최 종
연구보고서

GOVP 12001239

산림자원으로부터 무공해 생물농약의 탐색 및 개발

Screening and development of biological control agents from forestry resources

임업연구원

농 림 부

최 종 보 고 서

1998 년도 농림기술개발사업에 의하여 완료한 산림자원으로부터 무공해 생물 농약의 탐색 및 개발 과제의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

첨부 : 1. 최종보고서 10부

2. 최종보고서 디스켓 1매

1999 . 12 . 20 .

주관연구기관 : 임업연구원

총괄연구책임자 : 박 지 두 (인)

주관연구기관장 : 임업연구원장

직 인

농 림 부 장 관 귀 하

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “산림자원으로부터 무공해 생물농약의 탐색 및 개발” 과제 (세부과제 “살충 및 행동제어물질의 탐색 및 개발”, “천적 미생물 탐색 및 개발”, “살충성 B.t 제 개발” 및 “천적 선충 탐색 및 개발")의 최종보고서로 제출합니다.

1999. 12 . 20 .

주관연구기관명 : 임업연구원
총괄연구책임자 : 박 지 두
세부연구책임자 : 신 상 철
연 구 원 : 이 상 길
연 구 원 : 김 철 수
연 구 원 : 김 준 범
연 구 원 : 이 상 명
연 구 원 : 김 철 수
연 구 원 : 박 일 권
협동연구기관명 : 서울대학교
협동연구책임자 : 안 용 준
협동연구기관명 : 경상대학교
협동연구책임자 : 추 호 렬

요 약 문

I. 제 목

산림자원으로부터 무공해 생물농약의 탐색 및 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

현재 우리나라의 산림자원으로부터 저독성 농약활성물질의 탐색 및 개발에 관한 연구는 전무한 실정으로 산림자원으로 부터 농림해충의 방제제 개발을 위하여 식물자원의 생리활성기능에 따른 계통체계 확립에 의한 자원관리, 농림해충의 사육법 및 생물검정법의 확립, 정밀분석기술을 확립함으로서 국내 농약업계의 저독성 농약개발을 위한 국제 경쟁력을 강화하며 천연물 유래의 저독성 물질을 살충제로서 개발하여 산업화 함으로서 국제수지 향상에 기여코자 함.

선진국은 지적소유권 확대로 기능성 생리활성물질의 기술개발 이전을 회피하고 있을뿐 아니라 저독성 농약 개발국에 막대한 Royalty를 지불하고 있는 실정임.

천적선충 및 미생물 살충제는 미국, 유럽의 여러나라 및 일본 등 선진국을 중심으로 많은 종류가 개발되어 시판되고 있으며, 분자생물학 및 유전공학 기법을 도입하여 숙주범위를 넓힘과 동시에 살충력을 강하게 할 수 있는 연구를 계속하고 있음.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 산림자원으로부터 산림 및 농업해충에 대한 살충활성, 섭식저해, 유인 및 기피활성물질의 분리 ·동정하여 야외적용시험을 실시함은 물론 산림자원으로부터 유효 천적자원을 분리하여 병원성을 검정하고 대량생산체계확립, 제형 및 보관기술개발 및 생물농약의 시제품을 제작함.

Ⅳ. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

○ 본 연구 결과 분리한 azadirachtin 등 7종의 천연물 유래 살충제는 유기합성농약에 의한 부작용을 최대한 줄이면서 강력한 살충력을 나타내기 때문에 산림자원뿐 아니라 한약재와 같은 고부가가치 작물에도 살포가능케 함으로서 국제경쟁력 강화로 인한 농가의 수익증대에 기여할 것임.

○ 천적선충 및 미생물농약의 선발과 이용기술의 개발로 산림해충 뿐만 아니라 과수, 채소 및 시설원예 해충에 까지도 무공해적으로 방제가 가능하여 고소득 작물의 생산성 향상에 크게 기여할 것임.

○ 모기에 살충성이 강한 국내산 Bt제의 시제품을 제작 개발함으로서 위생해충에 대한 생물농약을 이용한 방제가 가능하게 되었으며, 야외적용시험을 거쳐 산업화함으로서 자연생태계를 보전함과 아울러 국내 농약산업의 활성화에 기여하리라 생각됨.

SUMMARY

62 families 123 species 127 plant samples were tested against the larvae of *Thecodiplosis japonensis*. The steam distillate of *Thujopsis dolabrata* var. *hondai* sawdust belonging to Cupressaceae family showed 100% larvicidal activity. The larvicidal component was isolated by chromatographic techniques and characterized by spectral analysis as carvacrol. Insecticidal activity of 37 families 71 species 94 samples of plants was tested against 2nd instar nymphs of *Matsucoccus thunbergianae*. The methanol extract of neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss) kernel showed strong activity. The larvicidal component was isolated by chromatographic techniques and characterized by spectral analysis as azadirachtin. In field study with trunk implantation, these two compounds showed synergistic effect when applied with the commonly used systemic insecticide phosphamidone. Berberine chloride was isolated from *Coptis japonica* root and it showed strong antifeeding activity against *Hyphantria cunea* and *Agelastica coerulea*. Cinnamaldehyde isolated from *Cinnamonum cassia* and it showed strong insecticidal activity against *Mechoris ursulus*. Essential oil of *C. obtusa* showed fumigant toxicity against *C. chinensis* and bornyl acetate, terpinolene and limonene were active compounds.

Three hundred eighty eight *B. thuringiensis* strains isolated from agricultural fields and forest resources in Korea were examined for insecticidal activity and crystal protein shape to be divided into four groups: 244 *Bombyx mori*-toxic strains, 18 *Culex pipiens*-toxic strains, 95 both *B. mori* and *C. pipiens*-toxic strains and 31 non-toxic strains. Among all *B. thuringiensis* isolates, an effective strain harboring high toxicity to mosquito larvae was selected and was named as Bt 185-1.

Entomopathogenic fungi originated from soils and insect cadavers were characterized, mass produced and evaluated their biocontrol potentials to develop biological insecticide. Among 61 isolates of entomopathogenic fungi collected, 36 were classified into *Beauveria* spp., 21 were *Metarrhizium* spp., and five were *Aspergillus* spp. The entomopathogenic fungi, *Beauveria* spp. and *Metarrhizium* spp., were grown well on all the six commercial media. *Metarrhizium* sp. 066 showed strong strong pathogenicity against several insects such as *Agelastica coerulea*, *Meganola melancholica*, *Anomala orientalis* and *Agrotis segetum*.

CONTENTS

목 차

제 1 장 서 론

제1절 연구개발의 목적과 범위

농약은 인류가 식량문제를 농업에 의존하는 한 농산물의 양적 증대 및 질적 향상에 필수 불가결한 농업자재의 하나로서, 그 특성상 유익성과 위해성을 동시에 갖는다. 특히 2차 대전 이후에 비약적으로 발전한 유기합성농약은 농업해충의 방제에 의한 농산물의 증수와 질병매개곤충의 구제에 의한 인류보건 향상에 크게 기여한 것은 사실이나. 이들 농약의 연용과 남용은 여러 가지 부작용을 야기하였다. 그중에서도 살충제 저항성해충의 출현에 의한 살충제 사용량과 살포회수의 증가는 이러한 부작용을 더욱 증폭시켜, 금후 약효의 선택성 및 안전성 측면에서 새로운 저독성 살충제의 개발이 절실히 요구되고 있다.

1938년부터 DDT가 살충제로서 실용화된 이후 BHC, aldrin, endrin 등의 유기염소계 살충제가 개발되기 시작하면서부터, 종래의 무기 및 천연물 살충제의 사용량은 감소하는 반면 유기합성 살충제의 사용은 폭발적으로 증가하게 되었고, 이에 따른 농산물의 증수와 인류의 보건향상도 괄목할 만한 발전을 보였다. 실제, 미국에서 1945년부터 9년간 살충제 DDT와 살균제 Nabam을 병해충방제에 사용한 결과, 감자는 90%, 밀은 20%, 야채류는 61%, 두류는 42%의 높은 단위면적당 생산량 증가를 보였지만, 반면에 농약무처리 토지에서는 그 9년간 전작에서 4-6%, 야채류에서 3-6% 정도의 낮은 증가를 보였을 뿐이었다. 이러한 DDT의 뛰어난 효과가 입증

된 이래 유기염소계, 유기인계, 카바메이트계 살충제등 점차 많은 수의 살충제가 개발, 시판되어 본격적인 농약시대에 막이 올랐다. 이와 같이 유기합성 살충제에 장점만이 사람들의 주목을 받던 이 시기를 농약의 역사에 있어서 "낙관의 시대 (The year of optimism) 라고 부르고 있다". 1958년 이후 인구증가로 인한 심각한 기아상태와 질병의 만연이 세계적으로 누적되어 각국은 농업해충 방제에 의한 식량 증산 및 위생해충의 구제에 의한 질병퇴치 정책상 살충제의 사용을 적극 권장하게 되었다. 그 때문에 식량증산과 보건향상에 큰 효과를 올린 것은 사실이었으나 반면 살충제의 사용량과 살포횟수는 점점 증가하여 저항성, 해충의 출현, 잠재해충의 주요 해충화, 해충의 이상격발, 천적과 유용곤충의 살해, 야생동물 및 어류에 대한 악영향, 인축에 대한 독성, 토양이나 식품등의 잔류 그외 각종 환경오염 문제등의 부작용이 나타나기 시작하였다. 마침내 잔류성과 인축 및 환경독성 등에 문제 때문에 DDT, parathion등 다수의 살충제의 사용이 1960년대를 전후하여 금지되었는데, 살충제의 역할에 대하여 회의가 높았던 이 시기를 살충제의 역사에 있어서 "회의의 시대" 라고 부르고 있다. 그러나, 인류는 여전히 제한된 면적에서 식량을 생산하지 않으면 안되고 아직도 곤충이 매개하는 질병의 위협하에 놓여있다. 따라서, 해충방제에 대한 새로운 접근이 필요하며 이의 일환으로 새로운 성질의 살충제, 즉, 탁월한 약효와 선택적 살충성, 인축 및 환경에 대한 낮은 위해성, 저항성 문제의 해결을 위한 새로운 살충기작등을 갖춘 살충제 개발에 주력하고 있으며 이러한 관점에서 구미, 일본등 선진제국들은 오래전부터 개발 확률이 매우 낮은 화학적 합성에 의한 살충제 개발에서 인축 및 환경에 부작용이 적은

천연물로부터의 살충성분의 탐색과 개발에 눈을 돌려 이미 많은 업적이 축적되어 있을 뿐 아니라 실용화에 이르고 있다. 또한 이들 천연물 유래의 살충성분을 모핵화합물로 하여 유기인계, 카바메이트계, 피레스로이드계 살충제 등이 개발되어 농업 및 위생해충의 방제에 이용되고 있으며, 오늘날도 꾸준히 저독성 살충제의 개발에 진력하고 있다.

예를 들면, 아프리카산 콩과 작물의 일종인 카라바콩 종자의 독성분인 physostigmine (eserine)이 수종의 곤충에 대해 살충력을 발휘한다는 사실이 발견된 이래로, physostigmine의 화학구조 중 N-methyl carbamoyl 기를 모핵화합물로 하여 carbaryl을 비롯한 많은 카바메이트계 살충제가 개발되었고 제충국의 살충성분인 pyrethrin을 모핵화합물로 하여 탁월한 살충효과를 갖는 합성 피레스로이드제가 개발되었다. 해안에 서식하는 환형동물에 속하는 갯지렁이의 일종인 Lumbriconereis heteropoda Marenz의 사체에 접촉된 파리나 모기가 마비, 치사한다는 사실로부터 그 활성본체인 nereistoxin이 분리되었고 이를 모핵화합물로 하여 아미노산계 살충제인 cartap이 개발되었다. 그러나, 이러한 천연물유래 살충제 개발 분야에 있어서의 국내의 연구동향은 체계적인 연구가 거의 이루어져 있지 않고 있을 뿐만아니라 살충제 개발을 위한 생물검정법에 관한 연구도 미미한 실정이다. 따라서, 본 연구는 본 연구진에 의해 확립된 생물검정법을 이용 수종 해충을 대상으로 하여 식물체 메탄올 조추출물의 살충활성 및 살충성분을 분리, 정제 및 구조동정하여 식물체 유래의 저독성 살충제를 개발하고자 본 연구를 수행하였다.

제 1 세부과제

살충 및 행동제어물질의 탐색 및 개발 분야

총괄연구책임자 : 임업연구원 박지두

제 2 장 살충 및 행동제어물질 탐색 및 개발 분야

제1절 서설

산림해충은 산림생태계의 한 구성요소인 수 많은 곤충류 중에서 인간이 산림에서 기대하는 역할을 저해하는 특정종을 임의로 규정한 것으로 해충방제는 이러한 특정종의 밀도를 인간의 이해에 따라 인위적으로 조절하기 위한 일련의 산림생태계에 대한 간섭으로 정의할 수 있다.

지금까지 산림해충 방제는 산림의 특수성에 입각한 이론과 체계의 정립없이 농업해충이나 위생해충에 적용하고 있는 방제법 및 약제를 그대로 적용하여 해결하려고 노력하여 왔으며, 광범위한 살충력을 지닌 유기합성 살충제의 획일적이고 무분별한 대량살포는 인축의 중독, 수질 ·토양 등의 환경오염 및 새로운 저항성 해충의 출현 등 심각한 사회적 문제를 야기시키고 있다.

따라서 오래전부터 선진국들은 유기합성 살충제의 부작용을 극복하고 산림 생태계의 부작용을 극소화하기 위해 해충제어물질(bioregulators)에 의한 해충종합관리(Integrated Pest Management)의 일환으로 산림생태계내에 존재하는 생물 상호간의 작용물질(semiochemicals)의 이용과 응용에 초점을 맞추어 왔으며 이들을 이용하여 해충의 밀도를 제어하고자 하는 시도가 행하여지고 있다. 이러한 예로서, 세균(*Bacillus thringiensis* 등) 및

곤충 바이러스(Nuclear Polyhedrosis Virus, Granulosis Virus, Cytoplasmic Polyhedrosis Virus 등)를 이용한 미생물적 수단, 곤충의 pheromone 및 호르몬을 이용하는 방법, 그리고 식물에 존재하는 종 특유의 이차대사산물 중 독물질(toxins), 유인물질(attractants), 섭식 또는 산란저해물질(deterrents), 기피물질(repellents) 및 곤충생장조절물질(insect growth regulators) 등의 이용법 연구에 진력하고 있다. 특히 곤충과 오랫동안 관계를 맺으면서 공진화해온 식물체에 함유된 이차대사산물(secondary metabolites)을 살충제로 개발·이용하고자 하는 연구가 1960년대 이후 꾸준히 진행되어 왔다. 식물체의 휘발성물질들은 여러 가지 다양한 기능을 갖고 있다. 곤충이 기주 식물을 찾는데 가장 중요한 역할을 할 뿐 아니라 식물체 자체내의 방어물질로서도 많은 기능을 갖고 있다. 오래 전부터 외국에서는 이들 식물체의 휘발성물질들을 이용하여 저장물 및 골목해충에 대한 훈증제로서의 가능성에 많은 연구를 해오고 있다. Shaaya(1991) 등은 anise (*Pimpinella anisum* L.)와 peppermint (*Mentah piperita* L.)의 정유가 쌀바구미를 비롯한 네 종의 저장물해충에 대해 살충활성을 갖는다고 보고하였고, Rajapakse와 Van-Emden(1997)은 여러 식물체의 정유에 대해 팥바구미에 대한 살충활성을 보고하였다. 국내에서도 이(1993)에 의해 측백나무과(Cupressaceae)의 나한백으로부터 흰개미, 배추좀나방 등에 대한 살충성분으로서 테르펜화합물의 일종인 carvacrol을 분리·동정하였으며, 이와 안(1995)은 솔잎혹파리 등 여러 저장물 해충에 대한 carvacrol의 훈증효과를 보고하였고, 또한 이 등(1997)과 이(1998)는 이 화합물을 솔잎혹파리와 솔껍질깍지벌레의 수간주사 약제인 phosphamidon의 협력제로

서 2종의 해충방제에 이용하려는 연구를 수행한 바 있다. 박 등(1999)은 계피의 헥산층에서 분리된 cinnamaldehyde, salicyaldehyde와 eugenol이 도토리거우벌레에 대한 훈증 및 접촉독성을 갖는다고 보고하였다.

본 연구에서는 산림자원으로부터 생물농약을 개발할 목적으로 식물체로부터 생리활성물질을 추출하여 중요한 해충에 대한 살충활성, 유인활성, 섭식저해활성을 검정하고 활성성분을 분리·동정하였으며 야외적용시험을 실시하였다.

1. Neem tree로부터 솔껍질깍지벌레에 대한 살충활성물질 탐색

가. 재료 및 방법

1) 솔껍질깍지벌레에 대한 살충활성성분의 분리 및 동정

가) 실험곤충

실내 살충활성 검정을 위한 솔껍질깍지벌레(*Matsucoccus thunbergianae* Miller and Park)는 1997년과 1998년 2월 하순에 경남 사천시 실안동의 곰솔 단순림에서 본 충에 감염된 치수목을 선발한 후 두께가 1㎝ 정도되는 가지중 2령약충 밀도가 높은 부위를 길이 20 ㎝ 정도로 절단하여 통풍이 잘 되는 비닐봉지에 넣어 실험실로 운반 후, 24시간 이내에 실험에 사용하였다.

나) 실험식물체 및 추출방법

공시식물체는 1995년과 1996년 제주도 한라수목원과 전남 완도 수목원에서 채집한 36과 70종 93시료 및 인도산 식물체 1과 1종(Tabel 1) 등 모두 37과 71종 94시료를 random 또는 anecdotal한 방법으로 채집하였다. 채집한 식물체의 추출은 50℃에서 2일간 열풍건조기(關東理化器製作所, 日本)에서 건조시킨 후 마쇄기를 이용해 분말로 만들었다. 이들 각각의 분말시료 30g씩을 취하여 500㎖ Erlenmeyer flask에 넣고 메탄올 300㎖를 부어 잘 흔든후에 실온암실하에 방치하였다. 24 48시간 후 감압농축하여 메탄올 조추출

물을 얻었으며, 이들 추출물을 살충력 검정을 위한 시료로 이용하였다. 이들 메탄올 조추출물과 정유를 이용하여 실험곤충에 대한 살충효과를 검정하였다. 한편, 인도산 식물체는 1996년 태국의 Dr. Visetson, S. (Department of Agriculture, Jatuchak, Bangkhen, Bangkok, Thailand)로부터 분양받은 Neem kernel extract를 실험재료로 사용하였다.

다) 살충활성 검정

식물체 조추출물의 솔껍질깍지벌레 2령약충에 대한 살충활성은 충체침지법으로 검정하였으며, 5,000ppm을 출발농도로하여 생물검정하였다.

생물검정에 이용한 충체침지법은 2령약충이 50마리 이상 서식하는 곰솔가지를 선발하여 5,000 ppm으로 조제한 시료용액 30㎖이 담긴 시험관(직경 2㎝, 높이 10㎝)에 1분간 침지한 후 침지가 안된 다른부위를 다시 1분간 침지 하였다. 침지한 가지는 백색의 복사용지에 올려놓은 후 실험실에 방치하고 72시간 후 현미경하에서 2령약충의 생사여부를 판정하여 살충율을 조사하였다.

생물검정의 효과평가는 살충율이 90% 이상일 경우 +++, 살충율이 61%에서 89%에 속하면 ++, 살충율이 40%에서 60% 사이일 때 +, 기타 40% 미만의 낮은 활성을 보일 경우는 -로 표시하였다.

Table 1. List of plant species to be tested

Plant species		Part collected*
녹나무	*Cinnamomum camphora*	L
왕후박나무	*Machilus thunbergii*	L
육계나무	*Cinnamomum loureirii*	B
생달나무	*Cinnamomum japonicum*	W, B
참식나무	*Neolitsea sericea*	W, L
센달나무	*Machilus japonica*	W
비목나무	*Lindera erythrocarpa*	W, B, L
감태나무	*Lindera glauca*	L
구실잣밤나무	*Castanopsis cupidata* var. *sievoldii*	L
갈참나무	*Quercus aliena*	B, L
붉가시나무	*Quercus acuta*	W
참가시나무	*Quercus salicina*	B, L
종가시나무	*Quercus glauca*	B
산벚나무	*Prunus sargentii*	W
복분자딸기	*Rubus coreanus*	L
홍가시나무	*Photinia glabra*	W, B, L
돌배나무	*Pyrus pyrifolia*	L
팔손이나무	*Fatsia japonica*	L
송악	*Hedera rhombea*	T
두릅나무	*Aralia elata*	L
음나무	*Kalopanax pictus*	W
개머루	*Ampelopsis brevipedunculata*	T
머루	*Vitis amurensis* var. *coignetiae*	T
담쟁이덩굴	*Parthenocissus tricuspidata*	L
칡	*Pueraria thunbergiana*	L+T
회화나무	*Sophora jaonica*	L
왕자귀나무	*Albizzia julibrissin*	W
향나무	*Juniperus chinensis*	L
측백나무	*Thuja orientalis*	B, L
편백	*Chamaecyparis obtusa*	L

(Continued Table 1)

Plant species		Part collected
나도밤나무	*Meliosma myriantha*	B, L, W
합다리나무	*Meliosma oldhamii*	B, L
전나무	*Abies holophylla*	B
리기다소나무	*Pinus rigida*	B
층층나무	*Cornus controversa*	B
말채나무	*Cornus walteri*	W
산초나무	*Zanthoxylum schinifolium*	L
초피나무	*Zanthoxylum piperitum*	B
조록나무	*Distylium racemosum*	W
송광납판화	*Corylopsis coreana*	L
모새나무	*Vaccinium bracteatum*	L
철쭉나무	*Rhododendron schlippenbachii* var. *schlippenbachii*	L, W
참회나무	*Euonymus oxyphyllus*	B, L
줄사철나무	*E. fortunei* var. *radicans*	L
보리수나무	*Elaeagnus umbellata*	L, T
보리밥나무	*Elaeagnus macrophylla*	L
신나무	*Acer ginnala*	B
나도박달	*Acer triflorum*	L
소사나무	*Carpinus coreana*	B, L
자작나무	*Betula platyphylla* var. *japonica*	W
목련	*Magnolia kobus*	W
튤립나무	*Liriodendron tulipifera*	L
굴피나무	*Platycarya strobilacea*	W, B
때죽나무	*Styrax japonica*	L, W
붓순나무	*Illicium religiosum*	B
소귀나무	*Myrica rubra*	L
계수나무	*Cercidiphyllum japonicum*	B, L, W
노린재나무	*Symplocos chinensis* for. *pilosa*	L
대추나무	*Zizyphus jujuba* var. *inermis*	L
아외나무	*Viburnum awabuki*	B, L

(Continued Table 1)

Plant species		Part collected
섬사스레피나무	*Eurya japonica*	L
호랑가시나무	*Ilex cornuta*	B
헛개나무	*Hovenia dulcis*	W
참느릅나무	*Ulmus parvifolia*	L, B
광대싸리	*Securinega suffruticosa*	T, L+T
모감주나무	*Koelreuteria paniculata*	B, L
벽오동	*Firmiana simplex*	B, L
플라타너스	*Platanus orientallis*	L
오동나무	*Paulowinia coreana*	B
청미래덩굴	*Smilax china*	L
Neem tree	*Azadirachta indica*	S

* B : bark, L : leaf, S : seed, T : twig, W: xylem

라) Neem kernel extract의 살충성분 분리 및 동정

Neem kernel extract의 살충성분 분리는 여러 가지 칼럼 및 HPLC를 이용하여 분리하였다(Fig. 1).

(1) 용매분획

Neem kernel 메탄올 조추출물 100 g을 증류수 800 ㎖와 헥산 800 ㎖에 녹여 2 ℓ 분획여두에 넣은 후, 마개를 닫고 시료와 두 가지 용매가 잘 섞이도록 흔들어 물층과 헥산층으로 분리한 뒤 헥산획분을 뽑아내고, 물층에 새로운 헥산 800 ㎖를 부어 동일한 방법으로 2차의 헥산층을 뽑아내었다. 남아있는 물층에 클로로포

름 800 ㎖을 붓고 마개를 닫은 다음 충분히 흔들어 물층과 클로로포름층으로 분리한 다음 클로로포름획분을 뽑아내고 물층에 새로운 클로로포름 800 ㎖를 부어 동일한 방법으로 2차의 클로로포름을 뽑아내었다. 남아있는 물층에 에틸아세테이트 800 ㎖를 부어 헥산 분배시와 동일한 방법으로 에틸아세테이트획분을 2회에 걸쳐 뽑아내었다. 또한 남아있는 물층에 부탄올 800 ㎖를 부어 역시 헥산 분배시와 동일한 방법으로 부탄올획분을 2회에 걸쳐 뽑아내었다. 이상과 같이 용매분획하여 헥산층, 클로로포름층, 에틸아세테이트층, 부탄올층을 얻었으며, 각 획분을 회전진공농축기로 45℃에서 농축하였다. 각각의 획분에 대해 살충활성을 검정하였다.

(2) 컬럼크로마토그래피

생물검정 결과 강한 살충활성을 보인 헥산층 획분 3.41g을 100% 클로로포름에 녹였다. 유리제 칼럼 (Φ 5.5 ×70 ㎝, PTEE end plate 부착)에 실리카겔 500 g을 클로로포름으로 습식충진한 다음 용매에 녹인 헥산층 획분을 피펫으로 충진시킨 후 클로로포름 100%를 1000 ㎖ 흘렸고 순차적으로 클로로포름과 메탄올을 25/1, 15/1, 5/1 (v/v)로 흘린 후 마지막엔 100% 메탄올로써 용출시켰다. 분취한 시료는 박층크로마토그래피(Thin Layer Chromatography, TLC)에 의해 클로로포름과 메탄올을 부피비로 섞어 전개시킨다음, TLC plate상에 전개된 band pattern을 UV hand lamp (UVGL-58, UV-254/366nm, UVP Inc.)로 확인하였으며 동일 spot으로 확인되면 서로 합쳐 감압농축한 후 생물검정을 행하였다. 살충활성을 보인 분취시료를 다시 크로로포름과 메탄올 (25/1, V/V) 용매시스템으로 크마토그래피를 실시하였다. 분취시

료는 UV hand lamp로 확인 후 감압농축하였다.

(3) HPLC (High performance liquid chromatography)

컬럼크로마토그래피와 TLC로 분리하고 생물검정을 거친 각각의 활성획분은 먼저 UV spectrophotometer (HP 8452A Diode Array Spectrophotometer, Hewlett Packard)를 이용하여 최대 흡수파장을 검색한 뒤 (reference solvent: methanol) Thermo Seperation Products HPLC system을 사용하여 정제하였다. 칼럼은 C_{18} semi-prep. column (7.8 ㎜ × 30 ㎝, particle size 10 micron)을 사용하였고 용매는 물과 메탄올을 3 : 7의 비율로 섞어 사용하였으며 flow rate는 1 ㎖/min. 으로 하고 파장을 217 ㎚로 하였다. 시료는 0.25 ㎖ syringe에 0.1 ㎖를 넣어 사용하였다.

(4) 살충 성분의 화학구조 결정

최종 정제된 살충성분에 대해 UV (JASCO, V-550), EI-MS (JEOL, AX505-WA, 70eV), CI-MS (JEOL, AX505-WA, 70eV), ^{1}H-NMR (JEOL, JNM-LA 400, 400MHz) 및 ^{13}C-NMR (JEOL, GSX-400, 100MHz, TMS as internal standard)을 통하여 화학구조를 결정하였다.

마) 야외방제효과 검정

실내 살충활성 검정에서 강한 살충효과를 보인 인도산 식물체 neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss) 열매의 추출물을 이용하여 1996년 12월과 1997년 12월에 전남 진도군에서 흉고직경 ㎝당 0.6㎖씩(솔껍질깍지벌레 현행 약제주입량) 수간주입하였으며, 처리내역은 neem 추출물 단독처리,

neem 추출물과 phosphamidon 혼합처리(1:1혼합), carvacrol과 phosphamidon 혼합처리, phosphamidon 단독처리 및 무처리 등 3본씩 난괴법 3반복으로 시험구 처리하였다.

방제효과 조사는 솔껍질깍지벌레 성충이 완전히 우화한 다음해 5월에 3단 고절가위(약 5m)를 이용하여 공시목에서 4방향의 1차 측지 1개씩을 절단한 후 절단한 가지에 달린 잎을 완전히 제거하고 가지를 20㎝ 정도로 잘라 통풍이 잘되는 비닐에 담아 실험실로 운반하였으며, 후약충 탈피각수(생충)와 2령약충(후약충) 폐사충수를 검경조사하여 살충율을 구하였다. 각 처리구에 대한 통계분석은 SAS(1987)를 이용 Tukey's test로 검정하였다.

나. 결 과

1) 식물체 추출물의 솔껍질깍지벌레에 대한 살충활성

71종 식물체 94시료의 메탄올 조추출을 5,000 ppm으로 희석하여 솔껍질깍지벌레 2령약충에 대한 살충효과를 충체침지법을 이용하여 검정하였고, 처리 72시간 후에 살충효과를 조사한 결과는 Table 2에 나타내었다. Neem kernel 메탄올 조추출물에서만 90% 이상의 높은 살충활성을 나타내었고, 초피나무(*Zanthoxylum piperitum*) 수피 추출물과 비목나무(*Lindera erythrocarpa*) 잎 추출물은 70 %의 살충활성을 보였으나 기타 식물체들은 활성을 나타내지 않았다(Table 2).

Table 2. Insecticidal activity of plant extracts against *M. thunbergianae* determined by insect dipping method.

Plant species[a]	Insecticidal activity[b]
Azadirachta indica	+++
Zanthoxylum piperitum	++
Lindera erythrocarpa	++

[a] Plants showing insecticidal activity with >70% are presented.

[b] Mortality>90%, +++; 90 61, ++; 40 60, +; <40%, -.

2) *Azadirachta indica* 열매 추출물의 살충활성

식물체 메탄올 조추출물 중에서 *Azadirachta indica* 열매 추출물에서만 강한 활성을 보였기 때문에 neem kernel 메탄올 조추출물 100 g을 증류수 800 mℓ와 헥산 800 mℓ에 녹여 용매분획하여 헥산층, 클로로포름층, 에틸아세테이트층, 부탄올층을 얻었으며, 각 획분을 회전진공농축기로 45℃에서 농축한 후 각각의 획분 2,000 ppm으로 살충활성을 검정하였다. 그 결과 헥산층에서 100%의 살충활성을 보였으며 다른 획분에서는 활성이 없었다 (Table 3).

Table 3. Insecticidal activity of solvent fractions of neem kernel extract against *M thunbergianae* determined by insect dipping method.

Fraction	Motality (%) (±SEM)
Hexane Fr.	100.0 a[a]
Chloroform Fr.	20.5 ± 4.5 b
Ethyl acetate Fr.	23.7 ± 5.1 b
Butanol Fr.	18.0 ± 3.4 b

[a]Means followed by the same letter in column are not significantly different (*P*= 0.05; Tukey's test 〔SAS Institute 1987〕).

3) *Azadirachta indica* **열매 추출물로부터 솔껍질깍지벌레에 대한 살충성분 분리**

최종 정제된 살충성분에 대해 UV (JASCO, V-550), EI-MS (JEOL, AX505-WA, 70eV), ^{1}H-NMR (JEOL, JNM-LA 400, 400MHz), ^{13}C-NMR**을 통하여 화학구조를 결정하였다. 이러한 스펙트럼 자료는** Kraus **등**(1985)**의 자료와 일치하여** azadirachtin ($C_{35}H_{44}O_{16}$)**으로 동정하였으며 그 분자구조는** Fig. 2**와 같다. 또한,** NMR spectral data**를 요약하여** Table 4**에 정리하였다.**

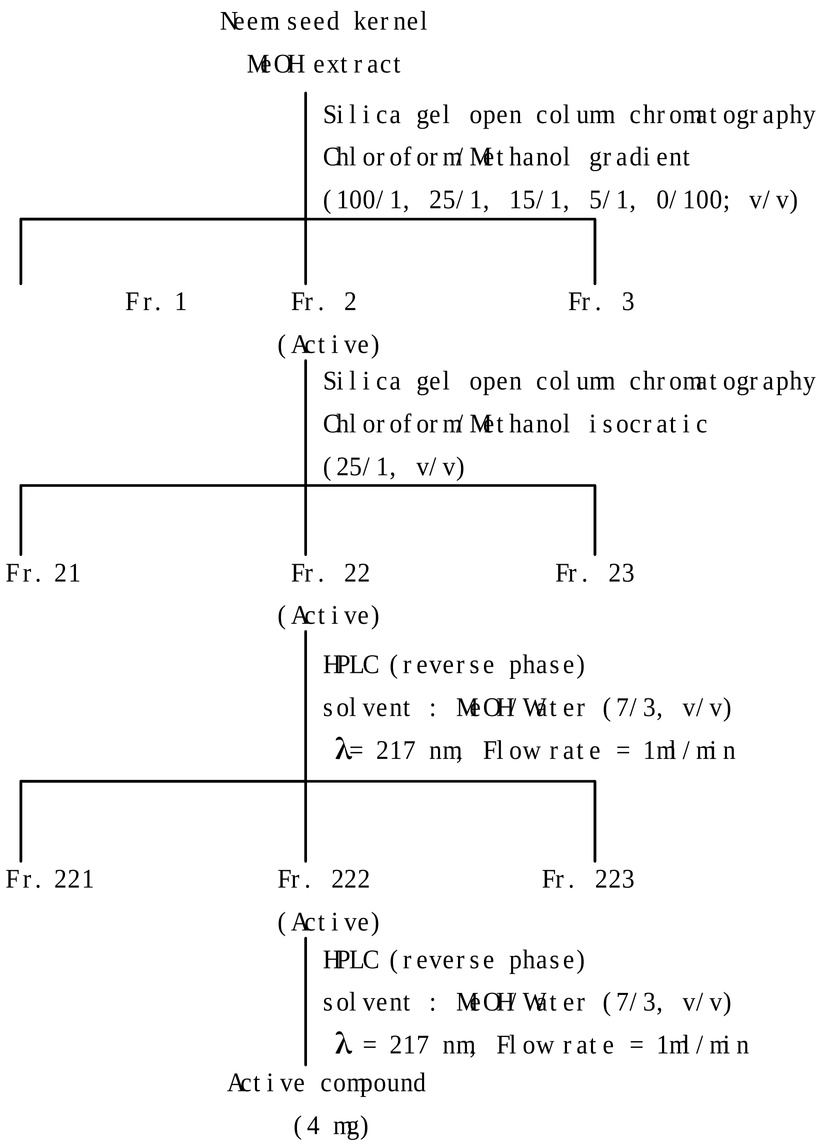


Fig. 1. Isolation precedure of active compound from neem seed kernel extract

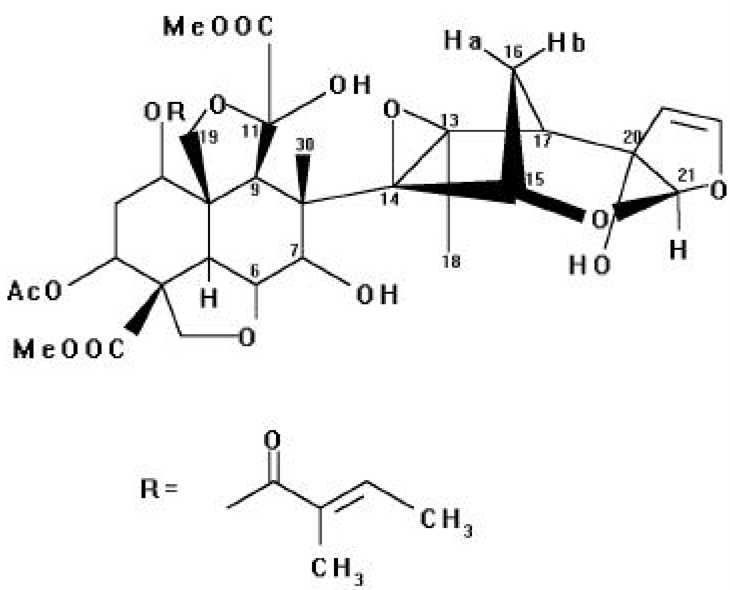


Fig. 2. Chemical structure of azadirachtin.

Table 4. ^{1}H-NMR (400 MHz) and ^{13}C-NMR (100 MHz) spectral data ($CDCl_3$, TMS=0) of the isolate

^{1}H	Isolate	^{13}C	Isolate
1-H	4.75(dd, 2.9; 3.1)	C-1	70.52(d)
2-H(α)	2.23(ddd, 16.7; 2.9; 2.7)	C-2	29.79(t)
2-H(β)	2.19(ddd, 16.7; 3.1; 2.9)	C-3	67.00(d)
3-H	5.49(dd, 2.7; 2.9)	C-4	52.51(s)
5-H	3.33(d, 12.5)	C-5	37.10(d)
6-H	4.57(dd, 12.5; 2.7)	C-6	73.76(d)
7-H	4.65(d, 2.7)	C-7	74.43(d)
9-H	3.34(s)	C-8	45.39(s)
15-H	4.60(d, 3.4)	C-9	44.70(d)
16-H(a)	1.69(ddd, 13.0; 3.4; 5.1)	C-10	50.18(s)
16-H(b)	1.29(d, 13.0)	C-11	104.19(s)
17-H	2.38(d, 5.1)	C-12	171.79(s)
18-H	1.99(s)	C-13	69.12(s)
19-H(a)	3.60(d, 9.6)	C-14	70.51(s)
19-H(b)	4.14(d, 9.6)	C-15	76.68(d)
21-H	5.62(s)	C-16	25.03(t)
22-H	5.03(d, 2.9)	C-17	48.68(d)
23-H	6.44(d, 2.9)	C-18	18.38(q)
28-H(α, β)	4.06(d, 9.0)	C-19	69.12(t)
	3.75(d, 9.0)	C-20	83.62(s)
30-H	1.73(s)	C-21	108.83(d)
7-OH	2.74(br.s)	C-22	107.38(d)
11-OH	4.99(s)	C-23	147.19(d)
20-OH	2.78(br.s)	C-28	73.03(t)

^{1}H	Isolate	^{13}C	Isolate
3^1-H	6.90(qq, 7.0; 1.5)	C-29	173.35(s)
4^1-H	1.76(dq, 7.0; 1.1)	C-30	21.32(q)
5^1-H	1.83(dq, 1.5; 1.1)	C-1^1	166.24(s)
CH_3COO	1.93(s)	C-2^1	128.69(s)
$COOCH_3$	3.77(s)	C-3^1	137.56(d)
	3.67(s)	C-4^1	14.31(q)
		C-5^1	11.97(q)
		CH_3COO	169.64(s)
		CH_3COO	20.90(q)
		$COOCH_3$	53.30(q)
			52.76(q)

4) **살충활성물질의 야외적용시험결과**

해송의 주요 해충인 솔껍질깍지벌레의 효율적 방제제 개발을 위하여 1-2**차년도에서 강한 살충효과를 보인 인도산 식물체** neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss)**의 추출물중** azadirachtin**이** 1.5%**와** 4.5% **함유된 물질을 이용 수간주입 효과를 검정하였는데**, azadirachtin 4.5% **함유물의 경우 사충율** 78.0%**로서** phosphamidon **단독처리** 79.5%**와 비슷한 효과를 나타내었으며** azadirachtin 1.5%**함유물의 경우에는** 61.4%**의 약간 저조한 사충율을 보였다**. **그러나** azadirachtin 1.5%**와** phosphamidon**을** 1 : 1**로 혼합하여 처리할 경우 다른 처리구에 비하여 월등하게 높은** 93.8% **의 살충효과를 나타내었다**. **또한**, phosphamidon**과** carvacrol **혼합처리구는** 86.9%**로서**

phosphamidon **단독처리보다는 높은 살충효과를 보였다**(Table 5).

