of Pine Bast Scales, <i>Matsucoccus thunbergianae</i> .....	26
Chapter 2-1. Objectives of the Research .....	26
Chapter 2-2. Methods for Insect-pathogenic Microorganisms studies	29
Chapter 2-3. Results and Discussion .....	37
Chapter 2-3-1. Isolation and Production System of <i>M.</i> <i>thunbergianae</i> Pathogenic nuclear polyhedrosis virus .....	37
Chapter 2-3-2. Isolation and Identification of Insect-pathogen Microorganisms and Microflora Examination of Infected Pine Tree .....	41
Chapter 2-3-3. Experimental Infection of Pathogen and Determination of them Potential for Pine Bast Scale Insecticides .....	52
Chapter 3. Juvenile Hormone Esterase(JHE) Gene of <i>M. thunbergianae</i>	67

Chapter 3-1. Objectives of the Research .....	67
Chapter 3-2. Methods for JHE Gene Studies .....	67
Chapter 3-3. Results and Discussion .....	73
Chapter 3-3-1. mRNA Isolation and RT-PCR for	
<i>M. thunbergianae</i> .....	73
Chapter 3-3-2. Genetic DNA Cloning of JHE Gene .....	73
Chapter 3-3-3. Sequence Analysis and Characterization of	
Genomic DNA .....	76
Chapter 3-3-4. Expression of JHE gene in Baculovirus .....	83
Chapter 4. Natural Enemies of <i>M. thunbergianae</i> .....	94
Chapter 4-1. Background of the Research .....	94
Chapter 4-2. Objectives of the Research .....	101
Chapter 4-3. Methods for Natural Enemies .....	102
Chapter 4-4. Results and Discussion .....	103
Chapter 4-4-1. Investigation of Natural Enemies .....	103
Chapter 4-4-2. Development of Mass Rearing Methods for	
the Pine Bast Scales .....	110

# 목 차

요 약 문 .....	2
SUMMARY .....	9
CONTENT .....	16
목 차 .....	18
제1장 서 론 .....	20
제1절 연구개발의 목적과 범위 .....	20
1. 연구개발의 필요성 .....	20
2. 연구개발의 목적과 범위 .....	25
제2장 솔껍질깍지벌레의 병원성 미생물 연구 .....	26
제1절 연구개발목표 .....	26
제2절 연구방법 .....	29
제3절 연구결과 및 고찰 .....	37
1. 솔껍질깍지벌레 indigenous 병원성 nuclear polyhedrosis virus(NPV)분리 및 배양체계확립 .....	37
2. 솔껍질깍지벌레 병원성 미생물의 동정 및 피해임목의 미생물상 규명 .....	41
3. 솔껍질깍지벌레의 미생물적 감염치사형태 및 원인규명 .....	52
제4절 참고문헌 .....	61
제3장 솔껍질깍지벌레의 유약호르몬 에스테르 가수분해효소 (juvenile hormone esterase, JHE)유전자 연구 .....	67
제1절 연구개발 목표 .....	67
제2절 연구방법 .....	67



제3절 연구결과 및 고찰 .....	73
3-1. 솔껍질각지벌레의 mRNA분리 및 RT-PCR .....	73
3-2. JHE 유전자의 Genomic DNA클로닝 .....	73
3-3. Genomic DNA sequence분석 및 특성 .....	76
3-4. Baculovirus에서 JHE유전자의 발현 및 검색 .....	83
제4절 참고문헌 .....	91
제4장 솔껍질각지벌레의 천적연구 .....	94
제1절 연구의 필요성 .....	94
제2절 연구개발목표 .....	101
제3절 연구방법 .....	102
제4절 연구결과 및 고찰 .....	103
4-1. 천적조사 .....	103
4-2. 솔껍질각지벌레의 대량사육방법확립 .....	110
제5절 참고문헌 .....	113

# 제 1 장 서 론

## 제1절 연구개발의 목적과 범위

### 1. 연구개발의 필요성

우리 나라의 산림면적은 전국토의 65%이상을 차지하고 있으며 국내의 대표수종인 소나무(*Pinus densiflora*)와 곰솔(海松, *Pinus thunbergii*)은 전체 산림면적 646만 ha의 약 45%인 293만 ha를 점유하고 있다. 따라서 Fig.1에 나타낸 바와 같이 우리 나라의 중요한 산림자원인 소나무와 곰솔에 막대한 피해를 주고 있는 솔껍질 깍지벌레(*Matsucoccus thunbergianae*, Miller and Park)의 문제 해결은 우리 나라 산림보호에 있어 중요한 현안 과제이다(이, 1998).

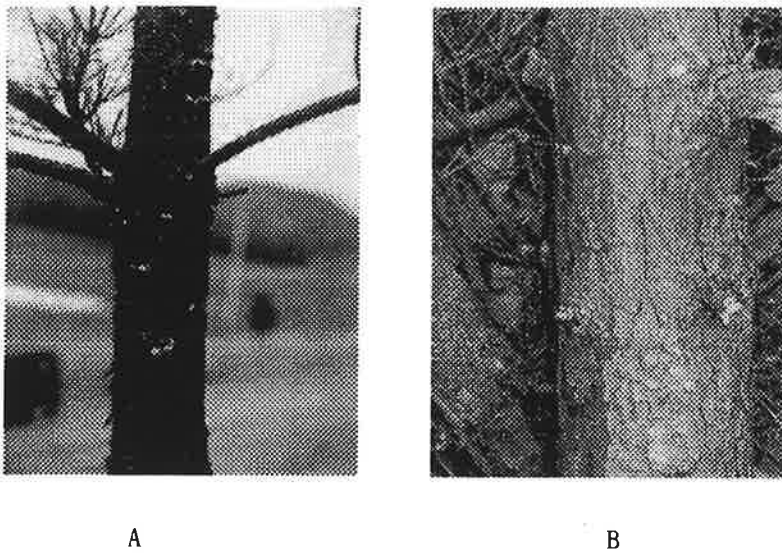


Fig. 1. Photographs of pine bark scale infested *Pinus thunbergii* (A) and *Pinus densiflora* (B).

우리 나라 해안지방의 주요 수종은 海松(곰솔)으로서 남부지역을 비롯하

여 서해안으로 경기도 남부, 동해안은 경상북도 북부까지 천연림이 연결되어 있다. 솔껍질 각지벌레는 소나무에도 피해를 입히지만 주로 해송림(곰솔)에 더 큰 피해를 주는 해충으로 1963년 전남 고흥군 도양읍 비봉산에서 최초로 발생한 이후 서해안 쪽으로는 전북 군산, 남해안쪽으로는 경남 거제 및 부산 등 해안지역으로 피해가 계속 확산되고 있어 본 해충에 대한 방제대책 수립이 시급한 실정에 있다.

1980년대 초부터 남서해안지방의 해송림에는 솔껍질 각지벌레가 대대적으로 발생하여 삼림을 황폐화시키고 있다. 이러한 피해원인이 솔껍질 각지벌레로 확인되었던 1983년 춘기당시에는 피해지역을 중심으로 전남 11개 시군의 약 12,000ha에 국한되어 있었으나 그 후 매년 약 5km의 속도로 확산되는 과정에서 매년 약 10,000ha의 해송림이 큰 피해를 받고 있으며 1990년에는 전남 20여만 ha의 해송림 거의 전역 및 전북 고창, 부안군으로 피해지역이 확대되어 전체적으로 약 30만 ha의 해송림이 피해를 입은 것으로 추정되고 있으며 북쪽으로는 군산, 익산 지역의 일원, 동쪽으로는 김해, 부산지역의 산림에도 큰 위협이 되고 있다.

솔껍질 각지벌레(*Matsucoccus thunbergianae* Miller and Park)는 매미목(Hemiptera), 각지벌레상과(Coccoidea), 이세리아각지벌레과(Margarodidae)에 속하는 해충으로서 海松과 소나무에 서식하나 주로 海松을 가해하며 심한 경우 임목을 고사시키는 우리 나라의 주요한 산림해충이다(김, 1986., 박, 1991., 김 과 오, 1992).

본 해충의 학명은 Miller와 Park(1987)에 의하여 신종으로 명명되었으며, 神田(1941)에 의하여 보고된 소나무껍질각지벌레(*M. matsumurae*)와는 형태적으로 거의 유사하나 본종은 1년 1세대 발생하며 2령 약충으로 월동하는 반면, 후자는 1년 2세대 발생하여 1령 약충으로 월동하는 것이 가장 큰 차이점이라고 하였다(Miller 와 Park, 1987).

현재 솔껍질깍지벌레류는 전세계적으로 30종이 밝혀져 있다. 이들 대다수의 종에 대한 생활사 조사결과 대부분은 양성생식을 하며 1년에 대체적으로 1~2회 발생하는 것으로 보고 되어 있다(박, 1991).

알에서 부화된 길이 약 0.35mm의 애벌레(부화약충, neonate crawler)는 소나무가지 위를 기어다니다가 가지 위의 인편 밑에 정착하여(1령 정착약충, settled crawler)인피부에 매우 가는 실같은 입을 꽂고 즙액을 흡수하여 성장하며 촉각, 다리 등의 부속지(附屬肢)가 없는 2령 약충(intermediate nymph)으로 탈피한 후 이동하지 않고 같은 장소에서 계속 가해한다. 암컷은 2령 약충에서 직접 날개가 없는 성충으로 우화(羽化)하지만 수컷의 경우는 암컷 성충과 형태가 유사한 前成虫(preadult)으로 탈피한 후 가지 위를 기어다니다가 가지 표면 또는 수피 틈에 정착, 고치를 짓고 그 속에서 용화(蛹化)한다. 고치속의 蛹은 일정기간 후 날개를 가진 수컷으로 우화 하는데 암컷 2령 약충 기간은 수컷 2령 약충, 전성충, 용의 기간을 합한 것과 유사하여 兩性の 성충 우화기는 대략 일치한다.

암컷은 우화한 가지 위를 기어다니다가 교배 후 주로 수피 틈에 정착, 직경 2mm 내외의 흰 솜 모양의 알주머니를 분비하고 그 속에 알을 낳는다. 1마리당 평균 산란수는 종에 따라 달라서 130~680개이나 대부분의 종은 250~300개 내외이다. 암수 모두 2령 약충 이후의 충태는 입이 없으며 기주 식물을 가해하는 시기는 1령 정착약충 및 2령 약충에 국한된다. 또한 1령 약충이 가해 장소에 정착한 후에는 암컷 성충 또는 전성충으로 탈피하기 까지 장소의 이동이 없으며 완전히 성장한 2령 약충이라도 가해 장소로부터 이탈되면 탈피하지 못하고 폐사하다(박, 1991).

국내 솔껍질 깍지벌레는 1년에 1회 발생하며 성충은 주로 4월에 우화, 알을 낳고 이들은 5월에 부화하며 부화약충은 정착 후 장기간의 여름 휴면 기간을 갖고 9월경부터 성장하여 가해하기 시작하는데 11월 경에 2령 약충

으로 탈피, 겨울에 즙액을 많이 흡수하며 성장한다고 알려져 있다(박과 박, 1985).

솔껍질깍지벌레류에 의한 소나무 類의 전형적인 피해증상은 수관 하부의 잎부터 갈변하며 심한 경우에는 수관전체가 갈변, 고사하는 양상을 보인다. 국내의 경우 피해가 심하게 진전되는 지역에서는 해충침입이 발견된 당년 또는 1년 후에 외견적 피해 증상이 나타나며, 이로부터 1~2년 후에 집단적인 입독고사가 관찰된다. 침엽이 갈변하는 현상은 3~5월에 주로 나타나며 여름 및 가을에는 외견상 피해진전이 없다가 이듬해 이른봄에 피해 선단지에서는 피해진전이 빠르게 진행되므로 수관형태가 그대로 유지된 채 고사한다. 한편 임분피해 양상을 보면 초기에는 동일 임분 내에서도 군상발생현상을 보이다가 세대가 경과함에 따라 이러한 집중도가 감소하여 해충이 임분 전체로 확산되는 양상을 보이는데, 이는 침입초기에 바람에 날려온 부화약충들이 낙하된 지점을 중심으로 급격히 번식한 후 단목간의 이동이 이루어지기 때문인 것으로 생각되고 있다(박, 1991).

솔껍질깍지벌레류에 의한 임목 피해는 약충이 구침을 수피 밑에 꽂고 가해할 때 흡즙에 의한 양료의 손실, 이에 수반된 세포막 파괴 및 세포내 물질의 분해가 복합됨으로써 나타나는데, 국내의 경우 피해목의 인피부는 약충의 가해가 완료된 4월경부터 수개월 후 탈색되기 시작하여 당년 가을에 갈변하며, 그 후 직경 2mm 의 갈색반점이 생기고 그 주위에 callus가 형성되며, callus외부에는 많은 송진이 분비되는데 해충밀도가 높으면 반점이 가지들레에 서로 연결되어 극심한 수세악화를 일으켜 결국 고사하는 것으로 보고하였다(박, 1991). 이러한 조직괴사는 겨울철에 확대되며, 괴사 부위의 연결에 의한 임목 피해는 Duda(1961), Bodenheimer와 Neumak(1955)에 의해서도 언급된 바 있다.

솔껍질깍지벌레류의 방제를 위한 연구는 주로 원산지 천적의 도입 및 기

존천적 세력의 증가를 도모하는 생물학적 방제, 살충제의 수관 살포, 수간 주입, 근부 토양처리 등에 의한 화학적 방제, 간벌, 피해목 제거 및 건전한 삼림생태계를 육성하는 임업적 방제 및 성 페로몬이용법 등을 중심으로 이루어지고 있다.

무당벌레의 방사에 의한 생물학적 방제 가능성(최, 1995)이 검토되었고, 화학적 방제법으로서 supracide를 약충 부화기인 5월에 살포하여 90%이상의 높은 살충효과를 얻었으나(박 등, 1984), 대 면적 살포가 어렵고 천적의 피해 등 부작용이 우려되어 보호수, 조경수 등 특수한 지역에서만 방제에 적용되고 있다. 이러한 약제 방제는 단위 면적당 인력이 많이 소요되며 대 면적 방제가 어려우므로 천적류에 영향이 적은 곤충 성장조절제(insect growth regulator)로서 나비목 및 매미목 해충에 사용되고 있는 fenoxycarb를 이용한 항공방제가 시도되어 부화약충의 정착율감소, 1령정착약충의 살충, 2령약충의 탈피방해효과 등이 조사되었으며(Mendel 과 Rosenberg, 1988), 국내의 경우 최 등(1997)은 벼멸구의 항공방제에 사용하는 부프로페진 40% 액상수화제를 2령 약충 말기에 항공 살포하여 80%이상의 방제효과가 있음을 보고하였다.

임업적 방제는 입목 밀도가 높은 입지에서 피해가 심하므로 간벌이 권장되며 그 외 피해목 벌채가 주로 2차 병해충의 대발생 방지를 목적으로 권장된다(Qi 와 Wang, 1981, Li 등, 1980, Schvester 등, 1980).

술겍질 깍지벌레류 암컷성충이 발산하여 수컷을 유인하는 성페르몬의 이용과 관련된 연구가 이루어져 유인효과가 있음이 보고되었다(Qi 등, 1983, Young and Qi, 1983, Park 등, 1986).

이상에서 살펴본 바와 같이 술겍질깍지벌레 방제에 대한 연구는 화학적 방제 및 성페르몬에 관한 연구가 일부 수행되고 있으나 술잎혹파리 방제비용의 예에서 비추어 볼 때 주로 수간 주사에 의하는 방제 비용이 연간 280

억원 이상인 점을 고려한다면 솔껍질깍지벌레 방제 비용도 이보다 적지는 않을 것이므로 환경 친화적 방제법의 확립이 시급히 개발되어야 할 것이다.

## 2. 연구개발의 목적과 범위

본 연구는 솔껍질 깍지벌레의 효과적인 방제 기술개발을 목적으로 제1세 부과제에서는 솔껍질 깍지벌레 특이적 병원성 미생물을 분리 동정하고, 솔껍질 깍지벌레가 서식하는 생태계의 미생물상을 규명하며, 자연상태에서의 솔껍질 깍지벌레의 미생물적 감염치사 형태 및 원인을 규명한다. 아울러 제2세부과제에서는 솔껍질 깍지벌레의 성장, 탈피, 변태에 관여하는 유약 호르몬 에스테르 가수분해효소(juvenile hormone esterase, JHE)를 암호하는 cDNA를 클로닝하고 발현한 후 JHE가 솔껍질 깍지벌레의 성장에 미치는 영향을 조사하여 솔껍질 깍지벌레의 생명공학적 방제를 위한 기초자료로 활용한다. 제3세부과제에서는 솔껍질 깍지벌레의 천적을 조사하고 이를 응용한 방제기술 및 솔껍질 깍지벌레 대량사육방법을 개발한다.

## 제2장 솔껍질깍지벌레의 병원성 미생물 연구

### 제1절 연구개발목표

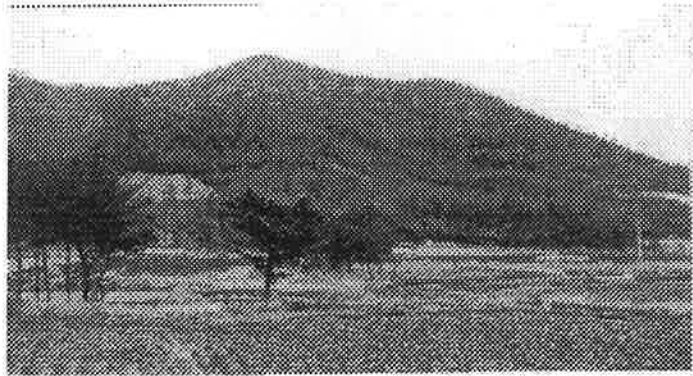
우리 나라 남서해안지대의 해송림에 만연된 솔껍질 깍지벌레는 1963년 전남 고흥군 도양읍 비봉산에서 처음 발생하여 현재 서해안 쪽으로는 전북 군산, 익산, 남해안 쪽으로는 경남거제, 부산 등 해안지역으로 피해가 계속 확산되어 소나무를 완전 고사시키는 등 치명적인 손상을 입히고 있다. 따라서 생태계의 파괴는 물론, 본 해충이 두터운 소나무 껍질 밑에서 흡즙에 의한 피해를 주기 때문에 강력한 살충제로도 방제가 매우 어려워 현재까지 뚜렷한 방제책이 없어 벌목으로 방제를 대신하고 있는 실정이다 (Fig. 2). 최근에 와서는 본 해충의 특이한 생태적인 특성을 고려할 때, 환경 친화적 방제법의 일환으로 유효 병원미생물을 이용하는 미생물적 방제법이 가장 유력한 수단으로 판단되어 이에 적합한 미생물 살충제의 개발이 절실히 필요한 실정이다.

현재 자연계에 존재하는 약 100만종 이상의 곤충에 기생하는 많은 곤충 병원 미생물은 그 종류가 매우 다양하며, 최근 분자생물학과 유전공학의 급속한 발전으로 이들 곤충 병원미생물의 병원력을 더욱 증대시켜서 새로운 미생물체로 형질전환 시킬 수 있게 됨으로써, 생물 신소재 측면에서 곤충병원미생물을 이용한 미생물 살충제의 개발 전망은 매우 밝은 실정이다.

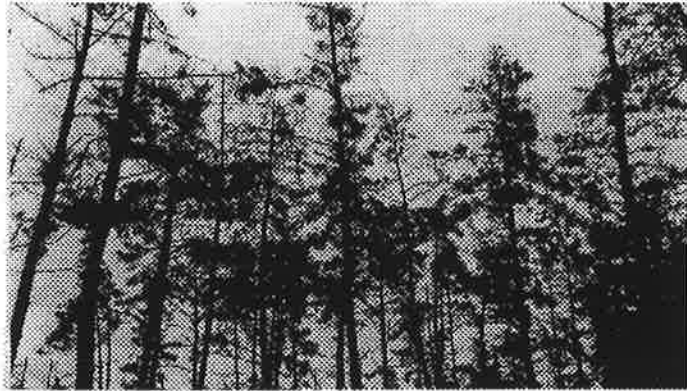
미생물 살충제는 유기합성 농약의 여러 가지 문제점을 해결 보완 할 수 있는 장점이 있다. 우선 방제 목적 해충 이외의 인축, 동·식물에 대하여는 전혀 해가 없고 약제내성이나 저항성 유발이 거의 안정되지 않는 이점 등 무공해적이고 무독성인 점 및 환경을 보전 할 수 있다는 점들은 특히



A



B



C



Fig. 2. Photographs of pine bark scale infested forest(A), black pine trees(B), and removed dead trees from the forest(c).

산림 해충방제에 있어서는 대단히 중요한 관점으로 생각되고 있다.

곤충 병원미생물을 이용한 미생물 살충제의 개발은 구미 각국을 비롯한 선진국에서는 주로 원예, 목초, 산림의 나비목 해충에 적용하고 있다(岡田齊夫, 1994). 그러나 우리 나라의 솔껍질 깍지벌레의 경우 생태적인 면을 고려하여 곤충 병원미생물의 세균, 바이러스 및 사상균 등의 감염경로를 볼 때, 세균, 바이러스 등의 경구감염 경로를 가진 미생물 보다 경피전염을 하는 사상균이 더욱 유력한 것으로 판단되고있다(강, 1997).

현재 곤충에 병원성을 나타내는 사상균(insect-pathogenic fungi)은 약 100속 750종 이상이 보고되고 있으나, 그 중 *Beauveria bassiana*를 비롯한 십 여종의 유효한 사상균(insect-pathogenic fungi)이 미생물 살충제로서 이용되고 있다(Hajek and St. Leger, 1993, 복성해, 1993, Carruthers and Hural, 1990, McCoy 등, 1988, Soper and Ward, 1981).

특히 곤충 병원성 사상균 중 불완전 균류인 *Paecilomyces farinosus*가 나비목(Lepidoptera) 뿐만 아니라 파리목(Diptera) 및 매미목(Homoptera) 곤충에도 병원성을 가지며, *Verticillium lecanii*가 진딧물이나 깍지벌레를 숙주로 기생하는 병원성 사상균으로 알려져 있고, 접합균류의 일종인 *Entomophthora*, *Erynia* 및 관련 사상균이 집파리나 진딧물에 병원성을 나타낸다고 보고되어있다(Charnley, 1989). 따라서, 곤충 병원미생물을 이용하여 솔껍질깍지벌레의 효과적인 방제를 위해 본 연구에서는 솔껍질깍지벌레 특이적 병원성 미생물을 분리, 동정하고 그 미생물상을 규명하며 자연 상태 하에서의 솔껍질깍지벌레의 미생물적 감염치사 형태 및 원인을 규명한다.

솔껍질깍지벌레의 피해가 극심한 지역을 대상으로 산림토양 및 이 병충으로부터 솔껍질 깍지벌레 병원 사상균을 확보하고 대량 배양체계가 확립되면 금후의 계속된 일련의 연구 과정을 거쳐 솔껍질깍지벌레 방제를 위한 미생물 살충제가 개발 될 것이다.

## 제2절 연구방법

### 1. 솔껍질깍지벌레 indigenous 병원성 nuclear polyhedrosis virus(NPV)분리 및 배양체계 확립

#### 1-1. 핵다각체 virus(NPV)의 분리

핵다각체 virus를 분리하기 위하여 솔껍질깍지벌레 피해 만연지역인 나주, 함평, 영광 피해확대지역인 고창 및 남평지역의 해송림에서 피해목을 절단하여 솔껍질 인피로부터 암컷 성충 및 수컷 성충을 수집하였다. 이를  $-80^{\circ}\text{C}$  냉동고에 보관한 후 virus분리 시료로 사용하였다. 핵다각체 virus 봉입체(NPV IBs)를 관찰하기 위해서 임 등(1989)의 방법에 따라 죽은 암컷성충 30마리를 잘 갈아 그 즙액을 짜내어 1000rpm에서 5분간 원심분리하여 그 상등액을 취하였고, 이 상등액을 다시 5000rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 제거하고 침전물을 얻었다. 침전물을  $10\mu\text{l}$ 의 증류수에 현탁하여 이것을 광학현미경 1200배 배율로 바이러스 감염여부를 확인하였다.

감염여부 확인 후 많은 양의 순수한 virus의 획득을 위하여 500마리의 죽은 암컷성충을 이용하여 다음과 같은 단계를 거쳐 virus를 확인하였다.

- ① 500마리의 암컷성충을 20ml의 0.01% SDS 용액에 현탁한다.
- ② 5분간 homogenizer를 이용하여 분쇄한다.
- ③ 분쇄된 시료를 1000rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 취

한다.

- ④ 상등액을 다시 3000rpm으로 10분간 원심분리하는 것을 3차례 반복 한 후 상등액을 제거하고 침전된 물질을 0.01% SDS용액 8ml에 재현탁한다.
- ⑤ 40~65%의 Sucrose 농도구배 용액에 재현탁된 시료를 첨가하여 22,000rpm에서 1시간 동안 원심분리한 후 band를 얻는다.
- ⑥ 얻어진 band를 주사바늘을 이용하여 원심분리관으로부터 분리한 후 증류수 100 $\mu$ l로 희석한 후 15,000rpm으로 30분간 원심분리한다.
- ⑦ 상등액을 취하여 -20 $^{\circ}$ C에 보관.

## 1-2. NPV의 배양체계확립

Virus의 기본적인 생산설계는 ①숙주곤충의 확보 ②virus의 접종 ③이병유충의 사육 ④병사충의 수확 ⑤다각체의 정제 및 보존의 과정을 반드시 거쳐야 한다. 현재까지 솔껍질 깍지벌레의 인공사육법이 개발되지 않아 자연상태하에서의 유충사육을 모색하였다. 근원직경 약 2cm의 5~6년생 해송을 화분에 옮겨심어 온실(greenhouse)에서 생육시키면서 이 소나무이 껍질 인피부에 솔껍질 깍지벌레의 난괴를 부착시켜 부화된 약충이 인피부에 정착하도록하고 정착된 약충 주위의 인피부조직에 다각체 현탁액을 주입하여 virus가 감염되도록 시도하였다. Virus 접종후 25일간 사육된 솔껍질깍지벌레를 채집하여 병증 발현을 확인하고 이들 시료로부터 전향의 ①NPV 검출방법과 동일한 수순에 따라 NPV를 추출하고, 현미경관찰을 실시하였다.

## 2. 병원성 미생물의 분리동정 및 피해임목의 미생물상 규명

### 2-1. 병원성미생물의 분리

#### 2-1-1. 세균

솔껍질 각지벌레 피해지역에서 채집된 솔껍질 각지벌레의 알, 유충, 번데기, 성충의 성체 및 사체, 소나무껍질, 토양 등의 시료로부터 Thiery & Frachon(1997)의 방법에 따라 주로 포자형성 *Bacillus*속 세균을 분리하였다. 분리 순서는 다음과 같다.

- 1) 시료를 분쇄하여 현탁한 10ml을 80℃에서 10분간 처리하여 영양성장상태의 세균을 열처리 사멸시킨다.
- 2) MBS배지[KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6.8g, Bacto-tryptose 10g, Yeast extract 2g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.3g, CaCl · 2H<sub>2</sub>O 0.2g, Stock solution(MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O 2.0g, Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> 2.0g, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 2.0g, D-H<sub>2</sub>O 1 l ) 10ml, Agar 15g, Distilled Water 1 l , pH 7.2 10ml를 담은 Petri dish에 시료액 0.1 ml를 도말한 후 30℃에서 24시간 배양한다.
- 3) 이 배지에서 성장한 각각의 집락(colony)을 MRS배지 10ml에 접종하여 30℃에서 48시간 진탕배양하고 미생물의 순도, 생육단계를 현미경으로 관찰한다.
- 4) 배양액을 plate에 도말하여 24-48시간 배양하다가 단일 집락을 순수 분리하여 세균의 동정, 특성규명, bioassay 시료로 사용한다.

#### 2-1-2. 균류

靑木(1983), Papierok & Hajek(1997) 및 Goettel & Inglis(1997)방법에 의해 분리한다.

- 1) 솔껍질깍지벌레의 알, 유충, 성충 등의 생체 및 사체를 5% sodium hypochlorite( $\text{NaClO} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )에 2-3분간 침적하거나, 65-70% 에탄올에 10-15초간 침적하여 표면소독을 실시한다. 재료가 적은 것은 처리시간을 단축하고 신선한 재료는 그대로 사용한다.
- 2) 멸균된 증류수로 3-5회 세척한다.
- 3) 시료를 분리용 한천배지 M84-a배지(egg york 5개, glucose 40g, Peptone 10g, yeast extract 2g, Agar 15g, D-H<sub>2</sub>O 1 l)에 약간 함유되도록 놓는다.
- 4) Plate를 20-25℃에서 수일간 배양한다.
- 5) 생육된 집락을 분리하여 M87-a배지(M84-a배지에서 egg york를 제외한 것)에 생육시켜 보존한다.
- 6) 솔껍질깍지벌레 개체에 분생자를 묻혀 체표에 도포하여 1주일간 관찰하면서 병증을 나타내는 기생균을 확인한다.

## 2-2. 병원성 미생물의 동정

세균은 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology(9th ed., 1994)를 이용하여 동정하고 균류는 Manual of Techniques in Insect Pathology(L. A. Lacey ed., 1997, AP) 및 菌類圖鑑(上, 宇田川俊一, 椿啓介, 堀江義一, 三浦宏一郎, 箕浦久兵衛, 山崎幹夫, 横山龍夫, 渡邊昌平, 1978,)에 기술된 방법에 따라 동정하였다.

## 2-3. 병원성 미생물상 규명

병원성 미생물의 생태적 특성을 규명하기 위하여 솔껍질깍지벌레 피해지의 삼림토양, 피해목의 줄기 및 잎, 수피, 솔껍질깍지벌레 등의 시료에 존재하는 병원성 또는 비병원성의 미생물의 생태적 분포 비율을

조사하였다.

### 3. 솔껍질깍지벌레의 미생물적 감염 치사 형태 및 원인 규명

해충방제를 위한 병원성 미생물의 효과적 이용을 위해서는 병원체의 정확한 동정은 물론, 전염경로, 감염치사형태, 숙주 특이성 같은 여러 가지 문제가 중요한 기술로서 확립되어야 한다.

#### 3-1. 솔껍질깍지벌레의 채집

본실험에 사용된 솔껍질깍지벌레의 알 및 애벌레(제1령 및 2령 약충)는 솔껍질깍지벌레 피해지역인 전남 나주시 산포면 교원리 방축마을, 나주시 남평읍 노동리 하노동 마을, 함평군 대동면 덕산리 외덕마을, 영광군 법성면 대덕리 대덕산, 전북고창군 해리면 하연리 이상산, 부안군 진서면 운호리 마동 마을 해송림에서 채집하여 저온(4~7℃)에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

#### 3-2. 솔껍질깍지벌레의 병원미생물 감염치사실험

##### 3-2-1. 감염치사실험에 사용한 균주

유효곤충병원 미생물 탐색을 위하여 솔껍질 깍지벌레 피해지역에서 채집한 한 시료로부터 분리한 세균 108주, 곰팡이 24주, 야외에서 병원 미생물에 감염되어 죽은 곤충(나방, 파리, 매미, 사마귀, 바퀴벌레 등) 으로부터 분리한 곰팡이 5주 및 中國 安徽省 安徽農業大學에 설립되어 있는 中國菌物學會 虫生菌研究中心(Research center for Entomogenous Fungi, Mycological Society of China)으로부터 분양 받은 다음과 같은 곤충 병원 사상균 12주를 감염치사 실험에 사용하였다.

Table 1. Entomopathogenic fungi obtained from the Research Center for Entomogenous Fungi, Anhui Agricultural University, Hefei, China

Fungus strain	RCEF number
<i>Beauveria bassiana</i>	0003
"	0064
"	0284
"	0333
<i>Metarhizium anisopliae</i>	0195
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	0200
<i>Paecilomyces farinosus</i>	0219
<i>Paecilomyces farinosus</i>	0453
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	0293
<i>Paecilomyces tenuipes</i>	0441
<i>Hirsutella sinensis</i>	0273
<i>Verticillium lecanii</i>	0915

### 3-2-2. 곤충병원균의 병원성검정 및 감염치사 형태조사

솔껍질작지벌레의 감염치사형태 및 원인규명을 위하여 분리동정된 미생물 및 국외연구기관으로부터 분양받은 곤충병원미생물을 Manual of Techniques in Insect Pathology (Lacey, 1997) 및 菌類研究法(青島清雄, 椿啓介, 三浦宏一郎, 1983)에 따라 솔껍질작지벌레에 감염시켜 각 병원성 균종에 의한 감염사체의 성상을 광학현미경에 의해 관찰조사 하였다.

### 3-2-3. 미생물적 감염치사 원인 규명을 위한 곤충각피분해효소 (cuticle-degrading enzymes)의 활성검색



곤충병원균은 곤충각피 분해효소를 생산하여 각피층(cuticle layer)을 분해하고 균사가 계속 곤충몸체를 관통하므로써 직접 숙주를 감염시켜 치사에 이르게 하는 것으로 알려져있다.

솔껍질병원균이 생산하는 각피관통관련 효소인 Protease, Lipase, Chitinase의 활성은 다음과 같은 배지를 사용하여 검색하였다

1) Protease활성검색배지(Skim Milk Agar)

Composition per liter:

Agar	15.0 g
Pancreatic digest of casein	5.0 g
Yeast extract	2.5 g
Glucose	1.0 g
Skim milk solution	100ml *
	pH7.0

\* Skim milk 8.0g을 증류수 100ml에 첨가하여 120℃, 15분간 고압멸균후 45~50℃ 냉각된 것

2) Lipase활성검색배지(Sierra Medium)

Composition per liter:

Agar	15.0 g
Peptone	10.0 g
NaCl	5.0 g
CaCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.1 g
Tween80	10.0ml *
	pH7.4

\* 별도로 120℃, 15분 고압멸균후 첨가

### 3) Chitinase활성검색배지(Chitin Agar)

Composition per liter:

Agar	15.0 g
Chitin, ppt *	3.0 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.1 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.7 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2 g
FeSO <sub>4</sub>	1.0mg
MnSO <sub>4</sub>	1.0mg
	pH7.0

\* Chitin 40 g 을 HCl conc. 400ml에 첨가후 이것을 5℃에 냉각한 증류수 2 l 에 현탁시킨후 Whatman No.1여지로 여과후 침전된 Chitin을 수도수로 12시간 투석하고 KOH로 pH7.0 으로 조정

### 제3절 연구결과 및 고찰

#### 1. 솔껍질깍지벌레 indigenous 병원성 nuclear polyhedrosis virus(NPV) 분리 및 배양체계 확립

##### 1-1. 핵다각체 virus(NPV)의 분리

핵다각체 virus를 분리하기 위하여 솔껍질깍지벌레 피해 만연지역인 나주, 함평, 영광 피해확대지역인 고창 및 남평지역의 해송림에서 피해목을 절단하여 솔껍질 인피로부터 암컷 성충 및 수컷 성충을 수집하였다. 이를  $-80^{\circ}\text{C}$  냉동고에 보관한 후 virus분리 시료로 사용하였다. 핵다각체 virus 봉입체(NPV IBs)를 관찰하기 위해서 죽은암컷성충 30마리를 잘 갈아 그 즙액을 짜내어 1000rpm에서 5분간 원심분리하여 그 상등액을 취하였고, 이 상등액을 다시 5000rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 제거하고 침전물을 얻었다. 침전물을  $10\mu\text{l}$ 의 증류수에 현탁하여 이것을 광학현미경 300배 배율로 바이러스 감염여부를 확인하였다.

확인 결과 Fig. 3.에 나타낸 바와 같이 죽은 암컷의 내부에 virus가 감염되어 있는 것을 확인 할 수 있었다.

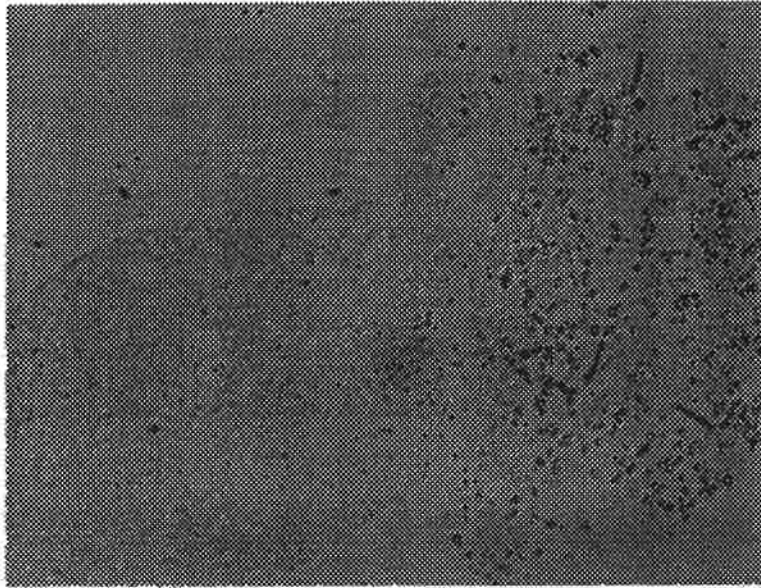


Fig. 3. Light micrograph of *Matsucoccus thunbergianae* NPV IBs ( $\times 1200$ )

감염여부 확인 후 많은 양의 순수한 virus의 획득을 위하여 500마리의 죽은 암컷성충을 이용하여 재료 및 방법에서 사용한 방법으로 virus를 분리한 결과 Fig. 4.와 과 같은 결과를 얻을 수 있었고, 현탁액중의 NPV IBs 개체수는 Wigley(1980)의 dry counting method에 의해 계산한 결과 그 농도는 약  $10^5 \sim 10^6$  PIB/ml인 것으로 나타났다.

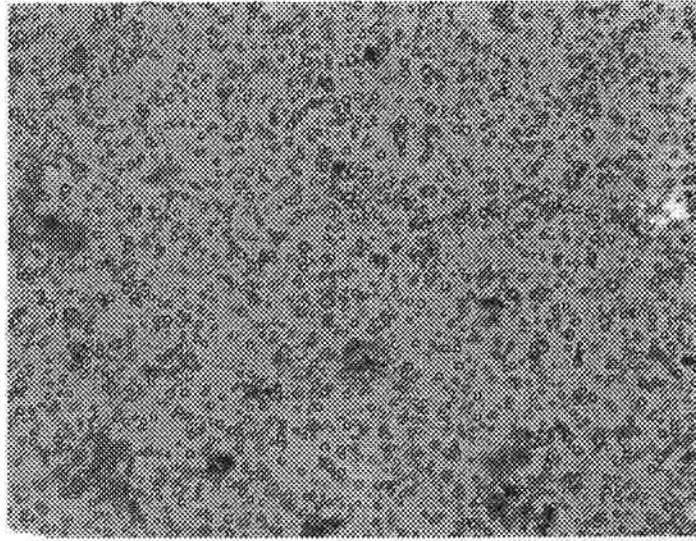


Fig. 4. Light micrograph of *Matsucoccus thunbergianae* NPV IBs obtained from 500 adult females( $\times 1200$ ).

#### 1-2. NPV의 배양체계확립

근원직경 약 2cm의 5~6년생 해송을 화분에 옮겨심어 온실(greenhouse) 및 성장상(growth chamber)에서 생육시키면서 이 소나무의 껍질 인피분에 솔껍질 각지벌레의 난괴를 부착시켜 부화된 약충이 인피부에 정착하도록 하고 정착된 약충 주위의 인피부조직에 다각체 현탁액을 주입하여 virus가 감염되도록 시도하였고, virus 접종후 25일간 사육된 솔껍질각지벌레를 채집하여 병증 발현을 확인하고 이들 시료로부터 전향의 ①NPV 검출방법과 동일한 수순에 따라 NPV를 추출하고, 현미경관찰을 실시한 결과 감염여부를 확인할 수 있었다(Fig. 5).

솔껍질깍지벌레 감염 후 얻은 virus는 솔껍질깍지벌레 피해목으로부터 채집한 약충사체에에서 검출된 NPV IBs와 동일한 양상이 확인되었다. 상기의 결과에서 대상해충에 대하여 NPV가 감염된 사실이 확인되기는 하였지만 병원성은 확인되지 않았다. 이와같이 감염된 약충이 죽지않고 병증이 관찰되지 않은 것은 이 NPV가 독성 virus(virulent virus)가 아닌 잠복성의 virus(temperate virus)이거나, NPV 감염량이 적은 결과이거나 또는 노숙 유충기에 virus가 감염되어 완전히 증식하지 못한 원인에서 기인된 것이 아닌가 추측된다. 따라서 병원성 유무의 확인은 추후 더욱 상세히 검토되어야 할 사항으로 사료된다. 만일 병원성이 없을 경우 대상해충을 치사에 이르게 할 수 있는 병원성 강화 방안과 더불어 BT toxin과 같은 살충성 유전자 또는 변태를 교란하는 JHE유전자의 도입이 이루어져야 할 것이다.

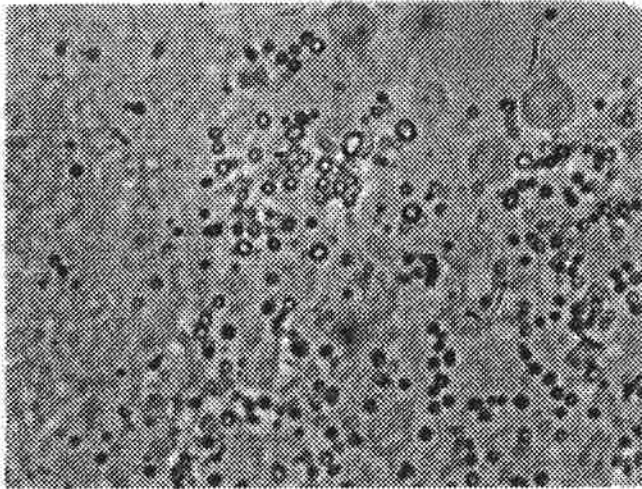


Fig. 5. NPV IBs isolated from *Matsucoccus thunbergianae* larvae( $\times 2400$ ) grown on the black pine in green house and growth chamber.

## 2. 솔껍질각지벌레 병원성미생물의 분리 동정 및 피해임목의 미생물상 규명

### 2-1. 솔껍질각지벌레 병원성 미생물의 분리 및 동정

솔껍질각지벌레 피해지역에서 채집된 솔껍질각지벌레 알, 애벌레(제1약충, 제2약충), 성충 및 기타의 곤충사체를 분쇄하여 10ml의 멸균 증류수에 현탁한 후 이것을 Nutrient Agar(NA, Agar 15g, Peptone 5.0g, NaCl 5.0g, Yeast extract 2.0g, Beef extract 1.0g, Distilled water 1L, pH 7.4) 및 Potato Dextrose Agar(PDA, Potatoes, infusion from 200.0g\*, Glucose 20.0g, Agar 15g, pH 5.6, (\* 감자를 세절하여 500ml의 증류수에 넣고 30분간 끓인 다음 가아제로 여과하여 여과액에 상기 포도당 및 한천을 넣고 증류수 1L로 mess up 하여 고압멸균하여 조제함) 및 M84-a(Egg york 5개, Glucose 40g, Peptone 10g, Yeast extract 2g, Agar 15g, Distilled water 1L)에 각각 0.1ml씩 도말하여 25℃ 또는 37℃에서 배양하면서 생육하는 미생물을 분리 조사하였다(Fig. 6, 7, 8).

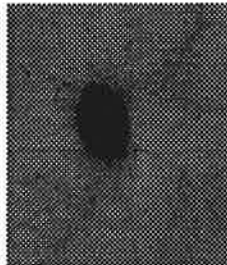
Fig. 6.에 나타낸 바와 같이 세균 MTB-1은 3일째에 왕성한 생육을 나타내었고, 곰팡이 MTB-1은 9일째에 솔껍질각지벌레 유충형태를 확인할 수 없을 정도로 왕성한 생육을 나타냈다. 이 곰팡이와 세균의 유충 이용성을 재현하기 위해 새로운 배지로 2% Agar로만 이루어진 배지에 새로운 유충의 생체 및 사체 약 300여 마리를 도말하고 이것에 1ml의 멸균 식염수에 곰팡이와 세균을 각각 한 colony씩 현탁 시킨 것을 각각 50 $\mu$ l씩 평판 도말하였다. 이렇게 해서 2일째부터 현미경 관찰을 수행한 결과 동일한 결과를 관찰 할 수 있었다.