Table 5. Susceptibility of *Matsucoccus thunbergianae* intermediate nymph (second instar) to phosphamidon alone and in mixture with neem seed kernel extract by trunk implantation application

Chemical	Dose (㎖/cm in DBH)	Mortality (%) (±SEM)[a]
Neem extract (1.5%)[c]	0.6	61.4 (±2.7) c[b]
Neem extract (4.5%)	0.6	78.0 (±2.9) b
Neem extract (1.5%) + Phosphamidon	0.3 + 0.3	93.8 (±3.9) a
Carvacrol + Phosphamidon	0.3 + 0.3	86.9 (±2.1) ab
Phosphamidon	0.6	79.5 (±3.6) b
Untreated	-	1.8 (±0.8) d

[a] Treated on 5 December 1997 and determined on 2 May 1998.

[b] Means followed by the same letter in column are not significantly different (P= 0.05; Tukey's test 〔SAS Institute 1987〕).

[c] Azadirachtin content.

2. 나한백톱밥으로부터 솔잎혹파리에 대한 살충활성물질 탐색

가. 재료 및 방법

1) 솔잎혹파리에 대한 살충활성성분의 분리 및 동정

가) 실험곤충

한방식물체의 살충활성검정을 위한 솔잎혹파리(*Thecodiplosis japonensis* Uchida et Inouye) 유충은 경기도 미금시 금곡동 금곡릉 주변 소나무림에서 1993년 9월 13일에 충영을 채집하였고, 한라산 식물체의 검정을 위한 유충은 강원도 횡성군 일대의 피해지에서 1995년 9월 22일에 충영을 채집하였다. 충영엽을 통풍이 잘되는 비닐봉지에 넣어 실험실로 운반 후, 충영이 형성된 엽만을 선별하고 예리한 칼날로 충영을 개봉하고 난 후, 유충을 부드러운 붓으로 물이 들어 있는 페트리디쉬에 털어내고 건전한 유충만을 골라 실험에 사용하였다.

나) 실험식물체 및 추출방법

공시식물체는 서울 경동시장에서 구입한 한약재 42과 79종(Table 6), 제주도산 식물체의 경우 한라수목원에서 1994년 8월에 채집한 19과 43종 및 일본원산 1과 1종(Table 7) 등 모두 62과 123종 127시료를 random 또는 anecdotal한 방법으로 채집·구입하였다. 일본원산 식물체인 *T. dolabrata* var. *hondai* 톱밥의 경우, 에테르를 이용 수증기

증류 (steam distillation) 하여 정유를 얻었고, 기타의 식물체는 50℃에서 2일간 열풍건조기(關東理化器製作所, 日本)에서 건조시킨 후 마쇄기를 이용해 분말로 만들었다. 이들 각각의 분말시료 30g씩을 취하여 500㎖ Erlenmeyer flask에 넣고 메탄올 300㎖를 부어 잘 흔든후에 실온암실하에 방치하였다. 24 48시간 후 감압농축하여 메탄올 조추출물을 얻었으며, 이들 추출물을 살충력 검정을 위한 시료로 이용하였다. 이들 메탄올 조추출물과 정유를 이용하여 실험곤충에 대한 살충효과를 검정하였다.

다) 살충활성 검정

식물체 조추출물의 솔잎혹파리 유충에 대한 살충활성은 조 등(1987), 안과 조(1992), 안 등(1992)의 방법에 따라 검정하였다. 조추출물의 출발농도가 너무 높을 경우에는 미생물에 의해서 부패되기 쉽고 너무 낮을 경우에는 추출물중에 미량으로 존재하는 활성본체를 놓칠 확률이 높기 때문에 (조 등, 1987), 본 실험에서는 5,000ppm을 출발농도로하여 생물검정하였다.

생물검정에 이용한 filter paper-impregnated method는 여지(ϕ 6cm) 1매를 추출물 용액에 5초간 침지하여 hood내에서 30분가량 풍건시킨 다음, 동일 직경의 페트리디쉬 바닥에 깔고서 약간의 수분을 분무한 후 솔잎혹파리 유충 20마리를 넣어주었다. 뚜껑을 덮어 준 뒤 빛 차단과 외부로의 수분증산을 방지하기 위해 습지를 위에 덮고나서 실험실에 방치하고 처리 48시간 후에 현미경하에서 살충율을 조사하

였다. 또한 충체침지법은 유충 20마리를 Effendorf tube에 넣어두고 5,000 ppm으로 조제한 시료용액을 피펫을 이용하여 0.5㎖을 취한 후, 유충이 들어 있는 tube에 15초간 침지하였다. 침지한 유충은 micro-tib을 충이 충분히 빨려 올 수 있도록 끝을 절단하고 마이크로피펫을 이용하여 취한 후 용액과 충을 함께 여지(ϕ 6cm)가 깔려있는 페트리디쉬(ϕ 6cm)에 처리하였다. 이후의 방법은 filter paper 방법과 동일하게 실행하였다.

생물검정의 효과평가는 살충율이 90% 이상일 경우 +++, 살충율이 61%에서 89%에 속하면 ++, 살충율이 40%에서 60% 사이일 때 +, 기타 40% 미만의 낮은 활성을 보일 경우는 -로 표시하였다.

Table 6. Oriental medicinal plant species to be tested

	Plant species	Part collected
당귀	*Angelica reticulata*	root
백지	*Angelica dahurica*	root
사상자	*Torilis japonica*	seed
시호	*Bupleurum falcatum*	root
전호	*Anthriscus sylvestris*	root
방풍	*Ledebourella seseliodes*	root
긴잎개회나무	*Syringa reticulata*	leaf
진피	*Fraxinus rhynchiphylla*	leaf
부자	*Aconitum carmichaeli*	root
진범	*Aconitum erectum*	root
위령선	*Clematis florida*	root
작약	*Paeonia japonica.*	root
갈근	*Pueraria thunbergiana*	root
황기	*Astagalas membranaceus*	root
땅비싸리	*Indigofera kirilowi*	root
조각자	*Gleditsia sinensis*	stem
대황	*Rheum undulatum*	root
하수오	*Pleuropterus tripliana*	root
도인	*Prunus persicae*	seed
산사	*Crategus maximowiczii*	flower
황매화	*Kerria japonica*	seed
섬개야곰나무	*Cotoneaster wilsonii*	seed
참조팝나무	*Spiraea fritschiana*	leaf
조팝나무	*Spiraea prunifolia* var. *simplociflora*	leaf
독활	*Aralia continentalis*	root
해동피	*Kalopanox pictum*	root
두릅나무	*Aralia elata*	root

(Continued Table 6)

Plant species		Part collected
두충	*Eucommia ulmoides*	leaf
만형자	*Vitex rotundifolia*	seed
맥문동	*Liriope platyphylla*	root
목향	*Inula helenium*	root
우방자	*Arctium lappa*	root
인진	*Artemisia messerschmidtiana*	stem
창출	*Atractylodes japonica*	root
홍화	*Carthamus tinctorium*	flower
미나리	*Oenanthe decumbens*	stem
백모근	*Imperata cylindrica*	root
빈랑	*Beckmannia syzigachne*	root
백하수오	*Cynanchum carmichaeli*	root
사간	*Belamcanda chinensis*	root
삼지구엽초	*Epimedium koreanum*	root
황련	*Coptis japonica*	root
세신	*Asarum sieboldii*	leaf
신이화	*Magnolia kobus*	root
흑오미자	*Schizandra migra*	root
원지	*Polygala tatarinow*	root
익모초	*Leonurus sibiricus*	leaf
형개	*Schizonepta tenuifolia* var. *kaponica*	leaf
자초	*Lithospermum erythrorhizon*	stem
지각	*Citrus aurantium*	fruit
탱자나무	*Poncitrus trifoliata*	fruit
황백	*Phellodendron amurense*	stem
지실	*Citrus aurantium*	root
길경	*Platycodon fradiflorum*	root

(Continued Table 6)

	Plant species	Part collected
사삼	*Condonopsis lanceolata*	root
청괴불나무	*Lonicera subsessilis*	stem
금은화	*Lonica japonica*	flower
토사자	*Cuscuta japonica*	fruit
향부자	*Cyperus rotundus*	fruit
삼릉	*Scirpus fluviatilis*	root
현삼	*Scrophylaria buergeriana*	root
목적	*Eqisetum hyemale*	stem
목통	*Akebia quinata*	stem
산조인	*Zizyphus jujuba*	root
초룡담	*Gentiana scabra*	root
포황	*Typha orientalis*	plant
과루인	*Trichosantes kirilowii*	root
참회나무	*Euonymus oxyphyllus*	leaf
나래회나무	*Euonymus macroptera*	leaf
대팻집나무	*Ilex macropoda*	leaf
수국	*Hydrangea macrophylla*	flower
까마귀밥따름	*Ribes fasciculatum*	leaf
매화말발도리	*Deutzia coreana*	root
가시말발도리	*Deutzia parviflora*	stem
물참대	*Deutzia glabrata*	root
현호색	*Corydalis turrschaninovii*	root
철쭉	*Rhododendron schlippenbachii*	flower
개오갈피	*Eleuterococcus senticosus*	stem
지모	*Anemarrhem asphodeloides*	root

Table 7. Mt. Han-la plants to be tested

	Plant species	Part collected
감탕나무	*Ilex integra*	leaf
말오줌때나무	*Euscaphis japonica*	leaf
털머위	*Farfugium japonicum*	leaf
중대가리	*Adina rubella*	leaf
합다리	*Meliosma oldhamii*	leaf
육박나무	*Lozoste lancifolia*	leaf
생달나무	*Cinnamomum japonicum*	leaf
생달나무	*Cinnamomum japonicum*	stem
새덕이	*Neolitsea aciculata*	leaf
후박	*Machilus thumbergii*	seed
후박	*Machilus thumbergii*	leaf
녹나무	*Cinnamomum camphora*	leaf
참식	*Neolitsea sericea*	leaf
센달나무	*Machilus japonica*	leaf
까마귀쪽	*Litsea jpaponica*	leaf
사람주나무	*Sapium japonicum*	leaf
굴거리	*Daphniphyllum macropodum*	leaf
예덕나무	*Mallotus japonicus*	leaf
멀구슬나무	*Melia azedarach* var. *japonica*	fruit
남오미자	*Kadsura japonica*	leaf
광나무	*Ligustrum japonicum*	leaf
황철	*Populus maximowiczii*	leaf
녹보리똥나무	*Elaeagnus maritima*	leaf
큰보리장	*Elaeagnus submacrophylla*	leaf
꾸지나무	*Broussonetia papyrifera*	leaf
삼백초	*Saururus chinensis*	leaf
석류나무	*Punica granatum*	leaf

(Continued Table 7)

	Plant species	Part collected
소귀나무	*Myrica rubra*	leaf
잣나무(정상)	*Pinus koraiensis*	leaf
잣나무(피해)	*Pinus koraiensis*	leaf
검양옻나무	*Rhus succedanea*	leaf
머귀나무	*Zanthoxylum ailanthoides*	leaf
쉬나무	*Evodia daniellii*	leaf
황벽나무	*Phellodendron amurense*	leaf
초피나무	*Zanthoxylum piperitum*	leaf
멀꿀	*Stauntonia hexaphylla*	leaf
이나무	*Idesia polycarpa*	leaf
이나무	*Idesia polycarpa*	seed
딧나무	*Sambucus sieboldiana*	leaf
아왜나무	*Viburnum awabuki*	leaf
조록	*Distylium racemosum*	leaf
후피향나무	*Ternstroemia japonica*	leaf
개가시나무	*Quercus gilva*	leaf
붉가시	*Quercus acuta*	leaf
종가시나무	*Quercus glauca*	leaf
된장풀	*Desmodium heterocarpon*	leaf
뽕잎피나무	*Tilia taquetii*	leaf
나한백[1]	*Thujopsis dolabrata* var. *hondai*	sawdust

[1]The sawdust was obtained from Aomori Forest Experimental Station, Aomori, Japan. The crude oil of the sawdust was obtained by steam distillation.

라) *Thujopsis dolabrata* var. *hondai* **톱밥의 살충성분 분리 및 동정**

공시 식물체의 1**차 스크리닝결과** *Thujopsis dolabrata* var. *hondai* **톱밥의 수증기 증류물이 솔잎혹파리에 대하여 강력한 살충효과를 보였기 때문에, 이 수증기 증류물의 살충활성을 조사하였다. 정유는** Ahn **등**(1995)**의 방법에 따라 물과 에테르로 수증기 증류하여 얻었으며, 이 정유를 다시** centrifugal thinfilm evaporator**로** 4**개의 분획을 얻어 솔잎혹파리에 대한 살충효과를 검정하였다. 정유** 500 g**을** 85℃, 5 torr**로 하여 무색의** Fraction Ⅰ 32 g**을 얻었고, 잔획물을** 95℃, 0.95 torr **조건으로하여 청색의** Fraction Ⅱ 165g**을 얻었다. 다시 나머지를** 90℃, 0.5 torr**로 하여 적색의** Fraction Ⅲ 143 g**과 흑색의** Fraction Ⅳ 160g**을 얻었다. 또한,** Ahn **등**(1995)**에 의해** *T. dolabrata* var. *hondai* **톱밥 수증기 증류물 분획중** Fr I**의 화합물로서** cedrol, α-terpinol, β-thujaplicine **및** carvacrol**이 분리 동정되였으며, 이 물질들이 수종의 해충에 대하여 강한 살충활성을 보인다고 보고하였으므로(이와 안,** 1995) **이들 화합물과 테르펜 화합물인** thujone, thymol **등을 구입하여 살충활성 검정에 이용하였다. 살충활성 검정에 이용한 표준품**(authentic samples)**으로서** cedrol, α-terpinol, β-thujaplicine**은** Funakoshi Chemical Co.**에서** carvacrol**은** Wako Chemical Co.**에서 구입하였다.**

마) 솔잎혹파리에 대한 방제효과 검정

솔잎혹파리에 대한 실내시험 결과 살충효과가 우수한 carvacrol의 야외방제효과를 검정하기 위하여 수간주입법을 이용 야외시험을 실시하였다. 1994년 6월 15일 강원도 평창군 진부면의 피해임지에서 carvacrol 원액 및 phosphamidon (2-chloro-2-diethyl carbamoyl-methyl vinyl dimethyl phosphate, 50% LC)을 공시하였으며 소나무에 천공기를 이용하여 구멍을 뚫은 후, carvacrol은 흉고직경 cm당 0.1㎖, 0.3㎖를 주입하였고, phosphamidon은 현재 이용되고 있는 액제 주입농도인 0.3㎖ 씩을 주입하였으며 carvacrol과 phosphamidon을 1:1의 비율로 혼합한 액 0.3㎖를 주입하였다. 시험구배치는 처리구당 3본씩 난괴법 3반복으로 배치하였고, 효과조사는 1994년 9월 20일에 실시하였다. 또한 1995년 6월 20일 강원도 강릉시 연곡면 삼산리 소금강지역의 피해임지에서 phosphamidon (0.3㎖/㎝ in DBH), carvacrol과 phosphamidon을 0.15㎖씩 1:1로 혼합한 액을 흉고직경 ㎝당 0.3㎖씩 처리하였으며, 시험구는 1994년과 동일한 방법으로 배치하였다.

Neem 열매 추출물의 야외 방제효과 검정은 1997년 6월 17일 평창군 도암면 대관령목장 주변의 피해임지에서 neem 추출물, phosphamidon, carvacrol과 phosphamidon 혼합액(1:1) 및 neem 추출물과 phosphamidon 혼합액(1:1)을 상기한 방법과 동일하게 수간주입하였다. 시험구배치는 처리구당 3본씩 난괴법 3반복으로 처리하였으며, 효과조사는 1997년 9월 8일 12일에 실시하였다. 한편, 솔잎혹파리에 대한

살충효과 조사시 neem 추출물 처리구의 유충이 타 처리구에 비하여 유충길이가 현저히 크게 관찰되어 각 처리구의 유충 생장상황을 조사 비교하였다.

방제효과 조사는 3단 고절가위(약 5m)를 이용하여 공시목에서 가지를 절단한 후 절단한 가지에 달린 1년생 가지를 임의로 1본당 10개씩 선택하여 통풍이 잘되는 비닐에 담아 실험실로 운반하였으며, 피해엽을 절개하여 유충의 생사여부를 검경조사하여 살충율을 구하였다. 각 처리구에 대한 통계분석은 SAS(1987)를 이용Tukey's test로 검정하였다.

나. 결 과

1) 식물체 추출물의 솔잎혹파리에 대한 살충활성

123종 식물체 127시료의 메탄올 조추출물과 수증기 증류물 10% 에탄올용액의 솔잎혹파리 유층에 대한 살충효과를 여지접촉법과 충체침지법을 이용하여 검정하였고, 처리 48시간 후에 살충효과를 조사한 결과, 산형과(Umbellifera)의 방풍(*L. seseloides*)이 70%, 미나리아재비과(Ranunculaceae)의 진범(*A. pseudo-leave* var. *erectum*)·부자(*A carmichaeli*)·위령선(*C. florida*)등이 모두 90% 이상의 높은 살충활성을 나타내었고, 측백나무과(Cupressaceae)의 *T. dolabrata* var. *hondai*의 수증기 증류물 또한 매우 강한 살충활성을 보였다(Table 8). 그러나 기타 식물체들은 활성을 나타내지 않았다.

Table 8. Insecticidal activity of plant extracts against *T. japonensis* determined by filter paper-impregnated and insect dipping methods.

Plant species[a]	Treatment[b]	
	Filter paper-impregnated[c]	Insect dipping[d]
Ledebouriella seseloides	++	+
Aconitum pseudo-laeve var. *erectum*	+++	+
Aconitum carmichaeli	+++	+
Clematis florida	+++	+
Thujopsis dolabrata var. *hondai*	+++	+

[a] Plants showing insecticidal activity with >70% are presented.

[b] Mortality>90%, +++; 90 61, ++; 40 60, +; <40%, -.

[c] Treated with 10 mg/filter paper(ϕ 6cm).

[d] Treated with 5,000 ppm.

2) *T. dolabrata* var. *hondai* **톱밥 추출물의 살충활성**

식물체 조추출물 중에서 측백나무과의 *T. dolabrata* var. *hondai* **톱밥의 수증기 증류물이 솔잎혹파리 유충에 대하여** 100%**의 강한 활성을 보였기 때문에**, **이 식물체 수증기 증류물의 살충활성을 조사하였다**.

톱밥 수증기 증류물의 분획층 중에서 무색의 Fr. I**이**

100%의 높은 활성을 나타냈고, 청색층의 Fr. Ⅱ는 58%의 살충효과를 보였으나, 적색층의 Fr. Ⅲ과 흑색층의 Fr. Ⅳ는 낮은 살충활성을 나타내었다(Table 9).

Table 9. Larvicidal activity of the crude fractions of *Thujopsis dolabrata* var. *hondai* against *T. japonensis*.

Fraction[a]	Motality (%) (±SEM)
Fr. Ⅰ	100.0 ± 0.0 a
Fr. Ⅱ	58.3 ± 4.4 b
Fr. Ⅲ	26.7 ± 3.3 c
Fr. Ⅳ	10.0 ± 0.0 c

Means followed by the same letter in column are not significantly different
(P= 0.05; Tukey's test 〔SAS Institute 1987〕).
[a] 10 ㎎/filter paper (ϕ 6 ㎝).

Fraction Ⅰ의 성분은 Ahn 등(1995)에 의하여 carvacrol, β-thujaplicine, cedrol, α-terpinol 등의 monoterpenoid류로 밝혀진 바 있어, 이들 4종 화합물 및 테르펜 화합물인 thujone과 thymol을 공시하여 살충활성을 검정한 결과, Table 10에 나타낸 바와 같이 carvacrol은 1㎎ 수준에서는 다른 화합물에 비해 유의성이 관찰되었으나 살충활성은 75.5%로 비교적 낮았고, 10㎎ 처리시에는 유의성은 없었으나 살충활성에 있어서는 93.3%로 높은 살충력을

나타내었다.

Table 10. Larvicidal activity of *Thujopsis dolabrata* var. *hondai*-derived materials and terpenoids against *T. japonensis*.

Compound	[a]Mortality (%) (± SEM)		
	1	5	10[b]
Carvacrol	75.5±2.3 a	79.0±3.8 a	93.3±1.7 a
β-Thujaplicine	67.3±3.7 ab	70.0±5.8 a	73.3±4.4 a
Cedrol	59.3±5.8 abc	70.0±5.8 a	70.0±7.6 a
α-Terpinol	52.7±6.4 abc	55.0±5.0 a	70.0±7.6 a
Thujone	47.7±3.9 bc	65.0±5.0 a	67.7±4.3 a
Thymol	42.3±6.2 c	60.0±5.8 a	76.3±4.5 a

[a] Means followed by the same letter in column are not significantly different
(*P*= 0.05; Tukey's test 〔SAS Institute 1987〕).

[b] Application rate, mg/paper (ϕ 6 cm).

3) 야외 방제효과

현재 솔잎혹파리 방제를 위해 수간주입 약제로 이용되고 있는 phosphamidon을 대조약제로 하여 carvacrol과 혼합 또는 단독 처리하였을 때의 살충효과를 2년차에 걸쳐 강원도 지역의 솔잎혹파리 피해지에서 조사하였다. Table 11은 1994년 시험결과로서 흉고직경 ㎝당 carvacrol 0.3㎖ 처리

시 10.8%의 사충율을 보여 극히 낮은 살충효과를 보였으며, phosphamidon 0.3㎖ 처리시에는 81.8%의 높은 살충효과를 나타내었다. 한편 phosphamidon과 carvacrol을 각각 0.15㎖씩 혼합하여 처리하였을 때의 사충율은 95.0%로서 phosphamidon 단독처리 보다 더 높은 살충활성을 보였으며, 이들 약제간에 협력작용(synergism)이 있는 것으로 판단된다.

또한 Table 12는 1995년 6월 20일에 처리구당 3본씩 난괴법 3반복으로 배치하여 당년 9월 25일에 효과조사를 한 결과로서, 94년도 결과와 동일하게 carvacrol과 phosphamidon을 혼합처리하였을 때, phosphamidon의 단독처리보다 살충효과가 우수하였다. 또한 충영형성율에 있어서도 phosphamidon과 carvacrol을 혼합처리한 경우 5.0%로서 대조구(55.6%)에 비해 현저하게 낮았다.

Table 11. The synergistic effect of the carvacrol by trunk implantation application in 1994.

Chemical	Dose (mℓ/cm in DBH[a])	[b]Mortality (%) (±SEM)
Carvacrol	0.1	0.0 d
Carvacrol	0.3	10.8 ±1.4 c
Phosphamidon (50% LC)	0.3	81.8 ±6.5 ab
Phosphamidon + Carvacrol	0.15 + 0.15	95.0 ±5.3 a
Untreated	-	1.8 ±0.7 d

[a] Diameter of Breast Height.

[b] Mean followed by the same letter in column are not significantly different
(P = 0.05; Tukey's test 〔SAS Institute 1987〕).

Table 12. The synergistic effect of the carvacrol by trunk implantation application in 1995.

Chemical	Dose (mℓ/cm in DBH)	Gall formation (%) (±SEM)	[a]Mortality (%) (±SEM)
Phosphamidon (50% LC)	0.3	12.0 ±1.5 b	83.4 ±1.6 c
Phosphamidon + Carvacrol	0.15 + 0.15	5.0 ±1.8 b	92.3 ±2.5 b
Untreated	-	55.6 ±3.3 a	2.0 ±0.6 a

[a] Means followed by the same letter in column are not significantly different (P=0.05; Tukey's test 〔SAS Institute 1987〕).

3. 황련(*Coptis japonica*)으로부터 오리나무잎벌레(*Agelastica coerulea*) 및 흰불나방(*Hyphantria cunea*)에 대한 섭식저해제 분리 및 동정

가. 재료 및 방법

1) 실험곤충

미국흰불나방은 서울대학교 농업생명과학대학내 버즘나무에서 채집하였다. 오리나무잎벌레 성충은 홍릉수목원내 물오리나무에서 채집하였다. 두 곤충 모두 25℃, 상대습도 65%, 명암 16:8(명:암) 조건으로 흰불나방의 경우 버즘나무 잎으로, 오리나무잎벌레의 경우 물오리나무 잎으로 사육하였다.

2) 화합물

실험에 사용한 화합물(Berberine chloride, palmatine iodide, coptisine chloride)은 Sigma에서 구입하였다.

3) 섭식저해제 분리 및 동정

실험식물체인 황련뿌리(4.5 kg)는 경동시장내 한약방에서 구입하였다. 60℃에서 2일간 건조기에서 건조시킨 후 마쇄하여 분말로 만들고 나서 20L 메탄올을 부어 잘 흔든 후에 실온 암실하에 방치하였다. 3일후 감압여과하고 회전진공농축기 (EYELA autojack NAJ-160, Japan)로 40℃에서 감압농축하여 메탄올 조추출물을 얻어, 생물검정 시료로 이용하였다. 메탄올추출물 수율은 21%였다. 메탄올추출물은 hexane(70.9g), chloroform(37.8g), ethyl acetate(14.2g), butanol (165.4g) 그리고 물층(656.7g)으로 분획한 후 생물검정에 사용하였다. 활성이 확인된 chloroform층은 유리칼럼을 이용하여 분리하였다. Chloroform과 methanol을 이용하여 (1, 2.5, 5, 10%) 분리하였고 10% 층에서 강한섭식기피활성을 보였다. 최종 순수물질은 HPLC(high performance liquid chromatography)와 Prep. TLC를 이용하여 분리하였다(Fig. 3). 분리된 순수물질의 화학구조는 ^{1}H-NMR과 ^{13}C-NMR 그리고 질량분석기를 이용하여 동정하였다.

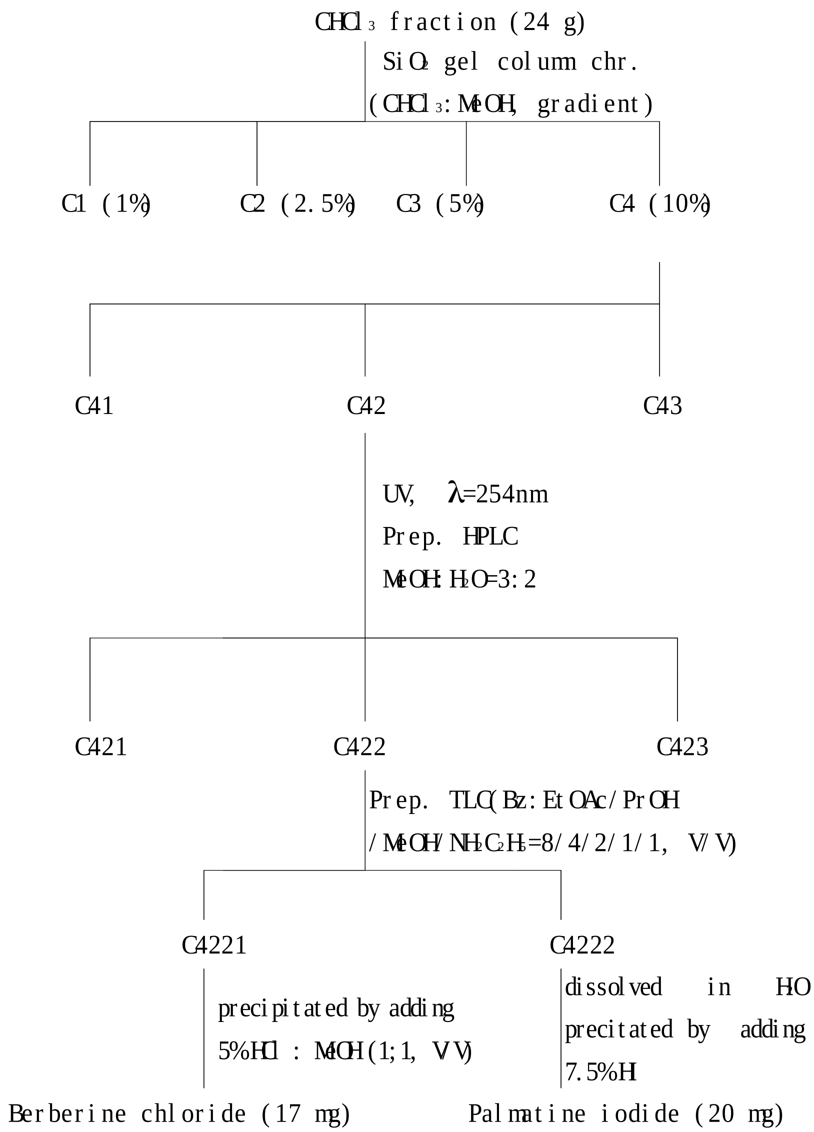


Fig. 3. Isolation procedure of antifeedant from $CHCl_3$ fraction against *H. cunea* and *A. coerulea*.

4) 생물검정

섭식저해효과는 엽침지법(leaf dipping method)을 사용하였다. 먼저 잎을 Cork borer(3cm)로 오려낸 후 추출물질을 농도에 따라 처리한 후 대조구와 함께 페트리디쉬에 넣었다. 24시간 후에 대조구와 처리구의 잎면적을 측정한후 섭식기피정도를 산출하였다. 흰불나방의 경우 버즘나무 잎을 사용하였으며 오리나무잎벌레의 경우 물오리나무 잎을 사용하여 처리 후 24시간 후에 섭식기피 활성검정을 하였다.

섭식저해활성 = (C-T/C+T) × 100

(C = 대조구 잎 면적, T = 처리구의 잎 면적)

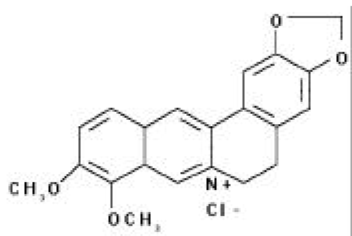
5) 통계분석

통계분석은 SAS 프로그램내 Scheffe's test (P = 0.05)를 사용하여 분석하였다.

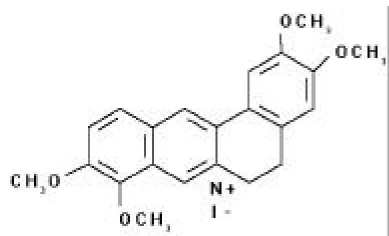
나. 결과

1) 활성물질의 분리 ·동정

질량분석기, IR, NMR등을 이용하여 물질구조를 분석한 결과 황련뿌리에서 분리된 활성물질은 isoquinoline alkaloid 계통인 berberine chloride와 palmatine iodide로 밝혀졌다(Fig. 4).



Berberine chloride



Palmatine iodide

Fig. 4. Chemical structure of berberine chloride and palmatine iodide

2) **활성물질의 섭식저해효과**

황련뿌리로부터 분리된 berberide chloride**의 미국흰불나방에 대한 섭식저해활성은 두 개의 다른** isoquinoline alkaloids**인** palmatine iodide**와** coptisine chloride**와 비교하였다**(Table 13). 500 ppm **농도에서**, berberine chloride**와** palmatine iodide**의 섭식저해활성은 각각** 75.4**와** 76% **이었다**. **그러나** berberine chloride**와** palmatine iodide**를 혼합하여 처리하였을 경우에는** 125, 250, 500 ppm **농도에서 각각** 61.2, 82.3**과** 100%**의 섭식기피활성을 보였다**. **이상의 결과에서** berberine chloride**와** palmatine iodide**는 미국흰불나방 유충의 섭식저해활성에 강한 시너지효과**(synergic effect)**가 있음을 보여주었다**.

Table 14**는 황련뿌리 유래** isoquinoline alkaloids**의 오리나무잎벌레 성충에 대한 섭식저해활성을 나타낸다**. Berberine chloride**는** 250 ppm**에서** 91.1%, 500 ppm**에서** 97.2%**의 섭식저해활성을 나타내었다**. **그러나** palmatine iodide**와** coptisine chloride**는 섭식저**

해활성을 나타내지 않았다.

Table 13. Antifeeding activity of isoquinoline alkaloids isolated from *C. japonica* against *H. cunea*

Compound[a]	Conc, ppm	Activity (%)
BC	500	75.4 ± 2.5b
PI	500	76.0 ± 3.1c
BC + PI	125	61.2 ± 3.1c
	250	82.3 ± 2.1b
	500	100.0a

[a]BC, berberine chloride; PI, palmatine iodide; and CC, coptisine chloride.

Tagle 14. Antifeeding activity of isoquinoline alkaloids isolated from *C. japonica* against *A. coerulea*

Compound[a]	Conc, ppm	Activity (%)
BC	125	57.5 ± 2.6b
	250	91.1 ± 0.8a
	500	97.2 ± 1.8a
PI	500	41.4 ± 3.8b
CC	500	52.4 ± 4.6b

[a]BC, berberine chloride; PI, palmatine iodide; and CC, coptisine chloride

4. 계피로부터 도토리거위벌레에 대한 살충물질 분리 및 동정

가. 재료 및 방법

1) 실험곤충

도토리거위벌레는 홍릉수목원내에서 8월에서 9월에 산란된 도토리를 채집한 후 3 4 주동안 실온에서 보관한 후 말령 유충을 실험에 사용하였다.

2) 실험식물체 및 메탄올추출

실험식물체인 계피는 경동시장내 한약방에서 구입하였다. 50℃에서 2일간 건조기에서 건조시킨 후 마쇄하여 분말로 만들고 나서, 분말시료 3.6 kg을 취하여 메탄올 10L를 부어 잘 흔든 후에 실온 암실하에 방치하였다. 3일후 감압여과하고 회전진공농축기(EYELA autojack NAJ-160, Japan)로 40℃에서 감압농축하여 메탄올 조추출물을 얻어, 생물검정 시료로 이용하였다.

3) 화합물

실험에 사용한 cinnamic acid, eugenol, salicylaldehyde는 Sigma에서 구입하였으며, cinnamic alcohol은 Tokyo Kasei에서 구입하였다.

4) 살충물질 분리·동정

계피 메탄올조추출물은 hexane, chloroform, ethyl acetate와 butanol을 이용하여 분획하였으며 이중에서 hexane층이 강한 살충

활성을 보였다. 강한 살충활성을 보인 hexane층은 다시 유리칼럼 상에서 hexane과 ethyl acetate (0, 10, 30, 50, 80 그리고 100%) 용매 시스템을 이용하여 분리하였다. 활성이 나타난 50% 층을 다시 hexane과 ethyl acetate를 2:1(v/v) 비율로 분리하였다. 다시 활성이 확인된 층은 HPLC를 이용하여 methanol과 물 3:7(v/v)의 비율로 분리하였다. 순수하게 분리된 활성물질은 ^{1}H와 ^{13}C-NMR, 질량분석기를 이용하여 구조동정을 하였다.

5) 생물검정

여과지침지법을 이용하여 추출물 및 순수화합물의 살충활성을 조사하였다. 적당한 양을 acetone 100㎕에 녹인 후 여과지에 침지한후 2분동안 실온하에서 아세톤을 날리고 polyethylene cup(지름 50mm, 높이 60mm)에 넣은 후 도토리거우벌레 유충을 집어넣었다. 유충을 집어넣은 후 컵의 뚜껑을 닫아주었다.
분리한 화합물의 훈증효과를 알아보기 위하여 컵에다 모래를 깐후 뚜껑을 덮은 경우, 모래를 깐후 뚜껑을 덮지 않은 경우, 모래를 깔지않고 뚜껑을 덮은 경우 등 세가지 방법을 사용하여 훈증활성을 조사하였다.

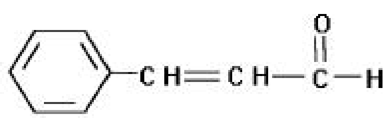
6) 통계분석

통계분석은 SAS 프로그램내 Scheffe's test (P = 0.05)를 사용하여 분석하였다.

나. 결과

1) 살충활성물질의 동정

분리된 순수화합물을 여러 가지 분석기기를 이용하여 분석한 결과 trans-cinnamaldehyde로 동정되었다(Fig. 5).



trans - Cinnamaldehyde

Fig. 5. Chemical structure of trans-cinnamaldehyde

2) 계피유래 화합물들의 도토리거우벌레에 대한 살충활성

계피유래 화합물들의 도토리거우벌레에 대한 살충활성은 Table 15에 나타내었다. 5mg 농도에서 eugenol, salicylaldehyde, trans-cinnamaldehyde는 100% 살충활성을 나타내었다. cinnamic acid의 경우 86%의 살충활성을 보였고 cinnamic alcohol은 60%로 다른 화합물에 비해 낮은 살충활성을 보였다. 2.5mg 농도에서는 trans-cinnamaldehyde가 96%로 가장높은 살충활성을 보였으며 1mg 농도에서는 trans-cinnamaldehyde와 salicylaldehyde가 76.7%로 가장높은 살충활성을 보였다.

3) 처리방법별 계피유래 화합물들의 도토리거우벌레에 대한 살충활성

처리방법별 계피유래 화합물들의 도토리거우벌레에 대한 살충활성은 Table 16에 나타내었다. 뚜껑을 덮고 접촉을 하지 못하도록 모래를 깔았을 때 5mg 농도에서 salicylaldehyde가 100% 살충활성을 보였고 eugenol은 83%의 살충활성을 나타내어 이 두 화합물은 훈증에 의한 살충활성이 상당히 높았다. 뚜껑을 열고 모래를 깔았을 경우에는 salicylaldehyde가 80%의 살충활성을 보였으나 나머지 화합물들의 살충활성은 상당히 감소하였다. 이상의 결과 trans-cinnamaldehyde의 경우 접촉 독성에 의한 살충활성이 상당히 강한 반면 salicylaldehyde와 eugenol의 경우에는 훈증에 의한 독성이 상당히 강하다는 것을 보여주었다.

Table 15. Insecticidal activity of *C. cassia* barks-derived materials against *M. ursulus*

Contentration	Chemicals[a]	N[b]	Mortality (Mean ± S.E ; %)
5mg/filter paper	CD	30	86.7 ± 5.77ab
	CL	30	60.0 ± 26.46b
	EN	40	100a
	SA	30	100a
	CA	40	100a
2.5mg/filter paper	EN	30	90.0 ± 17.32ab
	CD	30	76.7 ± 11.55ab
	SA	30	86.7 ± 15.28ab
	CA	30	96.7 ± 5.77a
1mg/filter paper	EN	30	66.7 ± 20.82a
	CD	30	53.3 ± 15.28a
	SA	30	76.7 ± 25.17a
	CA	30	76.7 ± 11.55a

[a]EN, Eugenol; CD, Cinnamic acid; SA, Salicylaldehyde; CA, *trans*-Cinnamaldehyde; CL, Cinnamic alcohol.