(1) 부화한지 3일 된 유충



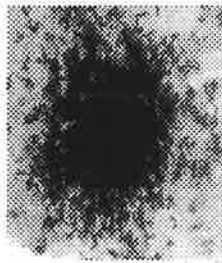
(2) 2일째 MTF-1



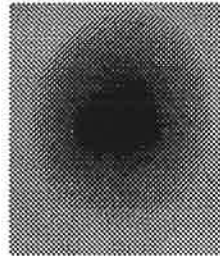
(3) 3일째 MTF-1



(4) 4일째 MTF-1



(5) 9일째 MTF-1



(6) 3일째 세균 MTB-1

Fig. 6. 솔껍질깍지벌레 유충의 생체 및 사체를 이용한 병원성 미생물의 생육상황



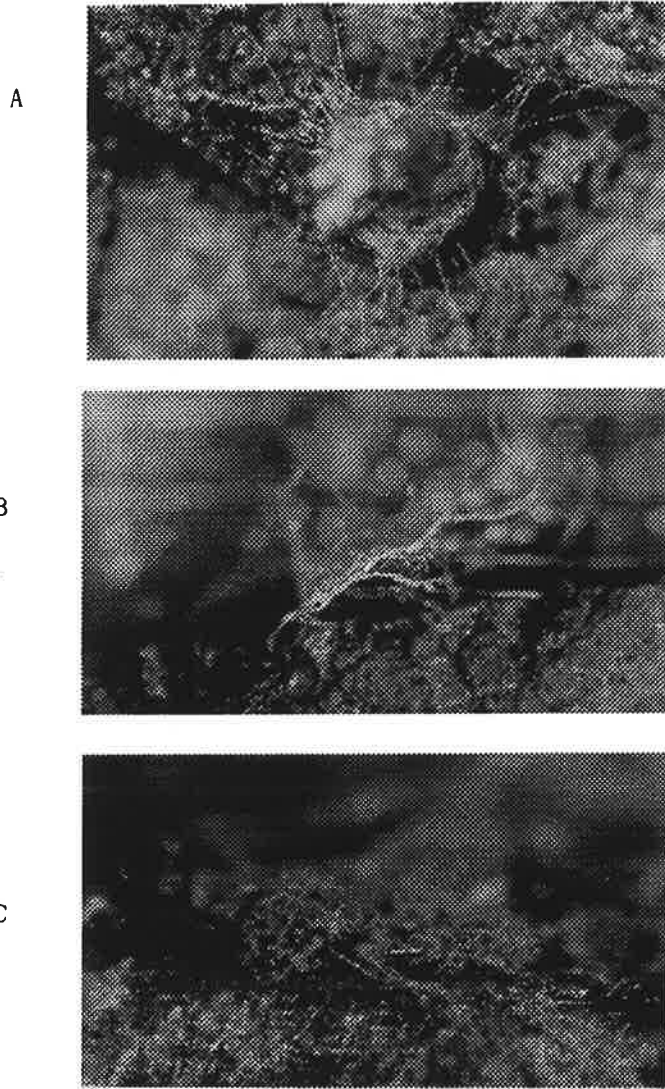


Fig. 7. Entomopathogenic fungi isolated from the second instar nymph.

A and B : *Syncephalastrum racemosum*. C : *Gliocladium* sp.

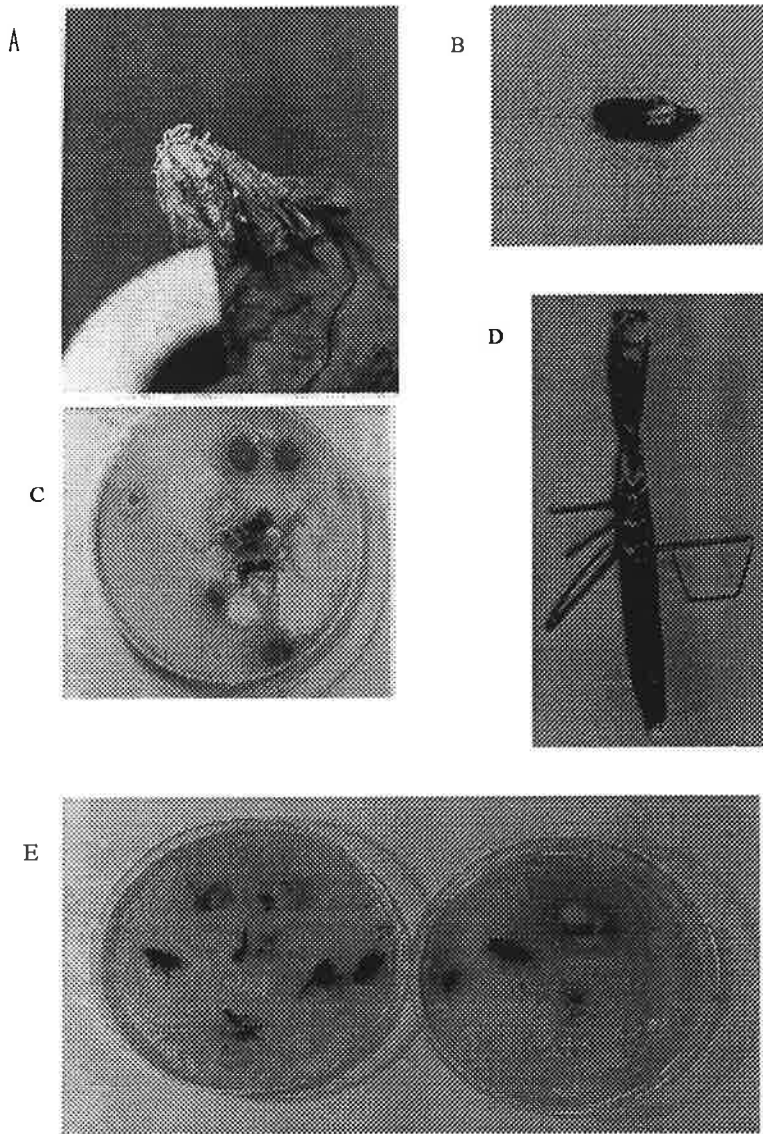


Fig. 8. Insects infected with entomopathogenic fungi.  
Moth(A), Fly(B), Cicada(C), Mantis(D),  
Fly and Cockroach(E)

Fig. 7.에 나타낸 바와 같이, 솔껍질깍지벌레에 특이적으로 병원성을 나타내는 사상균은 Hesselstine 및 Ellis(1973)가 기술한 *The Fungi IVB, A Taxonomic Review with Keys : Basidiomycetes and Lower Fungi* (ed. Anisworth, G.C., Sparrow, F.K., Sussman, A.S, pp.203-208, Academic Press, 1973) 및 三浦(1978)가 기술한 *菌類圖鑑(上)* (宇田川俊一, 椿啓介, 堀江義一, 三浦宏一郎, 箕浦久兵衛, 山崎幹夫, 横山龍夫, 渡邊昌平, 1978, 講談社)의 분류지표에 의거 *Syncephalastrum racemosum*으로 동정되었다.

술껍질각지벌레에 특이적 병원성을 나타내는 사상균의 형태적 특징은 다음 Table 2와 같다.

Table 2. Morphological characteristics of *Syncephalastrum racemosum*

Group key	Character
균사 포자낭병	영양균사가 잘 발달하고 성장이 빠르다. 영양균사로부터 직립하거나 횡적으로는 포복상을 취하며 가근을 갖는다. 처음은 분지하지 않고 격벽이 없으나 나중에 불규칙적으로 분지하여 격벽을 생성한다. 측지는 때로는 구부러지는 灣曲상이 된다. 주축 또는 측지의 선단에 정낭을 형성한다. 정낭은 아구형~난형, 때로는 타원형이며 주축에 생긴 것은 직경 30~80 $\mu$ , 측지에 생긴 것은 약간 작아서 10~40 $\mu$ , 오래된 것은 회색~갈색을 띤다. 전면에 다수의 포자낭을 직접 형성한다
포자낭 (분절포자낭)	短桿狀~指狀(3~)5~10(~18)개의 포자를 1열로 생성한다. 포자낭막은 포자막으로부터 명료하게 구별된다. 부서지면 포자가 방출된다.
포자	거의 무색, 단세포, 평활, 亞球形~卵形, 직경 3~7 $\mu$ m.
접합포자	접합은 Mucor형, 접합포자지지는 거의 동형, 아구형, 직경 50~90 $\mu$ m, 흑색, 표면에 다수의 사마귀형의 돌기를 갖는다. 헤테로형 접합

한편 Fig. 9의 C에 나타난 바와 같이 술껍질각지벌레 존재유무에 관계없이 생육범위가 광범위하고 생육활성이 매우 강력한 균종은 *Gliocladium* sp.로 동정되었다. 술껍질각지벌레에의 병원성 소지여부에 대하여 좀더 상세한 검토가 있어야 할 것으로 판단된다.

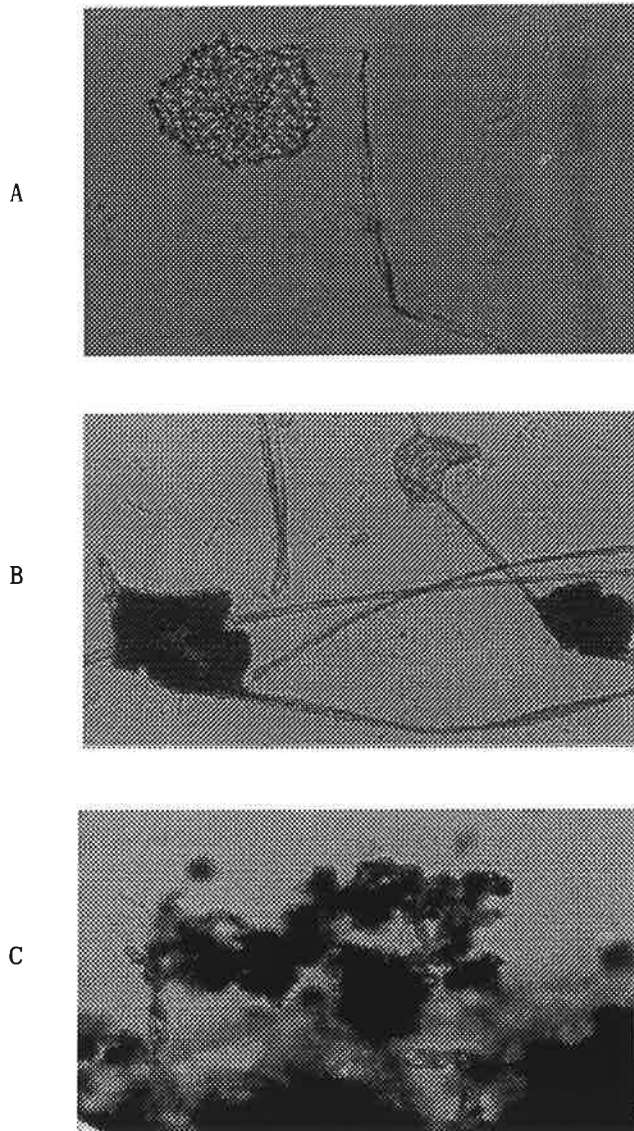


Fig. 9. Photomicrographs of *Syncephalastrum racemosum*,  
(A : Sporangiphore and a head of rod-shaped sporangioles  
B : Zygospores) and *Gliocladium* sp. (C).

## 2-2. 솔껍질각지벌레 피해임목의 미생물상 규명

솔껍질각지벌레 피해지역인 전남 나주시 산포면 및 남평읍 야산의 3개지점으로부터 토양시료를 채취하고 아울러 벌채한 해송림 피해목을 지상으로부터 1m, 2m, 4m, 5m, 및 잎부분으로 나누어 미생물상 규명을 위한 시료로 사용하였다(Fig. 10).



Fig. 10. Approximately 20 years old infested pine trees were harvested for investigation of microflora.

각 시료 1g을 분쇄하여 10ml의 멸균중류수에 현탁한 후 이것을 NA 및 PDA 배지에 0.1ml씩 도말하여 25℃ 및 37℃에서 배양한 후 조사하였다. 그람 음성세균67주, 그람 양성세균 41주 및 곰팡이 24주를 분리하였다(Table 3).

Table 3. Microorganisms isolated from the forest soils and black pine trees damaged by pine bast scales

Sample	Bacteria		Fungi
	Gram(-)	Gram(+)	
Soil-1	2	4	<i>Trichoderma</i> sp.
2	2	2	<i>Aspergillus</i> sp.
3	2	·	<i>Stachybotrys</i> sp.
Stem 1m-1	3	2	<i>Trichoderma</i> sp.
2	3	3	<i>Trichoderma</i> sp.
3	2	1	<i>Trichoderma</i> sp.
Stem 2m-1	11	6	<i>Paecilomyces</i> sp. 외 2types
2	4	3	1type
3	3	3	<i>Paecilomyces</i> sp. 외 2types
Stem 4m-1	5	4	<i>Syncephalastrum</i> sp. 외 1type
2	·	·	<i>Gliocladium</i> sp.
3	9	·	<i>Gliocladium</i> sp.
Stem 5m-1	5	2	<i>Gliocladium</i> sp.
2	·	1	1type
3	8	2	2types
			<i>Scopulariopsis</i> sp.
Leaf-1	2	1	<i>Stachybotrys</i> sp.
			<i>Syncephalastrum</i> sp. 외 1type
2	3	4	<i>Alternaria</i> sp. 외 1type
3	3	3	1type
Total	67	41	24

이들 중 그람 음성세균으로서는 *Pseudomonas* sp. 가 그람 양성세균으로서는 *Bacillus* sp.가 주종을 이루고 있었다. 사상균으로서는 토양에는 *Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp., *Stachybotrys* sp. 가, 줄기에는 *Paecilomyces* sp., *Syncephalastrum* sp., *Gliocladium* sp. 가, 잎에는

*Scopulariopsis* sp., *Stachybotrys* sp., *Syncephalastrum* sp. 및 *Alternaria* sp. 가 주요 우점종인 것으로 규명되었다(Fig. 8). 그리고, 토양 및 줄기 부위에 따른 미생물 수는 Table 4 에 나타낸바와 같이 토양에는 세균은  $4.2\sim 8.4\times 10^8$ (cfu/g), 사상균은  $1\sim 2\times 10^6$ (conidia/g), 줄기에는 세균이  $2.0\sim 4.9\times 10^4 \sim 1.5\sim 3.2\times 10^5$ (cfu/g), 사상균은  $1.5\sim 7.3\times 10^4$ (conidia/g), 잎에는 세균이  $2.1\sim 3.0\times 10^3$ (cfu/g), 사상균은  $1.5\sim 2.8\times 10^3$ (conidia/g)이 존재하고 있음을 알수있었다.

특히 흥미로운 결과로서는 줄기 및 일부위에 *Syncephalastrum* sp.가 우점종으로 존재한다는 사실과 이 사상균이 솔껍질깍지벌레에 병원성을 나타내는 결과를 연계시켜 볼 때 이 사상균이 솔껍질깍지벌레의 생태계에 지대한 영향을 미칠 것으로 예상된다. 따라서 본 사상균에 대한 상세한 연구가 뒤따라 이뤄짐으로써 솔껍질깍지벌레 방제를 위한 새로운 환경친화적 미생물 농약이 개발 될 것으로 기대된다.

Table 4. Distribution of viable cells in forest soils and infested pine trees.

Sample	Bacteria(cfu/g)	Fungi(conidia/g)
Soil	$4.2\sim 8.4 \times 10^8$	$1\sim 2 \times 10^6$
Stem 1m	$1.5\sim 3.2 \times 10^5$	$1\sim 4 \times 10^4$
Stem 2m	$4.7\sim 7.7 \times 10^4$	$2.1\sim 3.4 \times 10^4$
Stem 4m	$2.0\sim 3.6 \times 10^4$	$4.6\sim 7.3 \times 10^4$
Stem 5m	$2.0\sim 4.9 \times 10^4$	$1.5\sim 4.1 \times 10^4$
Leaf	$2.1\sim 3.0 \times 10^3$	$1.5\sim 2.8 \times 10^3$



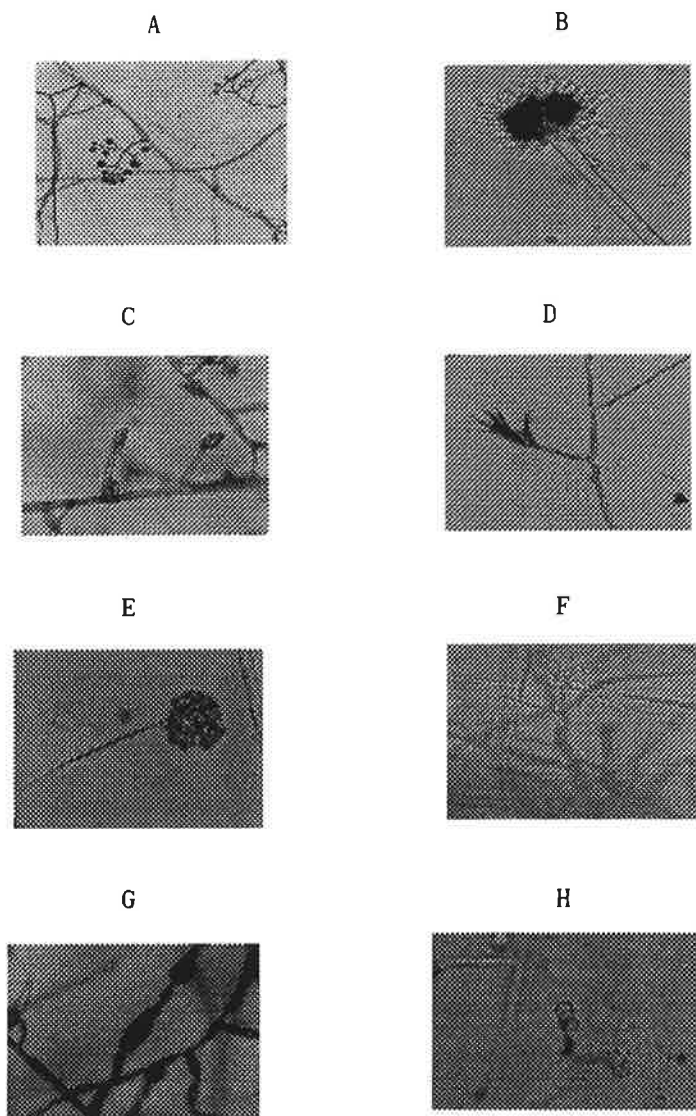


Fig. 11. Filamentous fungi isolated from forest soil and black pine trees infested by pine bast scales.

A : *Trichoderma* sp. B : *Aspergillus* sp. C : *Stachybotrys* sp.

D : *Paecilomyces* sp. E : *Syncephalastrum racemosum*

F : *Scopulariopsis* sp. G : *Alternaria* sp. H: Unidentified

### 3. 솔껍질각지벌레의 미생물적 감염 치사형태 및 원인규명

#### 3-1. 솔껍질각지벌레의 우화촉진 유도

솔껍질각지벌레 피해지역 해송림으로부터 채집한 5-10년생 피해목을 60cm 로 절단하여 수분증발을 방지하기 위하여 절단면을 파라핀으로 밀봉하고 이것을 Fig. 12에 나타낸 것처럼 화분에 담아 25℃/RH 70%로 조정된 성장상에 두고 절단목의 건조예방 목적으로 매일 3회 씩 수돗물을 분무했다. 약 1주일 후 제2약층이 우화하는 시기에 앞서 제2약층이 다량 부착된 해송의 인피 부위를 목질부를 포함하도록 1.5×7cm 크기로 잘라 수분함유 거즈를 넣은 배양접시(disposable plastic Petri dishes)에 담아 솔껍질각지벌레의 우화를 촉진했다. 시간의 경과에 따른 우화정도를 관찰한 결과 약 1주일 후 성충으로의 우화가 확인되었다(Fig. 13).

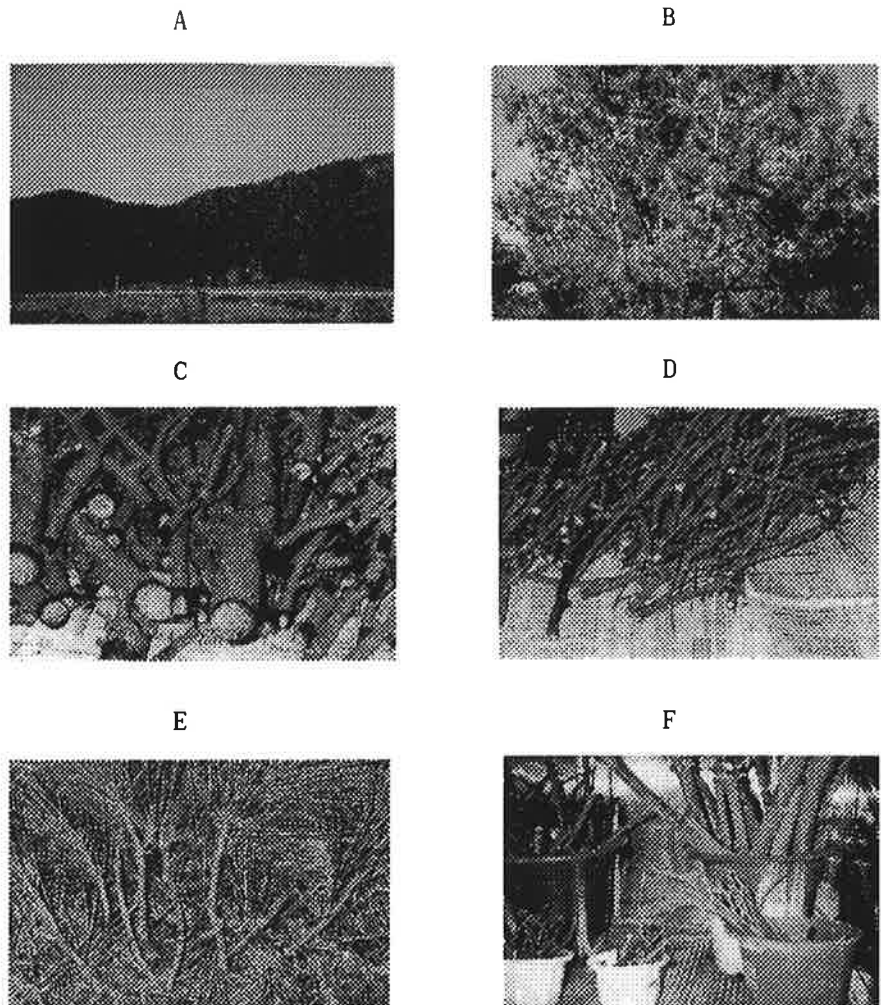


Fig. 12. Induced hatching from the second instar nymph from infested pine trees.

A : Pine bast scales infested forest. B : Pine bast scales infested trees. C : Paraffin sealed branches. D , E : Pine bast scales infested small branches and leaves. F : Water sprayed branches in growth chamber.

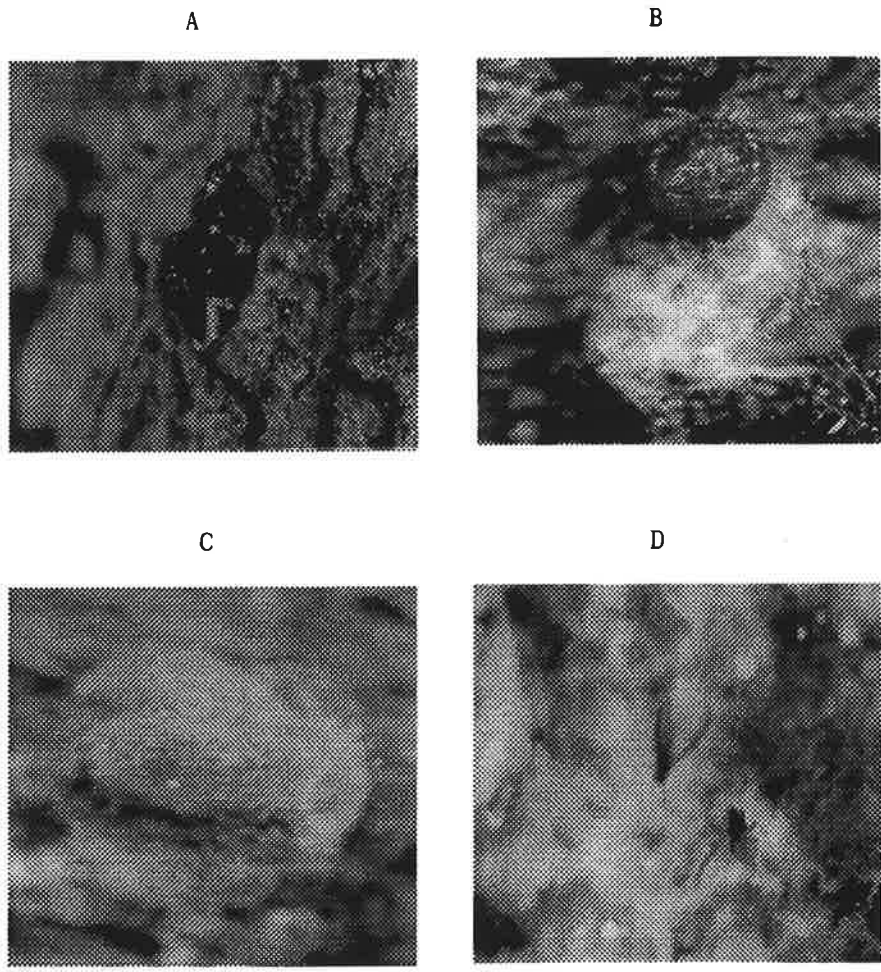


Fig. 13. Hatching stages from the 2nd instar nymph(A),  
laying female(B), pupa(C), adult male(D).

### 3-2. 곤충병원균의 병원성 검정 및 감염치사 형태 조사

토양, 솔껍질깍지벌레 피해 임목, 솔껍질깍지벌레 사체, 곤충이병충으로 부터 분리된 사상균 균주를 각각 PDA 고체 배지에서 배양하여 분생포자를 얻고 이를  $1 \times 10^8$  spores/ml 농도로 현탁한 후 피펫으로 솔껍질깍지 벌레 약충 몸전체에 도포하였다. 이것을 수분을 함유한 거즈위에 얹어 Petri dish에 담아 25°C/RH 70% 조건하에서 병원성을 검정하였다(Fig. 14).

분리균주 중 *Syncephalastrum racemosum*과 *Gliocladium* sp. 균주만이 병원성을 나타냈다(Fig. 15). *Syncephalastrum racemosum*은 성충 및 약충에 특이적을 병원성을 나타냈으나 *Gliocladium* sp.의 경우 솔껍질깍지벌레가 서식하고 있는 소나무 껍질 전체를 뒤덮어 버리는 형태를 취하므로 이 사상균에 대한 상세한 검토가 필요하다고 인정되었다.

감염치사형태는 Fig. 15에 나타낸바와 같이 사상균 균사체가 솔껍질깍지벌레의 각피를 파괴하여 영양을 섭취하고 생육한 포자낭포자병 위에 분절포자낭을 부착한 점으로 미루어보아 본 사상균이 분비하는 솔껍질깍지벌레 각피 분해효소(cuticle-degrading enzymes)가 솔껍질깍지벌레의 각피에 작용하여 곤충 각피를 파괴하여 치사에 이르게 한 것으로 판단되었다. 즉 다음 Fig. 16에 제시하는 바와 같은 곤충병원성 균류의 일반적 감염 경로와 동일한 감염치사 형태를 취하는 것으로 판단되었다.

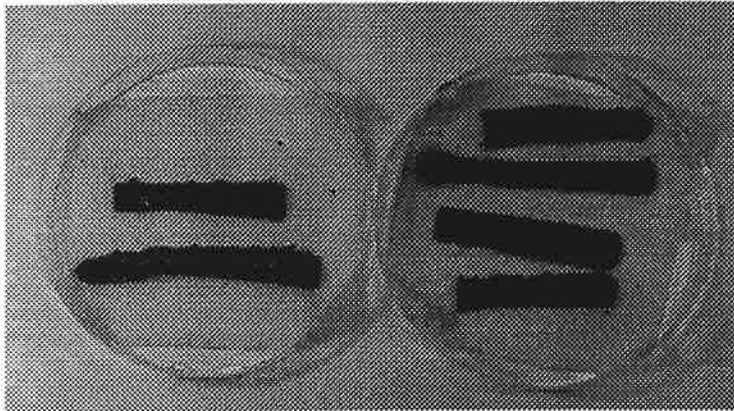
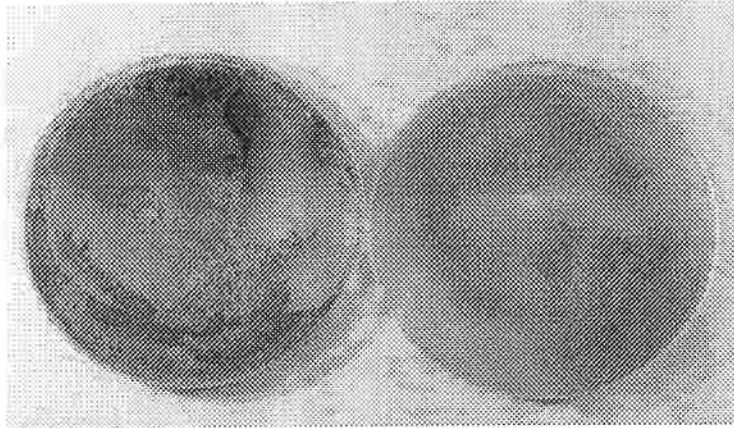


Fig. 14. *In vivo* culture of the pathogen for bioassay.  
 $1 \times 10^8$  spores/ml conidia of entomopathogenic fungi  
were sprayed on the hatching pine bast scales.

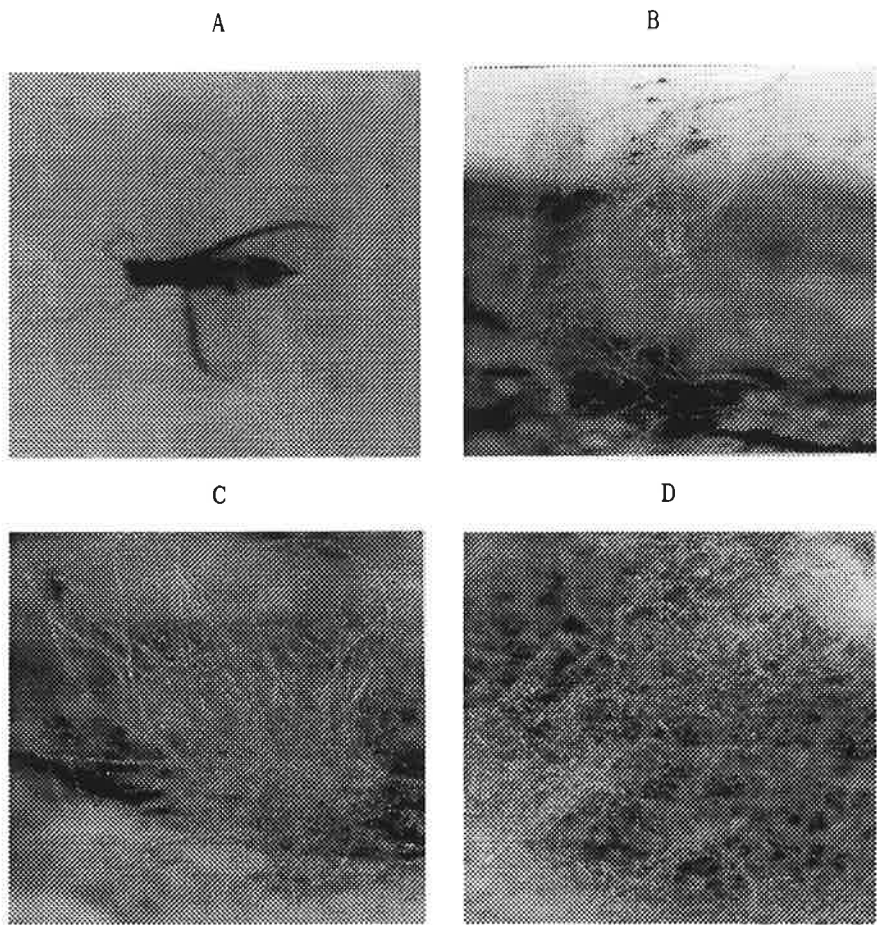


Fig. 15. Experimental infection and determination of their potential in biological control of pests.

A : Sporangiphore and sporangioles of *Syncephalastrum racemosum* on the infected adult male, B , C : Sporangiphore and sporangioles of *S. racemosum* on the infected second instar nymph, D : Spores and sporangiophore of *Gliocladium* sp. on the infected scales.

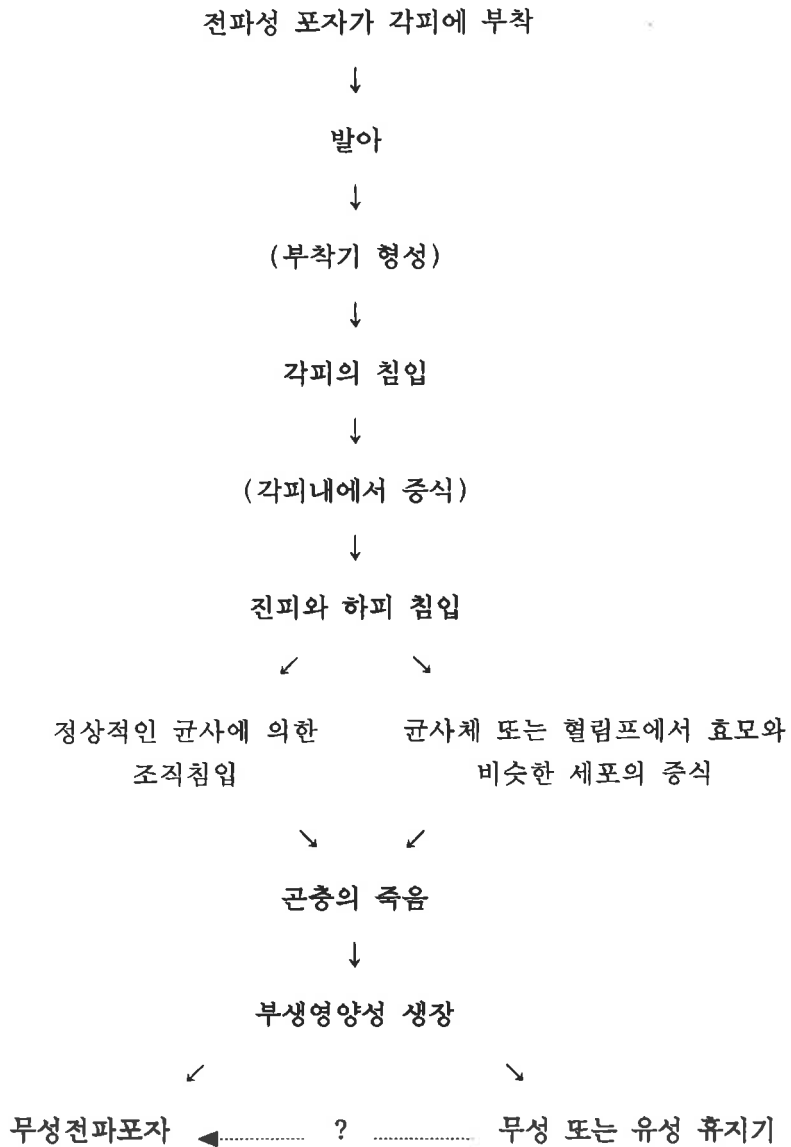


Fig. 16. 곤충병원성 균류의 일반적 감염 회로 : 일어나지 않을 수 있는 단계는 괄호내에 표시 (Deacon, J.W., 1997, Modern Mycology, Blackwell Science Ltd. pp. 265)

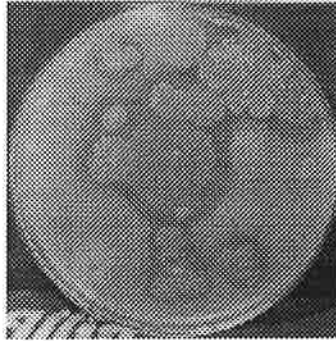


### 3-3. 미생물적 감염치사원인 규명을 위한 곤충각피 분해 효소의 활성 검색

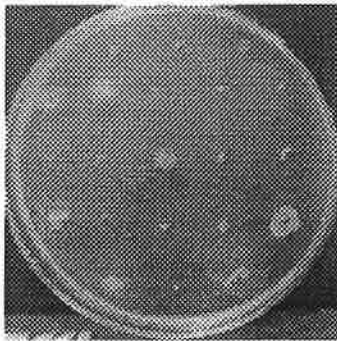
솔껍질각지벌레 병원균이 생산하는 곤충각피관통관련효소(cuticle-degrading enzymes)인 protease, lipase 및 chitinase의 활성을 검색하였다. Protease 활성은 Skim Milk Agar 배지를, Lipase 활성은 Sierra 배지를, Chitinase 활성은 Chitin Agar 배지를 이용하였다. 이들 배지에 곤충병원성 미생물을 접종하여 protease 및 chitinase는 배지상에 나타나는 투명환(clear zone)을, lipase는 집락주위에 나타나는 침전물 생성 여부를 확인하여 효소활성유무를 판단하였다.

Fig. 17에 나타낸 바와 같이 솔껍질각지벌레 병원 사상균인 *Syncephalastrum racemosum*은 상기의 곤충 각피 분해효소를 모두 생산하였다.

A



B



C

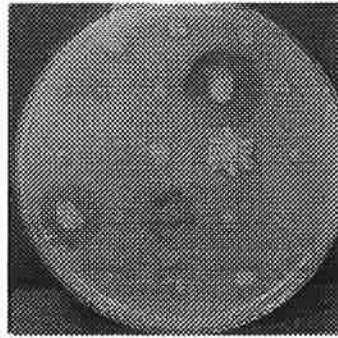


Fig. 17. Production of cuticle-degrading enzymes  
by entomopathogenic microorganisms.

A : protease, B : lipase, C : chitinase

## 제5절 참고문헌

1. Bodenheimer, F. S. and S. Neumark, 1955, The Israel Pine Matsucooccus(M.josephi), Kiryath Depher Ltd., Jerusalem, pp. 122.
2. Carruthers, R. I. and K. Hural, 1990, Fungal as naturally occurring entomopathogens In: New Directions in Biological Control: Alternatives for Suppressing Agricultural Pests and Diseases (Baker, R. R. and P. E. Dunn, eds.). 115-138, Alan R. Liss, New York.
3. Charnley, A. K, 1989, Mechanisms of fungal pathogenesis in insects, In: Biotechnology of Fungal for Improving plant Growth(eds. J. M. Whipps & R. D. Lumsden), pp. 85-125, Cambridge University Press, Cambridge.
4. Deacon, J. W, 1997, Modern Mycology, pp. 265, Blackwell Science Ltd, Malden, MA, USA.
5. Duda, E. J. 1961. Some aspects of the biology and ecology of the red pine scale, *Matsucooccus resinosae* B. and G. (Homoptera: Margarodidae), ph.D. Dissertation, Univ. of Massachusetts, Amherst, pp. 168.

6. Hajek, A. and R. J. St. Leger, 1993, Interactions between fungal pathogens and insect hosts, *Annu. Rev. Entomol.* 39, 293-322.
7. Hesseltine, C. W. and J. J. Ellis, 1973, Mucorales, In *The Fungi IVB: A Taxonomic Review with Keys: Basidiomycetes and Lower Fungi*, pp. 187-217. Academic press, New York.
8. Goettl, M. S. and G. D. Inglis, 1997, Fungi: Hyphomycetes, In *Manual of Techniques in Insect Pathology*(ed. L. Lacey), pp. 213-249, Academic Press, New York.
9. Lacey, L. 1997, *Manual of Techniques in insect Pathology*. pp. 153-249. Academic Press, New York.
10. Leathers, T. D., S. C. Gupta, and N. J. Alexander, 1993, Mycopathogens: status, challenges and potential, *J. Ind. Microbiol.* 12, 69-75.
11. Li, G., L. Zhuang, R. Han., X. Liu, R. Xia, 1980, A study on the pine stem coccid *Matsucoccus matsumurae* Kuwana, *Rep. Inst. For. Liaoning Pro.* 9, 1-27.
12. McCoy, C. W., R. A. Samson and D. G. Boucias, 1988, Entomogenous fungi, In: *Handbook of Natural Pesticides*, Vol. V, Microbial Insecticides, partA, Entomogenous Protozoa and

- Fungi(Ignoffo, C. M. and Mandava, N. B. eds), 151-236, CRC Press, Boca Raton, FL.
13. Mendel, Z. and U. Rosenberg, 1988, Trials to control *Matsucoccus josephi*(Homoptera: Margarodidae) with Fenoxycarb, *J. Econ. Entomol.* 81, 1143-1147.
  14. Qi, J. and Y. Wang, 1981, Studies on the Yunnan pine bast scale. [*Forestry Science*] 1, 20-25.
  15. Miller, D. R. and S. C. Park, 1987, A new species of *Matsucoccus*(Homoptera: Coccoidea: Margarodidae) from Korea, *Korean J. Plant Prot.* 26: 49-62.
  16. Papierok, B. and A. E. Hajek, 1997, Fungi: Entomophthorales, In *Manual of Techniques in Insect Pathology*(ed. L. Lacey), pp. 188-122, Academic press, New York.
  17. Qi, Y., M. Yang and F. Zhao, 1983, A preliminary study of the sex pheromone of the Japanese pine bast scale, *Matsucoccus matsumurae*(Kuwana), *Contr. Shanghai Inst. Entomol.* 3, 21-28.
  18. Soper, R. S. and M. G. Ward, 1981, Production, formulation and application of fungi for insect control, In: *Biological Control in Crop Production*(Papavizas, G. C., ed.), 161-180, BARC Symposium

No. 5.

19. Schvester, D., P., R. Carle, J. P. Fabre, J. Riom. 1980, *Matsucoccus feytaudi* Duc., Heteroptera, Margarodidae a dangerous scalepest of maritime pine(*Pinus pinaster* Ait.) in the western Mediterranean countries, Section 9, 16th International Congress of Entomology, Kyoto, pp. 11.
20. Thiery, I. and E. Frachon ,1997, Identification, isolation, culture and preservation of entomopathogenic bacteria, In Manual of Techniques in Insect Pathology(ed. L. Lacey) pp.55-90.
21. Young, B. and Y. Qi, 1983, Application of sex pheromone to the identification of pine bast scales. *Conts. Shanghai Inst. Entomol.* 3, 273-278.
22. Wigley, P. J. Practical(1980) : Counting micro-organisms. In Microbial control of pests(eds J. Kalmakoff & J.F. Longworth), pp. 29. New Zealand Department of Science and Industrial Research, Bulletin 228. Wellington, New Zealand.
23. 岡田齊夫, 1994, 微生物的防除 の 現狀 と 展望, *植物防疫*, 48, 449-454.
24. 宇田川俊一, 椿啓介, 堀江義一, 三浦宏一郎, 箕浦久兵衛, 山崎幹夫, 横山 龍夫, 渡邊昌平, 1978, 菌類図鑑(上). pp. 303-304, 講談社,

東京.

25. 神田重夫, 1941. 朝鮮産介殼蟲考察(其の1), *昆蟲世界* 45, 296-303.
26. 蒲鰲龍, 李增智, 1996. *昆蟲真菌學*, 安徽科學技術出版社, 中國.
27. 青木襄兒, 1983. *昆蟲寄生菌類, 菌類研究法*(青島清雄, 椿啓介, 三浦宏一郎編), pp. 259-263, 共立出版(株).
28. 강석근, 1997. *솔잎혹파리방제를 위한 유효병원미생물 탐색 및 배양기술체계의 개발*, 과학기술처 연구보고서, pp. 1-68.
29. 김규진, 임봉기, 1986. *솔껍질각지벌레의 생태 및 피해에 관한 연구*, 전남대는문집31, 1-11.
30. 김규진, 오광인, 1992. *한국서해안지대의 해송림에 만연된 솔껍질각지벌레(Matsucoccus thunvergiana)의 생태, 기주범위 및 피해해석에 관한 연구 (I)*, 한국응용곤충학회지31(4), 386-395.
31. 박승찬, 1991. *솔껍질각지벌레류의 지리적 분포, 생태, 피해 및 방제연구*, 한국임학회지, 80(3), 326-349.
32. 박승찬, 박남창, 1985. *솔껍질각지벌레의 생활사 및 여름휴면현상*, 임업시험장 연구보고 32, 11-16.
33. 박승찬, 김종국, 박남창, 1984. *솔껍질각지벌레생태 및 방제에 관한*

연구, 임업시험장연구보고서, 1227-1252.

34. 박승찬, 1986, 솔껍질깍지벌레상태 및 방제에 관한 연구, 임업시험장 시험연구보고서(3), 105-122.
35. 복성해, 1993, 미생물을 이용한 병충해 방제산업의 현황과 전망, 한국 산업미생물학회20년사, pp. 268-281.
36. 이상길, 1998, 솔잎혹파리 및 솔껍질깍지벌레 방제를 위한 식물체유래 생리활성성분의 분리 및 이용, 서울대학교 박사학위논문 pp. 1-112.
37. 임대준, 박범석, 최귀문, 강석권, David K. Reed, 1989, 담배거세미나방 핵다각체바이러스 분리 및 형태적 관찰, 한국곤충학회지 19(1), 69~77.
38. 최광식, 이상길, 김종국, 박지두, 1995, 솔껍질깍지벌레의 생물적방제에 있어서 무당벌레의 역할, 산림과학논문집, 51, 115-118.
39. 최광식, 이상길, 신상철, 1997, 솔껍질깍지벌레(*Matsucoccus thunbergianae*) 항공방제용 저독성 약제선발, 산림과학논문집56, 82-86.