[b]Number of insect tested

Table 16. Insecticidal activity of *C. cassia* barks-derived materials against *M. ursulus* by different application method

con.	Method[a]	N[c]	Mortality (Mean ± S.E)			
			EN[b]	CD	SA	CA
5mg	A	120	83.3 ±5.77b	66.7 ±5.77ab	100a	66.7 ±5.77b
	B	120	36.7 ±5.77c	36.7 ±23.09b	80.0 ±10.00b	46.7 ±11.55c
	C	140	100a	86.7 ±5.77a	100a	100a

[a]A: Polyethylene cup contains filter paper treated with test materials, sea sand and lid; B: Polyethylene cup contains filter paper treated with test materials, sea sand and no lid; C: Polyethylene cup contains filter paper treated with test materials and lid

[b]EN, Eugenol; CD, Cinnamic acid; SA, Salicylaldehyde; CA, *trans*-Cinnamaldehyde.

[c]Number of insect tested

5. 식물체 메탄올추출물의 5대 농업해충에 대한 살충활성

가. 재료 및 방법

1) 실험곤충

벼멸구 (*Nilaparvata lugens*), 배추좀나방 (*Plutella xylostella*)과 담배거세미나방 (*Spodoptera litura*)은 온도 27 ± 1℃, 상대습도 55 ± 5%, 명암 16L:8D의 조건으로, 복숭아혹진딧물(*Myzus persicae*)은 온도 22 ± 1℃, 상대습도 45 ± 5%, 명암 16L:8D의 조건으로, 점박이응애(*Tetranychus urticae*)는 25 ± 1℃, 상대습도 55 ± 5%, 명암 16L:8D의 조건으로 사육하였으며, 이들은 살충제 도태를 하지 않은 실험실내 계통이었다.

2) 실험식물체 및 메탄올 추출

실험식물체는 임업연구원내 홍릉수목원에서 약 150 여종의 식물체를 random 또는 anecdotal 한 방법으로 채집하였다. 채집된 식물체는 50℃에서 2일간 건조기에서 건조시킨 후 마쇄하여 분말로 만들고 나서, 각각의 분말시료 50g씩을 취하여 500㎖ Erlenmeyer flask에 넣고 메탄올 300㎖를 부어 잘 흔든 후에 실온 암실하에 방치하였다. 3일후 감압여과하고 회전진공농축기 (EYELA autojack NAJ-160, Japan)로 40℃에서 감압농축하여 메탄올 조추출물을 얻어, 생물검정 시료로 이용하였다.

3) 살충활성

벼멸구에 대한 식물체 메탄올 추출물의 살충활성은 충과 유묘

동시살포법(Spary method)으로 검정하였다. 벼(품종: 추청) 유묘(초장 5cm)를 3-5본씩 뿌리부위를 솜으로 말아서 약간의 물이 들어있는 유리시험관(직경 3 × 15cm) 속으로 밀어넣은 시험관에 흡충관으로 우화 3일후의 암컷 성충을 접종하고 나서, 소형 분무기를 이용하여 5,000ppm으로 희석한 시료를 시험관 입구에서 분무기를 이용하여 분무 처리하였고, 처리 48시간 후에 각각의 사충수를 조사하였다.

복숭아혹진딧물에 대한 살충활성은 담배 (품종: NC81) 잎을 cork borer로 오려낸 절단엽 (직경 5cm) 1매를 5,000ppm 공시약액에 10초간 침지한 후 hood에서 통풍건조시켜 샤레 (9cm)에 옮겼다. 처리잎이 담겨져 있는 샤레에 무시태생의 성충암컷을 10마리씩 접종하고 덮개를 덮은 다음 48시간 후에 각각의 사충수를 조사하였다.

점박이응애의 경우 강남콩 잎을 채가 borer로 오려낸 절단엽 (직경 5cm) 1매를 아세톤에 녹인 5,000ppm의 조추출물 희석액에 10초간 침지하고 나서, hood에서 통풍건조시켰다. 물에 충분히 흡수시킨 두꺼운 탈지면을 샤레에 깔고 탈지면 위에는 여지를 한 장 깐 다음 건조잎을 여지 위에 얹었으며, 건조잎 위에 응애성충 20마리를 접종하고 나서 처리 48시간후에 사충수를 조사하였다.

배추좀나방 및 담배거세미나방에 대한 살충활성은 양배추잎을 cork borer로 오려낸 절단엽 (직경 5cm) 1매를 5,000ppm 공시약액에 10초간 침지한 후 hood에서 통풍건조시켜 샤레 (9cm)에 옮겼다. 처리잎이 담겨져 있는 샤레에 배추좀나방 및 담배거세미나방 10마리씩 접종하고 덮개를 덮은 다음 48시간 후에 각각의 사충수를 조사하였다.

나. 결과

1) 식물체 메탄올 추출물의 살충활성

식물체 메탄올 추출물의 5종의 해충에 대한 살충활성은 Table 17에 나타내었다. 벼멸구에 강한 활성을 보인 식물체는 초피나무 수피, 편백 잎, 비목나무 잎이었다. 이들 중 초피나무 수피는 100%, 편백 및 비목나무 잎은 95%의 활성을 보였다. 나머지 식물체 추출물들은 약하거나 활성을 보이지 않았다. 담배거세미나방과 복숭아혹진딧물에 대해서는 약하거나 활성을 보이지 않았다. 굴피나무 목부, 나도밤나무 수피, 회화나무 잎, 해송 목부는 배추좀나방에대해 80% 이상의 매우 강한 살충활성을 보였고, 머루 줄기, 때죽나무 잎, 담뱅이덩굴 잎, 초피나무 수피는 70% 이상의 강한 살충활성을 보였다. 점박이응애의 경우, 보리밥나무 잎 추출물이 매우 강한 살충활성을 보였고, 광대싸리 잎+줄기, 두릅나무 잎, 참가시나무 잎, 모새나무 잎 추출물이 강한 살충활성을 보였고, 나머지 식물체들은 약하거나 활성을 나타내지 않았다.

Table 17. Insecticidal activity of plants extract against five major agricultural pests

식물명	부위	농도(ppm)	BPH[a]	GPA	DBM	TCW	TSSM
소귀나무	잎	5000	50	0	0	0	10
생달나무	수피	5000	0	0	10	0	0
짜구사리	잎	5000	60	0	0	0	20
자작나무	목부	5000	0	0	40	0	0
청미래덩굴	잎	5000	0	0	60	0	0
굴피나무	목부	5000	0	0	90	20	0
머루	줄기	5000	0	0	70	0	0
나도밤나무	수피	5000	0	0	80	0	0
합다리나무	수피	5000	0	0	50	30	0
합다리나무	잎	5000	0	0	60	0	0
회화나무	잎	5000	0	0	80	20	10
때죽나무	잎	5000	0	0	70	30	0
때죽나무	목부	5000	0	0	60	20	0
참회나무	수피	5000	0	0	40	0	67
참회나무	잎	5000	0	0	30	0	0
비목나무	수피	5000	0	0	60	0	0
비목나무	목부	5000	0	0	50	0	60
철쭉꽃	잎	5000	0	0	60	0	0
철쭉꽃	목부	5000	0	0	50	0	0
복분자딸기	잎	5000	0	0	40	0	0
담쟁이덩굴	잎	5000	0	0	70	0	0
향나무	잎	5000	0	0	40	0	10
대만풍나무	잎	5000	30	0	10	0	0
계수나무	잎	5000	0	0	10	0	0
대추	잎	5000	0	0	0	0	0
보리수나무	잎	5000	0	0	0	0	0
갈참나무	잎	5000	0	0	0	0	0
참느릅나무	잎	5000	0	0	0	0	0
말채나무	목부	5000	0	0	10	0	0
광대싸리	줄기	5000	0	0	0	0	0
측백나무	수피	5000	0	0	50	0	0
측백나무	잎	5000	0	0	0	0	20
칡	잎+줄기	5000	0	0	0	0	0

[a]BPH, 벼멸구; GPA, 복숭아혹진딧물; DBM, 배추좀나방; TCW, 담배거세미나방; TSSM, 점박이응애

Table 17. continued

식물명	부위	농도(ppm)	BPH	GPA	DBM	TCW	TSSM
산초나무	잎	5000	0	0	0	0	0
나도밤나무	목부	5000	0	0	10	0	0
수양벚나무	수피	5000	0	0	0	0	0
모감주나무	잎	5000	0	0	10	0	0
참식나무	잎	5000	0	0	30	0	0
홍가시	잎	5000	0	0	0	0	0
센달나무	목부	5000	0	0	20	0	0
생달나무	목부	5000	0	0	30	10	0
산벚나무	목부	5000	0	0	0	0	0
오동	수피	5000	0	0	0	0	0
계수나무	목부	5000	0	0	10	0	0
보리밥나무	잎	5000	0	0	0	0	80
팔손이	잎	5000	0	0	0	0	0
육계나무	수피	5000	30	0	0	0	0
돌배나무	잎	5000	0	0	0	0	0
사스레피나무	잎	5000	0	0	0	0	60
후박나무	잎	5000	0	0	0	0	50
녹나무	잎	5000	0	0	0	0	0
종가시나무	수피	5000	0	0	0	0	50
헛개나무	목부	5000	0	0	0	0	60
참식나무	목부	5000	0	0	0	0	43
복자기	잎	5000	0	0	0	0	37
광대싸리	잎+줄기	5000	0	0	0	0	70
참느릅나무	수피	5000	0	0	0	0	0
음나무	목부	5000	0	0	0	0	40
줄사철나무	잎	5000	0	0	0	0	57
개머루	줄기	5000	0	0	0	0	20
굴피나무	수피	5000	0	0	0	0	20
붉가시나무	목부	5000	0	0	0	0	23
참가시나무	수피	5000	0	0	0	0	0
구실잣밤나무	잎	5000	0	0	0	0	50
자귀나무	목부	5000	0	0	0	0	33
두릅나무	잎	5000	0	0	0	0	70
초피나무	수피	5000	100	0	70	0	73
층층나무	수피	5000	0	0	0	0	50
편백	잎	5000	95	0	0	0	57

Table 17. continued

식물명	부위	농도(ppm)	BPH	GPA	DBM	TCW	TSSM
잣나무	목부	5000	0	0	0	0	0
모과나무	수피	5000	0	0	0	0	0
방크스소나무	수피	5000	0	0	0	0	0
산딸나무	수피	5000	0	0	0	0	0
느릅나무	수피	5000	0	0	0	0	0
자작나무	잎	5000	0	0	0	0	0
느티나무	수피	5000	0	0	0	0	0
두충	목부	5000	0	0	0	0	0
해송	잎	5000	0	0	0	0	0
진달래	꽃	5000	0	0	0	0	0
종가시나무	잎	5000	0	0	0	0	0
참취		5000	0	0	0	0	0
잣나무	잎	5000	0	0	0	0	0
구상나무	수피	5000	0	0	0	0	0
멀구슬나무	잎	5000	0	0	0	0	0
붉가시나무	수피	5000	0	0	0	0	0
전나무	잎	5000	0	0	0	0	0
서어나무	잎	5000	0	0	0	0	0
센달나무	잎	5000	0	0	0	0	0
잣나무	수피	5000	0	0	0	0	0
진달래	줄기	5000	0	0	20	0	0
감탕나무	잎	5000	0	0	0	0	0
삼나무	잎	5000	0	0	0	0	0
조구나무	잎	5000	0	0	10	0	0
굴피나무	잎	5000	0	0	0	0	0
송악	잎	5000	0	0	0	0	0
굴거리나무	수피	5000	0	0	0	0	0
화살나무	잎	5000	0	0	0	0	0
조록나무	잎	5000	0	0	0	0	0
음나무	수피	5000	0	0	0	0	0
모새나무	목부	5000	0	0	0	0	0
삼나무	목부	5000	0	0	0	0	0
노각나무	수피	5000	0	0	50	0	0
두릅나무	수피	5000	0	0	20	0	0
구상나무	잎	5000	0	0	20	0	0
신나무	목부	5000	0	0	0	0	0
구걸목서	잎	5000	0	0	20	0	0
먼나무	목부	5000	0	0	10	0	0
방크스소나무	잎	5000	0	0	0	0	0

Table 17. continued

식물명	부위	농도(ppm)	BPH	GPA	DBM	TCW	TSSM
종비나무	목부	5000	0	0	0	0	0
산벚나무	수피	5000	0	0	0	0	0
낙엽송	잎	5000	0	0	0	0	0
소귀나무	수피	5000	0	0	0	0	0
음나무	수피	5000	0	0	10	0	0
먼나무	수피	5000	0	0	0	0	0
적송	수피	5000	0	0	0	0	0
분비나무	수피	5000	0	0	0	0	0
다래		5000	0	0	0	0	0
육박나무	잎	5000	0	0	0	0	0
광나무	잎	5000	0	0	0	0	0
해송	목부	5000	0	0	80	0	0
느릅나무	목부	5000	0	0	0	0	0
호랑가시나무	잎	5000	0	0	0	0	0
개망초		5000	0	0	0	0	0
리기다소나무	잎	5000	0	0	0	0	0
미역취		5000	0	0	0	0	0
해송	수피	5000	0	0	0	0	0
푸조나무	잎	5000	0	0	0	0	0
굴거리나무	잎	5000	0	0	0	0	0
돈나무	잎	5000	0	0	20	0	0
산딸나무	목부	5000	0	0	0	0	0
센달나무	수피	5000	0	0	0	0	0
주목	잎	5000	0	0	0	0	0
붉나무	잎	5000	0	0	0	0	0
족제비싸리		5000	0	0	20	0	0
전나무	목부	5000	0	0	0	0	0
육박나무	수피	5000	0	0	0	0	0
오미자		5000	0	0	0	0	0
물푸레나무	목부	5000	0	0	0	0	0
팽나무	목부	5000	0	0	0	0	0
오동	잎	5000	0	0	0	0	0
참식나무	수피	5000	0	0	0	0	0
서어나무	목부	5000	0	0	0	0	0
사람주나무	수피	5000	0	0	0	0	0
참가시나무	목부	5000	0	0	0	0	0

Table 17. continued

식물명	부위	농도(ppm)	BPH	GPA	DBM	TCW	TSSM
송악	줄기	5000	0	0	0	0	0
벽오동	잎	5000	0	0	0	0	0
보리수나무	줄기	5000	0	0	10	0	0
소사나무	수피	5000	0	0	10	0	0
전나무	수피	5000	0	0	0	0	60
모감주나무	수피	5000	0	0	20	0	0
갈참나무	수피	5000	0	0	0	0	0
목련	목부	5000	0	0	0	0	40
성쑥부쟁이		5000	0	0	10	0	57
참가시나무	잎	5000	20	0	0	0	77
모새나무	잎	5000	0	0	0	0	70
조록나무	목부	5000	0	0	0	0	0
비목나무	잎	5000	95	0	0	0	0
붓순나무	수피	5000	0	0	0	0	0
아왜나무	잎	5000	25	0	0	0	0
플라타너스	잎	5000	0	0	20	0	0
목백합	잎	5000	0	0	0	0	0
큰잎꽝꽝	잎	5000	0	0	0	0	0
개비자나무	잎	5000	0	0	0	0	0
육박나무	목부	5000	0	0	0	0	0
미역줄나무		5000	0	0	10	0	0
태산목	잎	5000	0	0	0	0	0
방크스소나무	목부	5000	0	0	0	0	0
노각나무	목부	5000	0	0	0	0	0
붉나무	수피	5000	0	0	0	0	0
느티나무	목부	5000	0	0	0	0	0
오동	목부	5000	0	0	0	0	0
황칠나무	목부	5000	0	0	10	0	0
합다리나무	목부	5000	0	0	0	20	0
후박나무	수피	5000	0	0	0	0	0
물푸레나무	수피	5000	0	0	0	10	0
구실잣밤나무	목부	5000	0	0	0	10	0
홍가시	수피	5000	0	0	0	0	0
홍가시	목부	5000	0	0	0	0	0
모감주나무	목부	5000	0	0	0	0	0
복자기	목부	5000	0	0	0	0	0

6. 향기성한방식물체 메탄올 조추출물의 5종의 농업해충에 대한 살충활성 스크리닝

가. 재료 및 방법

1) 실험식물체 및 메탄올 추출

실험식물체는 경동시장에서 35 종의 향기성한방식물체를 random 또는 anecdotal 한 방법으로 경동시장에서 구입하였다. 구입한 식물체는 50℃에서 2일간 건조기에서 건조시킨 후 마쇄하여 분말로 만들고 나서, 각각의 분말시료 50g씩을 취하여 500㎖ Erlenmeyer flask에 넣고 메탄올 300㎖를 부어 잘 흔든 후에 실온 암실하에 방치하였다. 3일후 감압여과하고 회전진공농축기 (EYELA autojack NAJ-160, Japan)로 40℃에서 감압농축하여 메탄올 조추출물을 얻어, 생물검정 시료로 이용하였다.

2) 실험곤충

- 식물체메탄올추출물의 5대 농업해충에 대한 살충활성과 동일

3) 살충활성

- 식물체메탄올추출물의 5대 농업해충에 대한 살충활성과 동일

나. 결과

1) 향기성한방식물체의 5종의 주요농업해충에 대한 살충활성

향기성한방식물체의 5종의 주요농업해충에 대한 살충활성은

Table 18과 Table 19에 나타내었다. 5000 ppm 농도에서 벼멸구에 강한 살충을 나타낸 식물체는 창포, 곽향, 삼내자, 정향, 후추 그리고 울금이었다. 복숭아혹진딧물에 강한 살충활성을 나타낸 식물체는 석창포, 창포, 편뇌, 대회향, 삼내자, 정향, 후추 그리고 천궁이었다. 편뇌, 대회향, 후추, 천궁과 울금은 배추좀나방에 대하여 80% 이상의 강한 살충활성을 나타내었다. 그 중요성에도 불구하고 담배거세미나방에 강한 살충활성을 갖는 식물체는 없었으며 점박이응애의 경우 마만이 80% 이상의 살충활성을 나타내었다.

5,000 ppm 농도에서 강한 살충활성을 나타낸 식물체들은 다시 2,500 ppm 농도로 희석하여 살충활성을 조사하였다. 2,500 ppm 농도에서 벼멸구에 강한 살충활성을 보인 식물체는 울금이었다. 복숭아혹진딧물의 경우 편뇌, 삼내자 및 대회향이 80% 이상의 강한 살충활성을 보였다. 배추좀나방의 경우 편뇌, 후추 및 울금이 강한 살충활성을 보였으며 담배거세미나방과 점박이응애는 살충활성을 나타내는 식물체는 없었다.

Table 18. Insecticidal activity of aromatic medicinal plants against five major agricultural pests at 5,000 ppm

식물체명	살충율 (평균 ± 표준편차, 반복수=3)				
	BPH	GPA	DBM	TCW	TSSM
석창포	63.6 ±35.1	83.3 ±20.8	50 ±17.3	16.7 ±5.8	73.3 ±6.5
창포	100	90.0 ±17.3	56.7 ±30.6	-	48.0 ±8.5
쑥	-	-	-	-	-
유향	-	-	-	-	-
목향	-	-	-	-	-
팔각향	-	-	-	-	-
모과	-	-	-	-	-
편뇌	78.3 ±17.6	100	100	-	45.7 ±19.1
곽향	100	-	-	-	-
형계	-	-	-	-	-
지초	-	-	-	-	-
육계	18.3 ±16.1	-	-	-	-
조협	-	-	-	-	-
감초	-	-	-	-	-
자단향	45 ±17.3	-	66.7 ±35.1	-	-
삼내자	100	100	-	-	35.7 ±15
대회향	28.3 ±20.2	96.7 ±5.8	100	-	-
후박	-	-	-	-	-
정향	90 ±5.0	86.7 ±23.1	36.7 ±15.3	-	32.3 ±21.4
산목	-	-	-	-	-
목단피	30 ±27.8	-	-	-	-
후추	98.3 ±2.9	100	100	23.3 ±5.8	60 ±10
대황	-	-	-	-	-
영릉향	-	-	-	-	53.3 ±15.3
단목	-	-	-	46.7 ±15.3	-
오수유	-	-	-	-	-
초피 (열매)	46.7 ±12.6	-	-	-	-
초피(식물전체)	45 ±20	-	-	-	-
마	-	-	-	-	84.3 ±5.1
백부근	-	-	-	-	-
침향	-	-	-	-	-
백지	33.3 ±22.5	-	-	-	30 ±30
천궁	60 ±20	100	100	-	-
감송향	-	-	-	-	-
계심	-	-	-	-	-
울금	95 ±8.7	-	100	-	-

Table 19. Insecticidal activity of aromatic medicinal plants against five major agricultural pests at 2,500 ppm

식물체명	살충율 (평균 ± 표준편차, 반복수=3)				
	BPH[a]	GPA	DBM	TCW	TSSM
창포	46.7 ±45.1	56.7 ±23.1	20	-	-
편뇌	16.7 ±24.7	100	96.7 ±5.8	-	-
곽향	8.3 ±7.6	-	-	-	-
삼내자	-	96.7 ±5.8	-	-	-
대회향	28.3 ±20.2	83.3 ±11.5	40 ±17.3	-	-
정향	-	-	-	-	-
후추	-	-	96.7 ±5.8	6.7 ±5.8	23.3 ±20.8
천궁	-	-	-	-	-
울금	95 ±8.7	-	93.3 ±11.5	-	-

[a]See Table 17

7. 후추(*Piper nigrum*)로부터 5종의 중요농업해충에 대한 살충활성물질 탐색

가. 재료 및 방법

1) 실험식물체 및 메탄올 추출

후추(*Piper nigrum*) 열매(2kg)는 경동시장에서 구입하였다. 말린 후추열매는 마쇄기로 간후 메탄올로 이틀간 침지한 후 진공회전농축기를 이용하여 농축하여 메탄올 조추출물을 얻었다. 후추 메탄올 조추출물의 수율은 10%였다. 메탄올 조추출물 100g은 다시 헥센(800 ㎖ ×2), 클로로포름(800 ㎖ ×2), 에틸아세테이트(800 ㎖ ×2), 부탄올로(800 ㎖ ×2) 용매분획을 하였다. 살충활성을 나타낸 헥센층과 클로로포름층은 다시 open column chromatography를 이용하여 분리하였다.

2) 실험곤충

- 향기성한방식물체의 5대 농업해충에 대한 살충활성과 동일

3) 살충활성

- 향기성한방식물체의 5대 농업해충에 대한 살충활성과 동일

나. 결과

1) 메탄올 및 용매분획층의 살충활성

후추의 메탄올 조추출물과 용매분획층의 살충활성은 Table 20

에 나타내었다. 메탄올 조추출물은 벼멸구, 복숭아혹진딧물 및 배추좀나방에 강한 살충활성을 나타내었고 hexane 층은 벼멸구 및 배추좀나방에 chloroform층은 배추좀나방에 강한 살충활성을 나타내었다. Ethyl acetate와 butanol 층은 활성을 나타내지 않았다.

2) Column을 이용한 분리층의 살충활성

유리칼럼을 이용하여 분리한 hexane 및 chloroform층의 살충활성은 Table 21에 나타내었다. Hexane Fr.I 층은 배추좀나방에 대해 2,500 ppm 농도에서 86.7%의 살충활성을 보였다. Hexane Fr.II 층은 복숭아혹진딧물 및 배추좀나방에 각각 90%와 100%의 강한 살충활성을 나타내었다. Chloroform 층은 Fr.II층이 배추좀나방에 대해 86.7%로 강한 살충활성을 나타내었다. Hexane Fr.I, hexane Fr.II와 chloroform Fr.II층의 활성물질은 지금 탐색중에 있다.

Table 20. Insecticidal activity of solvent fractions of *P. nigrum* extract

Solvent fractions	Con. (ppm)	Mortality (Mean ± S.E, %)				
		BPH[a]	GPA	DBM	TCW	TSSM
MeOH	5000	+++[b]	+++	+++	-	+
Hexane	2500	+++	-	+++	+	+
Chloroform	2500	-	-	+++	-	-
Ethyl acetate	2500	-	-	-	-	-
Butanol	2500	-	-	-	-	-

[a]See Table 17

[b]+++; > 80%, ++; > 60-80%, +; >40-60%, -; <40%

Table 21. Insecticidal activity of column fractions

fraction[a]	Con. (ppm)	Mortality (Mean, %)				
		BPH	GPA	DBM	TCW	TSSM
H Fr. I	2500	0	3.3	86.7	0	0
H Fr. II	2500	41.74	90	100	53.3	34
H Fr. III	2500	16.7	23.3	46.7	0	47.3
C Fr. I	2500	0	0	0	0	0
C Fr. II	2500	0	16.75	86.73	0	0
C Fr. III	2500	0	0	0	0	0

[a]H: hexane; C: chloroform

8. 편백정유의 팥바구미에 대한 살충활성검정

가. 재료 및 방법

1) 정유추출 및 생물검정

편백건전목 잎을 체취한 후 길이를 약 1cm로 자른 후 AOAC 19.117에 규정한 정유추출 장치의 1 ℓ용량 후라스크에 약 150g을 넣고 100℃에서 3-4시간 증류하여 얻었다. 실험에 사용한 팥바구미는 한국화학연구소에서 분양받아 팥으로 25℃, RH 65%, 명암 16:8 (L:D) 시간 조건으로 사육한 성충을 사용하였다. 생물검정은 여과지침지법(filter paper diffusion method)을 사용하였다. 정유추출물을 원하는 농도로 하여 50㎕ 아세톤에 녹인후 여과지에 처리한 후 2분간 휘발시켰다. 처리된 여과지는 바이엘(40㎖)의 아랫면에 넣은후 팥바구미 10마리를 집어넣었다. 각각의 농도에 대한 반복수는 5반복이었고, 살충율은 처리 24시간 후에 조사하였다.

2) 정유성분분석

정유성분분석 조건은 Table 22에 나타내었다.

Table 22. Conditions of Gas chromatography and mass spectrometer

GC	HP6830
MS	JMS-600W, JEOL
Column	DB-WAX (60m, 0.25 mm I.D, 0.25 ㎛ film thickness, J & W Scientific Co.)
Oven temperature	70℃ to 200 ℃ (2℃/min)
Injection volume	2 ㎕

나. 결과

1) **편백정유 및 편백정유성분의 팥바구미에 대한 살충활성**

편백정유의 팥바구미 암수에 대한 살충효과는 Table 23**에 나타내었다**. LC_{50} **및** LC_{95}**의 값은 숫컷의 경우** 1.17 **및** 2.83㎎/**여과지 이었고 암컷의 경우** 1.80**과** 7.65 ㎎/**여과지 이었다**. **암컷의 경우 편백정유에 대한 강한 내성을 보여 이후의 실험에는 암컷만을 사용하였다**. **편백정유를 분석한 결과 대부분이 침엽수 계통의 나무에서 잘 알려진** terpenoids **계통의 물질들이 주를 이루었다**. **이 중 많은 양이 함유된** alpa-pinene, terpinolene, limonene, sabinene, bornyl acetate **및** myrcene**을 가지고 훈증효과를 조사하였고** Table 24**에 그 결과를 나타내었다**. 2㎎/**여과지 농도에서** bornyl acetate, terpinolene**과** limone**등은 높은 살충활성을 나타내었으나** alpa-pinene, sabinene**과** myrcene**은 낮은 활성을 나타내었다**. bornyl acetate, terpinolene **및** limone**의** LC50 **및** LC95 **값은** Table 25**에 나타내었다**. Bornyl acetate**의 경우** LC_{50} **및** LC_{95}**값**

은 각각 0.66 및 2.61㎎/여과지 이었고 terpinolene의 경우 0.94 및 3.11 ㎎/여과지 이었으며 limonene의 경우 1.65 및 3.97㎎/여과지 이었다.

2) 편백정유성분

가스크로마토그래피 및 질량분석기에 의해 분석된 편백정유성분은 Fig. 6에 나타내었다.

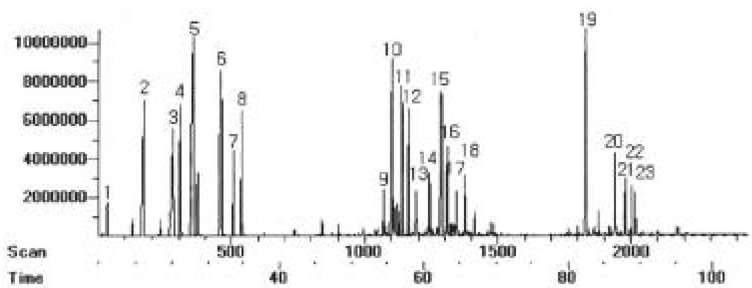


Figure 1. Gas chromatogram ofC. *obtusa* essential oil. 1; camphene, 2; sabinene, 3; myrcene, 4; (+)-2-carene, 5; limonene, 6; α-pinene, 7; 1-methyl-4-(1-methylethyl)-benzene, 8; α-terpinolene, 9; α-cedrene, 10; bornyl-acetate, 11; 4-methyl-1-(1-methylethyl)-3-cyclohexen-1-ol, 12; widdrene, 13; δ-cadinene, 14; phellendrene, 15; α-terpinyl acetate, 16; α-elemene, 17; β-himachalene, 18; cadinene, 19; elemol, 20; δ-selinene, 21; 13-methyl-1-17-norkaur-15-ene, 22; α-eudesmol, 23; β-eudesmol

Fig. 6. Gas chromatogram of *C. obtusa* essential oil

Tabel 23. Insecticidal activity of *C. obtusa* essential oil against *C. chinensis*

Sex	N[a]	LC_{50} ([95% CL), mg/filter paper]	LC_{95} ([95% CL), mg/filter paper]	Slope
Male	250	1.17 (1.06 - 1.29)	2.83 (2.37 - 3.70)	4.30
Female	250	1.80 (1.46 - 2.10)	7.65 (5.42 - 15.09)	2.62

[a]Number of insect tested

Table 24. Insecticidal activity of components of *C. obtusa* essential oil against female adult of *C. chinensis*

Chemicals[a]	N[b]	Mortality (Mean ± S.E), %[c]
Bornyl acetate	50	96 ± 5.5a
Terpinolene	50	86 ± 13.4ab
(+)-Limonene	50	62 ± 4.5b
Myrcene	50	20 ± 4.5c
(+)-Sabinene	50	20 ± 4.5c
α-pinene	50	0c

[a]2mg/filter paper

[b]Number of insect tested

[b]Mortality: Investigated at 24h later after treatment

Table 25. Insecticidal activity of bornyl acetate, terpinolene and limonene against female adult of *C. chinensis*

Chemicals	N	LC_{50} ([95% CL), mg/filter paper][a]	LC_{95} ([95% CL), mg/filter paper]	Slope
Bornyl acetate	250	0.66 (0.55 - 0.78)	2.61 (1.97 - 4.06)	2.77
Terpinolene	250	0.94 (0.80 - 1.09)	3.11 (2.40 - 4.55)	3.16
Limonene	250	1.65 (1.48 - 1.86)	3.97 (3.13 - 6.09)	4.31

[a]Mortality: Investigated at 24h later after treatment

9. 오리나무잎벌레의 기주선호도와 기주식물체의 유인성분 탐색

가. 재료 및 방법

1) 실험곤충

오리나무잎벌레의 기주선호도는 오리나무잎벌레 유충을 사용하였다. 오리나무잎벌레의 유충은 홍릉수목원내 물오리나무 및 오리나무에서 1998년도와 1999년도에 채집하였다. 채집한 유충은 25℃, RH 65%, 명암 16:8 (L:D) 시간 조건하에서 물오리나무를 이용하여 사육하였다. 기주식물체에 대한 유인력은 오리나무잎벌레 성충을 사용하였다. 오리나무잎벌레는 홍릉수목원에서 5월에 물오리나무에서 채집하였다. 채집한 성충은 25℃, RH 65%, 명암 16:8 (L:D) 조건하에서 물오리나무를 이용하여 사육하였다. 유인력 검정에 사용한 식물체는 물오리나무, 오리나무였고 홍릉수목원내에서 채집하였다.

2) 실험식물체

오리나무잎벌레 유충 및 성충의 기주식물체는 자작나무과로 알려져 있다. 따라서 오리나무잎벌레 유충의 기주선호도에는 자작나무과 9종의 식물체를 사용하였다. 채집한 식물체는 Table 26에 나타내었다.

Table 26. Plant species tested for host preference

Genus	Plant species
Alnus	*A. hirsuta* Ruprecht *A. japonica* Steud. *A. maximowiczii* Callier
Betula	*B. schmidtii* Regel *B. davurica* Pallas
Corylus	*C. sieboldiana* var. *mandsburica* Bl. *C. heterophylla* var. *thunbergii* Schneider
Carpinus	*C. cordata* Bl. *C. tschonoskii* var. *brevicalycina*

3) **기주선호도 검정**

기주선호도는 choice**와** no choice **검정법을 사용하였다**. choice **검정의 경우 각각의 식물체를** cork borer (720 mm^2)**로 오려낸 후** 24h**후에 섭식면적을 계산하였다. 대조구로는 물오리나무 잎을 사용하였고 나머지** 8**종의 식물체를 물오리나무와 비교하였다**. No choice **검정의 경우** 9**종의 식물체를** cork borer**로 오려낸 후** 24h **후에 면적을 계산하였다. 면적은 컴퓨터와 연결된** color image microscope system (Samsung)**을 이용하였다**.

4) **유인력 검정**

기주식물에 대한 오리나무잎벌레의 유인력은 Y-tube olfactometer**를 이용하여 검정하였다. 한쪽 유리** chamber**에 검정에 기주식물을 넣고 한쪽에는 아무것도 넣지않은 유리** chamber**에**

600㎖/min 속도로 charcol을 이용하여 불순물을 제거한 깨끗한 공기를 흘려주었다. 오리나무잎벌레 성충 1마리를 Y-tube olfactometer 끝에 위치한후 양쪽 유리 chamber중 어느쪽을 선택하는지 조사하였다. 총 관찰시간은 마리당 5분동안 관찰하였고 5분내에 아무것도 선택하지 않은 경우는 무반응으로 처리하였다. 물오리나무에는 성충 60마리, 오리나무는 46마리를 사용하였다.

5) 휘발성물질 추출

물오리나무 및 오리나무의 휘발성 물질은 수증기증류법을 사용하여 추출하였다. 채취한 잎을 증류수로 깨끗이 씻은 후 2-3cm 길이로 잘라내어 수증기증류장치에 증류수(50㎖)와 함께 넣어 수증기증류장치를 이용하여 2시간 동안 추출하였다. 추출은 hexane을 이용하였다.

6) 유인성분분석

정유성분분석은 GC-MS를 이용하여 분석하였다. 분석조건은 Table 27과 같다.

Table 27. Conditions of gas chromatography and mass spectrometer

GC	HP6830
MS	JMS-600W, JEOL
Column	DB-WAX(60m, 0.25 mm I.D, 0.25 ㎛ film thickness, J & W Scientific Co.)
Oven temperature	70℃ to 200 ℃ (2℃/min)
Injection volume	4㎕

나. 결과

1) **기주선호도 조사** (No choice assay)

오리나무잎벌의 no choice **검정에 의한 기주선호도는** Fig. 6 **에 나타내었다**.

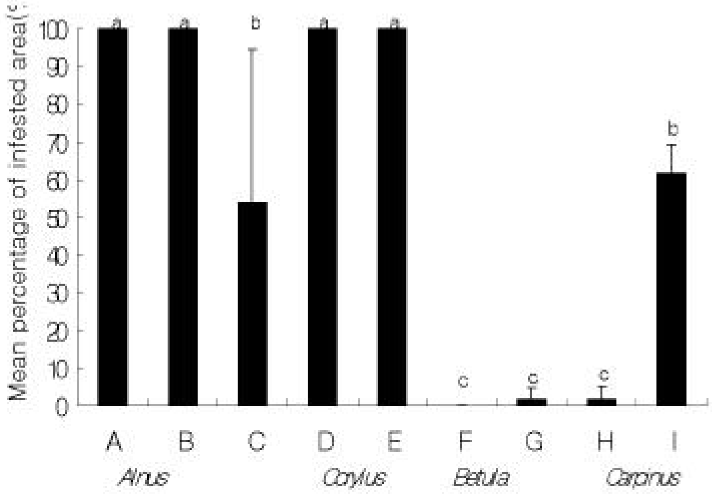


Fig. 6. Host preference of *A. coerulea* larvae (no choice). A=*A. hirsuta*, B=*A. japonica*, C=*A. maximowiczii*, D=*C. sieboldiana* var. *mandsburica*, E=*C. heterophylla* var. *thunbergii*, F=*B. schmidtii*, G=*B. davurica*, H=*C. cordata*, I=*C. tschonoskii* var. *brevicalycina*. Replication=3.

Fig. 6에서와 같이 오리나무잎벌레 유충은 오리나무속의 물오리나무, 오리나무는 100% 가해를 하였다. 개암나무속의 물개암과 개암나무도 쉽게 가해를 하는 것을 보여주었다. 오리나무속의 두메오리는 물오리나무나 오리나무에 비해 가해정도가 적었으며 자작나무속의 박달나무와 물박달나무는 거의 섭식을 하지 않았다. 서어나무속의 당개서어나무는 60% 정도 가해를 하였으나 까치박달은 거의 섭식을 하지 않았다.

Fig. 7은 choice 검정을 하였을 때의 기주선호도를 나타낸다. 대조구로는 물오리나무 잎을 사용하였고 나머지 8종의 자작나무과 나무 잎을 물오리나무잎의 섭식정도와 비교하였다.

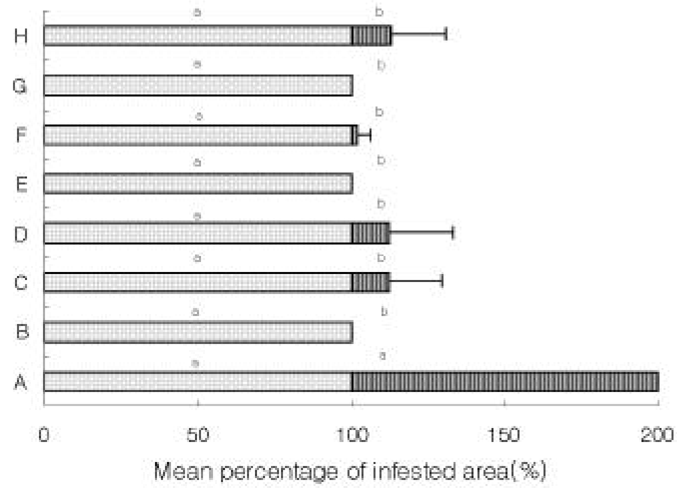


Fig. 7. Host preference of A. coerulea larvae (choice). A = *A. hirsuta* vs *A. japonica*, B = *A. hirsuta* vs *A. maximowiczii*, C = *A. hirsuta* vs *C. sieboldiana* var. *mandshurica* D =*A. hirsuta* vs *C. heterophylla* var. *thunbergii*, E = *A. hirsuta* vs *B. schmidtii*, F = *A. hirsuta* vs *B. davurica*, G = *A. hirsuta* vs *C. cordata*, H = *A. hirsuta* vs *C. tschonoskii* var. *bervicalycina*. ▧; A. hirsuta leave, ▥; other tested leaves. Replication = 3.

Fig. 7**에서 보듯이 오리나무잎벌레 유충은 오리나무와 물오리나무 경우를 제외하곤 모두 물오리나무를 더 많이 섭식함을 알 수 있다. 위의 결과들로 보아 오리나무잎벌레가 가장 선호하는 기주식물은 물오리나무와 오리나무임을 알 수 있었다. 실제로 수목원내에서 오리나무잎벌레가 가해하는 수종은 물오리나무와 오리나무**

만을 가해하는 것으로 채집도중 관찰되었다. 물오리나무와 오리나무 근처에 여러 자작나무과 나무들이 있었으나 산란된 알이나 가해하는 유충을 발견하진 못하였다.

주요 기주식물로 알려진 물오리나무와 오리나무에 대한 오리나무잎벌레 성충을 Y-tube olfactomere를 사용하여 유인정도를 알아본 결과는 Fig. 8에 나타내었다.

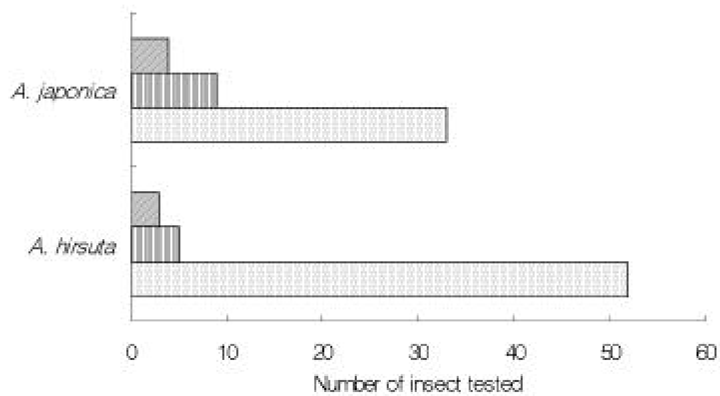


Fig. 8. Olfactory response of A. coerulea adult to host plants. ▧; leave, ▥; clean air, ▨; no response.

Fig. 8에서와 같이 물오리나무의 경우 성충 60마리중 57마리가 반응을 나타내어 반응정도는 95% 이었다. 반응한 개체들중 물오리나무잎을 선택한 개체수는 52마리로 91.2%가 물오리나무잎을 선택하였다. 깨끗한 공기를 선택한 개체수는 3마리로 8.8% 이었다. 오리나무의 경우 46마리중 42마리가 반응을 나태내어 반응정

도는 93.3% 이었다. 반응한 개체수중 오리나무잎을 선택한 개체수는 33마리로 78.5%가 오리나무잎을 선택하였다. 깨끗한 공기를 선택한 개체수는 9마리로 21.5%였다.

이상의 결과에서 오리나무잎벌레는 물오리나무와 오리나무에서 나오는 냄새에 강한 반응을 나타냄을 알 수 있었다. 이러한 반응에 관여하는 물질이 무엇인가를 알아보기 위하여 물오리나무와 오리나무잎의 휘발성물질을 탐색하였고 그 결과는 Fig. 9에 나타내었다.

두 나무의 휘발성물질들은 매우 비슷한 것으로 밝혀졌다. 물오리나무의 경우 (Z)-3-hexen-1-ol acetate (6.9%), 1-hexen-ol (1.2%), (Z)-3-hexen-1-ol (19.5%), L-linalool (6.3%), hotrienol (11.5%), tetradecanal (3.2%), beta-citronellol (1.2%), trans-geraniol (1.4%), 2,6-bis(1,1-dimethylethyl-4-methyl) phenol (3.3%), 1,2-methoxy-4-(2-propenyl) phenol (2.0%), tricosane (2.3%) and pentacosane (2.9%) 등이 동정되었고, 오리나무의 경우 (Z)-3-hexen-1-ol acetate (1.3%), 1-hexen-ol (0.9%), (Z)-3-hexen-1-ol (16.8%), L-linalool (0.9%), hotrienol (1.3%), trans-geraniol (3.7%), 2,6-bis(1,1-dimethylethyl-4-methyl) phenol (0.7%), neophytadiene (2.6%), valencene (0.7%), 1,2-methoxy-4-(2-propenyl) phenol (5.0%) and kaur-16-ene (50.1%) 등이 동정되었다. 두 나무 모두 green leaf volatile compounds로 알려진 (Z)-3-hexen-1-ol acetate, 1-hexen-ol, (Z)-3-hexen-1-ol이 다량으로 포함되어 있었고 linalool 및 geraniol 등이 함유되어 있었다. 아직 어떠한 물질이 오리나무잎벌레에 유인력을 갖는지 확실하지 않고 다음연도에 실험실 및 필드에서 실험할 계획으로 있다.

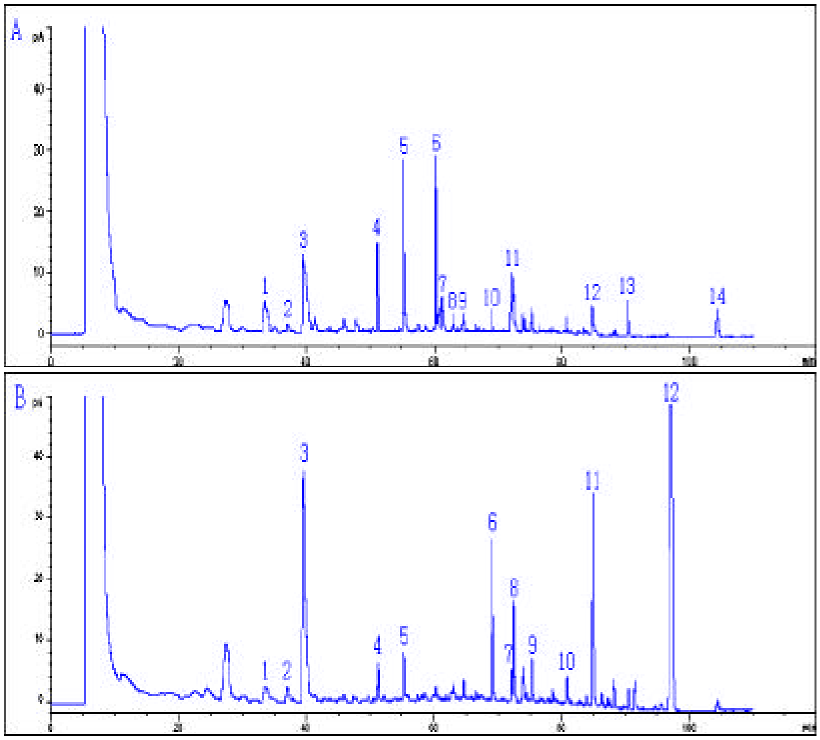


Fig. 9. Gas chromatogram of *A. hirsuta* and *A. japonica*. A = *A. hirsuta* ; 1: (Z)-3-hexen-1-ol-acetate, 2: 1-hexenol, 3: (Z)-3-hexen-1-ol, 4: Linalool, 5: hortrienol, 6: UK, 7: tetradecanal, 8: UK, 9: Beta-citronellol, 10: trans-geraniol, 11: 2, 6-bis (1, 1, dimethylethyl-4-methyl) phenol, 12: 2-methoxy-4-(2-propenyl) phenol, 13: tricosane, 14: pentacosane B = *A. japonica* ; 1: (Z)-3-hexen-1-ol-acetate, 2: 1-hexenol, 3: (Z)-3-hexen-1-ol, 4: Linalool, 5: hortrienol, 6: trans-geraniol, 7: 2, 6-bis (1, 1, dimethylethyl-4-methyl) phenol, 8: neophytadiene, 9: UK, 10: valencene, 11: 2-methoxy-4-(2-propenyl) phenol, 12: kaur-16-ene.

인 용 문 헌

Ahn, Y. J., K. H. Kim, N. J. Park & K. Y. Cho. 1992. Establishment of bioassay system for developing new insecticides II. Differences in susceptibilities of the insect species to insecticides according to different application methods. Korean J. Appl. Entomol. 31: 452-460.

Ahn, Y. J., M. Kwon, H. M. Park & C. G. Han. 1996. Potent insecticidal activity of *Ginkgo biloba*-derived Trilactone terpenes against *Nilaparvata lugens*. In *Phytochemical Pest Control Agents* (P. HEDIN, R. HOLLINGWORTH, J. MIYAMOTO, E. MASLER and D. THOMPSON, eds.). ACS Symp. Ser. Am. Chem. Soc., Washington, D.C., pp.

Arnason, J. T., B. J. R. Philogene & P. Morand. 1989a. *Insecticides of Plant Origin* ACS Symp. Ser. No. 387, Am. Chem. Soc., Washington, D.C.

Arnason, J. T., B. J. R. Philogene, P. Morand, K. Imrie, S. Iyengar, F. Duval, C. Soucy-Breau, J. C. Scaiano. N. H. Werstiuk, B. Hasspieler & A. E. R. Downe. 1989b. Naturally Occurring and Synthetic thiophenes as photoactivated insecticides. In *Insecticides of Plant Origin* (J.T. ARNASON, B.J.R. PHILOGENE and P. MORAND, eds). ACS Symp. Ser. No. 387. Amer. Chem. Soc. Washington, D.C., pp. 164-172.

Benner, J. P. 1993. Pesticidal compounds from higher plants. Pestic. Sci. 39, 95.

Cramer, H. H. 1967. Plant protection and crop production. Pflantzenschutz Nachrichten, 20. Farbenfabriken Bayer AG, Leverkusen.

Edwards, C. A. 1973. Environmental Pollution by Pesticides. Plenum Press. New York.

Georghiou, G. P & T. Saito 1983. Pest Resistance to Pesticides, Plenum Pub. New York.

Green, M. B., H. M. Lebaron & W. K. Moberg. 1990. Managing Resistance to Agrochemicals from Fundamental Research to Practical Strategies. ACS Symp. Ser. No. 421, Am. Chem. Soc., Washington, D.C.

Harborne, J. B. 1993. Introduction to Ecological Biochemistry, 4th Ed., Academic Press.

Hedin, P. A., R. M. Hollingworth, E. P. Masler, J. Miyamoto & D. G. Thompson. 1997. Phytochemicals for Pest Control. ACS Symp. Ser. No. 387, Am. Chem. Soc., Washington, D. C.

Jacobson, M. 1989. Botanical pesticides: past, present, and future. 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. 1-10.

Kwon, M., Y. J. Ahn, J. K. Yoo & B. R. Choi. 1996. Potent Insecticidal activity of *Ginkgo biloba* leaves against *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae). Appl. Entomol.

Zool. 31: 162-166.

Lee, C. B. 1982. *Illustrated Flora of Korea*. Hyangmunsa, Seoul, Republic of Korea.

Lee, S. G., S. I. Kim, Y. J. Ahn, J. B. Kim & B. Y. Lee. 1997. Effectiveness of carvacrol derived from *Thujopsis dolabrata* var. *hondai* sawdust against *Thecodiplosis japonensis* (Diptera: Cecidomyiidae). Pestic. Sci. 49: 119-124.

Lowery, D. T & M. B. Isman. 1995. Toxicity of neem to natural enemies of aphids. Phytoparasitica 23: 297-306.

Miyakado, M., I. Nakayama & N. Ohno. 1989. Insecticidal unsaturated isobutylamides: from natural products to agrochemical leads. In Insecticides of Plant Origin, (J.T. Arnason, B.J.R. Philogene & P. Morand, eds). ACS Symp. Ser. No. 387. Amer. Chem. Soc. Washington, D.C., pp. 173-187.

Namba, T. 1986. *Colored Illustrations of Wakan-Yaku (The Crude Drugs in Japan, China and the Neighbouring Countries) (Vols. I and II)*. Hoikusha Publishing, Osaka, Japan.

National Research Council. 1986. Pesticide Resistance, National Academic Press.

SAS. 1989. SAS user's Guide: Statistics. SAS Institute, Gary, North Carolina.

Saxena, R. C. 1989. Insecticides from neem. In *Insecticides of Plant Origin* (J.T. ARNASON, B.J.R. PHILOGENE and P.

Schmutterer, H. 1992. Control of diamondback moth by application of neem extracts. In *Diamondback Moth and Other Crucifer Pests, Proc. 2nd Internat. Workshop* (N.S. TALEKAR, ed.). Tainan, Taiwan, pp. 325-332.

Swain, T. 1977. Secondary compounds as protective agents. Ann. Rev. Plant Physiol. 28: 479-501.

Verkerk, R. H. J. and D. J. Wight. 1993. Biological activity of neem seed kernel extracts and synthetic azadirachtin against larvae of *Plutella xylostella* L. Pestic. Sci. 37: 83-91.

제 2 세부과제

천적미생물 탐색 및 개발 분야

세부연구책임자 : 임업연구원 신상철

제 3 장 천적미생물 탐색 및 개발 분야

제 1 절 서 설

인구의 증가는 식량확보라는 현실적인 문제와 밀접한 연관이 있으며 고도로 산업화된 오늘날에도 식량문제는 가장 중요하고 기본적인 것으로서 식량생산을 저해되는 요인을 제거하거나 개선시키기 위한 많은 연구들이 진행되고 있다. 식량 생산성을 감소시키는 여러 가지 요인들 중에서 해충에 의한 피해를 줄이기 위하여 과거 50여년 동안 화학농약에 전적으로 의존해 왔으며, 실제로 농약사용은 농업생산성 향상에 크게 기여해 왔다 (山本 1992). 그러나 화학농약의 사용은 식량의 증수는 가져왔지만 환경오염과 생태계파괴라는 부수적인 문제도 야기시킴으로서, 최근에는 환경친화적 해충방제에 대한 연구들이 많은 주목을 받고 있다. 1940년대부터 개발된 유기인계 농약들은 우리나라에서도 해충 밀도 억제의 유일한 방법으로 인식되어 왔다 (백 1983).

그러나 농약사용은 해충의 저항성 증가와 (Forgash 1984) 각종 천적류에 대한 부정적인 영향, 유효성분의 잔류에 의한 생태적, 환경적 문제를 유발시키고 있다. 그리하여 green round와 같은 국제협약을 통해 환경친화적인 생물농약개발을 독려하게 되었으며, 선진국에서는 2010년부터 화학농약의 사용을 금지하고 있다. 해충의 화학적 방제의 대체수단으로서 최근에는 천적류를 이용한 생물적 방제가 보편화되어 활용되고 있다. 또한 환경보전형 농업의 개념이 농업생산에 도입되면서 종합적 방제가 실질적으로 이용되고 있고, 종합적 방제에서 생물학적 방제의 중요

성이 더욱 증가되고 있다.

생물적 방제 인자들 중 곤충병원성 곰팡이는 기주체에 직접 접촉하거나 기주가 섭식하는 과정에 감염하여 기주를 치사시키는 천적으로서 (Leger 1993) 세계적으로 700여종이 알려져 있다 (Hajek와 Leger 1994). 이들은 넓은 기주범위를 가지며 (Tanada와 Kaya 1993), 논, 밭은 물론 과수원이나 산림, 묘포장등 모든 농림생태계의 해충방제에 이용되고 있다 (岡田 1989). 뿐만아니라 상품화되어 실용적으로 이용되고 있기도 하다 (Ferron 1978, 河上 1985). 곤충병원성 곰팡이를 실용화하기 위해서는 자연생태계에서 곰팡이를 탐색하고 탐색된 곰팡이의 생태적 특성을 조사하며 각종 해충에 대한 병원성 및 인공배지에서의 증식과 대량배양체계의 수립 및 장기보존방법의 확립과 유효성의 안전한 유지방법 연구 등이 수반되어야 할 것이다. 자연생태계에 광범위하게 분포하고 있는 병원성 곰팡이의 탐색은 주로 토양이나 곤충의 치사체에서 이루어 지고 있다. 한편, 곤충병원성 곰팡이는 노린재목이나 딱정벌레목, 나비목, 흰개미목, 매미목 등에 효과가 있는 것으로 보고되고 있어, 각종 농작물과 산림에서의 해충 방제에 효과적인 것으로 알려져 있다. 그 외에도 곤충병원성 곰팡이를 증식시키기 위하여 pH나 탄소원의 종류, 영양원 등이 포자생산이나 균사생장에 미치는 영향 등이 연구되기도 하였다. 곤충병원성 곰팡이의 장기보존을 위한 몇가지 방법도 연구되어 있다 (河上 1987, Sanchez-pena와 thorvilson 1995). 우리나라의 곤충병원성 곰팡이에 관한 연구는 그렇게 많지 않다. 추 등(1994a)은 *Beauveria brongniartii* 의 대량생산을 위한 경제배지 선발과 제제기술개발에 관한 연구와 함께 경제배지에서 증식된 *B. brongniartii* 의 병원성과 지속성을 알아보았고 (추 1994b), 이 등(1997)은 우리나라 남부지방에 분포하는 곤충병원성 곰팡이에 관해 조사한 바 있다.

따라서 본 연구는 화학농약에 대체할 방제수단으로서 환경친화적 방제인자활용을 목적으로 곤충병원성 곰팡이의 탐색과 그들의 생태적 특성, 각종 해충에 대한 병원성, 다른 방제법과의 혼용효과, 식물이나 식물병에 미치는 영향 등을 조사하였고, 대량배양을 위한 배지의 선발과 공정개발 및 장기보존법에 관한 기초연구를 수행하였다.

1. 곤충병원성 곰팡이의 선발과 균학적 특성

가. 재료 및 방법

1) 곤충병원성 곰팡이의 분리

곤충병원성 곰팡이를 분리하기 위하여 1994년 4월부터 98년 4월까지 Blackshaw(1988)의 방법을 응용하여 우리 나라 전역을 전(田)자 모양으로 위도와 경도를 중심으로 나누었으며 (Fig. 1), 이 지역의 삼림, 농경지, 골프장, 강둑 등으로부터 토양과 곤충치사체를 채집하였다.

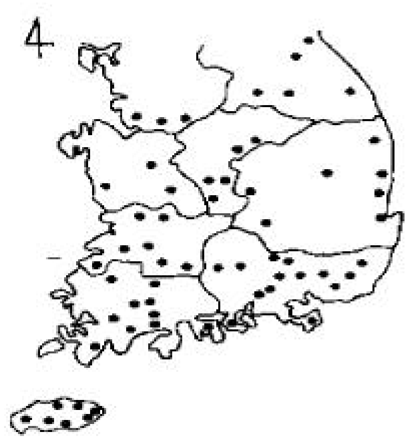


Fig. 1. Sampling sites (●) for isolation of entomopathogenic fungi from soils and/or insect cadavers from 1994 to 1998.

토양 채취는 도로로부터 200m내외 지점에서 하였고, 2 4㎡내에서 10×10×15㎝ 크기의 지점 5군데를 선정하여 토양 800cc를

모종삽으로 채취한 후 비닐봉지에 넣어 실험실로 운반하였다. 곤충병원성 곰팡이의 분리와 병원성 검정을 위해 실험실로 가져온 토양 샘플은 잘 섞어 250cc를 취한 후 300cc의 플라스틱통에 넣었으며, 꿀벌부채명나방 (*Galleria mellonella*) 노숙유충 5마리를 넣어 25±2℃의 항온기에 7일간 보관하였다. 그 후 곤충병원성 곰팡이에 의한 꿀벌부채명나방 유충의 치사 유무를 조사하였고 치사된 유충을 여과지(whatman #2) 1매를 깐 petri dish에 넣어 25±2℃에서 7일간 보관하여 유충표면에 증식된 포자를 얻었다. 포자를 PDA (potato dextrose agar)배지에 접종하여 다시 7일간 배양한 다음 곤충병원성 곰팡이 colony를 순수 분리하였다. 병원성 검정에 이용한 곰팡이는 포자현탁액을 PDA배지에 도말하여 7일간 배양한 후 포자를 긁어 0.05% Tween 20 용액에 넣어 현탁액을 만들었다. 그리고는 여과지 1매를 깐 직경 9cm의 petri dish에 꿀벌부채명나방 유충 10마리를 넣고 포자현탁액 (2.1×10^7 conidia/㎖) 1㎖를 접종하여 25±2℃ 항온기에서 8일간 보관하면서 병원성을 검정하였다. 분리된 곰팡이는 Samson(1981)의 방법에 따라 분류·동정하였다. 또한 조사기간 중 야외에서 발견된 곤충의 치사체도 비닐봉지에 넣어 실험실로 가져와서 위와 같은 방법으로 곤충병원성 곰팡이를 증식시켜 분리하였으며, 특히 산림내의 고사목 수피에 천공성해충이 많이 서식하기 때문에 수피를 벗겨낸 후 치사충을 수집하여 동일한 방법으로 증식시켜 분리하였다. 채취한 토양 샘플의 토성은 경남 농업과학기술원 식물환경과에 의뢰하여 미국 농무성법에 따라 구분하였다.

2) 곤충병원성 곰팡이의 배양적 특성

가) 배양기별 곤충병원성 곰팡이의 균사증식

배지종류에 따른 균사생장량을 조사하기 위하여 PDA, CSA, potato dextrose agar+yeast (SDAY), yeast extract agar (YEA), sucrose nitrate agar (SNA), ashour's nutrient medium(ANM)을 만들어 직경 9㎝의 petri dish당 15㎖를 분주하여 굳힌 후 PDA배지에서 2주간 배양한 균총선단 disc(5㎜)를 이식하였다. 그리고 25℃항온기에서 14일간 배양한 후 균사생장량을 측정하였다. 실험은 3반복으로 하였다. 또한 PD broth 첨가량에 따른 *B. brongniartii* 5913의 포자형성수를 알아보기 위하여 PD broth를 water agar배지에 0%, 0.5%, 1.0%, 2.0% 그리고 4.0%로 첨가하여 배지를 만들어 직경 9㎝의 petri dish에 분주하여 굳힌 후, 앞의 방법대로 균을 이식하고 25℃항온기에서 배양한 다음 포자수를 조사하였다. 포자수는 배지표면을 조심스럽게 긁어서 0.05% Tween 20용액에 담아 교반한 다음 10배 희석하여 광학현미경(200 ×)하에서 hemocytometer로 계수하였다. 실험은 3반복으로 하였다.

나) 온도와 pH의 영향

배지의 pH와 온도조건에 따른 균사생장량을 조사하기 위하여 0.5N HCl과 NaOH를 사용하여 pH를 3.0, 5.0, 7.0, 9.0, 11.0로 조절한 PDA배지에 앞의 방법대로 균을 이식하고, 15, 20, 25, 30℃에서 배양하였다. 균증식량은 7일, 9일, 14일간 배양한 후 균총직경생장량을 조사하였다. 실험은 3반복으로 하였다.
온도에 따른 균사생장과 포자 형성수는 25℃, 15℃의 PDA (potato

dextros agar 39g + water 1 ℓ) 배지에서 14일간 배양하여 4㎜ cork borer로 균총 disc를 떼내어 PDA 배지의 중앙에 옮긴 후 상온 처리의 경우 25±2℃ 항온기에 보관하면서 1, 2, 3주 후에 균사 생장을 조사하였으며, 저온 배양의 경우 15±2℃에서 배양하여 10일과 23일 후에 균사 생장을 조사하였다. 포자수 조사는 25±2℃처리의 경우 3주째에, 저온 처리의 경우 23일 후에 1㎝ cork borer로 균총을 떼내어 0.05% Tween 20 용액 9㎖에 넣어 교반기로 30초간 교반하였으며, 광학현미경(200×)하에서 hemocytometer로 계수하였다. 처리는 각각 3반복으로 하였다.

곤충병원성 곰팡이의 포자가 저온에서 어느 정도 발아하는지를 알아보기 위하여 *Beauveria* spp.와 *Metarrhizium* spp.를 PDA배지에 접종하여 25±2℃에서 14일 동안 배양하였다. 배지표면의 포자를 조심스럽게 긁어서 0.05% Tween 20 용액에 현탁하여 1×10^6 conidia/㎖의 포자현탁액을 얻었다. 그리고 PDA배지에 포자현탁액 0.1㎖를 접종하여 도말한 후 5℃와 10℃에서 배양하였다. 포자발아여부는 germ tube가 포자길이의 1/2이상일 때 발아한 것으로 하였으며, 발아수와 미발아수는 광학현미경(400×)에서 각 plate의 일부분에서 계수하였다. 10℃에서는 접종 3일후 24시간마다 조사하였으며, 5℃에서는 3일후 1회 조사한 다음 6일 후부터 24시간마다 조사하였다.

다) 보관온도가 곤충병원성 곰팡이의 지속성에 미치는 영향

곤충병원성 곰팡이를 장기간 보관하기 위하여 저장온도에 따른 곤충병원성 곰팡이의 생존력을 조사하였다. *Metarrhizium* sp. 066 균주와 *Beauveria* sp. 523 균주를 수분 50%의 톱밥과 쌀겨(8

: 2)를 혼합한 배지에서 2주간 배양한 후, 5℃와 10℃, 25℃ 항온기에 보관하면서 60, 120, 180일 후에 WA 배지를 이용하여 균 밀도를 조사하였고, 꿀벌부채명나방 유충을 이용하여 병원성을 검정하였다.

라) 목초액과 농약에서의 곤충병원성 곰팡이의 장기보존

식물생장조절작용과 항균작용이 있다고 하여 많이 사용되고 있는 목초액이 곤충병원성 곰팡이의 포자발아에 미치는 영향을 알아보기 위하여 참나무 목초액(pH 2.7)을 0.001%, 0.01%, 0.1%, 1%, 2%로 조제한 다음 potato dextrose broth 0.5%를 첨가하여 직경 2㎝ 시험관에 10㎖을 분주하였다. 그리고 121℃ 1.5기압에서 30분간 멸균하였다. 그런다음 PDA배지에서 2주간 배양한 *Beauveria* sp. 523 균주와 *Metarrhizium* sp. 066 균주의 포자 disc(5㎜)를 1개씩 접종하여 25℃에서 배양하였다. 접종 24시간마다 광학현미경(400×)에서 포자의 발아율을 조사하였다. 발아와 미발아는 germ tube가 포자길이의 1/2이상일 때 발아한 것으로 하였다. 농약이 곤충병원성 곰팡이에 미치는 영향을 평가하기 위하여는 곤충병원성 곰팡이에 대한 증식 억제력이 큰 fenitrothion 50% EC (O-O-dimethyl-O-4-nitro -m-tolyphosphorothioate)를 각각 100 ppm, 500 ppm, 1,000 ppm, 10,000 ppm으로 희석한 액에 potato dextrose broth를 0.5% 첨가하였다. 그리고 직경 2㎝ 시험관에 10 ㎖씩 분주하였고 121℃ 1.5기압에서 30분간 멸균하였다. 그리고는 PDA 배지에서 2주간 배양한 *Beauveria* sp. 523 균주와 *Metarrhizium* sp. 066 균주의 분생포자 disc(5㎜)를 1개씩 접종하여 25℃ 배양기에서 배양하였다. 접종 24시간마다 광학현미경(400

×)에서 분생포자의 발아율을 조사하였으며, 발아와 미발아는 germ tube가 포자길이의 1/2이상일 때 발아한 것으로 하였다. 포자 발아율은 목초액과 농약의 농도별 발아효과 조사에서 얻어진 발아억제 농도 300㎖을 tissue culture contaner에 200㎖ 씩 넣은 후, 포자(10^6/㎖)를 접종하여 25℃에 보관하면서 10일 간격으로 광학현미경(400 ×)을 이용하여 조사하였다. 즉, 보관현탁액을 살균수로 희석한 다음 PDA배지에 접종하여 발아 및 증식능력, 꿀벌부채명나방 유충을 이용한 병원성을 검정하였다.

나. 결 과

1) 곤충병원성곰팡이의 분리

234곳의 토양 샘플중 곤충병원성곰팡이가 분리된 곳은 45곳(Fig. 2)으로 전체의 19.2%를 차지하였고, 균별로는 *Beauveria*가 20곳 (8.5%), *Metarrhizium*이 20곳 (8.5%), *Aspergillus*가 5곳(2.1%)이었다. 그리고 21종의 곤충치사체에서도 곰팡이가 분리되었다. 서식처별로는 삼림지 135곳 중 30곳 (22.2%), 경작지 20곳 중 2곳 (10.0%), 휴한지 11곳 중 6곳 (54.5%), 강둑 28곳 중 7곳(25.0%)에서 곰팡이가 검출되었다 (Table 1).

Table 1. Sources and numbers of entomopathogenic fungi collected from 1994 to 1998

Location	No. samples containing entomopathogenic fungi / No. samples collected					
	Forest	Cultivated land	Fallow	Riparian	Golf courses	Insect cadaver
Chunnam	(B: 1)(A: 1)/5	0/2	(B: 2)(M: 1)/2	(B: 1)/2	0/5	(B: 3)/3
Chunbuk	0/6	ND	(B: 1)(M: 1)/1	(B: 1)/2	ND	(B: 1)/1
Gyeongnam	(B: 8)(M: 10)(A: 1)/55	(A: 2)/10	(B: 1)/6	(M: 3)/20	0/4	(B: 5)(M: 1)/6
Pusan	0/4	ND	ND	(B: 1)/1	0/10	(B: 1)/1
Gyeongbuk	(B: 1)(M: 1)/5	ND	ND	(M: 1)/1	0/8	(B: 1)/1
Taegu	0/6	ND*	ND	ND	0/10	ND
Chungbuk	(B: 2)/5	ND	ND	ND	ND	ND
Chungnam	(B: 1)(A: 1)/11	ND	ND	ND	ND	(B: 1)/1
Gyeonggii	(M: 1)/9	ND	ND	ND	ND	(B: 3)/3
Cheju	(M: 2)/29	0/8	0/2	0/2	0/3	(B: 1)/1
Total	(M: 14)(B: 13)(A: 3)/135	(A: 2)/20	(B: 4)(M: 2)/11	(B: 3)(M: 4)/28	0/40	(B: 16)(M: 1)/17

*B; *Beauveria*, M; *Metarrhizium*, A; *Aspergillus*.

**ND; Not determined.

***The great wax moth larvae were used as a bait to isolate entomopathogenic fungi from soil.

Fig. 2. Map of Korea showing the actual positive sampling sites for *Metarrhizium* spp.(■), *Beauveria* spp.(△), and *Aspergillus* spp.(▲).

Table 2. Location, soil texture, and vegetation of the entomopathogenic fungus positive habitats

Province & location	Soil texture[b]	Habitat	Dominant vegetation	Fungus	Isolate No.
Chunbuk					
Soonchang	Sc	Forest	*Castanea crenata*	*Beauveria*	674
Jangsoon	Sc	Riparian	Turfgrass	*Beauveria*	656
Jeongju	Sc	Agricultural	Fallow[a]	*Beauveria*	681
Namweon	Sc	Agricultural	Fallow[a]	*Metarrhizium*	671
Chunnam					
Hwasoon	Sc	Agricultural	Fallow[a]	*Metarrhizium*	612
Hwasoon	Sc	Agricultural	Fallow[a]	*Beauveria*	613
Hwasoon	Sc	Agricultrual	Fallow[a]	*Beauveria*	614
Kurye	Sc	Riparian	Turfgrass	*Beauveria*	664
Bosung	Sc	Forest	*Pinus palustris*	*Beauveria*	694
Sungju	Sc	Forest	*Chamaecypalis obtusa*	*Aspergillus*	661
			Unidentified cerambycid	*Aspergillus*	662
Hampyeong	Sc	Forest	*Pinus densiflora*	*Beauveria*	615
Changhung	Sc	Forest	*Pinus densiflora*	*Metarrhizium*	665
Changhung	Sc	Forest	*Pinus densiflora*	*Metarrhizium*	666
Gyeongpook					
Sangju	Sc	Riparian	Turfgrass	*Metarrhizium*	582
Koryoung	Sc	Forest	*Pinus densiflora*	*Metarrhizium*	543
Koryoung	Sc	Forest	*Pinus rigida*	*Beauveria*	544
Eusung		Forest	*Pinus rigida* Unidentified cermbycid larvae	*Beauveria*	576
Andong		Forest	*Pinus densiflora* Unidentified scolityd adult	*Beauveria*	571
Gyeongnam					
Chinju	Sc	Riparian	Turfgrass	*Metarrhizium*	591
Chinju	—	Forest	Japanese walking stick adult (*Phraortes elongatus*)	*Metarrhizium*	5912
Chinju	C	Agricultural	Soybean field unidentified scarab larvae	*Beauveria*	5913
Chinju	—	Forest	Peach pyralid moth larvae (*Dichocrocis punctiferalis*)	*Beauveria*	5914
Chinju	Sc	Forest	*Cryptomeria japonica*	*Beauveria*	5915

[a]Cultivated field that was fallow at the time of sampling.

[b]C; Clay, S; Sandy, Sc; Sandy clay.

Table 2. Continued

Province & location[a]	Soil texture[b]	Habitat	Dominant vegetation	Fungus	Isolate No.
Chinju	—	Forest	Unidentified fly adult	*Beauveria*	5916
Chinju	—	Forest	Unidentified leaf insect adult	*Beauveria*	5917
Chinju	—	Forest	Unidentified grasshopper adult	*Beauveria*	5918
Chinju	—	Forest	*Agelastica coerulea* adult	*Beauveria*	5919
Kimhae	Sc	Riparian	Turfgrass	*Metarrhizium*	525
Milyang	C	Forest	*Quercus aliena*	*Metarrhizium*	527
Milyang	Sc	Agricultural	*Zizyphus jujuba*	*Aspergillus*	528
Yangsan	Sc	Agricultural	Fallow[a]	*Beauveria*	523
Keoje	Sc	Forest	*Pinus thunbergii*	*Beauveria*	558
Changnyoung	Sc	Agricultural	Barley	*Aspergillus*	559
Uljin	Sc	Forest	*Pinus thunbergii*	*Aspergillus*	565
Uljin	Sc	Forest	*Pinus thunbergii*	*Metarrhizium*	566
Sancheong	Sc	Forest		*Beauveria*	596
			Larix leptolepis		597
Sancheong	Sc	Forest	*Larix leptolepis*	*Beauveria*	598
Sancheong	Sc	Forest	*Larix leptolepis*	*Metarrhizium*	599
Sancheong	Sc	Forest	*Larix leptolepis*	*Metarrhizium*	600
Sancheong	Sc	Forest	*Larix leptolepis*	*Metarrhizium*	601
Sancheong	Sc	Forest	*Larix leptolepis*	*Metarrhizium*	602
Sancheong	Sc	Forest	*Larix leptolepis*	*Metarrhizium*	603
Sancheong	Sc	Forest	*Larix leptolepis*	*Metarrhizium*	604
Sancheong	Sc	Forest	*Larix leptolepis*	*Metarrhizium*	605
Sancheong	Sc	Forest	*Larix leptolepis*	*Metarrhizium*	606
Sancheong	—	Forest	*Agelastica coerulea* adult	*Beauveria*	607
Namhae	—	Forest	Japanese alder minute weevil (*Rhynchaenus excellens*)	*Beauveria*	594
Namhae	Sc	Agricultural	Fallow[a] Unidentified Formicidae adult	*Beauveria*	595
Hapchon	Sc	Forest	*Robinia pseudoacacia*	*Beauveria*	5990
Euchang	Sc	Forest	*Quercus aliena*	*Beauveria*	551
Haman	Sc	Forest	*Pinus densiflora*	*Beauveria*	552
Haman	Sc	Riparian	Turfgrass	*Metarhizium*	553
Koseoung	—	Forest	*Pinus thunbergii* *Rhyacionia duplana* larva	*Beauveria*	556
Pusan					
Gupo	Sc	Riparian	Turfgrass	*Beauveria*	002
Tongrae	Sc	Forest	*Pinus densiflora*	*Beauveria*	003

[a]Cultivated field that was fallow at the time of sampling.

[b]C; Clay, S; Sandy, Sc; Sandy clay.

Table 2. Continued

Province & location	Soil texture[a]	Habitat	Dominant vegetation	Fungus genus	Isolate No.
Kyeonggi					
Osan	-	Forest	*Pinus densiflora* Unidentified scolytid adults	*Beauveria*	339
	Sc	*Forest*	*Quercus variabilis*	*Metarrhizium*	340
Icheun	-	Forest	*Pinus rigida* Unidentified cerambycid larva	*Beauveria*	335
Ansoung	-	Forest	*Pinus densiflora* Unidentified scolytid larva	*Beauveria*	334
Chungnam					
Gongju	Sc	Forest	*Pinus rigida*	*Beauveria*	416
Chungbuk	-				
Moongyeong	-	Forest	*Pinus densiflora* Unidentified scolytid adults	*Beauveria*	581
Chechun	—	Forest	Bald cypress Unidentified cerambycidae larvae	*Beauveria*	443
Cheju					
Namcheju	—	Forest	Pine sawyer larvae (*Monochamus alternatus*)	*Beauveria*	064
Namcheju	Sc	Forest	*Carpinus laxiflora*	*Metarrhizium*	065
Namcheju	s	Forest	*Pinus densiflora*	*Metarrhizium*	066

[a] C; clay, S; Sandy, Sc; Sandy clay.

지역별로는 경남지역이 105곳의 채집지 중 25곳에서 곤충병원성 곰팡이가 분리되어 23.8%의 검출율을 보였고, 경북, 전북, 전남의 경우 10% 내외의 검출율을 보였으나, 지역의 특색이나 지역별로 채집한 샘플 채취수에서 차이가 있어 직접적으로 검출율을 비교할 수는 없었다.

검출된 곤충병원성 곰팡이는 *Beauveria*, *Metarrhizium*, 그리고 *Aspergillus* 였는데, 이들 검출지의 식생과 토성은 Table 2와 같다. *Beauveria*는 서어나무, 밤나무, 소나무 등의 산림이나 휴한지, 강둑등의 잔디밭에서 다양하게 분리되었고, *Metarrhizium*은 산림지에서 분리율이 높았다. 지역적인 분포는 특이성이 없었으나

*Metarrhizium*의 경우 산청의 지리산 지역에서 검출율이 높았다. 또한 8 지역의 잔디밭에서도 병원성 곰팡이가 분리되었다 (3.6%). *Aspergillus*는 경남 울진의 산림 2곳, 밀양의 농경지 1곳, 전남 승주의 편백림 1곳에서 각각 분리되었다. 곤충의 치사체에서는 경남 진주의 복숭아명나방 유충과 남해 금산의 오리나무벼룩바구미 성충, 그외 미동정된 파리와 메뚜기의 성충 및 제주도 남제주의 해송 고사목에서 채집된 솔수염하늘소 유충에서 *Beauveria*가 분리되었다. 긴수염대벌레에서는 *Metarrhizium*이, 전남 승주의 미동정 바구미 성충에서는 *Aspergillus*가 분리되었다. (Table 3).