## 제3장 솔껍질깍지벌레의 유약 호르몬

### 에스테르 가수분해효소(JHE)유전자 연구

#### 제1절 연구개발목표

솔껍질깍지벌레의 성장, 탈피(molting)와 변태(morphogenesis)에 관여하는 곤충유약호르몬 에스테르 가수분해효소(Juvenile hormone esterase, JHE)를 암호하는 cDNA를 클로닝 하여 JHE를 baculovirus에서 발현 한 후 JHE가 솔껍질깍지벌레의 성장에 미치는 영향을 조사하여 솔껍질깍지벌레의 생명공학적 방제를 위한 기초자료를 제공한다.

#### 제2절 연구방법

##### 1. JHE full length cDNA clone 클로닝

###### 1-1. Primer 제작

솔껍질깍지벌레(*Matsucoccus thunbergianae*)의 탈피호르몬 조절에 관여하는 유전자인 Juvenile Hormone Esterase(JHE)의 genomic DNA를 클로닝하기 위하여 지금까지 알려진 *Heliothis*의 JHE 유전자의 cDNA와 곤충의 각종 esterase의 sequence를 비교하여 *Heliothis* JHE 특이적 sequence 가운데 highly conserved region을 PCR primer 제작용 sequence로 선정하고 이를 바탕으로 하여 5개의 primer를 합성하였다(Table1).

Table 1. constructed primer for PCR of JHE gene

Primer	Sequence	Length
1F(forward)	5'- GGC GTG CCG CGC TCA GCG GAT -3'	21mer
2R(Reverse)	5'- CGC TCA TCT CGC TTG CCG CCA TG -3'	23mer
3F(Forward)	5'- ATA CCG CCT AAA CTG TTA TTT ATG ACT C -3'	28mer
3R(Reserve)	5'- GAG TCA TAA ATA ACA GTT TAG GCG GTA T -3'	28mer
4R(reserve)	5'- ATG TTG GCA AGA AAT TAC TTT AGT AAC C -3'	28mer

Table 2. *Heliothis virescens* juvenile hormone esterase precursor (JHE) mRNA amino acid sequence상의 conserved region 1, 2, 3

```

translation="MTSHVLALAFLLHACTALAWQETNSRSVVAHLDSGIIIRGVPRSA
DGIK FASFLGVPYAKQPVGELRKELEPLEPWDN|LNATNEGPICFQTDVLYGRLMAA
conserved region1
SEMSEACIYANIHPVWQSLPRVRGTTPLRP|LVEIHGGGF AFGSGHEDLHGPEYLVTK
conserved region2
NVI VITFNRYRLNVFGFLSMNTNI|PGNAGLRDQVTLRWVQRNAKNFGGDPSDITIAQ
QSAGASAAHLLTSLKATEGLFKRAI|MSGTGMSYFFTTSP LFAAYI SKQLLQILG I NE
conserved region3
TDPEE|HRQL|DLPAEKLNEANAVL|EQ|GLTTFVPIVESPLPGVTTI|DDDPE|L|A
EGRGKN|PLL|GFTSSECETFRNRLLNFDLVKKIQDNPTI|PPKLLFMTPELLMEL
AKT|ERKYNGT|S|DNFVKSCSDGFYEYPALKLAQKRAETGGAPLYLYRFAYEGQNS
I|KKVMGLNYEGVGH|EDLTYVFKVNSMSDALHASPSENDVKMKNLMTGYFLNFIKCS
QPTCEDNNSLEVWPANNGMQYED|VSPTI|RSKEFASRQQDI|EFFDSLSSRSPL
    
```

## 1-2. 시료 채취

4월에서 5월에 걸쳐 솔껍질깍지벌레의 피해를 받고있는 전북 고창군 일대와 전남 영광군 일대를 직접 방문하여 피해 소나무 40여 주를 현지에서 벌채한 다음 성충과 유충을 채취한 다음 불순물을 제거하기 위하여 원심분리 하였다.

## 1-3. 솔껍질깍지벌레 유충에서 genomic DNA 분리 방법

- 1) 차가운 1X SSC 완충액(0.15M NaCl, 15mM sodium citrate(pH7.0))으로 여러 번 세척 후 액체질소로 급속 동결하여 사용시까지 -80℃에 냉동 보관하였다.
- 2) 시료 무게의 2.5배의 DNA 추출 완충액(0.5% SDS, 5mM EDTA, 20mM Tris-HCl(pH7.5), 0.1M NaCl, 10ug/ml proteinase K)를 첨가 후 막자 사발을 이용하여 마쇄하여 37℃에서 15분간 반응시켰다.
- 3) 2ml의 1M Tris-HCl(pH7.5)와 3ml의 phenol을 가하여 천천히 혼합후 저온 원심분리(5,000rpm, 5℃) 후 상등액을 새 튜브로 옮겼다.
- 4) Phenol/Chloroform 1:1 희석액을 동량이 되게 2회 처리하겠다.
- 5) 3배의 salted ethanol(2% Potassium acetate, 98% ethanol)을 첨가하여 DNA를 침전시켰다.
- 6) 침전된 DNA를 유리봉으로 모아 TE완충액에 녹인 후 다시 3배의 salted ethanol을 가하여 DNA를 침전시키고, 70% ethanol에 washing 한 후 건조시켜 1ml의 TE 완충액을 가하여 녹였다.
- 7) 10ug/ml가 되도록 RNaseA를 처리한 후 37℃에서 2시간 동안 반응시켜 RNA를 제거 한 후, RNaseA의 활성을 없애기 위하여 phenol/chloroform(1:1)용액을 2회 처리한 후 salted ethanol로 DNA를 침전시켰다.

8) 침전된 DNA를 70% ethanol로 washing 후 건조시켜 TE용액으로 녹였다.

#### 1-4. PCR 반응

Genomic DNA의 농도를 OD<sub>260</sub>에서 측정하여 농도를 결정한 다음 이를 10ug/ml 되도록 농도를 조정 한 후 중합효소 Taq DNA Polymerase(BIONEER의 AccuPower™) PCR Premix를 사용하여 PCR을 수행하였다. Premix의 구성은 1 unit의 Taq DNA Polymerase, 250uM의 each dNTP, 10mM Tris-HCl(pH9.0), 40mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, Stabilizer and tracking dye이다. 또한 PCR 반응 온도는 변성 94℃, 합성반응 74℃을 사용하였고 annealing은 45℃로 출발하여 5℃씩 올리면서 반복 실험하여 최적조건이 60℃임을 확인하였다. 반응조건은 PCR premix(20ul용)에 DNA template 10ug/ml 5ul, Primer 10pM 1ul 그리고 deionized water 17ul를 첨가하여 94℃에서 10분, (94℃에서 1분, 60℃에서 1분, 74℃에서 1분) X 35회, 74℃에서 10분간의 순서로 MR research사( 모델명 : PTC-2000) PCR Machine을 사용하여 수행하였다.

#### 1-5. PCR 산물의 확인 및 형질 전환

PCR 산물의 확인을 1% agarose gel 전기영동으로 수행하였다. PCR 산물(500-700bp)을 pGEM-Teasy vector kit(PROMEGA Co.)와 3:1 비율로 혼합한 다음 16℃에서 하루 밤동안 반응 시킨 후 *E. Coli* XL1-Blue(STRATAGENE Co.) competent cell 에 도입한 다음 LB agar plate에 ampicilline(50ug/ml)과 IPTG(100mM) 및 X-gal(100ug/ml)이 포함된 선별 배지에 도말하여 자란 white colony를 선발하였다.

### 1-6. Plasmid DNA 분리 및 inserted DNA의 확인

선발된 white colony들을 LB+AP broth에서 배양한 다음 QIAGEN 회사의 plasmid prep kit를 사용하여 plasmid DNA를 분리하였고 insert 확인은 제한효소 *EcoRI*로 절단한 다음 0.7% agarose gel 전기영동을 통하여 수행하였다.

### 1-7. DNA염기서열 분석

형질전환체의 insert DNA 염기서열을 분석하기 위하여 SP6와 T7 phage primer를 사용하여 dideoxy chain termination 반응을 한 다음 automatic DNA sequencer를 이용 염기서열을 분석하였다.

## 2. Baculovirus에서 JHE 유전자의 발현

### 2-1. 시료채취

전남 영광군과 전북 고창군일대의 솔껍질 깍지벌레 피해목을 벌목하여 실험실로 운반한 다음 껍질층내부에서 활동하고 있는 솔껍질 깍지벌레를 forcep으로 채집하고 현미경으로 관찰하여 껍질벌레로 확인된 곤충들만 채집하였다.

### 2-2. mRNA의 분리

솔껍질 깍지벌레의 total RNA를 분리하기 위하여 생리 식염수로 시료들을 세척한 다음 Clontech사의 mRNA 분리 kit를 이용하여 RNA를 분리하였다.

### 2-3. cDNA library 제작 및 RT-PCR

정제된 mRNA를 Promega Co.사의 cDNA library kit를 이용하여 library를 제작하였고, 또한 직접 mRNA로부터 RT-PCR을 수행하여 cDNA clone을 얻었다.

#### 2-4. Full-length clone 선발

이미 cloning되어 nucleotide sequence를 알고있는 clone No.1의 5'과 3'의 역방향의 complementary sequence를 합성하여 5'과 3'-expanding PCR을 수행하였다.

#### 2-5. Cell과 virus

본 실험에 사용한 세포는 *Spodoptera frugiperda*(*Lepidoptera*) IPLB-SF9 cell을 TC-100 배지(GIBCO Laboratories)에 10% fetal bovine serum이 첨가된 배지에서 배양하며 사용하였다.

#### 2-6. recombinant plasmid 작성과 발현

JHE cDNA 유전자를 갖는 재조합 plasmid와 virus 작제는 Invitrogen사의 Bac-N-Blue-DNA kit을 이용하여 수행하였다. JHE 발현을 SF9 cells에 0.5 p.f.u/cell 가 되도록 recombinant virus를 감염하여 4일간 배양한 배양액의 crude extract를 얻어 SDS-PAGE 전기영동으로 유전자 발현 여부검색 실험을 수행하였다.

## 제3절 연구결과 및 고찰

### 1. 솔껍질각지벌레(*Matsucoccus thunbergianae*)의 mRNA 분리 및 RT-PCR

솔껍질각지벌레의 mRNA를 정제 kit를 이용하여 분리 정제한 후 reverse transcriptase를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 전기영동으로 확인한 후(Fig. 1) 작제된 primer로 PCR을 수행하였다. PCR을 수행한 결과 JHE 특이적 unique band가 나타나지 않고 많은 수의 multi-band가 나타났다. 이러한 결과는 PCR에 사용된 primer가 *Heliothis* 특이적 sequence이기 때문인 것으로 사료된다(Fig. 2).

### 2. JHE 유전자의 genomic DNA의 클로닝

JHE 유전자의 genomic DNA를 클로닝하기 위하여 솔껍질각지벌레(*Matsucoccus thunbergianae*)의 genomic DNA를 분리정제하고 이를 template로 사용하여 앞에서 사용되었던 primer를 이용 PCR을 수행하였다.

6개의 조합으로 PCR을 수행한 결과 primer로 1F-4R과 1F-3R 및 3F-4R를 사용한 PCR에서 500bp에서 700bp 크기의 product를 얻었다.(Fig.3, Fig.4) 이 단편들을 PROMEGA Co.의 pGEM-Teasy vector에 ligation 한 후 STRATAGENE 회사의 *E. coli* XL1-Blue competent cell에 도입한 후 LB에 ampicilline(10ug/ml)과 IPTG(100mM) 및 X-gal(100ug/ml)이 포함된 배지에 도말하여 자란 white colony들을 형질 전환체로 선별하였다. Primer로 1F와 4R을 사용한 PCR product에서 3개, 1F와 3R을 사용한 product에서 2개의 recombinant를 선별하였다.

이들 형질 전환체들을 배양한 후 recombinant plasmid DNA를 분리 정제한

후(Fig.5) inserted DNA를 확인하기 위하여 *EcoRI*III 제한효소로 절단한 후 전기영동을 통하여 확인한 결과 Fig.6에서 보듯이 5개의 clone중 4개의 clone에서 inserted DNA가 확인되었다. 이 clone들을 각각 JHE1-1, JHE1-2, JHE1-3, JHE3이라 명명하였다.

1 2

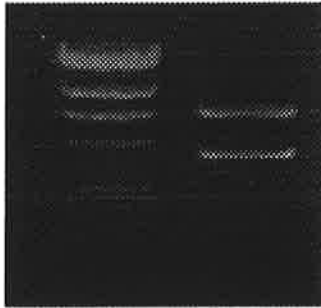


Fig. 1. Electrophoresis patterns of synthesized cDNA.

Lane 1.  $\lambda$  Phage- HindIII size marker

Lane 2. RT-PCR product

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

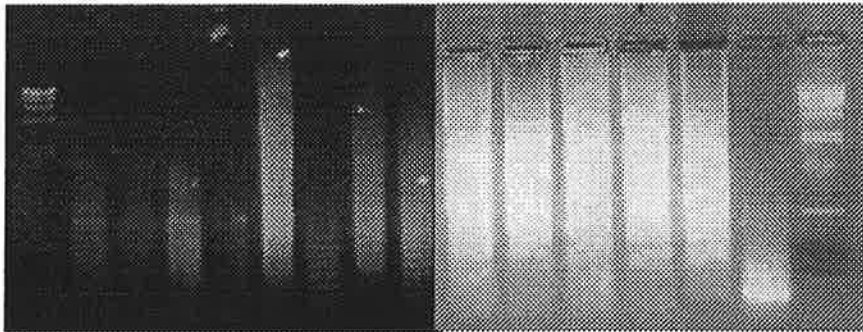


Fig. 2. Electrophoresis patterns of PCR product.

Lane 1 and 16  $\lambda$  Phage- HindIII size marker

Lane 2 to 15 PCR product



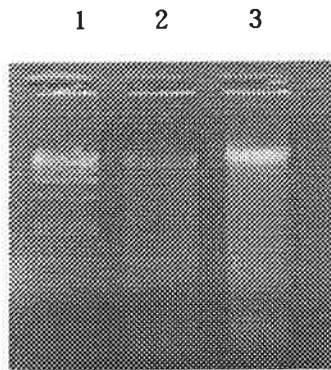


Fig. 3. The electrophoresis patterns of genomic DNA of *Matsuococcus thunbergiana*.

Lane 1 :  $\lambda$  Phage- HindIII size marker

Lane 2 and 3 : genomic DNA of *Matsuococcus thunbergiana*

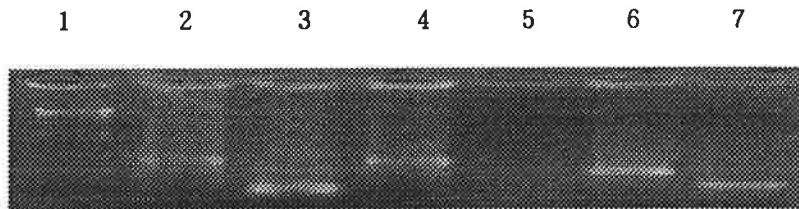


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis patterns of PCR product.

Lane 1 :  $\lambda$  Phage- HindIII size marker

Lane 2 : Primer 1F and Primer 4R를 long band(JHE1)

Lane 3 : Primer 1F and primer 4R를 short band(JHE2)

Lane 4 : Primer 1F and primer 3R을 band(JHE3)

Lane 5 : Blank

Lane 6 : Primer 3F and primer 4R를 long band(JHE5)

Lane 7 : Primer 3F and primer 4R를 short band(JHE6)

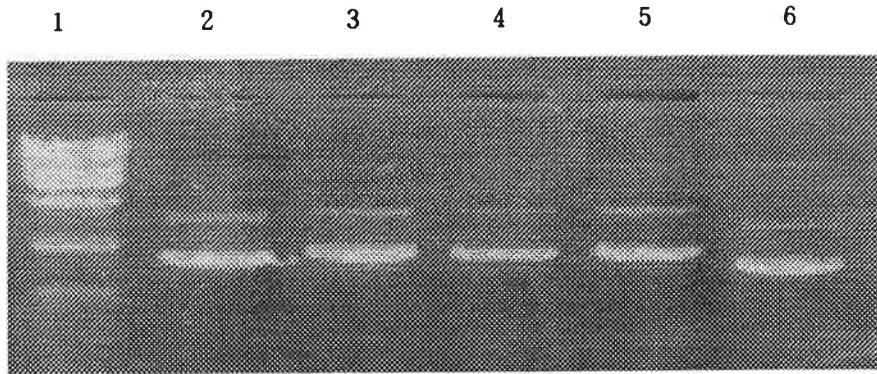


Fig. 5. Agarose gel electrophoresis patterns of transformants.

- Lane 1 :  $\lambda$  phage-HindIII digested size marker
- Lane 2 : Clone of inserted JHE1(JHE1-1)
- Lane 3 : Clone of inserted JHE1(JHE1-2)
- Lane 4 : Clone of inserted JHE1(JHE1-3)
- Lane 5 : Clone of inserted JHE3(JHE3-1)
- Lane 6 : Clone of inserted JHE3(JHE3-2)

1                      2                      3                      4                      5

### 3. Genomic DNA sequence 분석 및 특징

Recombinant DNA의 염기서열을 분석하기 위하여 DNA를 정제한 후 Sanger 등의 dideoxynucleotide chain termination 반응을 수행한 후 automatic DNA sequencer(PERKIN ELMER Co.)를 사용하여 reading 하였다.

Clone1은 762bp로 구성되었고 이 nucleotide sequence를 NCBI의 BLAST program을 이용하여 nucleotide sequence homology를 비교하여 본 결과 *Heliothis virescens*의 juvenile hormone esterase의 cDNA sequence와 약 45.8% homology를 보였고 Colorado potato beetle의 JHE 유전자의 sequence와 약 45%의 homology를 보였다. 각지벌레의 Juvenile hormone esterase에 관한 연구는 거의 전무한 상태이고 단지 곤충에서 나비목(Lipoptera)에 속하는 tobacco burdworm(*Heliothis virescens*)와

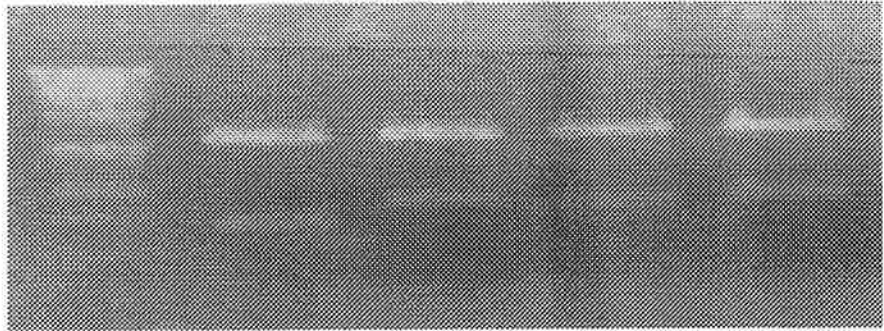


Fig. 6. Agarose gel electrophoresis patterns of digested recombinant DNA.

- Lane 1  $\lambda$  phage-HindIII digested size marker
- Lane 2 Clone JHE1-1 digested with *EcoR*III
- Lane 3 Clone JHE1-2 digested with *EcoR*III
- Lane 4 Clone JHE1-3 digested with *EcoR*III
- Lane 5 Clone JHE3-1 digested with *EcoR*III

Colorado potato beetle(*Trichoplusia ni*), Cabbage looper 등에서만이 현재까지 알려져 있다. JHE 유전자의 homology는 곤충에 따라서 크게 차이가 난다. 즉 나비목에 속하는 *Heliothis*와 Cabbage looper의 상동성은 각각 45%와 47%이었다. 이러한 결과로 clone1은 솔껍질깍지벌레의 putative JHE 유전자로 사료된다.