Table 3. List of entomopathogenic fungi isolated from insect cadavers

Host insect	Stage	Collected site	Fungus
Monochamus alternatus	Larvae, Adult	Forest	*Beauveria*
Unidentified bark beetle	Adult	Forest	*Beauveria*
Unidentified scarab	Larva	Forest	*Beauveria*
Unidentified weevil	Larva	Forest	*Beauveria*
Unidentified longicorn beetle	Larva	Forest	*Metarrhizium*
Dichrocis punctiferalis	Larva	Forest	*Beauveria*
Phraortes illepidus	Adult	Forest	*Metarrhizium*
Rhynchaenus excellens	Larva	Forest	*Beauveria*
Chilo suppressalis	Larva	Agriculture	*Beauveria*
Unidentified fly	Adult	Forest	*Beauveria*
Unidentified grasshopper	Adult	Forest	*Beauveria*
Unidentified ant	Adult	Agriculture	*Beauveria*
Agelastica coerulea	Adult	Forest	*Beauveria*
Unidentified ant	Adult	Agriculture	*Beauveria*
Rhycacionia duplana	Larva	Forest	*Beauveria*

특히, 진주지역의 해송 고사목에 서식하던 하늘소와 바구미 및 나무좀 유충에서 곤충병원성 곰팡이가 검출되었는데 천공성 해충의 밀도 억제에 많은 역할을 할 것으로 보인다. 또한, 경남 진주의 콩밭에서 거세미나방 유충으로부터 *Metarrhizium*이 분리되었

으며 미동정 풍뎅이 유충으로부터는 *B. brongniartii*가 분리·동정되었다. *B. brongniartii*가 분포하고 있던 진주 콩밭에서는 콩 수확 후의 전 포장에 불규칙적으로 곤충병원성 곰팡이 분생포자가 분포하고 있음을 확인할 수 있었다. 한편, 병원성곰팡이가 검출된 지역의 토성은 두 곳의 양토를 제외하고는 모두 사양토였다.

2) 곤충병원성 곰팡이의 배양적 특성

가) 배양기별 곤충병원성 곰팡이의 균사증식

상업용배지 중에서 균증식에 적합한 배지를 선발하기 위하여 각각의 병원성 곰팡이들중 *B. brongniartii* 5913 균주를 SDY배지 외 5종의 배지에서 균증식효과를 조사한 결과, SDY배지가 다른 배지에 비하여 증식이 양호하였으며, 접종 1주후 균사직경은 22.0㎜에서 23.5㎜였다. 2주후에는 균사생장이 가장 양호한 SDY배지에서 37.5㎜였고, 다른 배지에서는 31.4㎜ 34.0㎜로 비슷한 경향을 보였다 (Table 4).

Table 4. Mycelial growth of the entomopathogenic fungi on various commercial media

Fungus	Media[a]	Diameter(㎜) of fungus colonies	
		7 days	14 days
B. brongniartii 5913	CSA	22.3 ±2.2 a	33.8 ±3.1 ab
	PDA	22.5 ±1.4 a	31.4 ±2.1 b
	SNA	22.0 ±2.1 a	32.1 ±1.4 ab
	ANM	22.2 ±2.5 a	34.3 ±2.6 ab
	SDY	23.1 ±1.1 a	37.5 ±1.3 a
	YEA	23.5 ±3.1 a	34.0 ±2.2 ab

[a] CSA; Czapek solution agar, PDA; Potato dextrose agar, SNA; Sucrose nitrate agar, ANM; Ashour's nutrient medium, SDY; Sabouraud dextrose yeast, YEA; Yeast extract agar.
Date were shown with mean value of 3 colonies.

나) **온도및** pH**의 영향**

온도에 따른 균사생장량은 15℃**에서 접종** 14**일째** *Metarrhizium* spp **이** 24.7 40.0㎜, *Beauveria* spp.**는** 24.7 55.5 ㎜**로써 두 속간에 큰 차이가 없었다** (Table 5).

Table 5. Mycelial growth and sporulation of the entomopathogenic fungi on potato dextrose agar at 15 and 25℃

Fungi	Diameter (㎜) of fungus colonies[a]		Conidia[b] ×10^7/㎠	
	15℃	25℃	15℃	25℃
Metarrhizium 582	37.3±0.5 c	65.3±0.5 b	-	17.1±0.8 a
525	33.7±0.5 cd	66.3±1.2 b	-	2.8±0.5 b
598	24.7±0.5 d	46.7±0.5 cd	-	4.9±2.1 b
681	32.0±0.8 cd	72.7±1.2 a	-	4.3±0.7 b
592	26.3±0.5 d	47.0±0.8 cd	-	14. ±61.2 a
065	26.7±0.5 d	64.3±2.5 b	-	4.9±1.6 b
551	40.0±0.8 c	63.7±1.2 b	-	3.2±0.9 b
674	25.0±0.8 d	58.0±1.6 c	-	6.5±1.7 b
527	27.0±0.0 cd	63.0±0.5 b	-	20. ±2.9 a
600	26.7±0.5 cd	54.7±2.9 c	-	3.3±1.2 b
Beauveria 601	30.7±0.5 cd	44.7±0.9 d	-	3.1±1.2 b
594	55.5±0.5 a	77.3±2.5 a	-	-
613	30.7±0.5 cd	52.3±0.5 cd	-	-
064	33.0±0.0 cd	35.7±4.1 e	-	-
600	31.7±0.5 cd	42.7±0.5 d	-	-
523	28.0±0.8 cd	43.7±3.8 d	-	-
664	34.7±0.5 cd	49.0±1.4 cd	-	-
598	24.7±0.5 d	57.7±0.5 c	-	-
002	44.0±1.4 b	54.0±2.8 c	-	-
5990	46.7±0.9 b	55.7±1.3 c	-	-
543	46.0±0.8 b	54.3±3.3 c	-	-
544	48.3±0.5 b	52.7±2.1 cd	-	-
671	47.0±0.8 b	53.3±1.3 c	-	-
614	39.3±1.2 c	48.3±1.3 cd	-	-

[a]14 days after inoculation. [b] 21 days after inoculation.

Data were shown with mean value of 3 colonies.

Means within a column followed by the same letters are not significantly different (P=0.05 : Duncan's multiple range test).

균주 가운데 15℃에서 증식이 가장 뛰어난 균은 *Metarhizium* sp. 551과 *Beauveria* sp. 594로 배양 14일 후 균총직경이 각각 40.0㎜와 55.5㎜였다. 25℃에서의 균사생장은 *Metarrhizium* spp.가 46.7 72.7㎜, *Beauveria* spp.가 35.7 77.3㎜로서 두 속간에 차이가 없었으나, 동일 속에서도 균주 간에는 큰 차이를 보였다. *Metarrhizium*속 중에서 증식이 가장 양호한 균주는 *Metarrhizium* sp. 681 (72.7㎜)이었으며 *Beauveria* sp.는 594 균주 (77.3㎜)였다.

포자형성은 *Metarrhizium*속이 많았던 반면에 *Beauveria*속은 철쭉잎벌 치사충에서 분리된 601 균주를 제외하고는 형성 되지 않았고 균사형태로만 증식하였다. 포자 형성수는 *Metarrhizium* sp. 582가 17.1×10^{7}, *Metarrhizium* sp. 527이 20.0×10^{7}, *Metarrhizium* sp. 592가 14.0×10^{7} 로 가장 많았다 (Table 5). 한편, 저온에서 균주별 분생자 발아효과를 조사한 결과는 Table 6 및 7과 같다. 5℃에서는 접종 2일후 *Beauveria* sp. 614 균주는 98%의 높은 발아율을 보였으나 그외 균주는 20%이하의 발아율을 보였는데, 6일후에 64.5 100%의 높은 발아율을 보였다. 그러나 *Beauveria* sp. 551, 335, 607, 600은 전혀 발아하지 못하였다. 10℃에서는 5℃에 비하여 발아 일수가 짧았는데, 접종 3일후 100%의 발아율을 보인 균주는 *Beauveria* sp. 661, 614, 002, 576, 671, 600, 443, 5441, 594 균주였다. 특히, 5℃에서 전혀 발아하지 못한 *Beauveria* sp. 600 균주는 10℃에서 다른 균주 551, 607, 335에 비하여 접종 3일후 100%의 발아율을 보였다.

속별로는 *Metarrhizium*이 *Beauveria*에 비하여 발아시간이 길고 발아율이 낮은 경향을 나타내었다. 즉, 5℃에서 공시균주 모두 전혀

발아하지 못하였고 10℃에서도 발아율이 떨어지는 경향을 보였다. 그러나 *Metarrhizium* sp. 606과 591, 582 균주는 10℃에서 접종 3일후에 100%의 발아율을 보였다.

Table 6. Conidia germination of *Beauveria* spp. on potato dextrose agar at low temperature, 5 and 10℃

Fungi	℃	Conidial germination (%) / days after treatment							
		2	3	4	5	6	7	8	9
Beauveria 523	10		97.7	100					
	5	0	—	—	—	100			
Beauveria 661	10		100						
	5	7.5	—	—	—	100			
Beauveria 551	10		4.0	43.0	50.5	53.3	93.6		
	5	0	—	—	—	0	0	0	0
Beauveria 664	10		42.1	93.5	96.7	100			
	5	3.3	—	—	—	86.6	97.0	100	
Beauveria 614	10		100						
	5	98.0	—	—	—	100			
Beauveria 334	10		90.9	100					
	5	16.7	—	—	—	96.7	100		
Beauveria 335	10		0	23.7	38.5	93.3	100		
	5	0	—	—	—	0	0	0	0
Beauveria 5990	10		98.7	100					
	5	0.1	—	—	—	100			
Beauveria 607	10		0	1.9	5.3	12.5	42.8		
	5	0	—	—	—	0	0	0	0
Beauveria 002	10		100						
	5	12.5	—	—	—	100			
Beauveria 576	10		100						
	5	0	—	—	—	100			
Beauveria 671	10		100						
	5	20.0	—	—	—	100			
Beauveria 571	10		98.4	100					
	5	4.7	—	—	—	100			
Beauveria 595	10		0	0	13.5	36.4	50.0		
	5	3.1	—	—	—	64.5	94.2	100	
Beauveria 600	10		100						
	5	0	—	—	—	0	0	0	0
Beauveria 443	10		100						
	5	2.5	—	—	—	100			
Beauveria 556	10		14.3	48.5	62.5	98.2	100		
	5	0	—	—	—	95.8	10		
Beauveria 335	10		90.6	100					
	5	0	—	—	—	86.7	95.7	100	
Beauveria 5441	10		100						
	5	2.4	—	—	—	100			
Beauveria 594	10		100						
	5	0	—	—	—	71.1	100		

Table 7. Conidia germination of *Metarrhizium* spp. on potato dextrose agar at low temperature, 5 and 10℃

Fungi	Temp. (℃)	Conidial germination(%) / days after treatment							
		2	3	4	5	6	7	8	9
Metarrhizium 599	10		0	0	33.3	80.0	84.6		
	5	0	—	—	—	0	0	0	0
Metarrhizium 554	10		0	2.8	45.9	66.7	69.2		
	5	0	—	—	—	0	0	0	0
Metarrhizium 665	10		73.5	96.7	100				
	5	2.0	—	—	—	2.0	2.0	2.0	2.0
Metarrhizium 605	10		0	0	49.3	100			
	5	1.7	—	—	—	100			
Metarrhizium 600	10		54.6	52.4	61.9	100			
	5	0	—	—	—	0	0	0	0
Metarrhizium 598	10		1.0	1.6	15.9	25.9	47.0		
	5	2.5	—	—	—	3.1	4.1	7.5	95.6
Metarrhizium 606	10		100						
	5	0	—	—	—	0	0	10.0	35.0
Metarrhizium 591	10		100						
	5	0	—	—	—	0	0	0	0
Metarrhizium 602	10		0	0	13.5	36.4	50.0		
	5	0	—	—	—	0	0	0	
Metarrhizium 601	10		0	0	1.1	2.2	11.1		
	5	0	—	—	—	0	0	0	0
Metarrhizium 603	10		0	0	5.6	30.0	62.2		
	5	0	—	—	—	0	0	0	0
Metarrhizium 582	10		100						
	5	0	—	—	—	0	0	0	0

Percentages of germinated conidia were detremined by microscopic observation of 500 conidia.

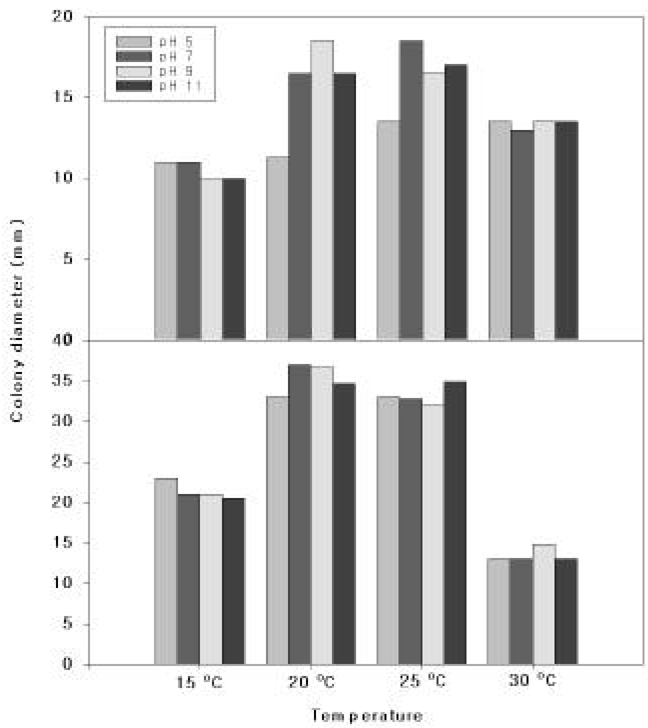


Fig. 9. Effect of pH on mycelial growth of the entomopathogenic fungus, *Beauveria brongniartii* 5913.

Fig. 3. Effect of PH on mycelial growth of the entomopathogenic fungus, *Beauveria brongniartii* 5913

B. brongniartii 를 이용하여 온도와 pH에 따른 곤충병원성 곰팡이의 균사생장을 알아보기 위하여 실험한 결과, 균사생장은 pH 보다도 온도의 영향이 큰 것으로 나타났다 (Fig. 3). 균사생장량은 같은 pH에서도 온도에 따라 차이를 보였으며, 20℃와 25℃에서 15℃와 30℃에 비하여 균총발육이 양호하였다.

다) 보관온도가 병원성 곰팡이의 지속성에 미치는 영향

실온이나 5℃ 또는 10℃ 모두 처리 180일까지 분생자의 활성과 병원성이 양호하였다 (Table 8).

Table 8. Long term survivability of the entomopathogenic fungi at different temperature

Preservation period (days)	Temperature (℃)					
	5		10		Room temp.	
	Colony growth	Pathogenicity	Colony growth	Pathogenicity	Colony growth	Pathogenicity
60	+	+	+	+	+	+
120	+	+	+	+	+	+
180	+	+	+	+	+	+

Entomopathogenic fungus was either stored under organic fertilizer or through susceptible hosts.
Conidia suspensions were obtained using Tween 20.
The fungus was inoculated to the larvae by injection at the rate of 10^7/㎖.

라) 목초액과 농약에서의 곤충병원성 곰팡이의 장기보존

목초액이 곤충병원성 곰팡이의 분생자 발아에 미치는 영향과 액체상태로의 장기 보존가능성을 검토한 결과, 목초액 0.1% 이하의 농도에서는 접종 1일후 100%의 발아율을 보인 반면에, 1%와 2%

농도에서는 처리 30일까지 발아되지 않았다. 또한 발아가 억제되는 1%와 2%에 보관했을 때 30일까지 분생자가 발아되지 않았지만 살균수로 희석한 다음 배양했을 때는 100%의 발아율을 보였다. 그리고 꿀벌부채명나방 유충에 처리했을 때 병원성은 매우 양호하였다 (Table 9).

Table 9. Germination and survivability of entomopathogenic fungi depending on the concentration of wood vinegar on quarter strength potato dextrose broth

Fungi	Concentration of wood vinegar (%)	Percent of germination (survivability*) / days after treatment			
		1	10	20	30 days
Metarrhizium	0.01	100			
066	0.1	100			
	1	0 (+)	0 (+)	0 (+)	0 (+)
	2	0 (+)	0 (+)	0 (+)	0 (+)
Beauveria	0.01	100			
523	0.1	100			
	1	0 (+)	0 (+)	0 (+)	0 (+)
	2	0 (+)	0 (+)	0 (+)	0 (+)

*The fungus was sporurated when the stock culture was diluted with distilled water.

농약이 곤충병원성 곰팡이에 미치는 영향은 fenitrothion 50 ppm**과** 500 ppm**농도에서는 접종** 1**일에는 발아하지 못하였으나** 2**일 후에는** 100%**의 발아율을 보였고** 1,000 ppm**이상의 농도에서는 전혀 발아되지 않았다**. **그리고 발아하지 않는** 1,000 ppm**과** 5,000 ppm**농도에 곰팡이를** 30**일간 보존한 후 희석하였을 때는** 100%**의 발아율을 보였으며 병원성도 유지하는 것으로 나타났다** (Table 10).

Table 10. Germination and survivability of entomopathogenic fungi depending on the concentration of fenitrothion on quarter strength potato dextrose broth

Fungi	Concentration of fenitrothion (ppm)	Percent germination (Survivability)[a] / days after treatment				
		1	2	10	20	30 days
Metarrhizium	50	0	100			
066	500	0	100			
	1,000	0 (+)	0 (+)	0 (+)	0 (+)	0 (+)
	5,000	0 (+)	0 (+)	0 (+)	0 (+)	0 (+)
Beauveria	50	0	100			
523	500	0	100			
	1,000	0 (+)	0 (+)	0 (+)	0 (+)	0 (+)
	5,000	0 (+)	0 (+)	0 (+)	0 (+)	0 (+)

[a]The fungus was sporurated when the stock culture was diluted with distilled water.

2. 곤충병원성 곰팡이의 해충 방제효과

가. 재료 및 방법

1) 곤충병원성 곰팡이의 살충효과 실내검정

가) 곤충병원성 곰팡이의 병원성

꿀벌부채명나방 (*Galleria mellonella*) 유충을 이용하여 분리된 곤충병원성 곰팡이의 병원성을 확인하였다. petri dish (Φ9㎝)에 여과지 (Whatman #2)를 1장 깔고 꿀벌부채명나방 노숙유충 10마리씩을 넣었다. 여기에 PDA에서 배양한 포자현탁액(10^7 conidia/㎖) 1㎖를 접종하였고 건조를 방지하기 위하여 랩으로 싼 다음 25±2℃ 항온기에 두었다. 접종 4일 후부터 곤충병원성 곰팡이의 감염에 의한 치사유무를 조사하였다.

나) 오리나무잎벌레 (*Agelastica coerulea*) 유충에 대한 곤충병원성 곰팡이의 병원성

오리나무잎벌레에 대한 병원성을 검정하기 위하여 고두밥 배지에서 배양한 곰팡이를 0.05% Tween 20용액에 넣어 교반한 후 고두밥을 걸렀다. 그리고 포자현탁액을 얻었다. *Beauveria* sp. 523 균주는 7×10^7, 7×10^6, 7×10^5, 7×10^4 conidia/㎖ 농도로 희석하였으며, *Metarrhizium* sp. 066 균주는 9.6×10^6, 9.6×10^5, 9.6×10^4, 9.6×10^3 conidia/㎖ 농도로 희석하였다. 희석한 포자현탁액을 500cc의 비이커에 300cc씩 넣고 오리나무 잎을 1분간 침지한 다음 20분간 그늘에서 건조시켰다. 9×1.5㎝ 크기의 1회용 petri dish에 여과지(Whatman #2) 1장를 깔고 살균수 1㎖를 주입한 다음 곰팡이 현탁액에 침지 ·건조시킨 오리나무 잎 한장씩을 넣었다. 여기에 야외에서 채집, 사육한 오리나무잎벌레 3령충 10마리씩을 넣었으며, 수분증발을 방지하기 위하여 petri dish를 비닐팩에 싸서 25±2℃항온기에 보관하면서 7일 후 병원균에 의한 치사유무를 조사하였다. 대조구는 살균수에 침지시킨 오리나무 잎을 이용하였다. 처리는 3반복으로 하였다.

다) 밤나무혹나방 (*Meganola melancholica*) 유충에 대한 곤충병원성 곰팡이의 병원성

밤나무혹나방에 대한 병원성은 고두밥 배지에서 배양한 병원성곰팡이를 앞의 방법과 동일하게 하여 검정하였다. *Beauveria* sp. 523 균주는 0.3875×10^7, 0.775×10^7, 1.55×10^7, 3.1×10^7 conidia/㎖ 농도로 희석하였으며, *Metarrhizium* sp. 066 균주는 2.7×10^7, 1.35×10^7, 0.657×10^7, 0.3375×10^7 conidia/㎖로 희석하였다. 희석한 포자현탁액을 500cc의 비이커에 300cc씩 넣고 밤나무 잎을 1분간 침지시킨 다음 20분간 그늘에서 건조시켰으며, 이것을 여과지(Whatman #2) 1매를 깔고 살균수 1㎖를 주입한 9×1.5㎝ 1회용 petri dish에 한장씩 넣었다. 여기에 야외에서 채집한 밤나무혹나방 10마리씩을 넣었다. 수분증발을 방지하기 위하여 비닐팩에 싸서 25±2℃항온기에 보관하였고, 7일 후 병원균에 의한 치사유무를 조사하였다. 대조구는 살균수에 침지시킨 밤나무 잎을 이용하였다. 처리는 3반복으로 하였으며 대조약제로 BT 수화제 (*Bacillus thuringiensis*)를 사용하였다.

라) 회양목명나방 (*Glyphodes perspectalis*) 유충에 대한 곤충병원성 곰팡이의 병원성

회양목명나방에 대한 병원성 검정은, 회양목 1년생가지를 2×10^7, 2×10^6, 2×10^5, 2×10^4 conidia/㎖의 *Beauveria* sp. 523 균주 현탁액과, 4×10^7, 4×10^6, 4×10^5, 4×10^4 conidia/㎖의 *Metarrhizium* sp. 066 균주 현탁액에 1분간 침지시킨 후 그늘에서 20분간 건조시킨 뒤 오리나무잎벌레에 대한 병원성 검정과 동일한 방법으로 처리하였다. 각 petri dish에 회양목명나방 유충 1마리씩을 넣어 10개의 petri dish를 1반복으로 하여 3반복으로 조사하였다. 대조 약제로 deltamethrin 1% EC 1,000배액을 이용하였으며, 처리 7일후 병원성곰팡이에 의한 치사유무를 조사하였다.

마) 등얼룩풍뎅이 (*Anomala orientalis*) 유충에 대한 곤충병원성 곰팡이의 병원성

등얼룩풍뎅이 유충에 대한 병원성 검정을 위하여 44×33×15 ㎝ 플라스틱 상자에 벤트그라스 (*Agrostis palustris* Huds.)를 이식한 15일 후 부산 동래 골프장에서 채집한 등얼룩풍뎅이 3령충 15마리를 접종하였다. 접종 1일 후 곰팡이 현탁액을 *Beauveria* 523 균주는 3.7×10^7 conidia/㎖ 농도로, *Metarrhizium* sp. 066은 3.4×10^7 conidia/㎖ 농도로 4 ℓ씩 살포한 뒤 실온에 두었다. 대조구는 살균수 4 ℓ를 살포하였으며, 대조 약제로는 시판되고 있는 fenitrothion 50% EC 1,000배액을 물조리개로 4 ℓ씩 관주하였다. 처리 2주일 후에 병원성곰팡이에 의한 치사유무를 조사하였으며 각 처리는 3반복으로 하였다.

바) 거세미나방 (*Agrotis segetum*) 유충에 대한 곤충병원성 곰팡이의 병원성

거세미나방 유충에 대한 병원성 검정은 등얼룩풍뎅이 유충에 대한 병원성 검정과 동일한 방법으로 수행하였으며, 포자현탁액의 농도는 *Beauveria* sp. 523은 2.5×10^{7} conidia/㎖였고 *Metarrhizium* sp. 066은 6×10^{7} conidia/㎖였다. 살포 7일 후에 곤충병원성 곰팡이에 의한 치사유무를 조사하였다.

사) 배추좀나방 (*Plutella xylostella*) 유충에 대한 곤충병원성 곰팡이의 병원성

배추좀나방에 대한 병원성 검정은 *Beauveria* sp. 523은 2×10^{7}, 1×10^{7}, 0.5×10^{7} conidia/㎖ 농도로, *Metarrhizium* sp. 066은 4×10^{7}, 2×10^{7}, 1×10^{7}, 0.5×10^{7} conidia/㎖로 희석한 현탁액에 실내 pot에서 20일간 키운 배추(춘하왕배추) 잎을 1분간 침지시킨 뒤 20분간 그늘에서 건조시켰다. 건조시킨 잎을 여과지(Whatman #2) 1매를 깔고 살균수 1㎖를 주입한 9×1.5㎝ petri dish에 한잎씩 넣고, 경남농업기술원에서 사육중인 배추좀나방 화현 계통 3령 유충을 10마리씩 접종하여 25±1℃의 항온기에 두었으며, 5일후에 치사율을 조사하였다. 대조구는 살균수를, 대조 약제로는 prothiofos 50% EC 1,000배액을 이용하였다. 처리는 3반복으로 하였다.

2) 곤충병원성 곰팡이의 포장 처리효과

동래베네스트 골프장에서 인위적으로 굼벵이를 접종하여 실시하였다. 시험구의 크기는 0.5m×0.5m로 하였으며 완전임의 배치법

으로 시험구를 배치하였다. 4번 back tee에서 채집한 등얼룩풍뎅이 3령충 50마리를 4㎝ 간격으로 4 5㎝ 깊이에 50마리를 넣었으며 여기에 *Metarrhizium* sp. 066과 *Beauveria* sp. 523을 10^7cfu/㎖ 농도로 2 ℓ씩 살포하였다. 처리 한달 후, 각 구의 25㎠내에 있는 굼벵이 밀도를 3개소에서 조사하여 대조구의 생충수와 비교하였다.

3) 농약이 곤충병원성 곰팡이에 미치는 영향

농약이 곤충병원성곰팡이의 포자형성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 SMAY (10g neopepton, 40g maltose, 2g yeast extract, 15g agar, 1 ℓ water) 배지에 fenitrothion, mepronil, metalaxyl, tolclopos-methyl을 권장량의 ½배, 권장량, 또는 권장량의 2배로 첨가하여 살균한 후 9㎝ petri dish에 분주하고는 PDA (39g potato dextrose agar, 1 ℓ water) 배지에서 배양한 *Beauveria* sp. 523과 *Metarrhizium* sp. 066의 포자현탁액 0.5㎖를 접종하였다. 그리고 25±2℃의 항온기에 보관하였다. 4일 후 형성된 cfu (colony forming unite)를 조사하였는데 대조구는 농약을 첨가하지 않은 배지에서 배양된 cfu를 조사하였다. 각 처리는 3반복으로 하였다.

실험에 이용된 농약의 종류는 Table 11과 같이 제초제 1종, 살충제 4종, 살균제 4종이었다.

Table 11. Pesticides used in the test

Classification	Common name	Formulation	Chemical name	AI in formulation (%)
Herbicide	alachlor	EC	2-Chloro-2',6'-diethyl-N-(methoxyl methyl) acetanilide	43.7
Insecticide	Bacillus thuringiensis	WP	Bacilus thuringiensis Berliner Variety Kurstaki(Serotype Ⅲ a, Ⅲ b)	(16 BIU/ ㎏)
	carbofuran	G	2, 3-Dihydro-2, 2-dimethyl benzofuran-7-yl methyl carbamate	3
	fenitrothion	EC	O, O-dimethyl-O-4-nitro-m-tolyl phosphoro-thioate	50
	teflubenzuron	SC	1-(3, 5-Dichloro-2, 4-difluorophenyl) -3-(2, 6-difluorobenzoyl) urea	5
Fungicide	iprodione ＋thiram	WP	3-(3, 5-Dichrolorophenyl)-N-isopropyl-2, 4-dioxoimidazolidime-1-carboxamide	15
			Tetramethylthiuramdisulfide	40
	mepronil	WP	3'-isopropoxyl-O-toluanilide	75
	metalaxyl	WP	Methyl-N-(2-methoxyacetyl)-N-(2, 6-xylyl)-D, L alaninate	25
	tolclofos-methyl	WP	O-2, 6-dichloro-p-tolyl O, O-dimethyl phosphorothioate	50

가) 농약 침지시간에 따른 곤충병원성 곰팡이의 병원성

Beauveria sp. 523 균주와 *Metarrhizium* sp. 066 균주를 고두밥에서 14일간 배양한 다음 1g (3.0×10^7 conidia/g)을 0.05% Tween 20 용액을 넣은 용기에 fenitrothion, mepronil, metalaxyl, tolclopos-methyl 권장량의 희석액을 넣었다. 그리고 1시간, 3시간, 5시간 동안 침지시킨 후 거즈로 고두밥을 제거한 다음, 원심분리기 (VS-5500 CF, Vision scientific Co. Korea)에서 3,000 rpm으로 30초간 원심분리하였다. 상층액을 제거한 뒤 다시

살균수 10㎖을 주입하여 동일한 방법으로 원심분리를 3회하여 농약성분을 세척한 후 9㎝ petri dish에 여과지 (Whatman #2)를 한 장 깐 다음 꿀벌부채명나방 (*Galleria mellonella*) 노숙유충 10마리를 넣었다. 그 다음 분리된 곰팡이 현탁액 1㎖를 접종하고 25±2℃의 항온기에 1주일간 보관하여 곰팡이에 의한 치사유무를 조사하였다. 대조구는 살균수에 침지시킨 뒤 동일한 방법으로 처리하여 치사유무를 조사하였다. 실험은 3반복으로 하였다.

나) 농약 살포후 곤충병원성 곰팡이 처리

농약을 살포한 경작지에 곤충병원성 곰팡이를 처리하였을 때의 병원성과 지속성을 알아보기 위하여 파종후 20일된 배추(춘하왕배추) 묘가 정식된 경남농업기술원의 배추포장에서 94년 9월 1일부터 9월 28일까지 실시하였다. 0.5×1m 크기의 시험구에 alachlor와 Bt, carbofuran, metalaxyl, teflubenzuron 권장량을 2 ℓ씩 살포하였으며, 대조구에는 물 2 ℓ를 살포하였다. 살포 6시간 후에 2주간 고두밥 배지에서 배양한 *Metarrhizium* sp. 066 현탁액 (4.3×10^8 conidia/㎖)을 2.4 ℓ씩 살포하였다. 처리후 1주부터 4주까지 매주 토양 300g씩을 채취하여 잘 섞은 후 200g씩을 취하여 300㎖들이 원통형 플라스틱 용기에 넣고, 꿀벌부채명나방 노숙유충 10마리씩을 넣어 25±2℃ 실내에 보관하였으며, 7일후 곰팡이 감염여부 및 곰팡이에 의한 치사여부를 조사하였다. 실험구 배치는 난괴법 3반복으로 하였다.

다) 곤충병원성 곰팡이 처리후 농약살포

곤충병원성 곰팡이를 처리한 다음 농약을 처리하였을 경우 곤

충병원성 곰팡이의 지속성에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 임업연구원 남부임업시험장의 잔디포(한국잔디)에 고두밥 배지에서 2주일간 배양한 *Beauveria* sp. 523 균주와 *Metarrhizium* sp. 066 균주를 ㎡당 20g(10^7 cfu/g)씩 고루 살포하였다. 살포 1주일, 2개월, 3개월 후에 iprodione+thiram, fenitrothion, mepronil, tolclofos-methyl을 권장량으로 희석하여 각 구당 3 ℓ씩 살포하였고 대조구는 물만 3 ℓ 살포하였다. 그런 다음 1개월 간격으로 4개월까지 매달 각 구의 1 5㎝와 5 10㎝ 깊이에서 토양을 300g씩 채취하여 잘 섞은 후 200g을 취하여 300㎖들이 원통형 플라스틱 용기에 넣은 뒤 꿀벌부채명나방 노숙유충 10마리씩을 넣어 25±2℃ 실내에 보관하였으며, 7일 후 곰팡이 감염여부를 확인하였다. 실험은 난괴법 3반복으로 수행하였다.

나. 결 과

1) 곤충병원성 곰팡이의 살충효과 실내검정

가) 곤충병원성 곰팡이의 병원성

토양과 곤충치사체로부터 분리한 곰팡이 균주들의 병원성을 검정한 결과, *Metarrhizium* sp. 554와 681 2균주와 *Beauveria* sp. 598 및 601 2균주를 제외하고는 처리 4일 후 모두 75% 이상의 높은 감염능력을 보였고, 처리 6일후에는 병원성이 낮았던 4균주도 75%이상의 병원성을 보여 분리된 균주들의 병원성이 일반적으로 높은 편이었다 (Table 12).

Table 12. Pathogenicity of entomopathogenic fungi

Fungi	Concentration (×10^7)	Pathogenic level[a]		
		4 days	5 days	6 days
Metarrhizium				
554	7.4	+	++++	
681	4.4	−	++	++++
552	6.2	++++		
671	7.8	++++		
525	5.2	++++		
553	6.4	++++		
582	7.2	++++		
612	5.2	++++		
066	5.8	++++		
527	6.4	++++		
5981	5.8	++++		

Table 12. Continued

Fungi	Concentration (×10^7)	Pathogenic level[a]		
		4 days	5 days	6 days
Beauveria				
596	6.0	＋＋＋＋		
598	7.8	＋	＋＋＋＋	
601	8.4	−	＋＋＋	＋＋＋＋
559	7.4	＋＋＋＋		
594	6.6	＋＋＋＋		
664	6.6	＋＋＋＋		
558	3.8	＋＋＋＋		
523	9.4	＋＋＋＋		
614	3.4	＋＋＋＋		
5990	5.3	＋＋＋＋		
5441	8.8	＋＋＋＋		
544	11.4	＋＋＋＋		
671	6.4	＋＋＋＋		
614	5.8	＋＋＋＋		

[a] −; 0 %, ＋; 1 25%, ＋＋; 26 50%, ＋＋＋; 51 75%, ＋＋＋＋; 75% <.

Pathogenic level was determined by mortality of *Galleria mellonella* larvae.

나) *Beauveria*의 병원성

오리나무잎벌레, 밤나무혹나방, 회양목명나방, 거세미나방, 배추좀나방 등의 유충에 대한 *Beauveria* sp. 523 균주의 병원성은 Table 13과 같다. 오리나무잎벌레 유충에 대해서는 7.0×10^7 conidia/㎖ 농도에서 100%의 치사율을 나타내었으며, 7.0×10^6 conidia/㎖과 7.0×10^5 conidia/㎖ 처리에서도 90% 이상의 높은 치사율을 보였고, 밤나무혹나방 유충에 대해서는 3.1×10^7 conidia/㎖ 처리에서만 100%의 치사율을 보였다. 그러나 회양목명나방 유충에 대해서는 병원성이 전혀 없는 것으로 나타났다.
잔디의 주요한 식근성 해충인 등얼룩풍뎅이 유충과 농작물에 피해를 주고 있는 거세미나방 유충에 대한 병원성은 비교적 낮은 편이었다. 거세미나방 유충에 대하여는 2.5×10^7 농도에서 63.3%의 치사율을 보였으나, 등얼룩풍뎅이 유충에 대한 치사율은 3.7×10^7 농도에서 46.7%로 낮은 편이었다. 그러나 배추좀나방에 대해서는 처리 5일후 2×10^7 conidia/㎖ 농도에서 100%의 높은 치사율을 나타내었으며, 1×10^7 conidia/㎖ 농도에서도 84.4%의 치사율을 보였다.

다) *Metarrhizium*의 병원성

오리나무잎벌레 유충에 대한 *Metarrhizium* sp. 066 균주의 병원성은 9.6×10^6 conidia/㎖ 농도에서는 100%의 치사율을 나타내었으나, 10^4 conidia/㎖ 농도에서는 20%의 낮은 치사율을 보였다. 밤나무혹나방은 0.3375×10^7 conidia/㎖ 처리에서 73.3%의 치사율을 나타내었다. 그러나 회양목명나방에 대해서는 전혀 치사효과가 없는 것으로 나타났다.

등얼룩풍뎅이 유충에 대해서는 3.7×10^7 conidia/㎖ 농도처리에서 53.6%의 치사율을 보였고, 거세미나방 유충은 2.6×10^7 conidia/㎖ 농도에서 100% 치사되었다. 또한 배추좀나방 유충도 4.0×10^7 conidia/㎖ 농도에서 100%의 높은 치사율을 보였고, 0.5×10^7 conidia/㎖ 농도에서는 70.7%의 치사율을 보였다 (Table 14).

Table 13. Virulence of an entomopathogenic fungus, *Beauveria* sp. 523 against several insect pests

Insect Korean name (Scientific name)	Concentration of conidial suspension /ml	Mortality (%)
오리나무잎벌레	7.0×10^7	100 a
(*Agelastica coerulea*)	7.0×10^6	98.0 a
	7.0×10^5	90.0 a
	7.0×10^4	57.0 b
	Control	0 c
밤나무혹나방	3.6×10^7	100 a
(*Meganola melancholica*)	1.55×10^7	92.0 a
	0.775×10^7	77.0 b
	0.3875×10^7	66.7 b
	Control	0 c
회양목명나방	2.0×10^7	0 b
(*Glyphodes perspectalis*)	2.0×10^6	0 b
	2.0×10^5	0 b
	2.0×10^4	0 b
	Deltamethrin 100 ppm	100 a
	Control	0 b
등얼룩풍뎅이	3.7×10^7	46.7 a
(*Anomala orientalis*)	Fenitrothion 500 ppm	0 b
	Control	0 b
거세미나방	2.5×10^7	63.3 a
(*Agrotis segetum*)	Fenitrothion 500 ppm	0 b
	Control	0 b
배추좀나방	2.0×10^7	100 a
(*Plutella xylostella*)	1.0×10^7	84.4 a
	0.5×10^7	52.2 b
	Control	0 c

Table 14. Virulence of an entomopathogenic fungus, *Metarrhizium* sp. 066 against several insect pests

Insect Korean name (Scientific name)	Concentration of conidial suspension /㎖	Mortality (%)
오리나무잎벌레	9.6×10^{6}	100 a
(*Agelastica coerulea*)	9.6×10^{5}	73.3 b
	9.6×10^{4}	20.0 c
	9.6×10^{3}	0 d
	Control	0 d
밤나무혹나방	2.7×10^{7}	100 a
(*Meganola melancholica*)	1.35×10^{7}	80.0 a
	0.675×10^{7}	80.0 a
	0.3375×10^{7}	73.3 b
	Control	0 c
회양목명나방	4.0×10^{7}	0 a
(*Glyphodes perspectalis*)	4.0×10^{6}	0 a
	4.0×10^{5}	0 a
	4.0×10^{4}	0 a
	Control	0 a
등얼룩풍뎅이	3.7×10^{7}	53.3 a
(*Anomala orientalis*)	Control	0 b
거세미나방	2.6×10^{7}	100 a
(*Agrotis segetum*)	Control	0 b
배추좀나방	4.0×10^{7}	100 a
(*Plutella xylostella*)	2.0×10^{7}	93.8 a
	1.0×10^{7}	93.2 b
	0.5×10^{7}	70.0 b
	Control	0 c

2) **곤충병원성 곰팡이의 포장 처리효과**

가) 골프장 해충방제 효과

Metarrhizium sp. 066 **처리구에서는** 22.4%**의 밀도 감소를**, *Beauveria* sp. 523 **처리구에서는** 52.4%**의 밀도감소율을 보였다** (Table 15)

Table 15. Evaluation of entomopathogenic fungi against *Anomala orientalis* larvae in turfgrass of Dongrae golf course

Treatment	Concentration of conidia / ㎖	% reduced white grubs
Metarrhizium sp. 066	10^7	22.4 c
Beauveria sp. 523	10^7	52.4ab
Fenitrothion 500 ppm		46.6 b
Control		57.5 a

[a]Each 2 ℓ of conidial suspension was applied for each plot sized 0.5 ×0.5m

[b]Figures followed by different letters in a coloum are significantly different ($P<0.05$) according to Duncan's multiple range test.

3) **농약이 곤충병원성 곰팡이에 미치는 영향**.

Beauveria sp. 523**의 경우 살균제인** metalaxyl**이나** tolclofos-methyl**에서는 대조구와 균체**(colony) **형성수에서 차이가 없었다**. **그리고 살충제인** fenitrothion**이나 살균제인** mepronil**에**

서는 권장량이나 권장량보다 낮은 농도에서 균체가 형성되었지만, 권장량의 2배 농도에서는 전혀 포자를 형성하지 못하여 이들 농약에 대해서는 매우 감수적이었다. *Metarrhizium* sp. 066의 경우도 *Beauveria* sp. 523과 유사한 경향을 나타내어 살충제인 fenitrothion이나 살균제인 mepronil에 대하여 높은 감수성을 나타내었다. 그리고 살균제인 tolclofos-methyl에서도 균체 형성수가 현저히 적었다 (Table 16).

Table 16. Effect of pesticides on colony formation of *Beauveria* and *Metarrhizium* on potato dextrose agar

Pesticides supplimented	Con. (ppm)	Number of cfu ± SD[a]	
		Beauveria sp. 523	*Metarrhizium* sp. 066
fenitrothion	500[b]	19.0 ±7.0 c	0.0 ±0 f
	1000	0.0 ±0 c	0.0 ±0 f
mepronil	375	4.67 ±2.5 c	34.0 ±8.0 ef
	750[b]	0.0 ±0 c	0.0 ±0 f
	1500	0.0 ±0 c	0.0 ±0 f
metalaxyl	500	368.3 ±44.0 b	313.0 ±62.8 b
	1000[b]	421.0 ±25.5 ab	323.0 ±25.2 ab
	2000	434.0 ±38.3 ab	275.0 ±25.0 bc
tolclofos-methyl	500	478.3 ±130.0a	139.0 ±5.9 d
	1000[b]	377.3 ±74.7 b	241.0 ±59.2 c
	2000	458.0 ±71.0 ab	75.0 ±10.3 e
None	-	439.0 ±71.0 ab	376.0 ±62.3 a

[a]Figures followed by different letters in a coloum are significantly different (P<0.05) according to Duncan's multiple range test.

[b]Field recomended rates.

가) 농약 침지시간에 따른 곤충병원성 곰팡이의 병원성

곤충병원성 곰팡이의 농약과의 혼용가능성을 알아보기 위하여 분생포자를 농약 희석액에 5시간 동안 침지하여 포자의 발아와 해충에 대한 병원성을 검정한 결과, 전 약종에서 분생포자의 발아와 병원성이 지속되었다 (Table 17).

Table 17. Survivability and pathogenicity of entomopathogenic fungi after soaking in pesticide solution

Pesticides	Entomopathogenic fungi	Survivability after soaking (h)		Pathogenicity after soaking (h)	
		1	5	1	5
fenitrothion	*Beauveria* sp. 523	+	+	+	+
	Metarrhizium sp. 066	+	+	+	+
mepronil	*Beauveria* sp. 523	+	+	+	+
	Metarrhizium sp. 066	+	+	+	+
metalaxyl	*Beauveria* sp. 523	+	+	+	+
	Metarrhizium sp. 066	+	+	+	+
tolclofosmethyl	*Beauveria* sp. 523	+	+	+	+
	Metarrhizium sp. 066	+	+	+	+
Control	*Beauveria* sp. 523	+	+	+	+
	Metarrhizium sp. 066	+	+	+	+

나) 농약 살포후 곤충병원성 곰팡이 처리

농약을 살포한 후에도 *Metarrhizium* sp. 066 병원성은 키틴합성저해제인 teflubenzuron과 생물제제인 Bt 및 침투성살충제인 carbofuran 등의 살충제 처리구에서 4주 동안 95% 이상이 유지되고 있었고, 살균제인 metalaxyl 처리구에서도 95% 이상의 높은 병원성을 유지하고 있었다. 한편, 산아미드계 제초제인 alachlor에서는 병원성이 다소 낮게 나타났으나 전체적으로는 4주까지 75%이상의 높은 병원성을 유지하고 있었다 (Fig. 4).

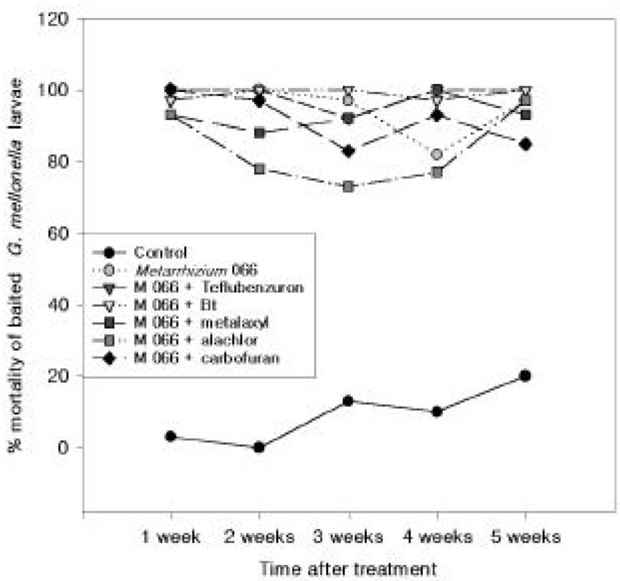


Fig. 3. Effect of pesticides on the persistence of entomopathogenic fungus, *Metarrhizium* sp. 066 in Chinese cabbage field.

Fig. 4. Effect of pesticides on the persistence of entomopathogenic fungus, *Metarhizium* sp. 066 in Chinese cabbage field.

다) 곤충병원성 곰팡이 처리후 농약살포

Beauveria sp. 523과 *Metarrhizium* sp. 066은 살충제인 fenitrothion 처리구에서 4개월 째부터 병원성을 소실하였는데, 배지에서 포자형성이 되지않았던 것과 같은 경향을 보여 농약에 의하여 영향을 받는 것으로 나타났다. 또한 mepronil 처리에 있어서도 066 균주는 4개월부터 병원성이 소실되었다. 그리고 분포는 *Beauveria*와 *Metarrhizium* 모두 토양 5㎝ 깊이 까지 분포하는 것으로 나타났다 (Table 18).

Table 18. Effect of post-treatment of pesticide on persistence of entomopathogenic fungi in turfgrass

Pesticides	Fungus	% mortality of *Galleria mellonella* larvae					
		Survivability after treatment[a] (month)			Pathogenicity after treatment[a] (month)		
		1	2	4	1	2	4
Iprodione + thiram	*Beauveria* sp. 523	+	+	+	+	+	+
	Metarrhizium sp. 066	+	+	+	+	+	+
Fenitrothion	*Beauveria* sp. 523	+	+	-	+	+	-
	Metarrhizium sp. 066	+	+	-	+	+	-
Mepronil	*Beauveria* sp. 523	+	+	+	+	+	+
	Metarrhizium sp. 066	+	+	-	+	+	-
Tolcolfos-methyl	*Beauveria* sp. 523	+	+	+	+	+	+
	Metarrhizium sp. 066	+	+	+	+	+	+
Control	*Beauveria* sp. 523	+	+	+	+	+	+
	Metarrhizium sp. 066	+	+	+	+	+	+

[a]The entompathogenic fungi were survived only 5cm deep from soil surface.

No fungi were detected below 5cm.

3. 곤충병원성 곰팡이의 식물병원균 억제효과

가. 재료 및 방법

1) 곤충병원성 곰팡이가 오이생육에 미치는 영향

가) 접종원 배양

버뮤큘라이트 (원예상토 1호)에 쌀겨 10%를 첨가하여 골고루 섞은 다음 수분을 90%로 조절하고 1,000㎖ 유리병에 500㎖를 담아 121℃ 1.5기압에서 30분간 2회 멸균하였다. 그리고 곤충병원성 곰팡이 포자현탁액(10^7 /㎖) 5㎖를 접종하여 25℃항온기에서 14일간 배양하였고, 1g을 9㎖의 0.05% Tween 20용액에 넣어 현탁시킨후 water agar에 도말하여 균밀도 (cfu)를 조사하였다. 접종원의 농도는 *Beauveria* sp. 523 균주는 2.4 ×10^7/g이었고 *Metarrhizium* sp. 066 균주는 3.4 ×10^7/g이었다.

나) 접종원 처리 및 파종

농가의 시설원예지에서 사질양토를 채취하여 살균한 다음 접종원의 농도를 3%, 6%, 12%수준으로 처리하여 원예용 스치로폴 pot (3㎝×15㎝, 160 holes)에 담고는 발아한 오이씨앗 (사엽오이, 중앙종묘)을 홀당 1개씩 파종하여 25℃ 생장상에서 재배하였다.

파종 10일후 오이의 지상부와 지하부 길이를 측정하였고 지상부와 지하부를 60℃ 건조기 (Dring oven, 삼화공사)에 24시간 건조시킨후 천평 (Casbee, Cass)을 이용하여 건물중을 측정하였다. 각 처

리는 10개의 홀을 1반복으로 하여 3반복으로 처리하였다.

다) 길항균의 배양여액이 오이 생장에 미치는 영향

PDA배지에서 14일간 배양한 균총 disc (5㎜) 1개를 30㎖ PD broth에 접종하여 15, 20, 25, 30℃에서 2주간 배양한 후 킴와이프로 균사를 제거하여 배양여액을 얻었다. 배양여액을 121℃에서 30분간 멸균한 다음 각각의 배양여액에 오이 (사엽오이) 종자를 24시간 침지한 후, 증류수로 세척하고 9㎝ 여과지 1매를 깐 1회용 petri dish에 오이종자를 놓아 발아율과 뿌리의 길이를 조사하였다.

2) 곤충병원성 곰팡이의 *Rhizoctonia solani* 에 대한 길항효과

가) 길항균 선발

토양과 곤충치사체로 부터 분리된 곤충병원성 곰팡이 균주의 일부가 *R. solani* 에 대한 길항효과가 있는지를 알아보기 위하여 각각의 5㎜ 균총 disc를 PDA 배지에 접종하여 25℃에서 10일간 배양한 다음 *R. solani* 균총 disc와 40㎜ 거리에 곤충병원성 곰팡이를 대치 배양하여 저지원 (Clean zone)을 측정하였다.

나) 길항균 배양시간에 따른 길항력

곤충병원성 곰팡이의 배양시간에 따른 모잘록병균에 대한 길항효과는 PDA 배지에 길항균과 병원균을 동시접종하거나 길항균 접종 4일과 8일후에 모잘록병원균을 접종하여, 병원균의 균사 생

장량과 저지원을 측정하였다. 이때 길항균과 병원균의 접종거리는 50㎜였다. 접종 2일후 오이모잘록병원균의 균사 생장량(Radial diameter)과 저지원(Clean zone, CZ)을 측정하였다. 각 처리는 3 반복으로 하였다.

다) *Beauveria* sp. 598의 온도별 균사생장량과 길항력 및 pH의변화

길항균의 배양시간에 따른 균사 생장량, 병원균에 대한 길항력, pH의 변화를 알아보기 위하여 40㎖의 PD broth 배지가 들어있는 100㎖ 삼각플라스크에 길항균 균총 disc (5㎜) 1개를 접종하여 15, 20, 25, 30℃에서 배양하였다. 배양후 pH meter (consort C831, Belgium)로 배양여액의 pH를 측정하였다. 또한 배양여액에 PDA를 첨가하여 평판배지를 만든 다음 병원균 균사 disc (5㎜)를 배지 중앙에 접종하여 병원균의 균사 생장 억제정도도 조사하였다. 길항균의 병원균 억제율은 다음과 같은 식으로 구하였다.

$$\text{억제율 (\%)} = 1 - \frac{\text{처리구 균사생장}}{\text{무처리구 균사생장}} \times 100$$

라) *Beauveria* sp. 598 균주의 배양여액이 *Beauveria* sp. 523 균주와 *Metarrhizium* sp. 066 균주의 증식에 미치는 영향

R. solani 에 대해 길항력이 인정된 *Beauveria* sp. 598 균주를 40㎖ PD broth (Difco pH 5.5)배지에 접종하여 10일간 배양하여 킴와이프로 균체를 제거한 다음 배양여액을 121℃에서 30분간 멸균시켰다. 그리고 살균수로 10배에서 100배까지 10배씩의 희석 농도로 희석하였다. PDA에서 14일 동안 배양한 포자현탁액 0.1㎖를

도말하여 25℃에서 2일간 배양한 후 cfu를 조사하였으며, 무처리구인 PDA배지의 cfu와 비교하였다.

나. 결 과

1) 곤충병원성 곰팡이가 오이생육에 미치는 영향

우리 나라에서 분리된 곤충병원성 곰팡이의 식물에 대한 안전성 여부를 검정하기 위하여 오이를 대상으로 pot에서 실험한 결과는 Table 19와 같다.

Table 19. Effect of *Beauveria* sp. 523 and *Metarrhizium* sp. 066 on cucumber growth in pot

Fungi	Inoculum (%wt / total soil)	Lenght (mm)		Weight (mg)	
		Root	Shoot	Root	Shoot
Beauveria	3	13.0 a	28.0 b	56.0 a	31.0 b
	6	13.9 a	34.0 a	56.0 a	36.0 a
	12	15.1 a	38.0 a	58.0 a	35.0 a
Metarrhizium	3	14.4 a	29.0 b	50.2 b	26.6 c
	6	15.2 a	35.0 a	52.0ab	30.5 b
	12	14.6 a	31.0ab	50.1 b	23.1 d
Control	0	13.4 a	27.0 b	46.0 c	20.0 d

Means within a column followed by the same letters are not significantly different (P=0.05 : Duncan's multiple range test).

지상부의 길이는 *Beauveria* 6%와 12% 처리구에서는 무처리에 비하여 높게 나타났으나 뿌리의 생장은 차이가 없었다. 그러나 뿌리의 건물중은 무처리에 비하여 처리구에서 높았으며 특히 *Beauveria* 처리구가 *Metarrhizium* 처리구에 비하여 높은 경향이었다.

2) 길항균의 배양여액이 오이 생장에 미치는 영향

R. solani 에대해 길항력이 있는 *Beauveria* sp. 598 균주를 온도별로 배양한 배양여액에 오이종자를 24시간 침지하여 오이의 생장량을 조사한 결과, 15℃와 30℃의 것이 각각 38㎜와 36㎜로서 살균수에 처리한 경우인 18㎜에 비하여 매우 높은 생장촉진 효과를 보였다 (Table 20).

Table 20. Effect of culture filtrate of *Beauveria* sp. 598 on cucumber growth

Culture filtrate grown at (℃)	Root length (㎜)	Seed germination (%)
15	38 a[a]	100
20	24 b	100
25	19 c	100
30	36 a	100
PD broth	12 d	100
Distilled water	18 c	100

[a]Means followed by the same letter are not significantly different (P=0.05 : Duncan's multiple range test)

3) **곤충병원성 곰팡이의** *Rhizoctonia solani* **에 대한 길항효과**

R. solani **에 대한 길항력을 실험한** 30**개의 공시균주 가운데서 길항력을 나타내었던 균은** 3**균주로** *Beauveria* sp. 576, 443**과** 598 **균주였다**. **그 중** *Beauveria* sp. 576 **균주가 매우 높은 길항력을 나타내었다**.

Beauveria sp. 576**의** *R. solani* **에 대한 저지원은** 16㎜, *Beauveria* sp. 443**은** 13㎜, *Beauveria* sp. 598**은** 2㎜**였다** (Table 21).

Table 21. Antagonistic ability of entomopathogenic fungi against *Rhizoctonia solani*

Fungi	Antagonism			
	Coiling	Lysis	Over growing	Clean zone
Beauveria 576	—	+	—	16 ㎜[a]
Beauveria 443	—	+	—	13 ㎜
Beauveria 598	—	+	—	2 ㎜
Beauveria 600	—	—	—	—
Beauveria 601	—	—	—	—
Beauveria 602	—	—	—	—
Beauveria 523	—	—	—	—
Beauveria 558	—	—	—	—
Beauveria 596	—	—	—	—
Beauveria 5990	—	—	—	—
Beauveria 552	—	—	—	—
Beauveria 674	—	—	—	—
Beauveria 656	—	—	—	—
Beauveria 681	—	—	—	—
Beauveria 613	—	—	—	—
Beauveria 614	—	—	—	—
Beauveria 615	—	—	—	—
Beauveria 064	—	—	—	—
Beauveria 544	—	—	—	—
Beauveria 593	—	—	—	—
Beauveria 594	—	—	—	—
Beauveria 598	—	—	—	—
Metarrhizium 5916	—	—	—	—
Metarrhizium 599	—	—	—	—
Metarrhizium 600	—	—	—	—
Metarrhizium 601	—	—	—	—
Metarrhizium 602	—	—	—	—
Metarrhizium 603	—	—	—	—
Metarrhizium 604	—	—	—	—
Metarrhizium 066	—	—	—	—

— : Not observed or occurred.

[a]Distance between colony of pathogen and by dual culture.

가) 길항균 배양시간에 따른 길항효과

병원균과 길항력이 있는 곤충병원성 곰팡이를 동시에 접종하였을때 *Beauveria* sp. 576은 CZ가 4.0㎜, *Beauveria* sp. 443과 *Beauveria* sp. 598은 CZ가 모두 0㎜ 였다. 길항균을 먼저 접종한 4일후 병원균을 접종하였을때는 각각 13.3㎜, 10㎜, 0㎜로서 *Beauveria* sp. 576은 저지원이 형성되지 않았으며 8일후 접종시에는 15.3㎜, 12.0㎜, 1.7㎜로서 *Beauveria* sp. 598의 길항력이 가장 높게 나타났다 (Table 22).

Table 22. Growth inhibition and clean zone formation of *Rhizoctonia solani* by dual culture different age of entomopathogenic fungi on potato dextrose agar

Entomopathogenic fungi tested	Radial growth of *R solani* (㎜)			Clean zone between *R. solani* and EPF		
	Cultural age of EPF			Cultural age of EPF		
	0	4	8 days	0	4	8 days
Beauveria sp. 598	36.3 a	8.0 b	3.3 b	4.0 a	13.3 a	15.3 a
Beauveria sp. 443	40.3 a	8.0 b	6.3 b	0 b	10.0 a	12.0 a
Beauveria sp. 576	40.0 a	17.3 a	19.3 a	0 b	0 b	1.7 b

[a]Means followed by the same letter are not significantly different (P=0.05 : Duncan's multiple range test)

나) *Beauveria* sp. 598의 온도별 균사생장량과 길항력 및 pH변화

Beauveria sp. 598의 온도별 균총생장량은 25 30℃에서 가장 좋았다. 15℃에서 2주 배양시킨 것은 19㎜로서 25℃ 와 30℃에 비하여 현저히 떨어지는 경향을 보였다 (Fig. 5). 각 온도별로 배양한 배양여액에 대한 길항효과를 조사한 결과는 Table 23과 같다. 무처리구인 PDA배지에서 균을 접종한 2일후 *R. solani* 균총 직경생장량은 49.7㎜였으나 15℃ 배양여액 배지에서는 20.3㎜로서 방제가가 59.6%였으며, 20℃에서는 39.9㎜로 20.9%, 25℃에서는 41.0㎜로 17.5% 그리고 30℃에서는 9.3㎜로 81.3%의 방제효과를 보여 15℃와 30℃에서 억제효과가 높았다.

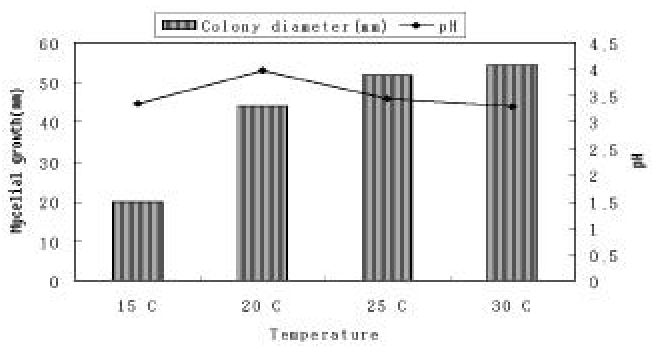


Fig. 2. Mycelial growth of *Beauveria* sp. 598 and pH changes of the culture filterate.

Fig. 5. Mycelial growth of *Beauveria* sp. 598 and pH changes of the culture filterate.

Table 23. Effect of culture filtrate of *Beauveria* sp. 598 grown at different temperature on the mycelium growth of *Rizoctonia solani*

Temperature for culture filtrate	Diameter (mm) of *R. solani*		% Control[b]	
	2 days	4 days	2 days	4 days
15	20.3 c[a]	52.7 b	59.6 b	38.0 b
20	39.9 b	84.3 a	20.9 c	0.8 c
25	41.0 b	84.7 a	17.5 c	0.4 c
30	9.3 d	22.3 c	81.3 a	73.8 a
PDA	49.7 a	85.0 a	0	0

[a]Means within a column followed by the same letters are not significantly different (P=0.05 : Duncan's multiple range test).

[b]Control(%) = (1-treatment/check) × 100.

다) *Beauveria* sp. 598 **균주의 배양여액이** *Beauveria* sp. 523**과** *Metarrhizium* sp. 066**의 균증식에 미치는 영향**

곤충병원성 곰팡이 *Beauveria* sp. 598**의 배양여액 배지에서** *Beauveria* sp. 523**과** *Metarrhizium* sp. 066**의 분생포자 발아수** (coloty forming unit)**를 조사한 결과**, **무처리** (PDA**배지**)**의 경우**

523 **균주**, 066 **균주**, 598 **균주에서 각각** 284, 126, 351**인데 비하여 배양여액** 100%**를 첨가한 배지에서의** colony**수는 각각** 271, 139, 360**으로서**, *R. solani* **에 길항력이 있는** *Beauveria* sp. 598 **균주의 배양여액은 곤충병원성 곰팡이의 분생자 발아에는 전혀 영향을 미치지 않았다** (Table 24).

Table 24. Effect of culture filtrate of *Beauveria* sp. 598 on conidial germination of *Beauveria* sp. 598, 523, and *Metarrhizium* sp. 066

Culture filtrate supplemented PDA (%)	Number of colony forming unit / plate		
	Beauveria sp. 523	*Beauveria* sp. 598	*Metarrhizium* sp. 066
0	284.3 a[a]	351.7 a	126.7 a
10	267.7 a	360.7 a	132.7 a
20	277.7 a	363.0 a	120.0 a
30	254.3 a	369.7 a	136.7 a
40	264.3 a	366.7 a	128.3 a
50	275.3 a	363.3 a	126.7 a
60	259.3 a	346.3 a	132.7 a
70	271.3 a	343.7 a	135.7 a
80	266.0 a	362.3 a	140.7 a
90	265.3 a	361.3 a	134.3 a
100	271.0 a	360.7 a	139.3 a

[a]Means within a column followed by the same letters are not significantly different (P=0.05 : Duncan's multiple range test).

4. 곤충병원성 곰팡이의 대량배양

가. 재료 및 방법

1) 첨가 유기물에 따른 곤충병원성 곰팡이의 증식

가) 곤충병원성 곰팡이의 대량배양

(1) 고두밥를 이용한 곤충병원성 곰팡이의 포자배양

곡물배지에서 병원성 곰팡이의 배양이 용이하였던 점을 고려하여 사료용으로 사용하고 있는 묵은 쌀을 이용하여 병원성 곰팡이의 배양 가능성을 알아보았다.

묵은쌀 (생산후 5년)을 물에 넣어 1일간 불린 다음 1,100㎖ 병버섯 재배용 플라스틱 용기(가나화학, 충남 천안)에 300㎖를 채운 뒤 고압멸균기(Rikakikai MAC-501)에서 멸균하였다. 그리고 고두밥이 엉기지 않게 흔든 다음 현탁액을 1㎖씩 접종하였다. 접종한 포자수는 *Metarrhizium* sp. 066은 2.2×10^5/㎖였고, *Beauveria* sp. 523은 3.3×10^5/㎖였다. 접종후 25±2℃ 항온기에서 배양하였고 1주후에 배양병을 5 10회 흔들어 균이 골고루 배양되도록 하였다. 배양 2주후는 3일간 음건한 뒤 1g을 취하여 9㎖의 살균수가 든 시험관에 넣어 교반기에서 잘 섞고 hemocytometer로 포자수를 조사하였다. 조사는 각각 5회 반복으로 하였다.

(2) Clay pellet을 이용한 곤충병원성 곰팡이의 포자배양

화훼 및 원예용으로 이용되고 있는 clay pellet을 곤충병원성

곰팡이의 대량 배양에 이용하고자 4 5㎜ 크기의 clay pellet (옥산, 경남 진동)을 1시간 동안 증류수에 침지시킨 후 1㎜ 망사에 담았다. 그리고 쌀겨를 pellet에 분의하여 1,100㎖ 플라스틱 용기(가나다화학, 충남 천안)에 500㎖를 넣어 고압멸균기(121℃ 1.5기압)에서 30분간 멸균하였다. 그런 다음 *Metarrhizium* sp. 066 현탁액 (10^6 conidia/㎖) 5㎖를 접종하여 10회 흔든 후 25℃ 항온기에서 배양하였으며, 배양 7일후 다시 10회 흔들어 균이 균일하게 배양되게 하였다. 포자형성수는 배양 14일후 0.05% Tween 20 용액 10㎖에 pellet 1개씩을 넣고 test tube mixer (창신과학)로 현탁하였다. 현탁액을 킴와이프 2매를 깐 깔때기를 통과시켰다. 포자수는 hemocytometer를 이용하여 200배 광학현미경(Unilux-12, Kyowa)으로 계수하였다. 조사는 5회 반복으로 하였다.

나. 결 과

1) 고두밥배지를 이용한 곤충병원성 곰팡이의 포자 배양

고두밥 배지를 이용한 병원성 곰팡이의 포자 배양 결과는 Table 25와 같다.

고두밥 배지에서의 포자형성수는 *Metarrhizium* sp 066의 경우 배양 14일후에 1.7×10^6, 28일후에는 1.9×10^8개의 포자수를 보였고, *Beauveria* sp. 523은 1.9×10^6개와 1.9×10^7개의 포자수를 보였다.

Table 25. Effect of hard-boiled rice medium on the sporulation of entomopathogenic fungi

Entomopathogenic fungi	Number of conidia / g media	
	14 days	28 days
	$\times 10^{6}$	$\times 10^{8}$
Metarrhizium sp. 066	1.7 ±0.4	1.9 ±0.4
Beauveria sp. 523	1.9 ±0.5	1.9 ±0.5

2) Clay pellet을 **이용한 곤충병원성곰팡이의 포자 배양**

Clay pellet을 **이용한 병원성 곰팡이의 포자 배양 결과는** Table 26**과 같다**. Clay pellet 1**개당** 10^{7}**개 이상의 포자가 배양되어 고두밥 배지와 유사한 배양력을 보였다. 따라서 병원성 곰팡이의 고체배양을 위한 물질로서 활용가치가 있을 것으로 생각된다**.

Table 26. Mass production of *Metarrhizium* sp. 066 using clay pellet coated with rice bran

Pellet condition		Number of conidia / pellet
Size (diameter)	Moisture (%)	$\times 10^{7}$
4 5	100	2.4 ± 0.7

*Number of conidia was checked at fourteen days after incubation.

5. 식물병원균에 대한 길항균 분리 및 길항효과

가. 재료 및 방법

1) 길항미생물 분리

경남 진주 대곡의 잔디라지벳취병반부 토양 300g을 채취하여 비닐봉지에 담아 실험실에 가져와 골고루 섞은 다음 1g을 9cc 살균수에 10^4까지현탁하여 NA배지에 도말하였다. colony를 각각 다른 배지에 접종한후 식물병원균을 대치 배양하여 길항균을 분리하였다.

2) 길항미생물의 길항력 검정

직경 9cm 1회용 사아레에 PDA 배지를 20㎖ 분주한다음 PDA배지에서 48시간 배양한 길항력이 있는 R1-12, 14H-3, Yell을 0.5㎜ 유리 피펫tip으로 PDA배지에 병원균과 5cm 거리에 대치배양하여 저지원의 크기를 측정하였다.

가) 길항세균을 첨가한 배지에서의 균증식 억제효과

900㎖ 병버섯 재배 용기에 PDbroth 500㎖를 넣어 121℃에서 30분간 멸균한후 각각의 공시균 1㎖(10^7cell)를 접종하였다. 그리고는 원심분리기에서 2일간 진탕배양한 후 (10^7cell) PDA배지에 50%, 10%비율로 혼합하여 9cm 샤아레에 20㎖씩을 분주하였다.

나) 길항세균 배양여액이 식물병원균 증식에 미치는 영향

배양여액에 PDA를 첨가하여 살균한다음 9cm 샤아레에 20㎖를

분주하였다. 그리고는 PDA배지에서 배양한 *Rhizoctonia solani*, *Pythium* sp. *Phytopthora* sp. 균총 disc (5㎜)를 접종하여 25℃ 항온기에 배양하면서 균총직경생장을 측정하였다.

다) 길항세균 배양여액 침지가 오이생육에 미치는 영향

배양여액을 원액(100%), 10배, 50배, 100배액으로 각각 조절한 다음 121℃에서 30분간 멸균한 액에 오이(정선오이)종자를 6시간 침지한 후 여과지 1매를 깐 9cm 1회용 petri-dish에 10립씩을 놓고 증류수 1㎖를 주입하였다. 수분증발을 방지하기 위하여 랩으로 싸서 25℃ 항온기에 보관하였다. 3일후 발아율, 뿌리길이 및 전체 생중량을 측정하였다. 반복당 10립으로 3반복하였다.

라) 길항세균과 배양여액이 soybean의 생장에 미치는 영향

생균 배양여액과 살균 배양여액에 soybean을 6시간 침지시킨 다음 900㎖ 병버섯 재배용기에 100㎖씩을 넣고 버뮤쿠라이트 (미성) 300㎖를 넣어 25℃ 항온기에서 재배하였다. 물은 9시와 17시에 각각 1회에 300㎖씩을 공급하였다. 생육상황은 처리 7일후 생체중과 길이를 측정하였다.

마) 길항세균 배양여액이 다른 유용미생물에 미치는 영향

900㎖ 병벗재배 용기에 PDbroth 500㎖를 다음 121℃에서 30분간 멸균한 후 길항미생물 포자현탁액 (10^5 cell/㎖) 1㎖를 접종하여 진탕배양기에서 2일간 배양하였다. 배양여액에 PDA를 첨가하여 평판배지를 조제하였다. 그리고는 길항세균 (10^3 cell/㎖)과 곤충병원성 곰팡이 (10^3 spore/㎖) 포자현탁액 0.1㎖를 접종한 다음

도말하였다. 접종 24시간 후 광학현미경 (400x) 하에서 colony 형성여부를 조사하였다.

3) 길항세균 배양여액이 다른 유용미생물에 미치는 영향

서로다른 길항미생물 배양여액을 첨가한 배지에서 길항균 증식관계를 알아보기 위하여 900㎖ 병버섯재배용기에 PDbroth 500㎖를 넣고 121℃에서 30분간 멸균한후 길항세균 현탁액 (10^5cell/㎖) 1㎖를 접종하여 진탕배양기에서 2일간 배양하였다. 배양여액에 PDA를 첨가하여 평판배지를 조제하였다. 그리고는 길항세균 (10^3 cell/㎖)과 곤충병원성 곰팡이(10^3 spore/㎖)포자현탁액 0.1㎖를 접종하여 도말하였다. 접종 24시간 후 광학현미경하에서 colony 형성여부를 조사하였다. 실험에 사용한 미생물은 곤충병원성 곰팡이 *Metarrhizium*과 *Beauveria*, 식물병원균 길항미생물 *Trichoderma* 였다.

4) 목초와 농약이 길항균에 미치는 영향

가) 목초와 살충제가 길항세균의 cell 발아에 미치는 영향

목초 (동양목초, 의령) 250배, 500배액과 메프 50%유제 100, 200, 500, 1,000배액에 PDA를 첨가하여 평판배지를 만든 다음 길항세균 현탁액 0.1㎖ 를 접종하여 도말한 다음 cell의 발아여부를 조사하였다.

나. 결 과

1) 길항미생물 분리

잔디 라지벳취병 이병토양을 채집하여 길항미생물을 분리, 동정한 결과 진주에서 채집한 토양으로부터 Yell와 R1-12가 분리 동정되었으며 부산 동래에서는 14H-3이 분리동정되었다 (Table 27).

Table 27. 천적미생물 분리

지역	식생	기주	토성	균명
경남 진주	잔디	토양	양토	*Pseudomonas fluorescens* (R1-12)
				미동정(Yell)
부산 동래	잔디	토양	양토	미동정(14H-3)

2) 길항미생물의 길항력 검정

가) 길항세균을 첨가한 배지에서의 균증식 억제효과

분리된 길항세균은 *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Phytophthora*에 대해서 매우 높은 길항력을 나타내었다 (표 2). *Rhizoctonia*에 대한 저지원 Yell이 9mm, R1-12가 11mm 였으며 *Phytophthora*에 대해서는 Yell이 11mm, R1-12가 7mm, 14H-3이 11mm 였다. 그리고 *Pythium*에 대해서는 14H-3이 5mm로 다른 균주에 비하여 좋았다.

Table 28. **식물병원균에 대한 길항균의 길항효과**

길항균	병원균	Antagonism			
		Coiling	Lysis	Over growing	Clean zone
Yell	*Rhizoctonia*		+		9
	Pythium				
	Phytophthora		+		11
R1-12	*Rhizoctonia*		+		9
	Pythium				
	Phytophthora		+		7
14H-3	*Rhizoctonia*		+		2
	Pythium		+		5
	Phytophthora		+		11

Table 29. **길항세균을 첨가한 배지에서의 균증식억제효과**

길항균	농도 (%)	접종 2일후 균총생장량 (mm)			억제율		
		Rh	Py	Phy	Rh	Py	Phy
Yell	50	0	0	0	100	100	100
	10	0	0	0	100	100	100
R1-12	50	0	0	0	100	100	100
	10	0	0	0	100	100	100
14H-3	50	0	0	0	100	100	100
	10	0	0	0	100	100	100
CK	-	45	80	19			

길항세균과 배양여액을 PDA**배지에** 50%**와** 10%**농도로 첨가한 배**

지에서 식물병원균 *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Ptytophthora*를 접종했을 때 균사생장이 무처리구에서 각각 45mm, 80mm, 19mm인데 비하여 처리구에서는 완전히 억제되는 결과를 보여 항균효과가 높았다(Table 28).

나) 길항세균 배양여액이 식물병원균 증식에 미치는 영향

길항세균 배양여액을 PDA배지에 첨가하여 살균한 배지에서의 식물병원균의 증식억제효과를 조사한 결과 길항미생물 첨가배지에서 억제율 75%이상으로 매우 높은 억제효과를 보였다(Table 30).

Table 30. 세균 배양여액이 식물병원균 증식에 미치는 영향

길항균	병원균	균총직경생장량(mm)		억제율	
		1일	3일	1일	3일
14H-3	*Phytophthora*	0	0	100	100
	Pythium	0	6	100	92.5
	Rhizoctonia	2	7	93.1	91.1
R1-12	*Phytophthora*	0	0	100	100
	Pythium	0	4	100	95.0
	Rhizoctonia	0	1	100	98.7
Yel1	*Phytophthora*	6	16	0	0
	Pythium	18	50	75.3	37.5
	Rhizoctonia	0	5	100	93.7
무처리	*Phytophthora*	3	6	-	-
	Pythium	73	80	-	-
	Rhizoctonia	29	79	-	-

다) 길항세균 배양여액 침지가 오이생육에 미치는 영향

길항미생물 배양여액을 침지한 오이가 무처리에 비하여 뿌리의 생장이 양호하였다. 뿌리무게에 있어서는 무처리가 0.05g인데 비하여 100배액 처리에서는 0.07g 이상이었다. 그리고 뿌리길이에 있어서는 무처리가 25.9㎜였으나 길항균 처리구에서는 34㎜이상이었다. 특히 14H-3균이 오이의 생장을 촉진시키는 효과가 높게 나타났다 (Table 31).

Table 31. 길항세균 배양여액 침지가 오이생육에 미치는 영향

세균	뿌리 무게 (g)				뿌리 길이 (㎜)			
	원액	10배	50배	100배	원액	10배	50배	100배
R1-12	0.04	0.05	0.06	0.07	30.3	35.5	42.4	43.2
Yel1	0.06	0.08	0.07	0.09	38.5	43.8	34.0	35.1
14H-3	0.05	0.06	0.07	0.08	34.8	33.7	40.1	45.2
무처리	0.05				25.9			

라) 길항세균과 배양여액이 soybean의 생장에 미치는 영향

길항균 배양여액에 soybean을 침지하여 생육상황을 조사한 결과 무처리구에서 길이 103.2㎜, 무게 547g인데 비하여 길항미생물 처리구에서 118.0-139.1㎜, 555-594g으로 길항미생물 처리 효과가 높게 나타났다.

Table 32. 길항세균 배양여액이 soybean의 생장에 미치는 영향

세균	생장량	
	길이 (mm)	무게 (g)
14H-3	124.2	594
Yell	139.1	568
R1-12	118.0	555
CK	103.2	547

3) 길항세균 배양여액이 다른 유용미생물에 미치는 영향

서로 다른 길항미생물 배양여액을 첨가한 배지에서 길항균 증식관계를 조사한 결과 Table 33에서와 같이 미생물간에 억제효과가 있는 것으로 나타났다. 길항미생물 R1-12균 배양여액에서는 같은 균 R1-12와 14H-3 균이 억제를 보였으며 R1-12균은 모든 배양여액에서 억제를 보였다. 그러나 곤충병원성 곰팡이 *Metarrhizium*과 *Beauveria*, 식물병원균 길항미생물 *Trichoderma*에 대해서는 전혀 영향을 받지 않았다.

Table 33. **길항세균 배양여액이 다른 유용미생물에 미치는 영향**

배지	유용미생물의 접종일별 포자발아											
	Yell		14H-3		R1-12		Tri		Met		Bea	
	1일	3일	1일	3일	1일	3일	1일	3일	1일	3일	1일	3일
14H-3	+		+		-	-	+		+		+	
R1-12	+		-	-	-	-	+		+		+	
Yell	+		+		-	-	+		+		+	
CK	+		+		+		+		+		+	

4) **목초와 농약이 길항균에 미치는 영향**

가) 목초와 살충제가 길항세균의 cell **발아에 미치는 영향**

목초와 살충제 농약이 길항미생물에 미치는 영향을 알아보기 위하여 모초를 각농도별로 첨가한 배지에서 미생물 cell**의 발아를 조사한 결과** Yell**은 목초 250배액에서는 발아되지 않으나 목초 500배와 메프 100배에서도** cel**의 발아가 양호하였다.** R1-12**와** 14H-3**은 목초 250배와 메프 200배에서도** cell**이 발아하지 않았다. 그러나 500배이하에서는 발아하는 것으로나타났다** (Table 34).

Table 34. 목초와 살충제가 길항세균의 cell 발아에 미치는 영향

처 리	농도	접종1일후 cell 발아		
		Yell	R1-12	14H-3
무처리	-	+	+	
목초	250배	-	-	-
	500배	+	-	+
메프	100배	+	-	-
	200배	+	-	-
	500배	+	+	+
	1000배	+	+	+

인 용 문 헌

백운하, 박종성. 1983. 천적자원의 보호와 이용. '83 농업과학 심포지움. 161-114.