한편, putative clone1은 genomic DNA이기 때문에 intron도 포함될 수 있기 때문에 homology가 낮은 것으로 생각된다. (Fig.9, Fig.10 )

Putative clone1은 *Heliothis virescens*의 127번 nucleotide부터 728 nucleotide까지 homology가 있는 것으로 보아 이 유전자는 JHE gene의 upstream 부위로 사료되며 현재 full length clone을 3'-과 5'-extending 방법으로 찾고 있는 중이다. 한편 putative clone3은 염기서열 440bp로 구성되어있고 염기서열은 human과 *E. coli*의 valyl-tRNA

synthetase(Valyl-tRNA ligase)와 50% homology를 보여주고 있다. 아미노산 상동성이 *E. coli*의 valyl-tRNA synthetase 유전자와 71%의 상동성이 보였다(Fig. 11)

```

T7 (5') 1- GCGGTGCCGC GCTCAGCGCA TCGCGTGGAC ATGGGCCTCG TCCACCGGCT - 50
SP6(3') 1- CCGCACGGCC CGAGTCGCCT AGCGCACCTG TACCCGGAGC AGTGGGCCGA - 50
T7      51- TCGCCGACGC CTCGGCTATC CGGACCATGA GAAGAAGGTT GCCGCTGGCA -100
SP6     51- AGCGGCTGGC GAGCCGATAG GCCTGGTACT CTTCTTCAA CGGCGACCGT -100
T7     101- AGTGGGTGCA GTCCCGGTT GAATGCGCG AGCACATAGG TCTGCGCGTC -150
SP6    101- TCAGCCAGT CAGGGCCCAA CTTACGCGC TGCTCTATCC AGACGCGCAG -150
T7     151- GAGCCCGGCG CGGAGCGGCG AGCGGGCTAG GTCCACGTCG TCGGGCGTGA -200
SP6    151- CTCGGGCGCG GCCTCGCCGC TCGCCCGATC CAGGTGCAGC AGCCCGCACT -200
T7     201- AGATCAGGCG GTCGGGCGTC ATGCGCGCAA CCAAACGCGG CCGGACGCGA -250
SP6    201- TCTAGTCCGC CAGCCCGCAG TACGCGCGTT GGTTCGCGC GCGCTGCGCT -250
T7     251- TTGACCCGA CACCGTATCG TGGCTTGCGC CGGCGACAAG GCGCGGAAT -300
SP6    251- AACCTGGGCT GTGGCATAGC ACCHAACGCG GCGCTGTTC CCGGCCCTTA -300
T7     301- AGCTGCGCAG CGGGGTGCGC CTCGACAGGA GTATCATCAT GGCCAAGGCA -350
SP6    301- TCGACGCGTC GCCCCACGCG GAGCTGTCC CATAGTAGTA CCGTTCCGT -350
T7     351- GCGCACCCG AGGOGAAGGA CGGCGCGCCC AAGAAGACCG ACGGCATCCA -400
SP6    351- CGCGTGGGC TCCGCTTCTT CCGCGCGGG TTCAACAGGC TGCCGTAGGT -400
T7     401- CAAGCCCGTA ACGCCCTCCG CCGAGCTCGC CGCTGTCGTG GCGAGGGCG -450
SP6    401- GTTCGGGCAT TGCGGGAGGC GGCTCGAGCG GCGACAGCAC CCGCTCCGCG -450
T7     451- CCATGCCCG CAGCGAGATC ATCAGCACGC TGTGGGAATA CATCAAGACC -500
SP6    451- GGTAACGGGC GTCGCTCTAG TAGTCGTGCG ACACCCATTAT GTAGTTCTGG -500
T7     501- AACAACTCG AGGACGTGAA GGACAAGCGA CAGATCAACG CCGATGCCAA -550
SP6    501- TTGTTGACG TCCTGCACTT CCTGTTGCT GTCTAGTTGC GGCTACGGTT -550
T7     551- GCTGGAGAAG ATCTTCGGCA AGAAGAGCGT CACCATGTT CAGATGAACA -600
SP6    551- CGACCTCTT TAGAAGCCGT TCTTCTCGCA GTGGTACAAG CTCTACTTGT -600
T7     601- AGCACGTTTC CGGCCACGTT AAGTAGTCG AAGGCAGCTT GATCCAGCGG -650
SP6    601- TCGTGCAAAG GCCGGTGCAA TTCATCAGCG TTCCGTCGAA CTAGGTCGCC -650
T7     651- CGGGCGGGCC ACGGCGCCGG GCGCGACGGC GCTTGCATC GCCATGCGGC -700
SP6    651- GCCCGCCCGG TGCCCGGCC CGCGCTGCC CGAACGCTAG CCGTACCGCG -700
T7     701- GAATCCCCT TGAATCCCGC GATCGGTAAG CACTACTTAC ATATCGCTGA-750
SP6    701- CTTAGGGGGA ACTTAGGGCG CTAGCCATTC GTGATGAATG ATAGCGACT-750
T7     751- GCGCGGCACG CC(3') -762
SP6    751- GCGCGGTC CG(5') -762

```

Fig. 7. Partial sequence of the JHE1 started from T7(5'→3') primer and SP6(3'→5') primer.

```

1  GCGTGCCGC GCTCAGCGGA TAGTCGACGT AGTACAGCGT GTCGGTGACG 50
   CCGCACGGCG CGAGTGCCT ATCAGCTGCA TCATGTCTGA CAGCCACTGC
51  OGGGTGGACT CCACCTCGAG GTCTGAGATC GCGCTGCCGC TGCCCGGATC 10
   GCCCACCTGA GGTGGAGCTC CAGACTCTAG CGCGACGGCG ACGGGCCTAG
101 CCAGTTGACC ATGTAGCGAT CGCGGTAGAT GTAGCCCTTC TCATACAGGG 150
   GGTCAACTGG TACATCGCTA GCGCCATCTA CATCGGGAAG AGTATGTCCC
151 CGACGAACAC CTCGAGCACC ACTCGGGCGT AGGCGTCGTC CAGCGTGAAG 200
   GCTGCTTGTG GAGCTCGTGG TGAGCCCGCA TCCGCAGCAG GTCGCACCTC
201 OGCTCGCCGA CGTAGTCCGC GCTCGCGCCC AGGCGCTTGA GCTGGGAGAT 250
   GCGAGCGGCT GCATCAGGCG CGAGCGCGGG TCCGCGAACT CGACCCTCTA
251 CATCGTGCCG CCGTACTGGG CGCGCCATTC CCAGACCCGC TCCAOGAACC 300
   GTAGCAGGGC GGCATGACCC GCGCGGTAAG GGTCTGGGCG AGGTGCTTGG
301 OCTCGCGGCC GATCTGCCTG CGGCCCGAGC CTTCTCGAC GAGCOGGCGC 350
   GGAGCGCCGG CTAGACGGAC GCCGGGCTCG GAAGGAGCTG CTCGGCCGCG
351 TCGACAAGCG TCTGCGTCGC GATCCCGCG TGATCGGTGC CGAGGATCCA 400
   AGCTGTTGCG AGACGCAGCG CTAGGGGCGC ACTAGCCACG GCTCCTAGGT
401 CTTGCGCGGG CGGCCCGCA TCCGCTGAGC GCGGCAGGCC -3' 441
   GAAGCGCGCC GCCGGGCGT AGGCGACTCG CGCCGTGCGG -5'

```

Fig. 8. Partial sequence of the JHE3 started from T7(5'→3') and SP6(3'→5') primer.



No.	Target File	Definition	Match	Over.	INIT	DPT		
3	HEL107-2.TXT		43.8	624	84	246		
1-1JHE77	.TXT	GGCGTGGCGGCTCAGCGGATGGGTTGGGATGGGCTTCTCCACCGCTTCCGCGACGC	10	20	30	40	50	60
HEL107-1	.TXT	GGCGTGGCGGCTCAGCGGATGGGTTGGGATGGGCTTCCACCGCTTCCGCGACGC	130	140	150	160	170	180
1-1JHE77	.TXT	CTCGGCTATCCCGA CCAATGAGAAAGGTTCCCTGCAAGTCGGTTCAGTCCCGGTT	70	80	90	100	110	120
HEL107-1	.TXT	CTAAGCAGCCGTGTGGAGAACTCAGGTTAAGGAGCTCGAGCTCTAGATCTTGGGAT	190	200	210	220	230	240
1-1JHE77	.TXT	GA-ATGGCGGAGC-ACTAGGCTG-CGGCTGAGCCGCGCGGAGCGGCGGAGCGGCG	130	140	150	160	170	
HEL107-1	.TXT	AATATCTTGAAGCAACAAATGAAGGACCACTCTGCTCCAAACAGATGATTATACGG	250	260	270	280	290	300
1-1JHE77	.TXT	TAGCTTCAAGTCTCGGGCTGAAGATC-AAG-----CGGTGGCGGCTCATCGCGG	180	190	200	210	220	
HEL107-1	.TXT	GALGCTCATGGCGCAAGCGAGTGAAGGAGCTTGCATYACGCCAATCTATGTTCC	230	240	250	260	270	280
1-1JHE77	.TXT	CAACCAAGCGCGCGGAGCGGATTTGACCGACCTATCTGGGCTTCCGCGCGGAC	230	240	250	260	270	280
HEL107-1	.TXT	ATCGCAAGCTTCCCGAGTGGGGGAC-ACACCTTACG--GCTATCTGGGCTT	370	380	390	400	410	420
1-1JHE77	.TXT	AAGCGCGGGAATAGCTGCGCAGCGGGTCTCCCTCGACAGGATATCATCATGCGCAA	290	300	310	320	330	340
HEL107-1	.TXT	CATACATGGTGGAGATTTGCTTTCGGCT---CCGCCACGAGGACTACACGAGCACG	470	480	490	500	510	520
1-1JHE77	.TXT	GGCAGCGGCACTCCAGCGGAGGACGGCGCGCCCAAGAACCGACCGGATCCAAAGCC	350	360	370	380	390	400
HEL107-1	.TXT	AATAATTGGTCACTA-AGAATGTCTCTCATCAGGTTAATTACAGATGAAGCTCTT	480	490	500	510	520	530
1-1JHE77	.TXT	CGTAACCCCTCCGCGAGCTCACCCTGCTGTGGGCGAGGCGCCATCCCGCGAGCGA	420	430	440	450	460	470
HEL107-1	.TXT	CGGTTCTCTGTCATGAACACAAATATCCCCGCAATGCC--GCTCCGAGATC-A	540	550	560	570	580	
1-1JHE77	.TXT	GATCATAGGACCTGTGGGAATCATCAAGCAACAACTTCAAGGACGTGAAGGACAA	470	480	490	500	510	520
HEL107-1	.TXT	GGTAACCTGTTGCTGGGCGCAAGGACCTCAAGAA--TTTCGGA-AGGACCCCA	590	600	610	620	630	640
1-1JHE77	.TXT	CGGACAGATCAACCGGATGCCAAGCTGGAGAGATCTTCGGCAAGAGGCTCACCAT	530	540	550	560	570	580
HEL107-1	.TXT	CGGACATCACTATAGCGGGCGAGCGCTGTGATCAAGCGGATCTATGAC-CTT	650	660	670	680	690	700
1-1JHE77	.TXT	GTTCCAGATGAACAAACAGGTTCCGGCCACGTTAAGTATCGCAAGGACCTTGTATCA	590	600	610	620	630	640
HEL107-1	.TXT	TCTAAGCTACTGAAGGCTTTTCAAAAAGCGATCTGTATGAGCGAAGAGGAGTGAAG	720	730	740	750	760	
1-1JHE77	.TXT	CGGCGGGCGGCGACGGCGGGGCAAGCGGYSNITGCHATGCTATCGGGGAATCCCC	650	660	670	680	690	700
HEL107-1	.TXT	TACTTCTTACTACTCTCCACTTTTCCGGGCTACATTTCTAAGCAGTTGTTGCAATC	770	780	790	800	810	820
1-1JHE77	.TXT	TTGANTCCGATCGCT	710	720				
HEL107-1	.TXT	CTGGCATCAAGGAC	830	840				

Fig. 10. Compare of nucleotide sequence of Helioyhis JHE and putative JHE1 Clone1.

```

pir||SYECVT valine--tRNA ligase (EC 6.1.1.9) - Escherichia coli
>gi|43302|emb|CAA29322| (X05891) valyl-tRNA synthetase
[Escherichia coli]
Length = 951

Score = 155 bits (389), Expect = 1e-37
Identities = 71/141 (50%), Positives = 102/141 (71%), Gaps = 1/141 (0%)
Frame = -2

Query: 433 RAQRMRGRRAKWILGTDHAGIATQTLVERRLV-EEGSGRRQIGREGFVERVWEWRAQYGG
257
      R QRM+G+  W +GTDHAGIATQ +VER++ EEG R  GRE F++++WEW+A+ GG
Sbjct: 64  RYQRMQGKNTLWQVGTDHAGIATQMVVERKIAAEEGKTRHDYGREAFIDKIWEWKAESGG
123

Query: 256 TMSQLKRLGASADYVGERFTLDDAYARVVLEVFVLYEKGYIYRDRYMVNWDPGSGSAI 77
      T+  Q++RLG S D+  ERFT+D+  + V EVFV LY++  IYR + +VNWDP  +AI
Sbjct: 124 TITROMRRLGNSVDWERERFTMDEGLSNAVKEVFVRLYKEDLIYRGKRLVNWDPKLRTAI
183

Query: 76 SDLEVESTRTDTLYYVDYPLS 11
      SDLEVE+  +++++ YPL+
Sbjct: 184 SDLEVENRESKGSMMHIRYPLA 205

```

Fig. 11. Compare of nucleotide sequence of putative clone3 and *E. coli* valyl-tRNA synthetase.



#### 4. Baculovirus에서 JHE 유전자의 발현 및 검색

##### 4-1. mRNA의 분리 및 PCR

슬깍질 각지벌레의 total RNA를 분지 정제 확인을 1% agarose gel을 이용하여 수행하였다. Fig. 12에서 나타낸바와 같이 슬깍질 각지벌레의 total RNA는 28S rRNA와 mRNA의 band를 볼 수 있었다. 정제된 RNA로부터 mRNA 분리 kit를 이용하여 정제한 후 cDNA를 합성한 다음 PCR로 증폭하였다(Fig. 13.). 증폭된 DNA 길이는 4kb부터 다양한 크기의 단편들이 생성되었다.

##### 4-2. Full length JHE 유전자의 cloning

Full length JHE 유전자를 cloning하기 위하여 기보고된 JHE clone 1의 염기서열로부터 reverse방향으로 5'-TCCGCTGAGCGCGGCACGCC-3' primer와 forward방향으로 5'-GCGATCGGTAAGCACTACTTAC-3' primer를 합성하였다. JHE cDNA를 template로 하여 위의 primer들을 사용 3'-end와 5'-end expending PCR을 수행한 후 T-easy Vector(Dakara Co.)에 ligation 한후 *E. coli* XL1-Blue cell에 도입하여 선별배지에서 형질전환체를 선발하였다.

선발된 형질전환체들은 모두 약 2.1kb와 1.8kb의 insert DNA를 갖고 있었다(Fig. 14). 재조합 virus DNA 작제를 위한 DNA의 제한 효소지도를 알기 위하여 여러 종류의 제한 효소를 처리하여 제한 효소 지도를 작성하였다(Fig. 15). 제한 효소중 *Bam*H I, *Eco*R I, *Nco* I, *Kpn* I, *Xba* I, *Xho* I 등의 인식부위가 있음을 확인하였다.

##### 4-3. Recombinant DNAconstruction

위에서 insert DNA 확인된 재조합 DNA를 *Bam*H I으로 절단한 다음 이 DNA를 추출하여 Invitrogen 사의 Baculovirus Bac-N-Blue의 *Bam*H I 부위에 ligation 한 다음 *E. coli* XL1-Blue에 도입하여 선발된 형질전환체에서 insert DNA의 존재 여부를 알기 위하여 *Bam*H I으로 절단한 다음 전기 영동하였다. Fig. 16에서 보는 바와 같이 약 2.1kb의 inserted DNA를 확인하였다.

#### 4-4. JHE 유전자의 발현

재조합 recombinant virus는 제조회사의 방법에 따라서 제작한 다음 Baculovirus에서 JHE유전자의 발현을 알기 위하여 SF6 cell에 위에서 제조된 recombinant virus를 0.5PFU/cell되게 감염시킨 후 100ml의 TC-100배지에서 27°C로 4일간 배양한 다음 세포를 수확한 후 PBS buffer로 세척한 다음 7ml의 PBS buffer로 재현탁하고 ultrasonication을 수행하여 crude extract를 얻고 이를 SDS-PAGE로 확인하였다(Fig. 17). Transfectants 세포는 TC-100 배지에서 잘자라지 않아 적은량의 세포를 얻었으며 이를 crude extract를 만들어 전기영동 하였다. 전기 영동 결과 대조구에 비해서 단백질의 종류가 매우 적음을 알 수 있었다. 그러나 대조구와는 다른 단백질 band 형태를 보여 이 band가 JHE 특이적 band인지 radioisotope labelled culture system을 이용 확인하여야 할 것이다.

1                      2                      3

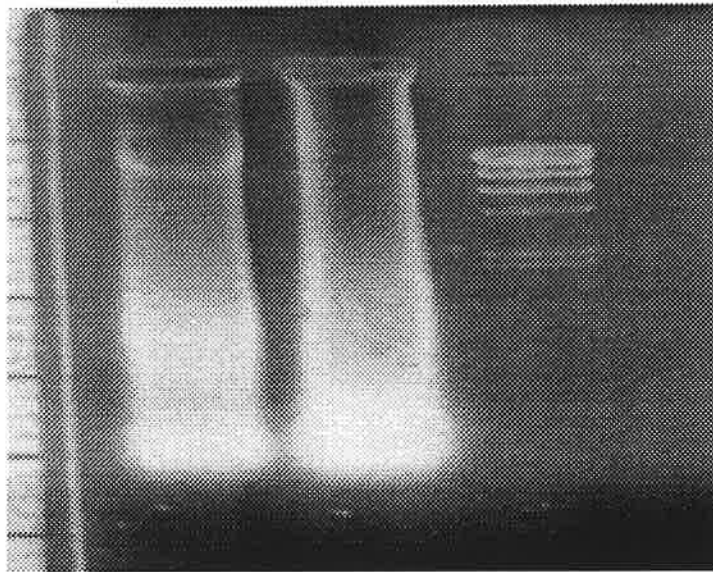


Fig. 12. Agarose gel electrophoresis patterns of Isolated total RNA

lane 1. Isolated total RNA of *M. thunbergianae*

lane 2. Isolated total RNA of *M. thunbergianae*

lane 3. Size marker DNA

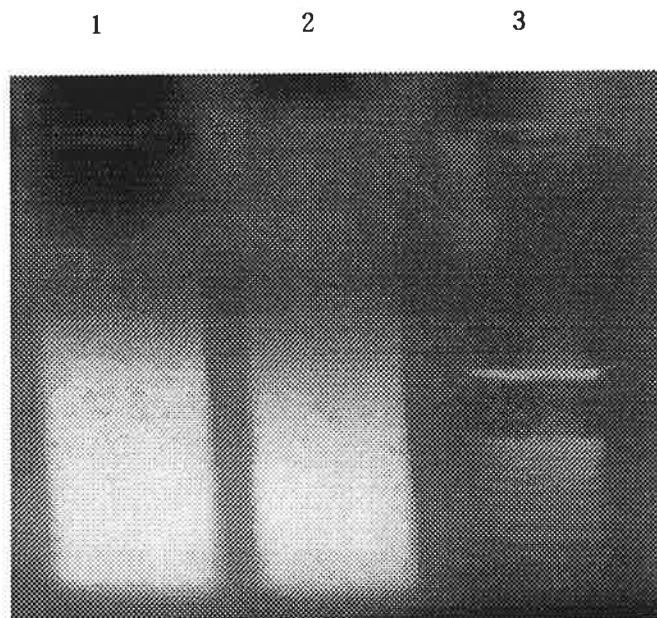


Fig. 13. Agarose gel electrophoresis patterns after RT-PCR.

lane 1. Amplified DNA of *M. thunbergiana*

lane 2. Amplified DNA of *M. thunbergiana*

lane 3. Size marker  $\lambda$  *HindIII* digested DNA

1

2

3

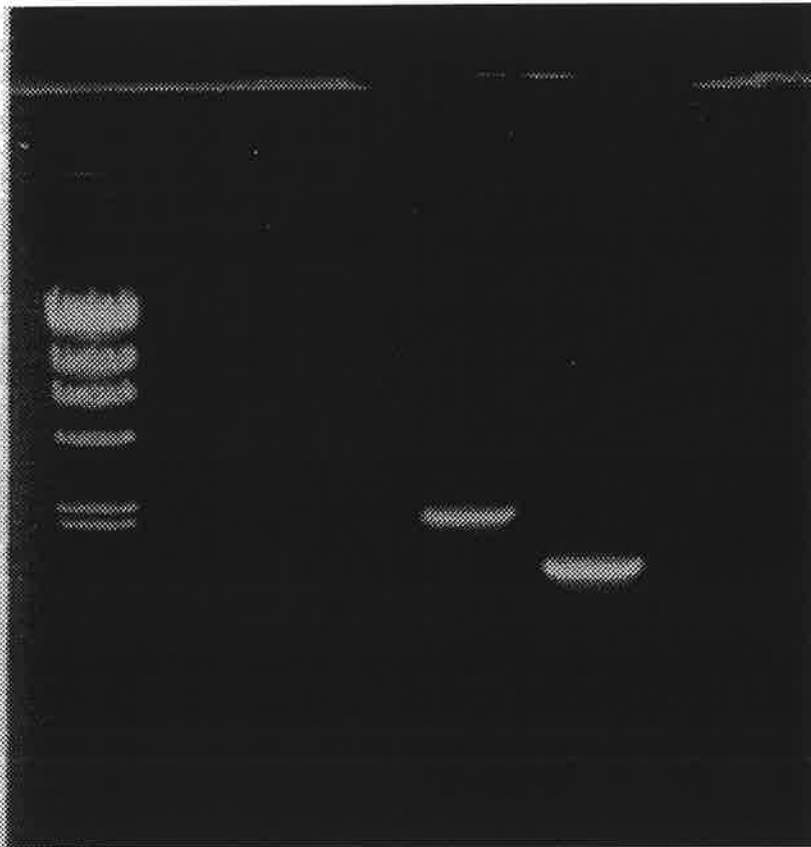


Fig. 14. Agarose gel electrophoresis patterns of full length JHE DNA.

lane 1. size marker  $\lambda$  *Hind*III digested DNA

lane 2. full length cDNA of *M. thunbergianae*

lane 3. cDNA after 5'-and 3'-end expending of *M. thunbergianae*

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

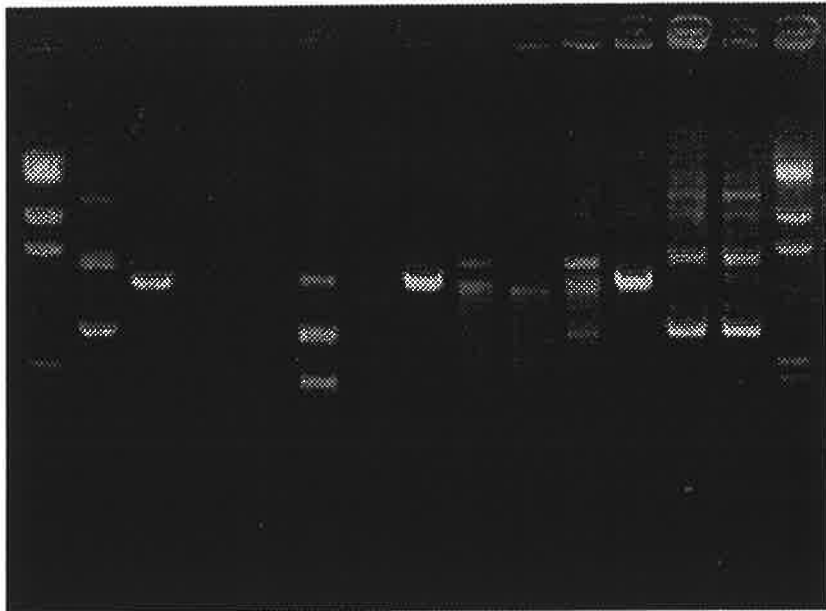


Fig. 15. Restriction Map of JHE full length cDNA.