추호렬, 이상명, 허진. 1994a. 곤충병원성 *Beauveria* 곰팡이를 이용한 생물 살충제 개발 연구. 1. *Beauveria brongniartii* 의 대량생산을 위한 경제배지 선발과 제제기술 개발. 농업논문집 36: 119-129

추호렬. 이상명. 허진. 1994b. 곤충병원성 *Beauveria* 곰팡이를 이용한 생물 살충제 개발연구. 2. 경제배지에서 증식된 *Beauveria brongniartii* 의 병원성과 지속성. 농업논문집 36: 131-140.

Ferron, P. 1978. Biological control of insect pests by entomopathogenous fungi. Ann. Rev. Entomol. 23: 409-442.

Foegash, A. J. 1984. History, evelution, and consequences of insecticide resistance. Pestic. Biochem Physiol. 22: 178-186.

Hajek, A. E. and R. J. St. Leger. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. Annu. Rev. Entomol. 39: 293-322.

河上　清. 1985. **天敵微生物の探究と利用**. **今月の農薬**. 29(2): 50-55.

河上 清. 1987. **昆蟲病原絲狀菌**. **微生物の長期保存法(農林水産省農林水産技術會議事務局·農業環境技術研究所編** pp. 158-160.

岡田齊夫. 1989. **微生物　製劑-現狀と展望**. **植物防疫** 43(11): 58-61.

Sánchez-Peňa, S. R, and H. G. Thorvilson. 1995. Effect of long-term cryogenic storage and conidial suspendinf agents on the virulence of *Beauveria bassiana* toward *Solenopsis invicta*. J. Invertebr. Pathol. 65: 248-252

Tanada, Y. and H. K. Kaya. 1993. Insect pathology. Academic Press. Sandiego. 666pp.

山本應基. 1992. **講座·土壤中の微生物とその動き(その**12)-**土壤微生物と農藥**-, **農業土木學會誌** 60(4): 47-52.

제 3 세부과제

살충성 B.t제 개발 분야

세부연구책임자 : 서울대학교 안용준

제 4 장. 살충성 Bt제 개발 분야

제1절. 서 설

유기합성 살충제가 해충방제에 활용된 이래로 인간을 포함한 포유동물에 대한 독성문제, 먹이사슬 단절, 천적의 감소 및 멸종, 잠재적인 암의 유발, 해충의 저항성 증가 등의 많은 문제점들이 심각하게 제기되고 있기 때문에, 그 대안으로 곤충병원성 미생물을 이용한 방제법의 개발이 연구되고 있다. 해충에 병원성을 가지는 바이러스, 곰팡이, 세균 등의 미생물을 이용한 해충 방제기법은 유기합성 살충제에서 제기되고 있는 부작용들이 없기 때문에 이에 대한 연구가 선진국을 중심으로 활발하게 이루어져 왔으며, 특히 농업해충과 위생해충에 방제효과가 있는 미생물을 이용하여 제품화에 성공함으로써, 이에 대한 수요도 증가되고 있다(Lüthy 등, 1982; Aronson 등, 1986). 해충에 병원성을 보이는 미생물 중에서도 *Bacillus thuringiensis*(이하 Bt)는 유기합성 살충제와 비슷한 살충력을 보이고, 파리목, 나비목, 딱정벌레목 등의 다양한 해충에 대해서 독성이 높아 농업 및 위생해충의 방제에 활용되고 있다.

Bt는 그람양성 토양세균으로 포자형성과정(sporulation) 동안 내독소 단백질을 형성하는 특징이 있다. 내독소 단백질은 높은 숙주특이성을 가진 살충성 성분으로(Aronson 등, 1986; Whiteley와 Schnepf, 1986), 숙주 특이성과 생화학적 특성이 다른 내독소 단백질을 생성하는 많은 Bt 균주들이 분리되어 왔다(Burges, 1981). Bt가 생성하는 내독소 단백질은 유전자(*cry* genes)의 염기서열 및

단백질 서열의 유사성, 숙주범위, H-항체와의 반응 등의 차이에 따라 분류되고 있다(Höfte와 Whiteley, 1989). 일반적으로 Bt 내독소 단백질을 만드는 유전자는 숙주범위에 따라 나비목 곤충에 독성을 보이는 *cryI* 유전자, 나비목과 파리목 곤충에 동시에 독성을 보이는 *cryII* 유전자, 딱정벌레목 곤충에 독성을 보이는 *cryIII* 유전자, 파리목 곤충에만 독성을 띠는 *cryIV* 유전자로 나누었다. 최근에 Crickmore 등(1998)은 보고된 내독소 단백질 유전자를 살충성과 내독소 단백질의 아미노산서열의 상동성에 따라 분류하는 명명체계를 제안하였다.

cry 유전자가 발현하는 내독소 단백질의 작용기작은 완전하게 밝혀지지 않았으나(Gill 등, 1992), 유충의 중장내 알칼리 조건과 단백질 분해효소에 의해 활성을 가진 내독소 단백질이 감수성 곤충의 중장 상피세포막에 있는 수용체(receptor)에 작용하여 곤충에 치사효과를 나타낸다. 전기생리학적인 연구(Harvey 등, 1983)와 생화학적인 보고(Knowles와 Ellar, 1987)에서, 수용체와 결합하는 내독소 단백질이 상피세포막의 물질이동 균형을 깨뜨려 삼투압을 저해하여 세포를 파괴하고, 유충은 섭식을 중지하고 죽게 된다. 몇 개의 Bt 균주들에서 내독소 단백질의 수용체가 중장 상피세포에 존재한다는 것이 보고되었다(Hofmann등, 1988a, b).

이러한 특성을 가진 Bt에 대한 최근의 연구경향은 크게 유효균주의 분리 및 특성 연구(Ragni 등, 1996; Inal 등, 1990), 새로운 *cry* 유전자의 구조적 특성 분석(Kostichka 등, 1996) 및 발현에 관한 조절기작(De Souza 등, 1993; Poncet 등, 1997), 숙주특이성에 관여하는 요인(Wolfersberger 등, 1996; Rajamohan 등, 1996), 내독소 단백질의 작용기작(Von Tersch 등, 1994;

Peyronnet 등, 1997), 유전공학 기법을 이용한 형질전환(Soltes-Rak 등, 1993), 전이식물개발(Nayak 등, 1997), 저항성(Tabashik 등, 1997; Wirth 등, 1997)에 관한 연구 등으로 나뉘어 활발히 진행되고 있다.

현재 진행되고 있는 연구 중에서도 새로운 유효균주의 분리에 대한 연구는 일본의 Ishiwata가 1901년에 누에나방(*Bombyx mori*)의 사체에서 처음으로 *Bacillus sotto*(*B. thuringiensis* subsp. *sotto*)를 분리하였으며, 1915년 Berliner가 지중해 가루명나방(*Anagasta kuehniella*)에서 분리하여 *Bacillus thuringiensis*로 명명한 이후, 많은 Bt 균주들이 분리되어 보고되었는데, 장소별로 보면, 토양(Kim 등, 1998), 양잠농가(Ohba 등, 1984), 식물체 잎 표면(Smith와 Couche, 1991; Park 등, 1997) 등에서 분리되는 것으로 보고되고 있으며, 기후에 따른 분포에서는 열대에서 한대에 이르기까지 매우 다양하다(Martin과 Travers, 1989). 한편 유기합성 살충제의 과용살포로 인한 저항성 해충의 출현에 대한 보고(McGaughey, 1985a; McGaughey와 Beeman, 1988)는 새로운 유효 균주의 선발 필요성을 더욱 높여 주었으며, 새로운 균주의 분리는 유기합성 살충제의 대안으로 활용될 미생물 살충제 개발에 있어서 가장 필수적인 과제로 떠오르고 있다. 또한 최근 모기성충 중심의 방제로 인하여 저항성 성충이 출현되고 있으며, 이로 인한 말라리아, 뎅그열, 황열병 등이 전염되고 있다. 현재 농업해충에 독성이 있는 균주의 분리는 미국의 Mycogen사와 국제미작 연구소를 중심으로 광범위하게 추진되고 있으나, 위생해충에 독성을 갖는 균주의 분리는 이에 비해 현저히 떨어져 있는 실정이다.

본 연구에서 전국의 농업지역과 산림지역을 대상으로 Bt 균주

를 분리하고, 독성검정을 통하여 여러가지 해충에 독성이 있는 균주를 분리하였다. 특히 보건적 측면에서 중요한 파리목 해충인 모기유충에 독성이 높은 균주를 선발하고, 이를 Bt 185-1로 명명하고, 균주의 특성을 구명하였다. 미생물 살충제로 이용되는 Bt 균주의 대량배양에서 내독소 단백질의 생산을 위한 배양시간의 연장과 늦은 단백질 발현으로 인한 살충효력의 지연에 대한 단점을 보완하고자, 고온에서 유도되는 *gro* 프로모터를 이용하여 모기유충에 높은 독성을 가진 *cry11Aa* 유전자를 발현하는 벡터를 구축하고, 분리한 Bt 185-1 균주에 형질전환하여 영양세포단계에서 모기유충에 독성을 갖는 *cry11Aa* 유전자를 발현하는 형질전환체를 제작하고 특성을 조사하였다. 한편으로 Bt 내독소 단백질의 야외적용에서 제기되고 있는 단점들(Pfannestiel 등, 1986; Delecluse 등, 1991; Thomas와 Ellar, 1983)을 보완하기 위하여, 광합성에 관여하는 *psbA* 프로모터와 열에 의해 유도되는 *gro* 프로모터를 이용한 *cry11Aa* 유전자를 발현하는 cyanobacteria를 제작하고, 모기유충에 대한 살충효과와 야외 적응성 및 야외 살충효과를 조사하였다.

1. 산림토양으로부터 살충성 Bt 선발, 특성규명, 대량배양 및 제제화

가. 연구수행 방법

1) 시료의 채취

Bacillus thuringiensis (이하 Bt)를 분리하기 위하여, 4월부터 11월사이에 산림지역을 대상으로 시료를 채집하였다. 시료 중에서 토양시료는 표토로 부터 2-5 ㎝ 깊이에서 수집하였으며, 먼지는 표면을 긁어 채집하였다. 나뭇잎은 약 1 m 이하의 높이에서 채집하였으며, 열매, 토양 등도 채집하였다. 채집한 모든 시료는 4℃에서 보관하여 이용하였으며, 1597개의 토양과 산림시료 (낙엽, 생엽, 열매 등 포함)를 채집하여 연구에 사용하였다.

2) Bt 균주의 분리

Bt 균주의 분리는 Ohba와 Aizawa (1978)와 Park 등 (1997)이 보고한 방법에 따라 분리하였다. 토양시료의 경우, 1 g 토양시료를 시험관에 넣고, 10 ㎖ 멸균된 증류수로 현탁한 다음, 5분 동안 강하게 섞어주었다. 현탁된 시료를 80℃에서 10분간 열처리를 한 다음, 1000배로 희석하여 영양배지 (nutrient medium)에 도말하였다. 30℃에서 5일 동안 배양한 다음, 형성된 콜로니를 위상차 현미경으로 관찰하여 포자 (spore)와 내독소 단백질 (crystal protein)을 형성하는 것을 선발하였다. 선발된 콜로니를 순수 배양하여, 4℃에서 보관하였다. 나뭇잎 시료의 경우, 약 2-3 ㎠ 면적을 멸균된 칼로 자른 후, 1 ㎖의 멸균된 증류수를 넣고 막자사

발을 이용하여 분쇄하였다. 1 ㎖의 분쇄된 시료를 시험관에 넣고 80℃에서 10분간 진탕하면서 열처리를 하였다. 상온에서 30분간 방치한 후 0.2 ㎖의 시료를 취해서 영양배지에 도말하고 30℃에서 5일간 배양하였다. 형성된 콜로니를 위상차 현미경으로 검경하여 포자와 내독소 단백질을 만든 콜로니를 선발하여 4℃에서 보관하였다.

3) 사용된 균주 및 배지와 배양조건

Bt subsp. *morrisoni* PG-14, Bt subsp. *kurstaki* $Cry^{-}B$ 균주는 S. S. Gill 박사 (U. C. Riverside, USA)로부터 얻었으며, Bt 185-1 균주는 나뭇잎 시료로부터 분리하여 보관하면서 사용하였다. *B. subtilis* 균주는 조용섭 박사 (Seoul Nat'l Univ., Korea)로부터 분양받았다. *E. coli* DH5 α와 XL1 blue는 유전자의 클로닝 숙주로 사용하였다.

Bt 균주 배양은 GYS, SPY, LB 배지를 사용하여 30℃에서 배양하였고, *B. subtilis*는 YT배지를 이용하여 30℃에서 배양하였다. *E. coli* 균주들은 37℃에서 LB 배지를 이용하여 배양하였다.

4) 현미경 관찰

포자를 형성하는 콜로니에서 내독소 단백질의 모양을 관찰하기 위해서, 위상차 현미경 (Nikon Optiphot-2)과 주사전자현미경 (Phillips SEM 515)을 이용하였다. 위상차 현미경 시료는 멸균된 증류수로 현탁된 시료를 슬라이드 글라스에 떨어뜨린 후, 커버글라스를 덮어서 1,000배 배율로 관찰하였다. 필요에 따라 선발된 일부 Bt 균주는 전자현미경으로 내독소 단백질을 관찰하기 위해서

시료를 동결건조하여 탄소와 금으로 코팅한 후, 6,000배 배율로 관찰하였다 (Roh 등, 1996).

5) 벡터의 제작과 제한효소의 처리

pHTBSgro4D 벡터를 제작하기 위해서, *B. subtilis* 전체 DNA를 Kalman 등 (1993)의 방법에 따라 분리하였으며, *gro* 프로모터와 *cry11Aa* 유전자에 특이적인 PCR (polymerase chain reaction) primer를 제작하였다. *gro* 프로모터와 *cry11Aa* 유전자를 증폭하기 위해서, PCR primer를 PreMix-Top™ (Bioneer Co., Korea) 에 첨가하였으며, *B. subtilis* 전체 DNA와 pCG5 벡터를 각각의 주형 (template)으로 이용하였다. *gro* 프로모터에 대한 PCR 반응은 94℃에서 1분, 45℃에서 1분, 72℃에서 1분간 반응시키는 주기로 30회 반복하였다. *cry11Aa* 유전자에 대한 PCR 반응은 94℃에서 2분, 45℃에서 1분 30초, 72℃에서 2분간 반응시키는 주기로 40회 반복하였다. PCR로 증폭된 *gro* 프로모터와 *cry11Aa* 유전자를 pGemT 벡터 (Promega Co., USA)에 각각 클로닝하여, pBSgro와 pCry4D로 명명하였다. pBSgro 벡터를 *Sac*I과 *Sac*II으로 처리하여, *gro* 프로모터를 포함한 DNA 절편을 *E. coli* 벡터인 pBluescriptSKII(+)에 클로닝하여 pBLBSgro로 명명하였다. pCry4D 벡터를 *Nco*I과 *Cla*I으로 반응시켜, *cry11Aa* 유전자를 분리하고, pBLBSgro에 클로닝하여, pBLBSgro4D를 제작하였다. pBLBSgro4D를 *Sac*I과 *Kpn*I으로 처리하고, *gro* 프로모터와 *cry11Aa* 유전자를 포함하는 DNA 절편을 pHT3101에 클로닝하여 Bt 균주에서 발현할 수 있는 pHTBSgro4D를 제작하였다. PCR에 이용한 primer는 다음과 같다 (Table 1).

Table 1. Nucleotide sequences of PCR primers used for vector on struction.

Primer	Sequence	Restriction enzyme used	Vector
BsgroF	5'-GTG*AGCTC*CGTTCATCTACAGC	*Sac*I	pHTBSgro4D
BsgroR	5'-GGCGGATCC***ATG***GAAATAACC	*Nco*I	
cry11F	5'-GAATTCC***ATG***GAAGATAGTTATTTAG	*Nco*I	
cry11R	5'-GAG*ATCGAT*CAATACTCAC	*Cla*I	

Nucleotides underlined and italicized indicate initiation codon and restriction enzyme site, respectively.

6) **내독소 단백질의 분리**

내독소 단백질은 Thomas**와** Ellar**의 방법**(1983)**을 변형하여 분리하였다**. Bt **균주를** GYS **배지에** 4**일 동안** 30℃**에서 배양한 다음**, **위상차 현미경을 이용하여 포자형성과정과** autolysis**가 일어난 것을 확인하였다**. **포자와 내독소 단백질을 완충액** [1 M NaCl, 0.01% Triton X-100]**으로 씻어준 후**, 12,000 g**에서** 10**분 동안 원심분리하였다**. **침전물을 증류수로 현탁한 다음**, 2**분 동안** 20,000 cycles/**초 속도로** sonication**하였다**. **시료를** 50-80 % sucrose density gradient**에 넣은 다음** 25,000 rpm**으로** 2**시간 동안 초원심분리하여**(Beckman Co.), **내독소 단백질 층만을 회수하였다**.

7) N-말단 아미노산 서열결정

내독소 단백질은 sucrose density gradient를 이용한 초원심분리를 통해서 순수분리하였다. N-말단 아미노산 서열 결정을 위해서, 용해된 내독소 단백질을 시료 완충액에 첨가하고, 100℃에서 15분 동안 진탕하였다. 시료를 12% polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동한 다음, gel에 있는 내독소 단백질을 PVDF (polyvinylidene difluoride)-type membrane (Clontech Co., USA)에 흡착시키기 위해, 전기를 이용한 전이과정 (electrotransfer)을 27 mA 크기로 90분 동안 수행하였다 (Lauriere, 1993). PVDF 막을 증류수로 씻어낸 다음, 50% 메탄올을 포함한 amino black 10B로 5분 동안 염색하고 증류수로 탈색하였다. 염색된 PVDF 막을 공기 중에서 건조한 다음, 4℃에서 보관하였다. 염색된 단백질 띠를 오려낸 다음, pulse-liquid N-terminal protein sequencing (Applied Biosystem Model 475A)를 이용하여 아미노산을 분석하였다.

8) DNA 분리

가) 플라스미드 DNA 분리

Bt 균주의 플라스미드 DNA는 alkaline lysis 방법 (Birnboim과 Doly, 1979)을 변형하여 분리하였다. Bt 균주는 50 ㎖ LB 배지에 접종하고, 30℃에서 12시간동안 배양하였다. 배양액을 100 ㎖ SPY 배지에 다시 접종한 다음, 30℃에서 OD_{600} 측정값이 0.7이 될 때까지 배양하였다. 형질전환체의 경우, erythromycin (25 ㎍/㎖)과 ampicillin (50 ㎍/㎖)을 배지에 첨가하였다. 배양된 세포를 시험튜브로 옮기고, 5 ㎖ TE 완충액 [10 mM Tris, 1 mM EDTA (pH 8.0)]으로 세척하고, 6,000 g에서 5분동안 원심분리하였다. 침전물을 50 ㎎/㎖ lysozyme의 농도로 처리된 Solution I [50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0)] 10 ㎖을 넣고 강하게 흔들어 준 다음, 37℃에서 10분간 배양하였다. 20 ㎖ Solution II [0.2 N NaOH, 10% SDS]를 시험관에 첨가하고, 가볍게 섞어준 다음, 5분 동안 얼음에서 반응시켰다. 15 ㎖ Solution III [3 M potassium acetate, 2 M glacial acetic acid]를 시험관에 넣고, 15,000 g 속도로 15분 동안 4℃에서 원심분리한 다음, 상청액을 수집하였다. 플라스미드 DNA를 침전시키기 위해 에탄올을 첨가한 후, -70℃에서 30분 동안 반응시키고, 15,000 g 속도로 4℃에서 15분 동안 원심분리하였다. 침전물을 70% 에탄올로 세척하고 건조한 후, 8 ㎖ TE 완충액에 녹였다.

나) *B. subtilis* 전체 DNA 분리

B. subtilis 균주의 전체 DNA는 다음과 같은 Kalman 등(1993)의 방법에 따라 분리하였다. *B. subtilis* 균주를 30℃ 조건으로 YT배지에서 OD_{600} 측정값이 0.8이 될 때까지 배양한 다음, 5,000 g 속도로 4℃에서 8분 동안 원심분리하였다. 침전물을 TES 완충액 [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl]으로 씻은 후, 1 ㎎/㎖ lysozyme이 포함된 Solution C [25 % sucrose, 25 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0)]로 풀어주고, 37℃에서 1시간동안 배양하였다. 시료에 SDS를 최종농도가 2%가 되게 처리하고, 50℃에서 15분 동안 배양하였다. SDS가 처리된 시료에 NaCl을 최종농도가 1 M이 되게 넣은 후, 50℃에서 5분간 배양하고, 4℃에 8시간동안 방치하였다. 시료를 12,000 g, 4℃에서 10분간 원심분

리한 다음, 상청액을 멸균된 시험관으로 옮겨주었다. 상청액을 페놀과 클로로포름이 동양으로 처리된 용액으로 2번 추출하고, 에탄올을 넣어 DNA를 침전시킨 후, -70℃에 1시간동안 방치하였다. 시료를 12,000 g 속도로 15분 동안 4℃에서 원심분리하고, 10 ㎍/㎖ RNase가 첨가된 5 ㎖ TE 완충액 [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA]에 녹였다.

9) SDS-PAGE

SDS-PAGE는 Laemmli의 방법 (1970)을 참고하여 12% separating gel과 3% stacking gel을 이용하였다. Gel은 Coomassie brilliant blue (Sigma Co.)용액으로 염색하고, high molecular weight marker (Sigma Co.)를 표준으로 사용하였다.

가) Bt 균주가 포자형성기에 생산하는 단백질 분리

형질전환체가 형성하는 단백질을 분석하기 위해, 세포를 25 ㎍/㎖ erythromycin과 50 ㎍/㎖ ampicillin이 들어있는 GYS 배지에서 5일동안 배양한 다음, 7,000 g, 4℃에서 10분 동안 원심분리하였다. 침전물을 160 ㎕ 증류수로 풀어준 다음, 단백질 시료 완충액 [60 mM Tris-HCl (pH 6.8), 25% glycerol, 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue] 40 ㎕를 첨가하였다. 시료를 10분 동안 중탕하고, 7,000 g에서 4℃, 5분간 원심분리하여 상청액을 회수하였다.

나) Bt 균주가 영양세포기에 생산하는 단백질 분리

1 ㎖ Bt 배양액을 25 ㎍/㎖ erythromycin과 50 ㎍/㎖ ampicillin이 첨가된 GYS 배지에 접종하고, 온도를 각각 30℃, 3

7℃, 45℃로 조정한 후, 30분마다 시료를 회수하였다. 시료를 -70℃에서 동결하고, 녹이는 과정을 2회 반복하고, 7,000 g 속도로 4℃에서 10분 동안 원심분리하였다. 침전물을 50 ㎎/㎖ lysozyme이 첨가된 Solution A [50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0)]로 강하게 흔들어 준 다음, 37℃에서 10분간 반응시켰다. 시료를 7,000 g에서 5분간 원심분리한 다음, 침전물을 Solution A로 씻어주었다. 시료를 Solution B [1 mM PMSF (phenylmethylsulfonylfluoride), 10 mM EDTA, 2% SDS]로 풀어주고, -70℃에서 10분, 37℃에서 10분간 반응시켰다. 시료에 단백질 시료 완충액을 넣고, 10분간 중탕한 후, 7,000 g, 4℃에서 5분 동안 원심분리하여 상청액을 회수하였다.

10) H-antisera antibody 생산과 면역학적 분석

33개 Bt 기준 균주에 대한 H 항혈청은 Ohba와 Aizawa의 방법(1978)에 따라 생산하였다. 균주는 영양배지 (pH 7.4)에 접종하여 30℃에서 16시간동안 배양하였다. 배양세포를 3,000 g에서 15분 동안 원심분리한 다음, PBS (phosphate buffered saline)로 풀어 주었다. 시료를 같은 부피의 0.25% 포르말린으로 섞은 다음, 37℃에서 1시간동안 배양하였다. 처리된 세포를 원심분리하여 침전시키고, PBS로 풀어주었다. 포르말린으로 처리한 세포를 ICR 암컷 쥐 복강내에 주입하여 면역화시켰다. 초기면역화는 complete Freud's adjuvant (Sigma Co.)를 포함한 250 ㎕ 용액을 주입하여 수행하였고, 1주일 간격으로 4회에 걸쳐 incomplete Freud's adjuvant (Sigma Co.)를 포함한 500 ㎕ 용액을 주입하였다. 다섯번째 복강주사 3일 후에, 쥐에서 채혈하여 혈청을 분리하고, -2

0℃에 보관하였다.

11) *cry* 특이적 유전자 탐색을 위한 Primer 및 PCR

PCR을 통해 Bt 균주가 가지는 내독소 단백질 유전자에 대한 유전자형을 조사하기 위해 현재까지 보고된 *cryI, II, III, IV, V* 유전자에 대해 특이적인 PCR primer를 제작하여 사용하였다 (Table 2). 각 primer는 *cry* 유전자의 보존영역으로 다른 *cry* 유전자와 구별되는 영역을 탐지할 수 있도록 제작하였다. PCR을 수행하기 위해서, Bt 균주를 영양배지에 접종한 후, 12시간동안 배양하였다. 배양액 1 ㎖를 SPY 배지에 접종하여 2-4시간동안 30℃에서 배양하고, Plasmid midi kit (Quiagen Co.)를 이용하여 DNA를 분리하였다. 플라스미드 DNA와 primer를 각각 1 ㎕를 PreMix-Top™에 넣고, DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer Co.)를 이용하여 PCR 반응을 수행하였다.

Table 2. Nucleotide sequences of PCR primers used for *cry* gene detection

Sequence	Expected product size	Primer binding site	Target gene
***cryI* type**			
GACCCAACCGACTCGACCAGTTTACACC	782	1910-1943	*cry1Aa1*
TCGAATTGAATTTGTTCC	238	2453-2470	*cry1Ab1*
TCACTTCCCATCGACATCTACC	550	2159-2170	*cry1Ac1*
GTCCAACCTTATGAGTCACCTCGGCTTC	902	1789-1815	*cry1Ba1*
CAACCTCTATTTGGTCCAGGTTC	288	2403-2425	*cry1Ca1*
CGGTACATTTAGATATTCACAGCCAC	465	2226-2270	*cry1Da1*
CTTAGCGGATAAATGTAGTACAG	961	1730-1751	*cry1Ea1*
CCCGGTGACCCATTAACATTCCAATC	383	2308-2690	*cry1Fa1*
ATCACTGAGTCGCTTCGCATGTTTGACTTTCTC		2658-2690	*cryI* *
ATATCGAGTGAATACGCCCG	235	1778-1797	*cry1Ga1*
TGAACGGCGATTACATGC		1994-2012	*cry1Ga1*
***cryII* type**			
CAGATACCCTTCGCTCGGTGTAA	1070	475-495	*cry2Aa1*
ATACGCCCCGTCGCTCCACCAGG		1524-1544	*cry2Aa1*
***cryIII* type**			
GTCCCGCTGTATCTTCAGGTG	650	1801-1821	*cry3Aa1*
CACTTAATCCTGTGACGCCT		2430-2450	*cry3Aa1*
***cryIV* type**			
CGACGGTGAAATTTCGCTCC	1032	1926-1943	*cry4Aa1*
ATCGCCTTGTTTCCGCTACATC		2938-2957	*cry4Aa1*
CGGTCGCTTCCTATTCTTTCGC	2610	372-391	*cry4Ba1*
ATCGCCTTGTTTCCGCTACATC		2962-2981	*cry4Ba1*
ATGAATCCATATCAAAATAAG	2040	941-961	*cry10Aa1*
AAGAACTTTGTTTTAATTAAC		2960-2980	*cry10Aa1*
ATCGAAGATAGTTCTTTAGAT	1932	41-61	*cry11Aa1*
CTACTTTAGTAACCGATT		1955-1972	*cry11Aa1*
***cryV* type**			
ATGAAACTAAAGAATCAA	2174	355-372	*cry5Aa1*
CGTAGATTTTAATTCTAC		2511-2528	*cry5Aa1*

*; conserved region-specific primer in *cry1* type gene

12) Bt 균주의 형질전환

Bt 균주에 벡터전이를 위한 형질전환은 Bone과 Ellar의 방법(1989)을 일부 변형하였다. Bt 균주를 200 ㎖ BHI (Biolife Co.) 배지에 접종하고, 30℃에서 12시간 배양하였다. 1 ㎖ 배양액을 100 ㎖ BHI 배지에 재접종하고, 37℃에서 OD_{600}의 측정값이 0.5가 될 때까지 배양하였다. 배양된 세포를 30 ㎖의 증류수로 세척하고, 3,000 g 4℃에서 5분 동안 원심분리하였다. 침전물을 2 ㎖의 멸균된 HG용액 [1 mM HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid) (pH 7.0), 10% glycerol]로 풀어주고, 0.4 ㎖의 배양세포를 1 ㎍ 플라스미드 DNA [10 ㎕ in 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA]와 섞은 다음, 0.2 ㎝ electroporation cuvette (Bio-Rad Co.)에 넣었다.

Electroporation은 Bio-Rad Gene Pulser™와 평형저항 조절기 (Bio-Rad Pulser Controller)를 이용하여 수행하였다. 플라스미드 DNA와 세포를 얼음에서 10분 동안 반응시킨 다음, 전기충격 (capacitance 25 ㎌, 전압 2.5 ㎸, 저항 200 Ω)을 주었다. 시료를 얼음 위에 10분동안 방치한 후, 1 ㎖ BHI 배지를 첨가하고, 37℃에서 3시간동안 배양하였다. 배양액을 25 ㎍/㎖ erythromycin과 50 ㎍/㎖ ampicillin이 첨가된 영양배지에 도말하고, 30℃ 배양기에 15시간 동안 배양한 다음, 형성되는 콜로니를 선발하였다.

13) 내독소 단백질의 용혈성 측정

내독소 단백질의 용혈성은 Ragni 등의 방법 (1996)을 변형하여 측정하였다. 소에서 채취한 혈액을 3,000 rpm에서 10-15분 동안 원심분리하여, erythrocyte를 추출하였다. 적혈구들을 PBS으로

3회 씻어준 다음, 농도를 10^8/㎖로 조정하였다. 적혈구를 용해된 내독소 단백질과 섞은 다음, 37℃에서 90분 동안 반응시켰다. 적혈구의 용혈성은 hemoglobin의 농도를 알 수 있는 특이파장인 540 nm에서 분광광도계를 이용하여 측정하였으며, HD_{50} 값은 50% 적혈구가 용혈되는 것으로 정의하였다. OD_{540}에서 측정값이 1이거나 1을 넘을 경우 완전히 파괴되는 것으로 간주하였으며, 0.5일 때 50% 파괴하는 값으로 환산하였다.

14) 살충력 검정

가) Bt 분리균주의 살충력 검정

분리한 Bt 균주에 대한 생물검정은 Bt 균주를 영양평판배지를 이용하여 내독소 단백질이 형성될 때까지 30℃에서 5일 동안 배양하였다. 포자의 농도가 10^7 spores/㎖이 되도록 조정한 다음, 인공사료에 첨가하였다. 실험곤충으로는 누에나방 3령 유충을 사용하여, 10마리씩 3반복으로 처리하여 25℃에서 48시간동안 치사율을 조사하였다. 대조구로는 나비목 곤충에 높은 독성을 가지고 있는 Bt subsp. *kurstaki* HD-1 처리구와 무처리구를 설정하였다. 파리목 곤충에 대한 생물검정은 빨간집모기 (*Culex pipiens pallens*) 3령 유충을 사용하였다. 3령 유충 10마리를 포자의 농도가 10^7 spores/㎖이 포함된 시험관에 넣고 25℃에서 48시간동안 치사율을 조사하였다.

나) 모기유충에 대한 Bt 185-1 균주의 치사율 검정

Bt 185-1 균주가 생성하는 내독소 단백질을 초원심분리로 순수분리한 다음, 농도가 알려진 BSA (bovine serum albumin)을 대

조구로 하여 Bradford 방법 (1976)을 이용하여 정량하였다. 정량된 내독소 단백질을 다양한 농도 (1 ng - 1 ㎍/㎖)로 나누고, 각 처리구에 나비목에 속하는 누에나방, 배추좀나방, 매미나방 (*Lymantria dispar*) 유충과 빨간집모기와 학질모기(*Anopheles sinensis*) 3령 유충을 10마리씩 3반복으로 처리한 다음, 48시간동안의 치사율을 조사하였다. 생물검정을 통하여 얻은 치사효과는 probit 분석을 통하여 LC_{50}으로 계산하였다. 대조구로는 Bt subsp. *morrisoni* PG-14를 사용하였다.

나. 연구수행 내용 및 결과

1) 산림자원으로부터 유용한 Bt 균주 분리

Bt는 다양한 자연환경에서 분포하는 것으로 알려져 있으며, 기후에 따른 분포로는 열대에서 냉대까지 분포하며, 서식환경으로 볼 때, 사막, 동굴 등의 건조환경에서부터 늪지 등의 습한 환경에서도 분리되고 있는 것으로 보고되고 있다 (Martin과 Travers, 1989). 따라서 전국의 산림지역을 대상으로 하여 유용한 Bt 균주를 분리하기 위하여 산림지역의 토양, 낙엽, 생엽, 열매 등의 다양한 장소에서 시료를 채집하였다.

지역적으로는 평야와 산림이 분포한 충남, 전북, 경기지역과 산악지역이 많은 강원, 경북지역을 비롯한 전국을 대상으로 1,597개의 시료를 채집하였으며 (Fig. 1), 이들 시료에서 Bt 균주를 분리하기 위해, 80℃에서 3분간 열처리를 하고, 영양배지에서 배양하여 형성되는 콜로니를 조사하였다.

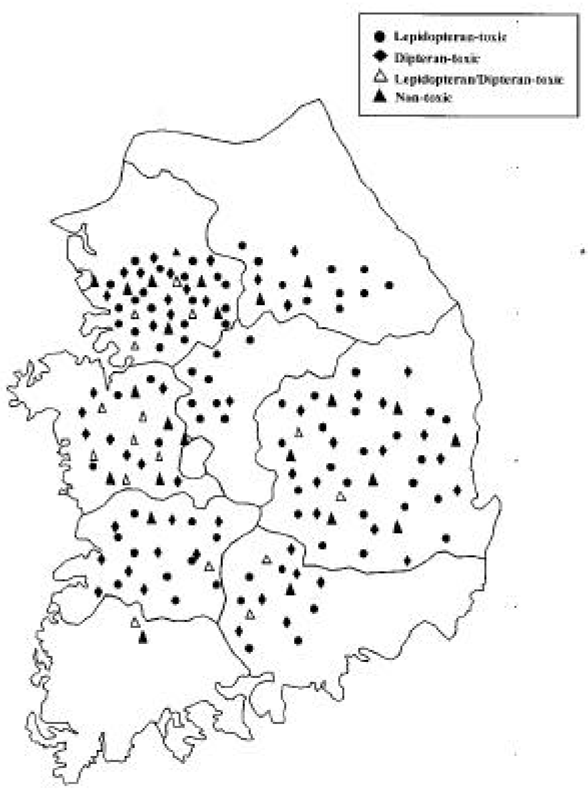


Fig. 1. Distribution and toxicity of Bt strains isolated from forest resources in Korea.

형성된 콜로니들 중에서 성장하는 형태로 Bt 균주를 1차로 선발하였으며, 이들 콜로니들 중에서 포자와 내독소 단백질을 형성하는 것을 위상차 현미경으로 선발하였다. 전국을 대상으로 채집한 1,597개 시료 중에서 589개 균주를 분리하였으며, 이중에서 388개 균주를 본 연구에 사용하였다. Bt 균주들의 생물검정을 위해, 나비목 곤충인 누에나방 유충과 파리목 곤충인 빨간집모기 유

충을 실험곤충으로 정성적인 살충성 검정을 수행한 결과, 지역별로 분리한 Bt 균주들은 누에나방 유충에 살충성을 보이는 균주들이 많이 분리되었으나, 전북과 충남지역에서는 누에나방 유충과 빨간집모기 유충에 동시에 독성을 갖는 균주들이 많은 것으로 나타났다 (Table 3).

Table 3. Number of Bt isolates from forest resources in Korea

Locality	No. Bt toxic to					Total
	B. mori	*B. mori* and *C. pipiens*	*C. pipiens*	*Sitophilus oryzae*	Non-toxic	
Kyunggi	138	26	3	-	15	182
Kwangwon	24	3	-	-	2	29
Chungbuk	7	1	-	-	-	8
Chungnam	4	16	9	-	5	34
Kyungbuk	50	22	2	-	6	80
Kyungnam	5	5	2	-	1	13
Chonbuk	16	22	1	-	1	40
Chonnam	-	-	1	-	1	2
Total	244	95	18	-	31	388

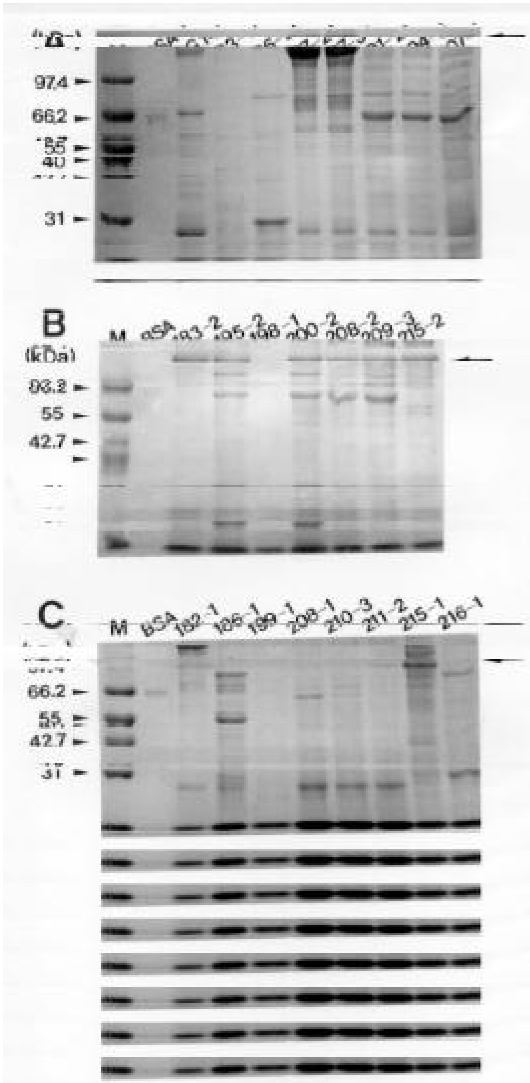
분리한 Bt 균주들이 형성하는 내독소 단백질의 형태는 각 균주마다 다양하게 나타났으며, 내열성 포자는 타원형으로 일정하였다. 분리된 균주들이 형성하는 내독소 단백질과 독성범위와의 관계를 조사하기 위하여, 내독소 단백질의 형태를 크게 마름모형 (bipyramidal), 구형 (spherical), 부정형 (irregular)으로 구분하고, 위상차 현미경으로 관찰하였다. 388개 균주 중에서 마름모

형 내독소 단백질을 형성하는 균주는 329개 (84.8%)를 차지하였으며, 누에나방에 독성을 갖는 균주가 228개, 양독성을 갖는 균주가 87개, 무독성인 균주가 14개로 나타났으며, 빨간집모기 유충에만 독성을 갖는 균주는 분리되지 않았다. 구형인 내독소 단백질을 형성하는 균주는 39개 (10%)였으며, 누에나방 유충에 독성을 갖는 균주는 2개, 빨간집모기 유충에 독성을 갖는 균주는 17개, 양독성을 갖는 균주는 6개, 무독성인 균주는 14개였다. 부정형인 내독소 단백질을 형성하는 균주는 20개 (5.2%)였으며, 누에 나방유충에 독성을 갖는 균주는 14개, 빨간집모기 유충에 독성을 갖는 균주는 1개, 양독성을 갖는 균주는 2개, 무독성 균주는 3개였다.