Lane 1. size marker  $\lambda$  DNA *HindIII* digested

Lane 2. digested with *BamH I*

Lane 3. digested with *BglII*

Lane 4. digested with *Cla I*

Lane 5. digested with *Dde I*

Lane 6. digested with *EcoR I*

Lane 7. digested with *HincII*

Lane 8. digested with *HindIII*

Lane 9. digested with *Kpn I*

Lane 10. digested with *Nco I*

Lane 11. digested with *Sac I*

Lane 12. digested with *Sca I*

Lane 13. digested with *Xba I*

Lane 14. digested with *Xho I*

Lane 15. size marker  $\lambda$  DNA *HindIII* digested

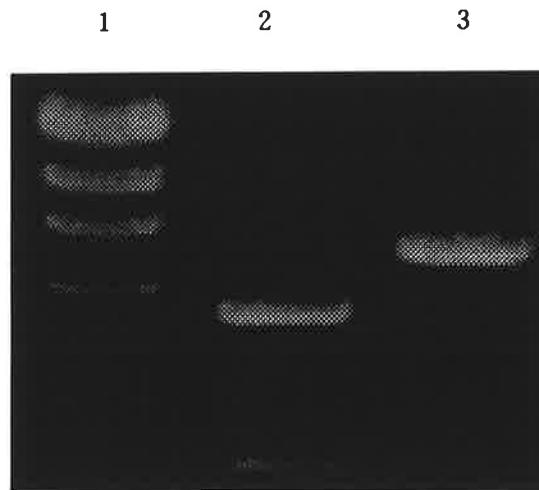


Fig. 16. Agarose gel patterns of recombinant Bac-N-Blue-JHE DNA.

lane 1. Size marker

lane 2. *Bam*H I digested recombinant DNA

lane 3. Intact recombinant DNA

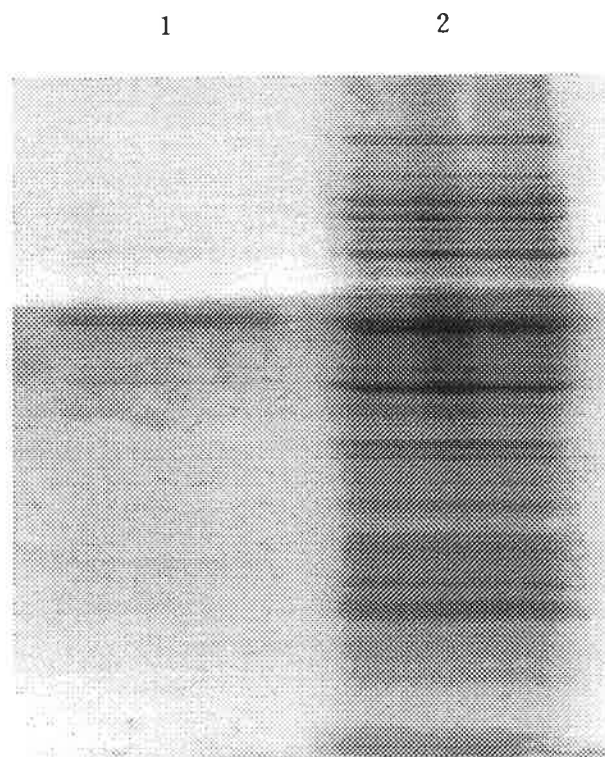


Fig. 17. SDS-PAGE gel electrophoresis patterns.

lane 1. Crude extract of Bac-N-Blue JHE recombinant cell

lane 2. Control cell crude extract

## 제4절 참고문헌

1. Bonning BC, Possee RD, Hammock BD.(1999) Insecticidal efficacy of a recombinant baculovirus expressing JHE-KK, a modified juvenile hormone esterase. *J. Invertebr. Pathol.* 73(2): 234-236.
2. Bryony C. Bonning, Tim F. Booth, and Bruce D. Hammock.(1997) Mechanistic studies of the degradation of juvenile hormone esterase in *Manduca sexta*. *Arch. Insect Biochem. phy.* 34:275-286.
3. F. Szurdoki, L. et al.(1996) Rapid assay for environmental and biological monitoring. *J. Environ. Sci. Health*, B31(3), 451-458.
4. Ganachari M., Nagaraja Javaregowda Nagaraju. (1995) Genome fingerprinting of the silkworm, *Bombyx mori*, Using random arbitrary primers. *Electrophoresis* 16,1633-1638.
5. Hanzlik, T. N., Abdel-Aal, Y. A., Harsham, L. G and Hammock, B. D.(1989) Isolation and sequencing of cDNA clone coding for juvenile hormone esterase from *Heliothis virescens*. Evidence for a catalytic mechanism for the serine carboxylesterases different from that of the serine proteases. *J. Biol. Chem.* 264(21):12419-124235.



6. J. Casas, L. G. Harshman, A. Messeguer, E. Kuwano, and B. D. Hammock(1991) In vitro metabolism of Juvenile Hormone III and Juvenile Hormone III Bisepoxide by *Drosophila melanogaster* and Mammalian Cytosolic Epoxide Hydrolase, *Arch. Insect Bioche. Biophy.* 286(1):153-158.
7. Russ Eldridge, David R. O'Reilly, Bruce D. Hammock, and Lois K. Miller(1992) Insecticidal properties of genetically engineered Baculoviruses Expressing an insect juvenile hormone esterase gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(5): 1583-1591.
8. Shelling, D. and Jones, G. (1995) Functional identification of the transcription start site and the core promoter of the juvenile hormone esterase gene in *Trichoplusia ni*, *Biochem. Biophys. Res. Commun* 214(1), 286-294.
9. Takahiro shiotsuki, Tien L. Huang, Tamon Uematsu, Bryony C. Bonning, Vernon K. Ward, and Bruce D. Hammock(1994) Juvenile hormone esterase purified by affinity chromatography with 8-Mercapto-1,1,1-trifluoro-2-octanone as a Rationally designed ligand. *Protein expression and purification* 5 : 296 - 306.

10. Vermunt ,A. M. W., Koopmanschap, A. B., Vlak, J. M. and de Kort, C.A.D.(1997), Cloning and sequence analysis of cDNA encoding a putative juvenile hormone esterase from the colorado potato beetle. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27(11), 919-928(1997).

11. 황재삼(1997) 주요 누에나방과와 산누에나방과 곤충의 RAPD 및 mtDNA의 RFLP에 의한 계통적 유연관계 해석, 경북대학교 대학원 천연섬유학과 박사학위 논문. 9-10

## 제4장 솔껍질각지벌레의 천적연구

### 제1절 연구의 필요성

#### 1. 피해상과 천적의 중요성

해송(곰솔, *Pinus thurnbergii*)은 암석이 많은 척박한 토양조건에서도 잘 자라며 병·해충의 피해도 적은 우리나라 해안지대의 대표적인 수종으로 알려져 왔다. 그러나 1963년 전남 고흥군 도양면 비봉산(飛鳳山)에서 최초로 발생하기 시작한 솔껍질각지벌레(*Matsucoccus thunbergiane*)는 1983년 5월부터 문제가 되기 시작하여 매년 4~5km 정도씩 北上하여 주로 해송림만을 집중적으로 가하기 때문에 해송림의 분포가 많은 해안지역에서는 그 피해가 치명적이며 특히 전라남도 島嶼 및 남서해안지대에 위치한 전남 무안군, 신안군, 목포시, 장흥군, 해남군, 고흥군, 강진군, 보성군, 여천군 일대의 해송림은 그 피해가 심한 편이며 서해안 쪽으로는 영암군, 영광군을 거쳐 전북 고창군, 부안군, 김제군 일대에까지 北上하고 있으며 남해안으로부터 동해안쪽으로는 전남 광양군, 여천군을 거쳐 경남 하동군, 남해군, 거제도, 삼천포에까지 그 피해가 서서히 확대되고 있는 실정이다(Fig. 1).

이와 같이 남서해안을 따라 北上하면서 피해가 서서히 확산되고 있으나 본 해충은 年 1회 발생 孵化 後 두꺼운 솔껍질 밑의 形成層 部位에 정착하여 집중적으로 가해하다가 5月 中하순경의 기온이 24~25℃ 이상이 되면 夏眠에 들어가기 때문에 약제방제의 기간이 제한되는 어려움도 따르게 된다.

이러한 관점에서 본 害虫에 대한 天敵을 이용한 생물학적 방제의 시도는 매우 중요한 意味를 가지고 있는 것이다.

솔껍질각지벌레는 Homoptera, Coccoidae 上科(Cockerell, 1909) Margarodidae 科

(Morrison, 1927) Xylococcinae亞科(Morrison, 1927) Matsucoccus屬 (Cockerell, 1909)으로 報告되었으며, 全 世界的으로 34種이 記錄되어있다 (Rieux, 1975).

한편 1980年初부터 우리나라 南西海岸地帶에 蔓延된 각지벌레에 對하여 金(1986)은 *Matsucoccus* sp. 라고 報告한 바 있고, Park & Mill(1987)이 *Matsucoccus thunbergiana*로 同定 報告하였다.

本 害蟲에 對한 生物學的 防除를 試圖하고자 하는 天敵으로서 昆蟲類에 있어서 솔껍질각지벌레를 攻擊하는 飽食蟲으로서는 Coccinellidae, Anthocoridae, Cecidomyiidae, Anthocoridae, Cecidomyiidae, *Chysopa* spp., Hemerobiidae, Formicidae, Miridae, Cantharidae 等 무당벌레類, 노린재類, 흑파리類, 개미類 等이라고 하였으며(Anderson 等 1976, Beardsley 1975), Argov & Rossler(1993)는 지중해각지벌레(*Saissetia oleae*)의 천적으로 고치벌科, 무당벌레科 等 總 17種, Battaglia(1994) 등은 각지벌레科 *Pseudaulacaspis pentagona*의 방제에 무당벌레科의 *Lindorus lophantae*가 效果的이라고 하였다.

한편 McClure(1986), Samway & Wilson(1988)은 해송에 치명적인 피해를 주는 *Matsucoccus resinosae*의 중요한 포식자가 *Harmonia axyridis*라고 하였으며, Gao(1987)는 꽃노린재科의 *Dufouriella ater*의 成蟲과 若蟲이 *Matsucoccus matsumura*를 捕食한다고 報告하였으며, Erichsen(1991) 등은 무당벌레科의 *Chilocorus nigrita*가 많은 각지벌레를, Hoebeke(1991) 등은 소바구미科의 一種인 *Anthrribus nebulosus*가 각지벌레類의 若蟲을 捕食한다고 하였고, Li.G(1980) 등은 솔껍질각지벌레의 天敵으로 中國原産 무당벌레類 *Xanotrachielliela inimica*를, Schvester & Demolin(1984)은 *Matsucoccus feytaudi*를 捕食하는 노린재類를 報告하였다.

솔껍질각지벌레의 천적으로서 거미類에 대한 研究로서는 거미類인

*Anystis* spp.가 솔껍질각지벌레를 攻擊한다고 하였으며(Ariderson et al. 1976, Beardsley, 1975), Grimble(1976)은 솔껍질각지벌레의 主要天敵이 응애類라고 하였고, Ji(1991) 등은 각지벌레科의 *Lepidosaphes salicina*를 거미類인 *Hemisarcoptes* sp.가 捕食한다고 하였다.

한편 Cheng & Ming(1979)은 포식성 응애類인 *Anystis* spp. 등이 *Bacillus thuringensis* 菌을 傳播하므로 솔껍질각지벌레의 密度抑制에 效果的이라고 하였으며, 金(1993)은 솔껍질각지벌레의 天敵으로서 거미類 19 種을 報告한 바 있다.

각지벌레類의 各態에 寄生하는 곤충류에 對한 研究로서는 가루각지벌레科의 *Rastrococcus invadens*에 깡충좀벌科의 *Gryanusoida tegygi*가 寄生한다고 하였고(Boavida & Neuenschwander, 1995), Deng(1985)은 *Anthribus niveovariegatus*(Coleoptera : Anthribidae)가 밀각지벌레科의 *Ericerus pela*에 寄生한다고 報告하였다. 또한 Zhao(1990), Spollen & Hoy(1992)은 캘리포니아각지벌레에 면충좀벌科의 *Aphytis melinus*(Hymenoptera : Aphelinidae)가 寄生한다고 報告한 바 있다.

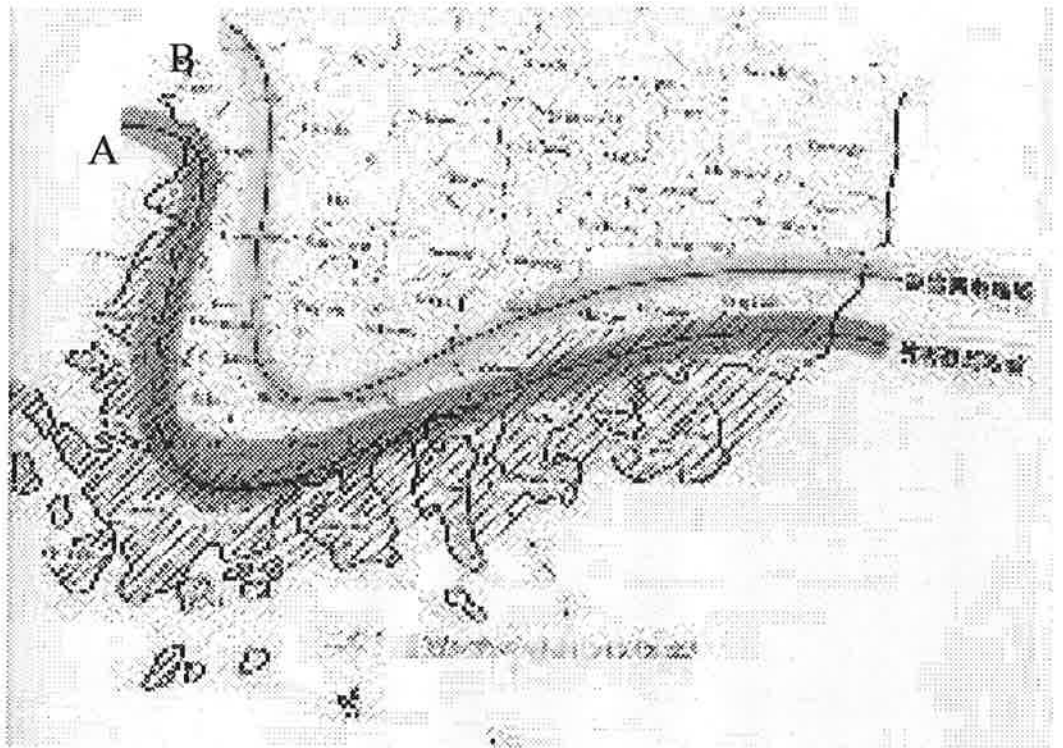


Fig. 1. Degree of damaged with black pine bast scale  
in south region of Korea.

A : Heavily infested areas,

B : Current infestation expanding areas

## 2. 솔껍질깍지벌레의 생활사

솔껍질깍지벌레는 Fig. 2 에서와 같이 암컷은 부화 후 2령약충을 거쳐 성충이 되는 불완전 변태를 하고, 수컷은 3령약충을 거쳐 용이 되어 성충이 되는 완전변태를 하는 특이한 생태를 가진 해충으로서(Fig. 2) 년 1회 발생(연구자: 김규진)하며 발생시기는 해에 따라 다소 차이는 있으나 3월 초 순경에서 5월 중순경으로서 그 peak는 지역에 따라 차이가 있으나 3월 하순~4월 중순경이다.

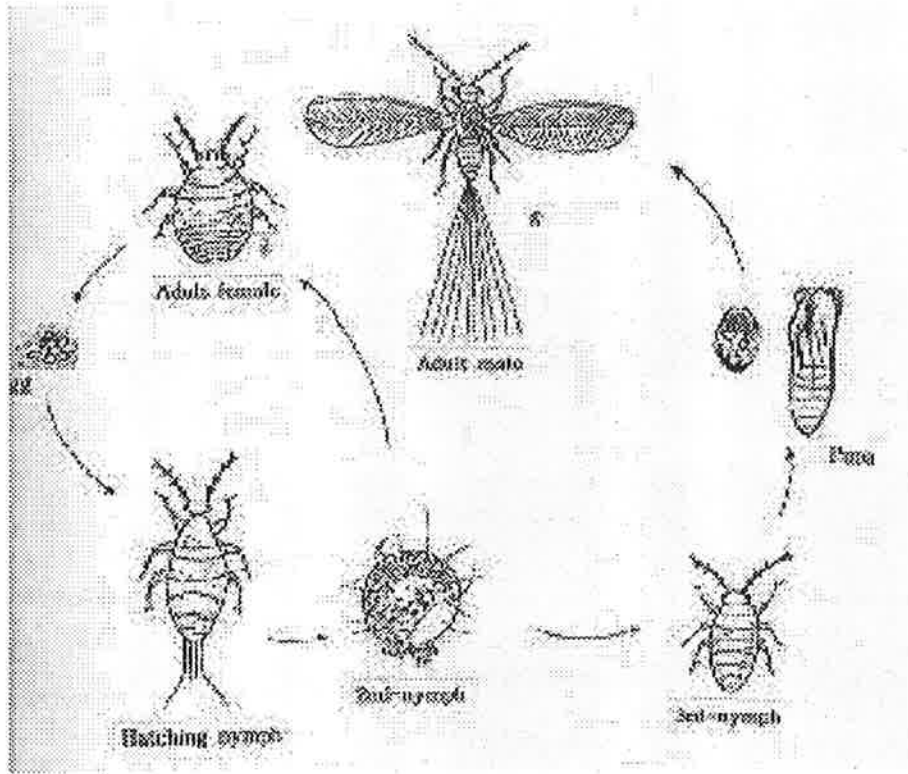
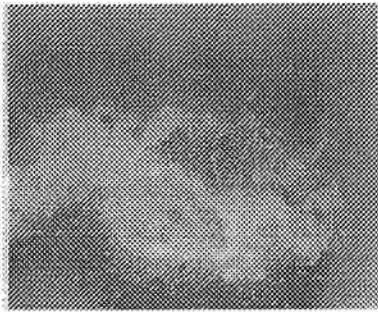
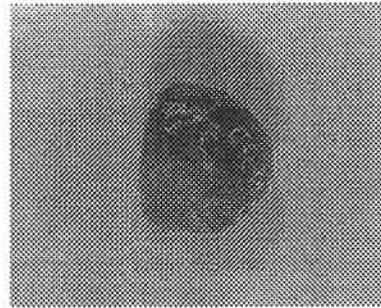


Fig. 2. Life cycle of black pine bast scale.

♂ : egg → first instar nymph → second instar nymph → third instar nymph → pupa → adult male → **complete metamorphosis**  
 ♀ : egg → first instar nymph → second instar nymph → adult female  
 → **incomplete metamorphosis**



Mass of Eggs



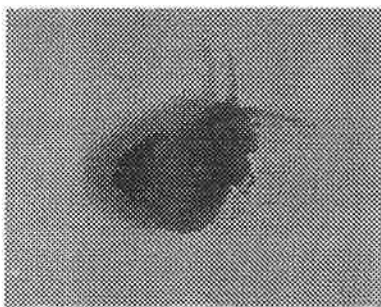
Nymph(2nd instars)



Nymph(3rd instars)



Pupa



Female(♀)



Male(♂)

Fig. 3. Each stage of black pine bast scale.



### 3. 피해기주이동

이제까지의 피해조사에서 솔껍질깍지벌레는 해송림에만 치명적인 피해를 주면서 확산되고 있었다. 그러나, Fig. 4, 5 에서 보는 바와 같이 전북 고창, 부안 일대에서는 곰솔뿐만 아니라 적송에서도 뚜렷한 피해가 확인되고 있었다.

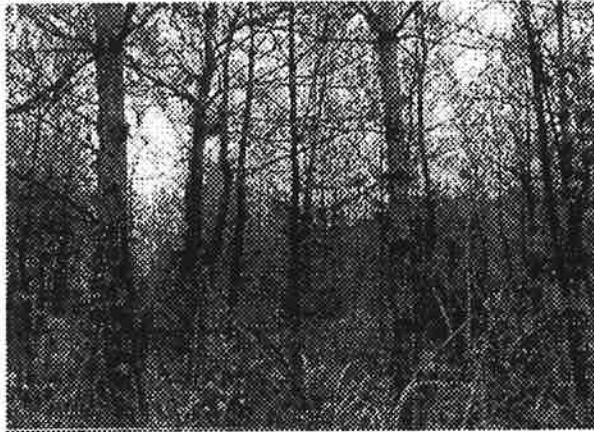


Fig. 4. 솔껍질깍지벌레의 해송림(곰솔) 피해.



Fig. 5. 솔껍질깍지벌레의 피해가 나타나고 있는 소나무(적송).

조사자(김규진)는 既히(1992년 한국응용곤충학회지 31권 4호) 솔껍질깍지벌레의 기주로서 곰솔 外에 방크스소나무, 맛소니아소나무, 테에다소나무, 타이완네스소나무 등을 報告한 바 있으나 이러한 結果는 대형 vinyl house 내에서 각 기주식물에 직접적으로 솔껍질깍지벌레의 數回에 걸친 接種시험에 의한 結果였으나 남서해안 전북 고창 부안 일대의 야외 야산에서의 소나무(적송)에 대량발생피해는 심각한 문제임을 報告한다.

## 제2절 연구개발목표

천적에 의한 해충방제는 해충의 원산지에 서식하는 천적을 도입, 정확시킴으로써 항구적 방제효과를 얻는 방법과 기존천적을 인위적으로 증식시켜 방제효과를 높이는 방법의 두가지로 크게 나눌수 있다.

우리나라에서는 솔껍질깍지벌레류의 포식성 천적으로 16종이 조사되었는데 현재 솔껍질깍지벌레 피해진행 지역에서는 천적에 의한 방제효과가 매우 낮은 것으로 추정되고 있다. 따라서 식물상의 다양화에 따른 대용 기주 곤충의 증식으로써 각종 천적류가 높은 밀도를 유지하도록 유도하는 것이 최선의 방법이라 생각된다.

본 연구에서는 솔껍질깍지벌레의 포식성, 기생성 천적을 조사하고 솔껍질깍지벌레의 증식방안을 확립하는데 그 목표를 둔다.

## 제3절 연구방법

### 1. 포식성, 기생성 천적조사

#### 1-1. 솔껍질깍지벌레의 난, 약충, 용, 성충을 포식하는 포식성 천적조사

1-1-1. 척추동물 - 짐승, 조류(새), 양서류, 파충류

1-1-2. 무척추동물 - 곤충류 및 지형류(거미), 선충류

#### 1-2. 솔껍질깍지벌레의 난, 약충, 용, 성충에 기생하는 기생성 천적조사

1-2-1. 곤충류의 기생성 파리 및 기생벌

### 2. 솔껍질깍지벌레의 대량사육

2-1. 대상곤충 : 솔껍질깍지벌레

2-2. 사육방법 : 대형항온 항습조를 활용한 사육

15-18℃ 항온조건에서 솔껍질깍지벌레가 대량발생하여 피해를 주고 있는 피해목을 40cm 정도 절단, 솔껍질깍지벌레가 피해목에 접종된 상태하에서 사육

## 제4절 연구결과 및 고찰

### 1. 천적조사(1999. 10. 20 까지 얻어낸 결과)

#### 1-1. 곤충류

솔껍질까지벌레의 천적으로서 1999.10.20일까지에 걸쳐 조사된 무척추동물군의 곤충류는 딱정벌레목 11種, 집게벌레목 2種, 노린재목 7種, 벌목 9種 등 총 4목 29種이었으며(表 1), 이들 중 Coleoptera에서는 *Coccinella septempunctata*(칠성무당벌레), *Chilocorus urbidus*(홍점박이무당벌레), *Chilocorus ruwanae*(무당벌레), *Chilocorus kuwanae*(애홍점박이무당벌레)가 Hemiptera에서는 *Sphedanolestes impressicillis*(다리무늬침노린재) 등이, Hymenoptera에서는 *Camponotus obscuripes*(홍가슴개미), *Brachyponera chinensis*(왕침개미), *Vespa carbro flavofasciata*(말벌)등이 발생빈도가 높거나 발생량이 많은 種들이었으며, 특히 Coleoptera의 *Coccinella septempunctata*, *Chilocorus ruwanae*, Hemiptera의 *Velinus nodipes*는 대량사육만 된다면 천적으로서 이용가치가 높을 것으로 판단되었다.

Table 1. Natural enemy of black pine bast scale (Insects)

Order/Family	Scientific name	Korean name	Remark ※Frequency
Coleoptera			
Coccinellidae	<i>Coccinella septempunctata</i> L.	칠성무당벌레	※※※
	<i>Chilocorus rubidus</i> H.	홍점박이 무당벌레	※※
	<i>Neotriplax lewisi</i> C.	-	※
	<i>Chilocorus rufarum</i> S.	무당벌레	※※※
	<i>Anatis halonis</i> L.	달무리 무당벌레	※
	<i>Chilocorus kuwanae</i> S.	애홍점박이 무당벌레	※
	<i>Neotriplax lewisi</i> C.	-	※
Staphylinidae	<i>Creophilus maxillosus</i> L.	왕반날개	※
	<i>Philonthus spinipes</i>	주홍좀반날개	※
	<i>Lathrobium angulare</i> L.	-	※
Carabidae	<i>Perigona nigriceps</i>	어깨무늬먼지벌레	※
Dermaptera			
Forficulidae	<i>Forficula scudderi</i> B.	못뽑이 집게벌레	※
	<i>Forficula mikado</i> B.	노랑날개 집게벌레	※
Hemiptera			
Reduviidae	<i>Sepedanolestes impressicollis</i> S.	다리무늬침노린재	※※
	<i>Velinus nodipes</i> U.	검적침노린재	※※※
	<i>Cydnochoris russatus</i> S.	고추침노린재	※
	<i>Harmonia acyridis</i> P.	-	※
	<i>Haematoloecha rufithorax</i>	붉은등침노린재	※
	<i>Isyndus obscurus</i> D.	왕침노린재	※※
	<i>Velinoides dilatatus</i> M.	민날개침노린재	※

Table 1. Continued

Hymenoptera			
Formicidae	<i>Leptothorax congruus</i> S.	집호리가슴개미	※
	<i>Camponotus obscuripes</i> M.	홍가슴개미	※※
	<i>Tetramorium caespitum</i> L.	주름개미	※
	<i>Pristomyrmex pungens</i> M.	그물등개미	※
	<i>Formicatusca japonica</i> M.	곰개미	※
	<i>Leptothorax congruus</i> S.	집개미	※
	<i>Brachyponera chinensis</i> E.	왕침개미	※
Vespidae	<i>Vespa crabro flavofasciata</i> C.	말벌	※
	<i>Vespula rufa schrenckii</i> R.	노란띠 땅벌	※
<b>Total 4 Order 7 Family 29 Species</b>			

### 1-2. 거미류

솔껍질각지벌레에 대한 거미류의 천적은 表 2에서 보는 바와 같이 總10科 27種이 조사되었는데 Argipoidae科 8種, Agelenidae科 1種, Atypidae科 1種, Lycosidae科 5種, Oxyopidae科 1種, Pisauridae科 3種, Salticidae과 3種, Thomisidae科 2種, Theridiidae科 1種, Tetragnathidae科 2種 등이었으며, 이들 중 Argipoidae科的 *Argiope bruennichii*(긴호랑거미), *Nephila clavata*(무당거미), *Argiope amoena*(호랑거미), *Neosscona nautica*(집왕거미), *Araneus fuscocoloratus*(떡왕거미), Lycosidae科的 *Paradosa pseudoannulata*(들늑대거미), *Oxyopes sertatus*(낮표스라소니거미), *Dolomedes sulfureus*(황닷거미) 등이 비교적 발생량이 많거나 발생빈도가 높은 種들이었다.

Table 2. Natural enemy of black pine bast scale (Spiders)

Order/Family	Scientific name	Korean name	Remark
			*Frequency
Argipoidae	<i>Neoscona soylloides</i>	연두어리왕거미	※
	<i>Argiope amoena</i>	호랑거미	※
	<i>Cyclosa octotuberculata</i>	여덟혹먼지거미	※
	<i>Argiope bruennichii</i>	긴호랑거미	※※※
	<i>Araneus ventricosus</i>	산왕거미	※
	<i>Nephila clavata</i>	무당거미	※※
	<i>Neoscona nautica</i>	집왕거미	※※
	<i>Araneus fuscocoloratus</i>	먹왕거미	※
Agelenidae	<i>Agelena limbata</i>	들풀거미	※
Atypidae	<i>Styus sp</i>	-	※
Lycosidae	<i>Paradosa astrigera</i>	별늑대거미	※
	<i>Paradosa pseudoannulata</i>	들늑대거미	※※
	<i>Paradosa sp</i>	-	※※
	<i>Pirata sp</i>	-	※
	<i>Lycosa suzurii</i>	땅늑대거미	※
Oxyopidae	<i>Oxyopes sertatus</i>	낮표스라소니거미	※※
Pisauridae	<i>Dolomedes stellatus</i>	줄닷거미	※
	<i>Dolomedes sulfureus</i>	황닷거미	※※
	<i>Perenethis fascigera</i>	번개닷거미	※
Salticidae	<i>Marpissa elongata</i>	살깃강총거미	※
	<i>Dendryohantes atratus</i>	까치강총거미	※
	<i>Evarcha albaria</i>	흰눈썹강총거미	※
Thomisidae	<i>Xysticus sphaeratus</i>	대륙게거미	※
Tetragnathidae	<i>Philodromus subaureolus</i>	갈새우게거미	※
	<i>Pachygnatha clercki</i>	턱거미	※
Theridiidae	<i>Tetragnatha clercki</i>	민갈거미	※
	<i>Theridion octomaculatum</i>	여덟점꼬마거미	※
<b>Total 4 Order 7 Family 29 Species</b>			

### 1-3. 척추동물

척추동물을 대상으로 하는 솔껍질깍지벌레의 천적으로서 조류(鳥類)에서는 表 3에서 보는 바와 같이 2目 4科 10種이 조사되어 Muscicapidae科 2種, Motacillidae科 1種, Paridae科 4種, Laniidae科 1種, Sturnidae科 1種, Corvidae科 1種이 조사되었으며 이들 중 Muscicapidae科의 *Paradoxornis webbiana*(붉은머리오목눈이), Paridae科의 *Parus majoy*(박새), Laniidae科의 *Lanius bucephalus bucephalus*(때까치)등이 출현빈도가 높았으며 특히 Muscicapidae科의 *Paradoxornis webbiana*(붉은머리오목눈이)는 남서해안에 취락을 형성하고 있는 어촌마을 주변의 무성한 해송림의 숲에서 서식하면서 솔껍질깍지벌레가 교미산란하기 위하여 해송림의 표면에 나타나는 3월중하순경부터 4월 하순경에 많은 개체들이 솔껍질깍지벌레의 卵과 孵化약충을 포식하기 위하여 피해 해송림 숲에 모여들어 부분적으로는 천적으로서 효과가 기대되는 종이었다.

Table 3. Natural enemy of black pine bast scale(Birds)

Order/Family	Scientific name	Korean name	Remark ※Frequency
Passeriformes			
Muscicapidae	<i>Turdus naumanni naumanni</i>	노랑귀빠귀	※
	<i>Paradoxornis webbiana</i>	붉은머리오목눈이	※※※
Motacillidae	<i>Motacilla grandis</i> Sharpe	검은둥할미새	※
	<i>Parus ater amurensis</i>		
Paridae	<i>Parus varius varius</i> Temminck.	진박새	※
	<i>Parus majoy wladivostkensis</i>	곤줄박이	※
	Kleinschmide	박새	※※
	<i>Parus palustris hellryri</i>	쇠박새	※
Laniidae	<i>Lanius bucephalus bucephalus</i>	때까치	※※
Sturnidae	<i>Sturnus cineraceus</i> Temminck.	찌르레기	※
Orioiidae			
Corvidae	<i>Garulus glandarius brandtii</i> E.	어치	※
<b>Total 2 Order 6 Family 10 Species</b>			



조사된 천적조류에서는 Muscicapidae의 붉은머리오목눈이(*Paradoxornis webbiana*), Paridae의 박새(*Parus major* minor T & S), Laniidae의 때까치(*Lanius bucephalus bucephalus*)가 출현빈도가 높았다.

Index : Natural enemy of Black pine bast scale, *Matsucoceus thunbergianae*



Fig. 6. Damaged trees of pine bast scale.



Fig. 7. *Velinus nodipes*(Insect).

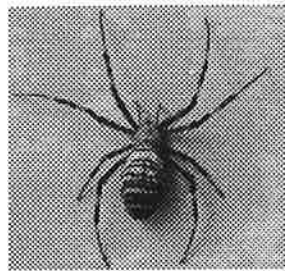


Fig. 8. *Nephila clavata*(Spider)

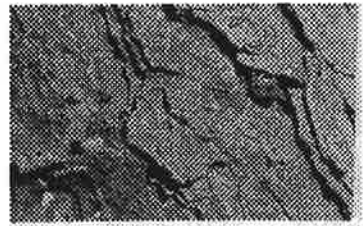


Fig.9 *Coccinella septempunctata*(Insect)



Fig. 10. *Comptonotus obscuripe*  
(Insect)

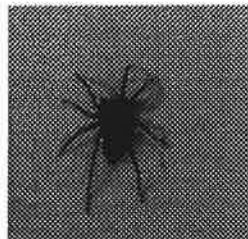


Fig. 11. *Paradosa* sp.  
(Spider)

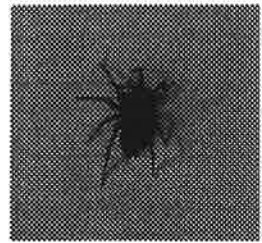


Fig. 12. *Paradosa astrigera*  
(Spider)

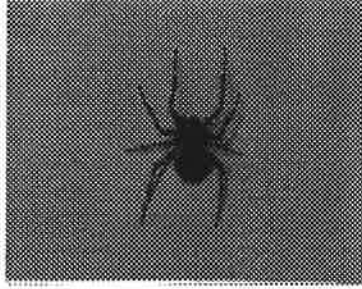


Fig. 13. *Araneus ventricosus* (Spider)

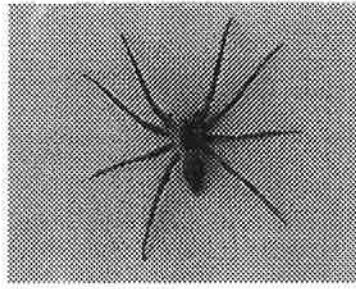


Fig. 14. *Lycosa* sp (Spider)

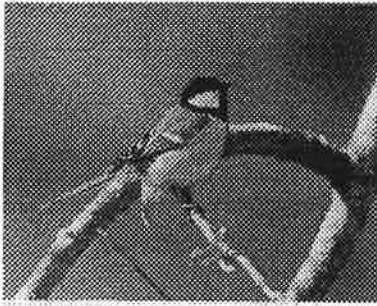


Fig. 15. *Parus varius varius*(Birds)



Fig. 16. *Pirapa* sp (Spider)

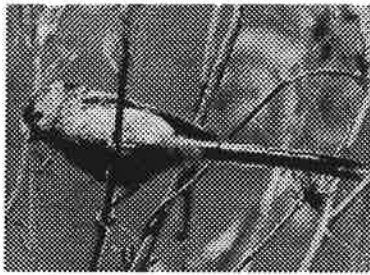


Fig. 17. *Paradoxornis webbiana*  
(Birds)

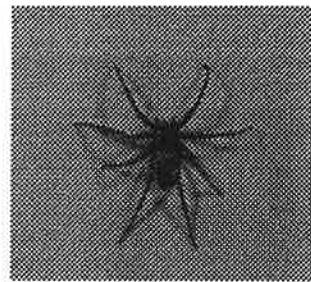


Fig. 18. *Dolomedes sulfureus*  
(Spider)

## 2. 솔껍질깍지벌레의 대량사육방법 확립

솔껍질깍지벌레의 생물학적 방제를 위한 환경친화적 무공해 생물농약을 개발하기 위해서는 우선적으로 해결되어야 할 문제가 실험재료인 솔껍질깍지벌레의 대량 확보이다. 솔껍질깍지벌레의 각 발육단계별, 층태별 폐사율 및 폐사요인, 미생물적 감염 치사원인 규명을 위하여는 언제든지 필요한 시기에 필요한 만큼의 실험재료가 구비되어야 한다.

대량사육방법을 확립하기 위하여 전남 여수시 봉계동 소재 조경공사(대표 장석동)로부터 6년생 해송을 다수 분양 받아 1999년 5월 10일 해송림 솔껍질깍지벌레 피해지인 전북 부안군 진서면 운호리 마동마을에서 채취한 난괴(알덩어리)를 분양받은 해송에 부착하고 잠복소를 설치하였다. 알이 부화하여 제1약충이 이 나무에 정착하도록 옥외에서 1개월간 방치한 후 1999년 6월 10일부터 8월5일까지 56일간 4℃ 냉장상에서 존치하여 여름 휴면을 타파하고 태풍 「올가」가 지나간 이틀 후인 8월 5일 다시 옥외로 옮겨 솔껍질깍지벌레의 거동을 관찰하였다. 11월 7일 이들 깍지벌레는 그림에 나타난 바와 같이 성충으로 우화하였고 그 후 잠복소에 다수 산란하였다(Fig. 19).

아울러 11월 이후 솔껍질깍지벌레 피해지 해송 3~5년생 가지를 절단하여 25℃/RH 70% 성장상에 약 2주일간 놔두면 제2약충이 성충으로 우화하고 암·수 성충이 되며 산란하고 일생을 마감하는 생활환을 인위적으로 조절할 수 있는 방법을 확립하였다(Fig. 20).

따라서 필요한 시기에 필요한 만큼의 솔껍질깍지벌레 시료를 확보할 수 있는 방안을 마련하였다.

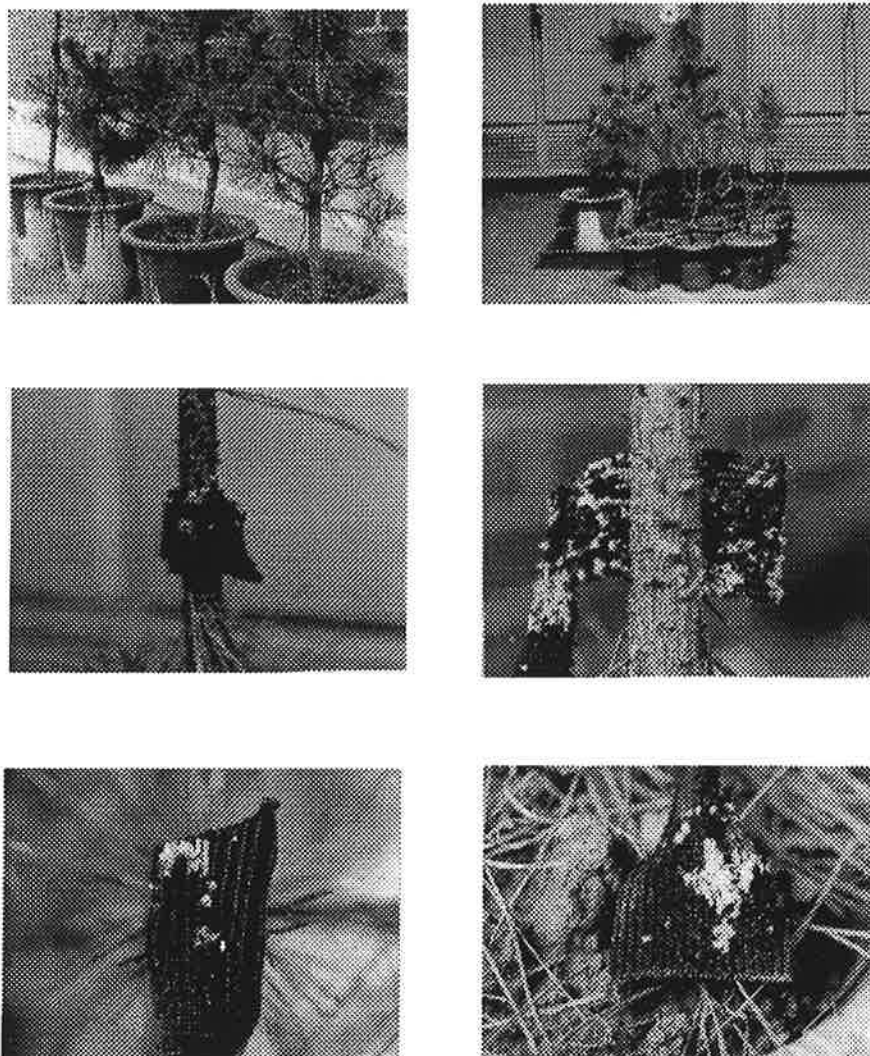


Fig. 19. Development of mass rearing methods of the pine bark scale.

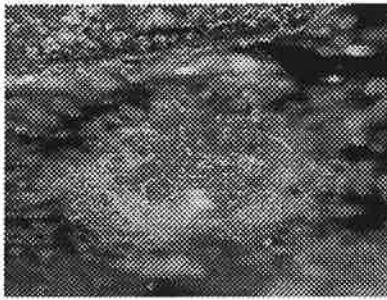
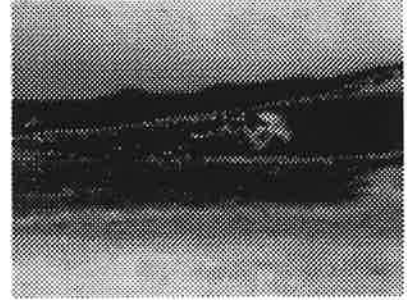


Fig. 20. Control of the pine bast scale's life stages.

## 제5절 참고문헌

1. Anderson, J. F., R. P Ford., J. D, Kegg., J. H. Risley. 1976. The red scale in North America. *Conn. Agr. Expt. Sta. Bull.* 765 :1.
2. Angerilli, N. P. D. and D. M, Logam. 1986. The use of Pheromone and barrier trap to monitor Sanhose scale phenology in Okanagan vally of British Columbia, Canada. *Can. Entomol.* 118 :767-774.
3. Argov, Y and Y, Rossler. 1993. Biological control of the Mediterranean black scale, *Saissetia oleae*(Hom: Coccidae) in Israel. *Entomophaga.* 38(1) : 89-100.
4. Bar-zakay, L., B, A. Peleg., A, Hefetz, 1989. Mating disruption of the Califonia red scale *Aonidiella aurantii*(Homoptera : Diaspididae). *Hass adeh.* 70 :1228-1231.
5. Beardsley, J. W., and R. H. Gonzalez. 1975. The biology and ecology of armored scale. *Ann. Rev. Entomol.* 20 : 47-73.
6. Cheng, H., and W. Ming. 1979. Population dynamics and biological control of *Matsucoccus matsumurae* Kuwana (Homoptera: Margarodidae). *Acta. Entomol. Sinica* 22 :149-155.

7. Gao, W. C. 1987. The anthocorid *Dufouriella ater*(Dufour) - a new natural enemy of Japanese pine bast scale *Matsucoccus matsumurae*(Kuwana). *Acta. Entomologica. Sinica.* 30(3) :271-276.
8. Grimble, D. G. 1976. Red Pine scale in new york. Newyork state tree pest leaflet. 1-28.
9. Hu, H., and Wang. L. 1976. Studies on the red pine bast scale *Matsucoccus massonicnae* Y.&H. *Acta Entomol. Sinica.* 19 : 383 - 392.
10. Ji, L. Z., Yang, J. K., Y. H. Shao. 1991. A prelininary report on the biology of *Hemisarcoptes sp.*(Acari : Hemisarcoptidae), an important natural enemy of willow oyster shell scale, *Lepidosaphes salicina* (Hom : Diaspidae). *Chinese Journal of Biological Control.* 7(4) 151-153.
11. Li, Go, L, Zhuang, R. Han, X. Liu & R. Xia. 1980. A study on the pine stem coccid *Matsucoccus matsumurae* Kuwana. *Rep. Inst. For. Liaoning Prov.* 9 : 1-27.
12. McClure, M. S. 1986. Importing ladybird beetles to control red pine scale. *Fronties of Plant Science.* 39(1) : 5-7.

13. Park, S. C. and Miller D. R. 1987. A new species of *Matsucoccus*(Homoptera : Coccoidea : Margarodidae)from Korea. *Korean Journal. Plant Protection* 26 : 49-62.
14. Samways, M. J., S. J, Wilson. 1988. Aspect of the feeding behaviour of *Chilocorus nigritus*(Col. : Coccinellidae)relative to its effectiveness as a biological agent. *Journal of Applied Entomology*. 106(2) : 177-182.
15. 金奎眞, 任奉基. 1986. “솔껍질각지벌레의 생태 및被害에 관한 研究. - 全南南西海岸 中心-”. 全南大論文集. 31輯 :41-51.
16. 金奎眞, 吳光仁. 1988. 韓國 南西海岸地帶의 海松林에 蔓延된 솔껍질 각지벌레(*Matsucoccus thunbergianae*)의 생태, 기주범위 및 被害解釋에 관한 研究( I ). 韓國應用昆蟲學會誌. 31(4) : 386-395.
13. 金奎眞, 1993. 韓國南西海岸地帶의 海松林의 蔓延된 솔껍질각지벌레 (*Matsucoccus thunbergianae*)의 天敵調査 研究(2). 韓國거미研究報告 9(12) : 89 - 98.
14. 金奎眞, 李虎範. 1998. 海松(곰솔)林에 蔓延된 “솔껍질각지벌레”의 捕食天敵에 관한 研究. 韓國應用昆蟲學會. 37(1) : 73-80.



## 주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림특정 연구사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림특정연구사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.