분리한 Bt 균주들이 형성하는 내독소 단백질의 분자량을 알아보기 위하여, 각 균주들을 GYS 배지에 5일 동안 배양하고, autolysis가 완전히 일어난 것을 확인한 다음, 내독소 단백질을 분리하고, SDS-PAGE를 수행하였다. 선발된 균주들은 다양한 단백질 크기를 가지고 있었으며, 대다수의 균주들은 약 130 kDa 크기의 내독소 단백질을 형성하였다 (Fig. 2).

선발된 균주들에 대해서 정량적인 생물 검정을 위해서, 각 균주들을 GYS 배지에서 5일동안 배양한 다음, 각 균주마다 포자의 농도가 10^7 spores/㎖이 되도록 조정하였다. 실험곤충으로 누에나방 유충, 빨간집모기 유충을 이용하여, 25℃에서 72시간동안의 치사율을 조사하였으며, 대조구로는 Bt subsp. *kustaki* 와 Bt subsp. *morrisoni* PG-14를 사용하였다. 생물검정결과, 누에나방 유충에 대한 검정은 정성검정 결과와 일치하였으며 (Fig. 3A), 빨간집모기 유충에 대한 검정은 살충성이 있는 것으로 판단된 균주들 중에서 Bt 185-1 균주만이 Bt subsp. *morrisoni* PG-14와 비슷한 높은

살충성을 보였고, 다른 균주들의 살충성은 43-67%로 낮게 나타냈다 (Fig. 3B). 생물검정결과를 통해, 누에나방 유충에 독성을 갖는 균주가 선발균주들에서 62.7%를 차지하였으며, 독성편차는 크지 않았다. 빨간집모기 유충에 독성을 갖는 균주들은 누에나방에 독성을 갖는 균주나 양독성을 갖는 균주에 비하여 분리율이 5%로 낮았으며, 생물 검정결과 대조구인 Bt subsp. *morrisoni* PG-14와 독성이 유사한 Bt 185-1 균주를 선발하였다.


97.4
66.2
55
40
31
B
M
BSA
(kDa)
55
42.7
C
M
BSA
66.2
55
42.7
31

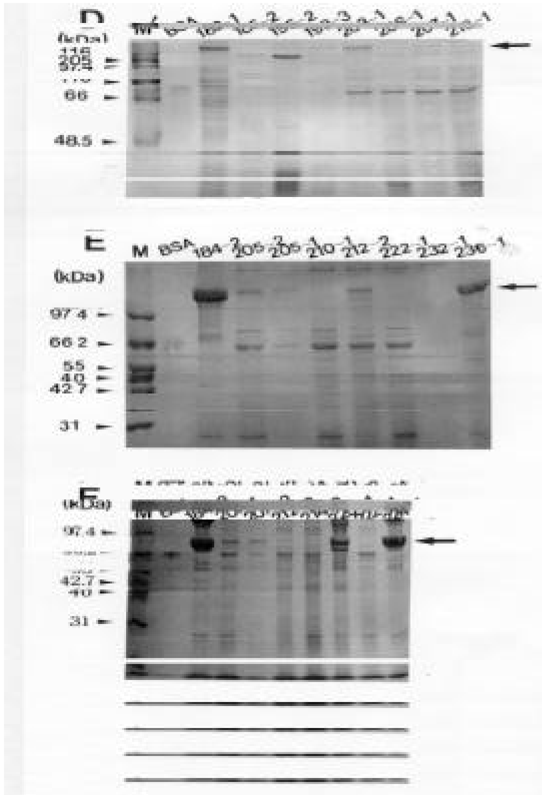


Fig. 2. SDS-PAGE analysis of 56 Bt isolates from forest resources (A-F).

Molecular weight standards (M) were phosphorylase b (97.4 kDa), bovine serum albumin (66.2 kDa), glutamate dehydrogenase (55 kDa), ovalbumin (42.7 kDa), aldolase (40 kDa), carbonic anhydrase (31 kDa), soybean trypsin inhibitor (21.5 kDa) and lysozyme (14.4 kDa). Molecular weight standards (M) were α-macroglobulin (205 kDa), β-galactosidase (116 kDa), phosphorylase b (97.4 kDa), bovine serum albumin (66.2 kDa), fumarase (48.5 kDa), and carbonic anhydrase (29 kDa). The arrow indicates the position of 130 kDa polypeptide.

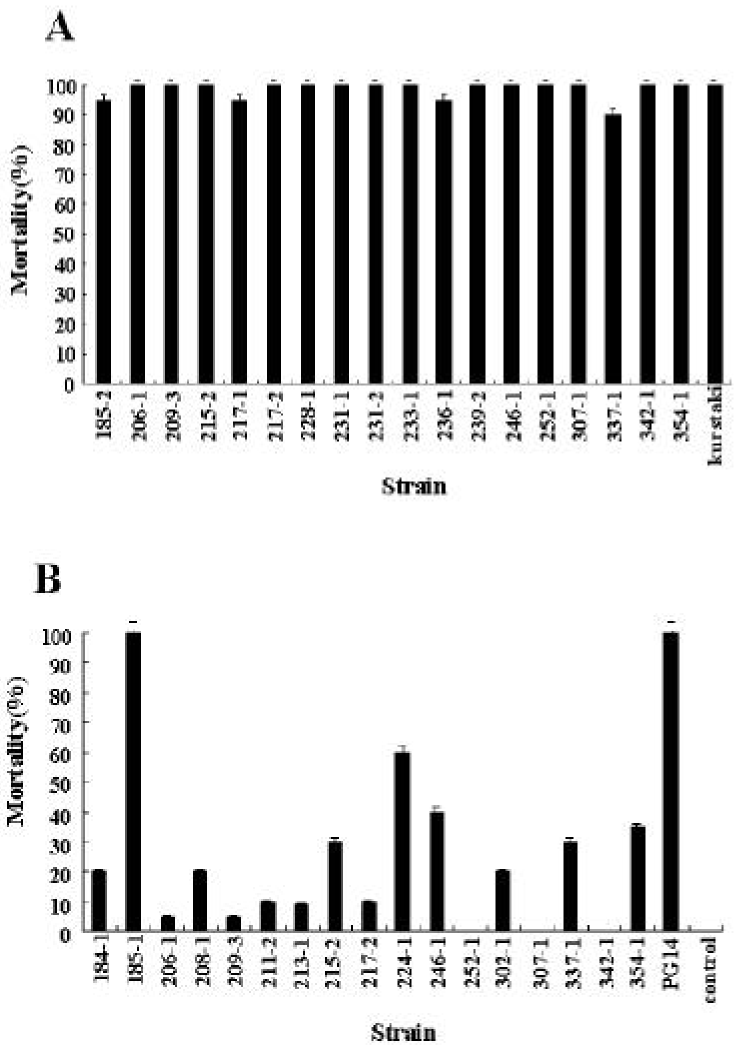


Fig. 3. Mortality of several Bt isolates against larvae of *B. mori* (A) and *C. pipiens pallens* (B). The concentration was adjusted to 10^7 spores/㎖.

Table 4. H agglutiantion test of Bt 185-1

H serotype	Serovar	Strain				
		israelensis	*morrisoni* PG-14	*alesti*	*kurstaki*	185-1
1	*thuringiensis*	-	-	-	-	-
2	*finitimus*	-	-	-	-	-
3a	***alesti***	-	-	+	+	+
3a3b	***kurstaki***	-	-	-	+	+
4a4b	*sotto*	-	-	-	-	-
4a4c	*kenyae*	-	-	-	-	-
5a5b	*galleriae*	-	-	-	-	-
6	*entomocidus*	-	-	-	-	-
7	*aizawai*	-	-	-	-	-
8a8b	*morrisoni*	-	+	-	-	-
8a8c	*ostriniae*	-	-	-	-	-
8b8d	*nigeriensis*	-	-	-	-	-
9	*tolworthi*	-	-	-	-	-
10	*darmstadiensis*	-	-	-	-	-
11a11b	*toumanoffi*	-	-	-	-	-
11a11c	*kyushuensis*	-	-	-	-	-
12	*thompsoni*	-	-	-	-	-
13	*pakistani*	-	-	-	-	-
14	*israelensis*	+	-	-	-	-
15	*dakota*	-	-	-	-	-
16	*indiana*	-	-	-	-	-
17	*tohokuensis*	-	-	-	-	-
18	*kumamotoensis*	-	-	-	-	-
19	*tochigiensis*	-	-	-	-	-
20a20b	*yunnanensis*	-	-	-	-	-
20a20c	*pondicheriensis*	-	-	-	-	-
21	*colmeri*	-	-	-	-	-
22	*shandongiensis*	-	-	-	-	-
23	*japonensis*	-	-	-	-	-
24	*neoleonensis*	-	-	-	-	-
25	*coreanensis*	-	-	-	-	-
26	*silo*	-	-	-	-	-
27	*mexicanensis*	-	-	-	-	-

+, Agglutination; -, No agglutination.

Bt 185-1 균주가 가지는 플라스미드 DNA의 패턴을 조사하기 위하여, Bt subsp. *kurstaki*, Bt subsp. *morrisoni* PG-14와 비교한 결과, Bt 185-1 균주의 플라스미드 DNA는 다른 두 균주의 플라스미드 DNA와는 매우 다른 패턴을 보였으며, Bt 185-1 균주와 Bt subsp. *morrisoni* PG-14의 플라스미드 DNA를 각각 *Hin*dIII와 *Pst*I으로 처리한 결과에서도 큰 차이를 보였다 (Fig. 5).

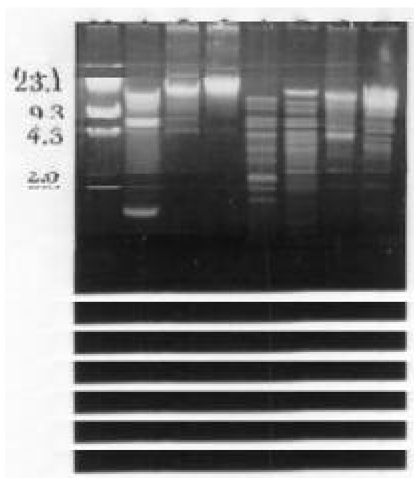


Fig. 5. Comparison of plasmid DNA of Bt 185-1 with that of Bt subsp. *morrisoni* PG-14 and subsp. *kurstaki* HD-1.
M, λ DNA digested with *Hin*dIII; 1, subsp. *kurstaki* HD-1; 2, subsp. *morrisoni* PG-14; 3, isolate 185-1; 4, subsp. *morrisoni* plasmid DNA digested with *Hin*dIII; 5, isolate 185-1 plasmid DNA digested with *Hin*dIII; 6, subsp. *morrisoni* plasmid DNA digested with *Pst*I; 7, isolate 185-1 plasmid DNA digested with *Pst*I.

Bt 185-1 균주가 가지는 내독소 단백질의 유전자형을 분석하기 위해, 각 *cry* 유전자에 특이적인 PCR primer를 합성하고, *cry* 유전자를 탐색하였다. *cryI* 형에 속하는 *cry1Aa1*, *cry1Ab1*, *cry1Ac1*, *cry1Ba1*, *cry1Ca1*, *cry1Da1*, *cry1Ea1*, *cry1Fa1*, *cry1Ga1* 유전자에 특이적인 primer를 사용한 결과 예상된 크기와 일치하는 PCR 산물을 얻지 못하였으며 (Fig. 6A), 나머지 PCR primer에서도 minor band는 많았으나 예상된 크기와 일치하는 PCR 산물을 얻지 못하였다 (Fig. 6B).

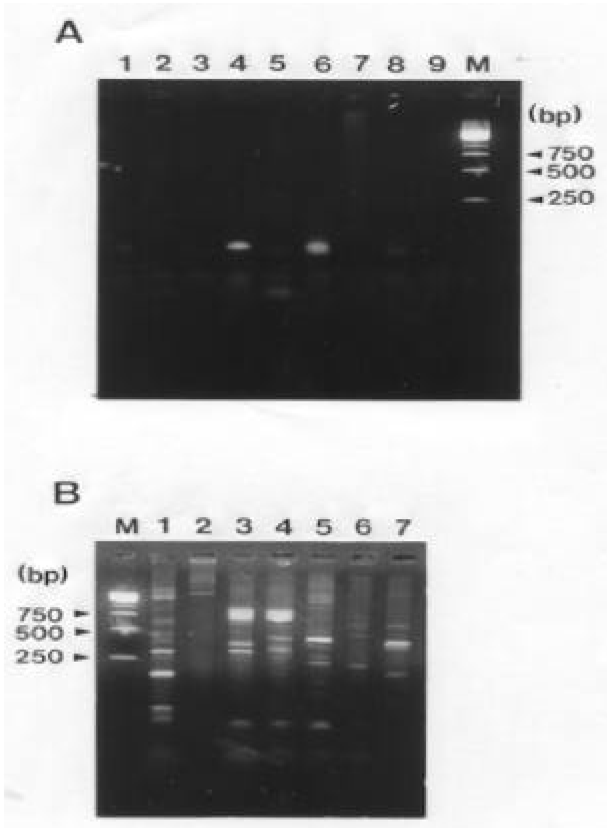


Fig. 6. *cry* type gene detection using *cry*-specific PCR primer in plasmid DNA of Bt 185-1. (A) M, 1 kb ladder molecular size marker; 1, *cry1Aa1*; 2, *cry1Ab1*; 3, *cry1Ac1*; 4, *cry1Ba1*; 5, *cry1Ca1*; 6, *cry1Da1*; 7, *cry1Ea1*; 8, *cry1Fa1*; 9, *cry1Ga1*. (B) M, 1 kb ladder molecular size marker; 1, *cry2Aa1*; 2, *cry3Aa1*; 3, *cry4Aa1*; 4, *cry4Ba1*; 5, *cry10Aa1*; 6, *cry11Aa1*; 7, *cry5Aa1*.

Bt 185-1 균주가 생성하는 내독소 단백질의 크기를 조사하기 위하여, GYS배지에서 5일 동안 배양하고, SDS-PAGE를 통하여 전체적인 단백질 패턴을 조사하였으며, sucrose density gradient를 이용하여 내독소 단백질을 순수분리한 다음, SDS-PAGE를 수행하여 내독소 단백질의 크기를 추정하였다. Bt 185-1 균주가 형성하는 전체적인 단백질의 크기는 105, 94, 83, 70, 62, 53, 48, 43, 25 kDa으로 Bt subsp. *morrisoni* PG-14와 차이를 보였다 (Fig. 7). 특히 내독소 단백질이 형성하는 분자량은 53, 48, 43 kDa으로 Bt subsp. *morrisoni* PG-14에서 보고된 28, 72, 128, 135 kDa과는 차이를 보였으며, 내독소 단백질을 형성하는 53 kDa을 PVDF 막에 흡착시키고, pulse-liquid N-terminal protein sequencing (Applied Biosystem Model 475A)를 이용하여 N-말단 아미노산 서열을 동정하였다. 동정된 아미노산 서열은 Met-Asn-Thr-Asn-Ala-Met-Lys이었으며, 보고된 Cry 단백질의 서열과는 상동성을 보이지 않았다 (Table 5).

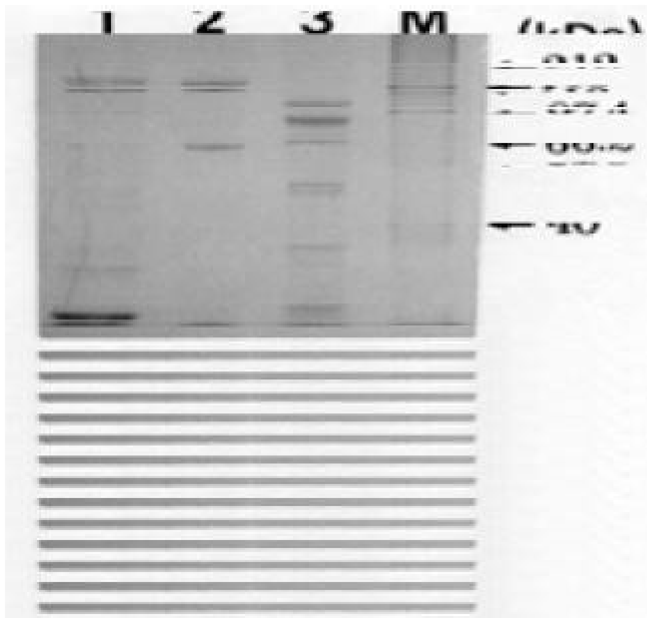


Fig. 7. Crystal protein profile of Bt strains. M, Molecular weight standards were myosin (212 kDa), β-galactosidase (116 kDa), phosphorylase b(97.4 kDa), bovine serum albumin (66.2 kDa), catalase (57.5 kDa), and aldolase (40 kDa); 1, subsp. *morrisoni* PG-14; 2, subsp. *kurstaki* HD-1; 3, Bt 185-1.

Table 5. Comparison between N-terminal amino acid sequences of 53 kDa crystal proteins from Bt 185-1 and those of other Bt strains

Gene type	Residue position 1	2	3	4	5	6	7	Homology
53 kDa	Met	Asn	Thr	Asn	Ala	Met	Lys	-
cry1Aa1	Met	Asp	Asn	Asn	Pro	Asn	Ile	28.6
cry1Ab1	Met	Asp	Asn	Asn	Pro	Asn	Ile	28.6
cry1Ac1	Met	Asp	Asn	Asn	Pro	Asn	Ile	28.6
cry1Ba1	Met	Thr	Ser	Asn	Arg	Lys	Asn	28.6
cry1Ca1	Met	Glu	Glu	Asn	Asn	Glu	Asn	28.6
cry1Da1	Met	Glu	Ile	Asn	Asn	Glu	Asn	28.6
cry1Ea1	Met	Glu	Ile	Val	Asn	Asn	Gln	14.3
cry2Aa1	Met	Asn	Asn	Val	Leu	Asn	Ser	28.6
cry2Ab1	Met	Asn	Ser	Vl	Leu	Asn	Ser	28.6
cry2Ac1	Met	Arg	Glu	Pro	Gln	Gly	Gly	14.3
cry3Aa1	Met	Ile	Arg	Lys	Gly	Gly	Arg	14.3
cry3Ba1	Met	Ile	Arg	Met	Gly	Gly	Arg	14.3
cry3Bb1	Met	Asn	Pro	Asn	Asn	Arg	Ser	42.9
cry3Ca1	Met	Asn	Pro	Asn	Asn	Arg	Ser	42.9
cry4Aa1	Met	Asn	Pro	Tyr	Gln	Asn	Lys	42.9
cry4Ba1	Met	Asn	Ser	Gly	Tyr	Pro	Leu	28.6
cry9Aa2	Met	Asn	Gln	Asn	Lys	His	Gly	42.9
cry10Aa1	Met	Asn	Pro	Tyr	Gln	Asn	Lys	42.9
cry11Aa1	Met	Glu	Asp	Ser	Ser	Leu	Asp	14.3
cyt1Aa1	Met	Glu	Asn	Leu	Asn	His	Cys	14.3

Bt 185-1 균주에서 용혈성을 가지는 *cytA* 유전자를 탐색하기 위해, *cytA* 유전자에 특이적인 PCR primer를 합성하고 Bt subsp. *morrisoni* PG-14 균주를 대조구로 하여, PCR 산물을 비교하였다. *cytA* 유전자에 특이적인 PCR 산물은 Bt subsp. *morrisoni* PG-14에서 약 270 bp 의 크기로 예상된 DNA 절편을 얻었으나, Bt 185-1 균주에서는 PCR 산물을 얻지 못하였다 (Fig. 8).

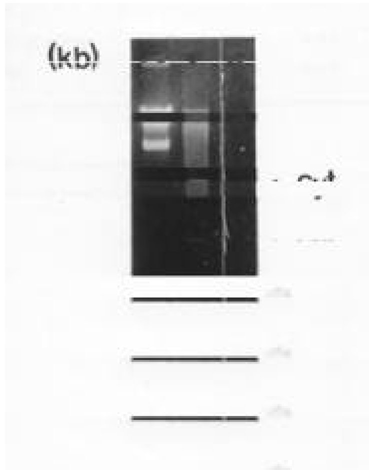


Fig. 8. *cytA* gene detection using *cytA*-promoter region specific PCR primer in plasmid DNA of Bt 185-1. M, λDNA digested with *Hin*dIII; 1, Bt subsp. *morrisoni* PG-14; 2, Bt 185-1.

혈구에 대한 내독소 단백질의 용혈성은 Ragni 등의 방법(1996)을 변형하여 수행하였다. Bt subsp. *morrisoni* PG-14와 Bt 185-1 균주의 내독소 단백질을 알칼리로 용해시키고, Bradford 방법으로 내독소 단백질의 농도를 측정한 후, 농도별로 혈구와 반응시켜 분광광도계를 이용하여 용혈성을 조사하였다. Bt 185-1 균주가 생성하는 내독소 단백질에서 용혈성은 나타나지 않았으나, Bt subsp. *morrisoni* PG-14에서 용혈성을 나타내는 HD (hemolytic dose)$_{50}$은 2.49 μg/mℓ이었으며, HD_{90}은 7.33 μg/mℓ이었다 (Table 6).

Table 6. The hemolytic dose of Bt 185-1 and subsp. *morrisoni* PG-14 against milk-cow erythorcytes

Bt strain	HD_{50} (μg/mℓ, Range)	Slope
185-1	ND*	-
subsp. *morrisoni* PG-14	2.49 (2.1-2.89)	0.873

*ND: Not determined.

Bt 185-1 균주의 살충범위를 조사하기 위하여 실험곤충으로 나비목에 속하는 누에나방, 배추좀나방, 매미나방, 파리목에 속하는 빨간집모기, 학질모기에 대해서 살충력을 조사한 결과, Bt 185-1 균주는 나비목에 속하는 곤충들에 대해서는 독성을 보이지 않았으며, 파리목에 속하는 학질모기와 빨간집모기 유충에 대해서 높은 독성을 보였다 (Table 7).

Table 7. Comparative toxicity of Bt 185-1 against lepidopteran and dipteran insect larvae

Insect tested	Toxicity
Lepidoptera	
Bombyx mori	-
Plutella xylostella	-
Lymantria dispar	-
Diptera	
Culex pipiens pallens	+++
Anopheles sinensis	+++

+++ ; highly effective, over 90% mortality, - ; not effective, 0-25% mortality

모기유충에 대한 살충성을 정량분석결과, Bt 185-1**균주와** Bt subsp. *morrisoni* PG-14**에 대해서 빨간집모기에 대한** LD_{50}**값은 각각** 29.40 ng/**㎖과** 10.84 ng/**㎖으로** Bt 185-1 **균주가 약** 3**배 살충성이 떨어졌으나**, **학질모기 유충에 대한** LD_{50}**은 각각** 9.85 ng/**㎖과** 7.46 ng/**㎖으로 비슷하였다** (Table 8).

Table 8. The median lethal concentration (LC_{50}) of Bt 185-1 and subsp. *morrisoni* PG-14 against third instar larva of *A. sinensis* and *C. pipiens pallens*

Bt strain	*A. sinensis*		*C. pipiens pallens*	
	LC_{50} (ng/ml, Range)	Slope	LC_{50} (ng/ml, Range)	Slope
185-1	9.85 (1.22-29.15)	1.50	29.40 (13.31-49.47)	0.87
subsp. *morrisoni* PG-14	7.46 (1.33-21.43)	0.99	10.84 (4.90-18.49)	0.94

이상의 결과를 종합하면 Bt 185-1 균주는 기존에 보고된 것과는 다른 내독소단백질을 형성하며 모기에 대한 살충력 또한 강독성 균주인 Bt subsp. *morrisoni* PG-14 균주와 비교하였을 때 유사하여 모기방제에 유용하게 적용할 수 있을 것으로 기대된다. 특히 Bt subsp. *morrisoni* PG-14 균주와는 달리 세포에 대한 용혈성이 나타나지 않아 목적해충이외의 생물에 상당히 안전할 것으로 생각된다. 이러한 Bt 185-1 균주의 특성을 바탕으로 하여 유용 모기독성 유전자가 형질전환된 재조합 균주를 제작하여 그 독성을 증대시키고자 하였으며, 이 균주에 대한 대량배양체계를 확립하고 시제품을 제작하고자 하였다.

3) **모기독성** Bt 185-1 **균주에서** *B. subtilis gro* promoter**를 이용한** *cry11Aa* **유전자의 발현**

Bt **내독소 단백질은 포자형성기** (sporulation) SpoIII-V **단계에서 합성되어** autolysis **과정을 거쳐 세포바깥으로 방출되며, 곤충이 섭식하였을 때 살충성을 나타낸다. 내독소 단백질** (*cry*) **유전자는 세포성장 말기에 나타나는 포자형성 신호** (sporulation signal)**에 의존적으로 발현되므로, 다른 단백질에 비하여 발현이 상대적으로 늦어 살충성이 나타나는 시간도 지연되며, 대량배양에서 경제적인 비용이 증가되는 문제점을 가지고 있다. 본 연구는 초기 성장단계인 영양세포기에서 모기유충에 가장 높은 살충력을 가지는 것으로 보고된** *cry11Aa* **유전자를 발현시키기 위해,** *B. subtilis gro* **프로모터를 이용하여 벡터를 구축하고, 모기유충에 살충성을 갖는** Bt 185-1**균주와 내독소 단백질을 형성하지 않는 무독성** Bt subsp. *kurstaki* CryB **균주에 각각 형질전환하여** *cry11Aa* **유전자의 발현 및 온도와 배양시간에 따른 빨간집모기 유충에 대한 살충성을 비교조사하였다.**

Bt subsp. *israelensis***와** Bt subsp. *morrisoni* PG-14**에서 발현되는** *cry11Aa* **유전자는 파리목 곤충에 독성을 보이는 다른** Cry **단백질보다 살충성이 높은 것으로 보고되었으며** (Thomas**와** Ellar, 1983), Donovan **등** (1988)**이 약** 2 kb **크기의** *cry11Aa* **유전자 염기서열을 보고하였다. 모기살충성** *cry11Aa* **유전자를 클로닝하기 위하여,** Donovan **등**(1988)**이 보고한** *cry11Aa* **유전자의 염기서열을 참고하여 특이적인** PCR primer**를 합성하고** (Table 1), PCR**을 통해 증폭시킨 결과, 약** 2 kb**의** PCR **산물을 얻었다** (Fig. 9). **이** PCR **산물을** *Acc*I, *Eco*RI, *Pvu*II**으로 처리하여 각각** 1.1 kb**와** 0.8

kb, 1.7 kb와 0.2 kb, 1.0 kb와 0.9 kb를 얻음으로써 *cry11Aa* 유전자를 확인하였고 (Fig. 10), pGemT 벡터에 클로닝하여 pCry4D를 제작하였다 (Fig. 10).

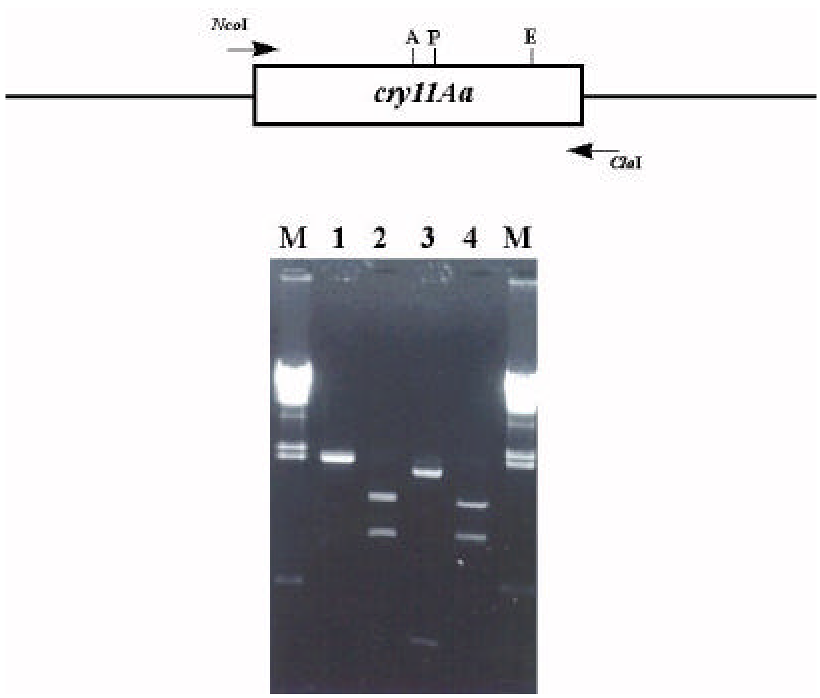


Fig. 9. Agarose electrophoresis of *cry11Aa* gene PCR product with various restriction enzymes.
M, λ DNA digested with *Hin*dIII; 1, *cry11Aa* gene; 2, *cry11Aa* gene digested with *Acc*I; 3, *cry11Aa* gene digested with *Eco*RI; 4, *cry11Aa* gene digested with *Pvu*II.

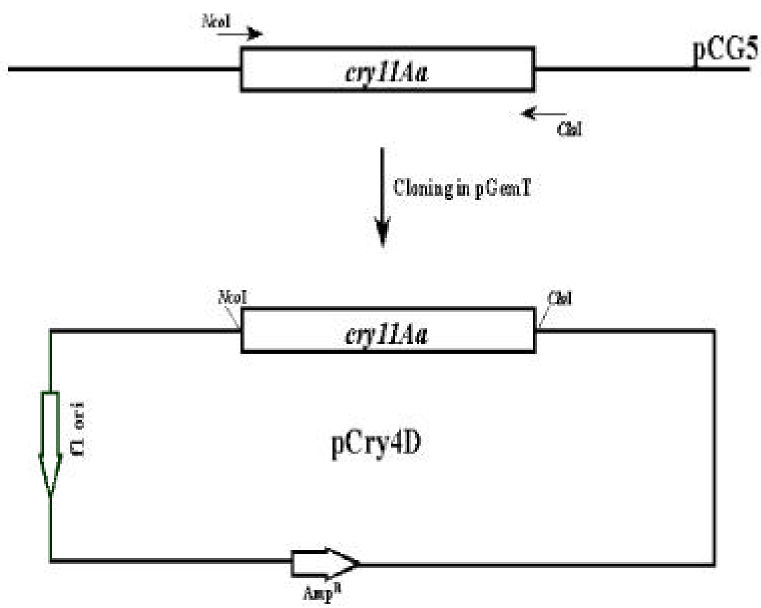


Fig. 10. Schemetic diagram of pCry4D vector construction.

고온조건에서 유도되는 *gro* 프로모터를 클로닝하기 위하여 (Fig. 11), *B. subtilis* 전체 DNA를 분리하고, Li와 Wong (1992)이 보고한 *gro* 프로모터의 염기서열을 참고하여 특이적인 PCR primer를 합성하고 증폭시킨 결과, 230 bp와 270 bp 크기의 DNA 절편을 얻었다 (Fig. 12). 이 중에서 *gro* 프로모터에서 보고된 *Apo*I 위치를 조사한 결과, 230 bp DNA 절편에서만 *Apo*I 위치를 가졌으며, pGemT 벡터에 클로닝하여 pBSgro를 제작하였다 (Fig. 13).

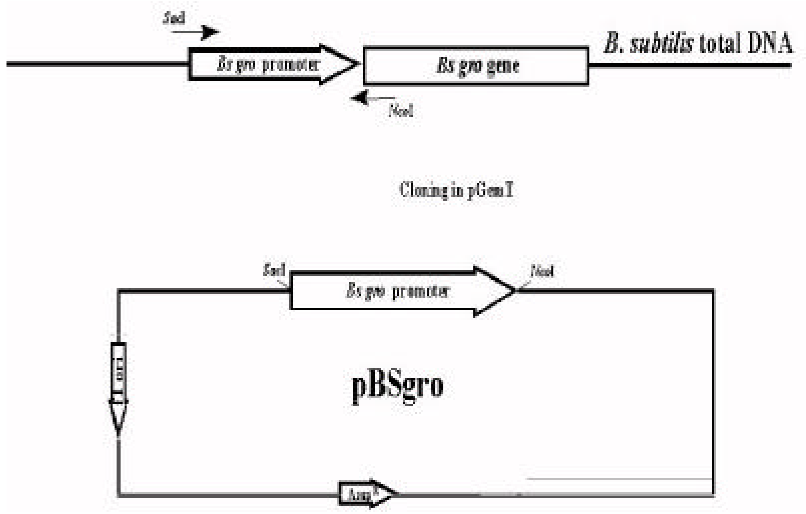


Fig. 11. Schemetic diagram of pBSgro vector construction.

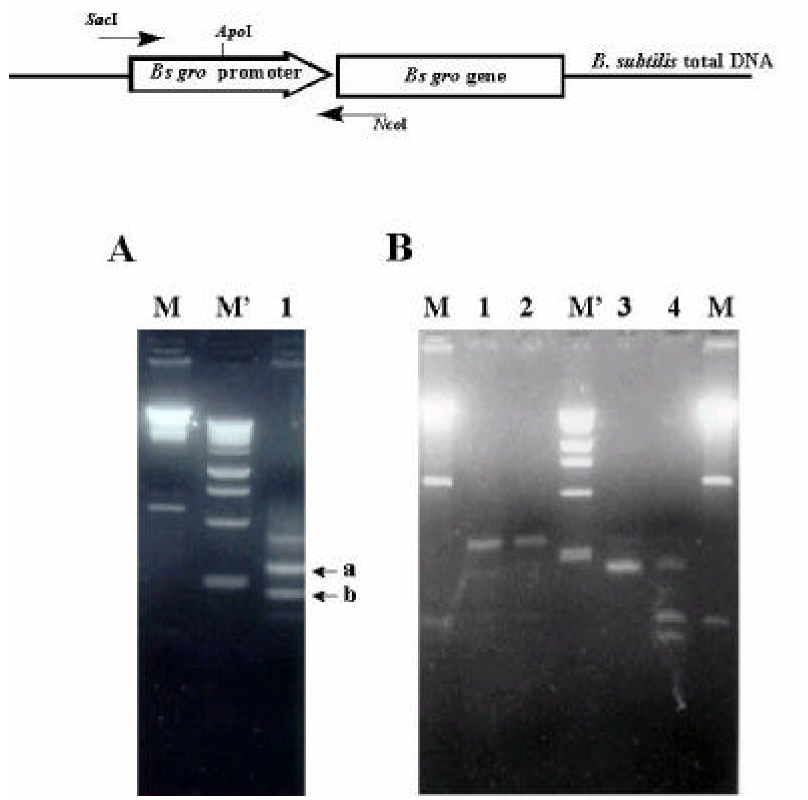


Fig. 12. Amplification (A) and identification (B) of *B. subtilis gro* promoter using *gro* specific PCR primer and restriction enzyme.

(A) M, λ DNA digested with *Hind*III; M', kb ladder molecular size marker; 1, PCR products in *B. subtilis* total DNA with the two major PCR products (a, b)

(B) M, kb ladder molecular size marker; M', λ DNA digested with *Hind*III; 1, a band; 2, a band digested with *Apo*I; 3, b band; 4, b band digested with *Apo*I

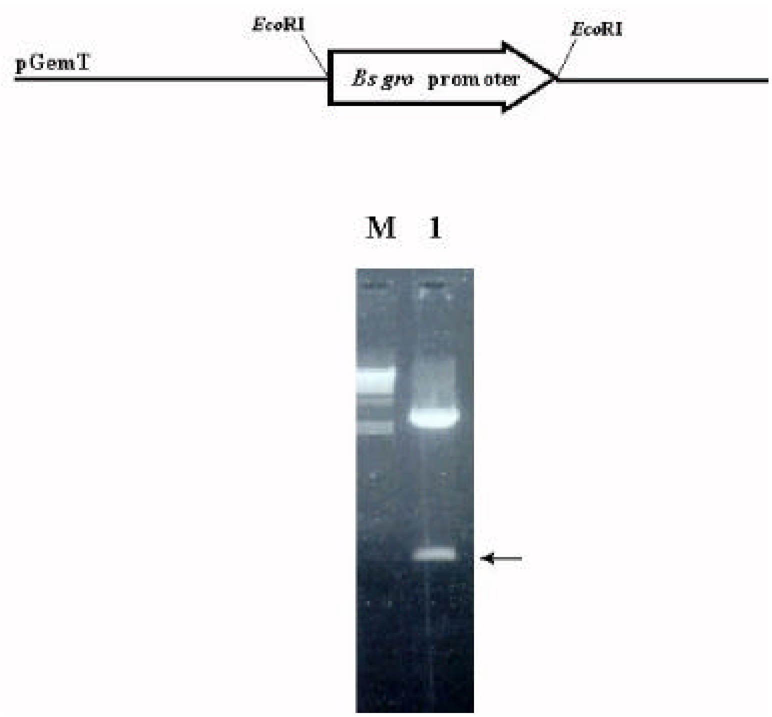


Fig. 13. Agarose electrophoresis (1.2%) of pBSgro. M, λ DNA digested with *Hin*dIII; 1, pBSgro digested with *Eco*RI. The arrow indicated *B. subtilis gro* promoter.

pBSgro를 *Sac*I과 *Sac*II으로 처리하여 *gro* 프로모터를 분리하고, pBluescript SKII(+) 벡터에 옮겨 pBLBSgro를 제작하였다 (Fig. 14). *gro* 프로모터가 *cry11Aa* 유전자를 조절하도록 클로닝하기 위해, pCry4D를 *Nco*I과 *Cla*I으로 처리하여 *cry11Aa* 유전자를 분리하고, pBLBSgro에 옮겨 pBLBSgro4D를 제작하였다. pBLBSgro4D에 *Cla*I, *Kpn*I, *Sac*I을 처리하여 5.3 kb DNA 절편을 얻어 *gro* 프로모터와 *cry11Aa* 유전자가 있음을 확인하였다 (Fig. 15). Bt 내에서 증식가능

한 pHT3101 벡터에 *gro* 프로모터와 *cry11Aa* 유전자를 옮기기 위해, pBLBSgro4D를 *Kpn*I 과 *Sac*I 으로 처리하여 *gro* 프로모터와 *cry11Aa* 유전자를 분리하고, pHT3101에 클로닝하여 pHTBSgro4D를 제작하였다 (Fig. 14). pHTBSgro4D를 *Pvu*II 으로 처리하였을 때 1.2 kb, 1.4 kb, 6.4 kb, *Sac*I 으로 처리하였을때, 9.0 kb를 확인하여, *gro* 프로모터와 *cry11Aa* 유전자를 확인하였다 (Fig. 16).

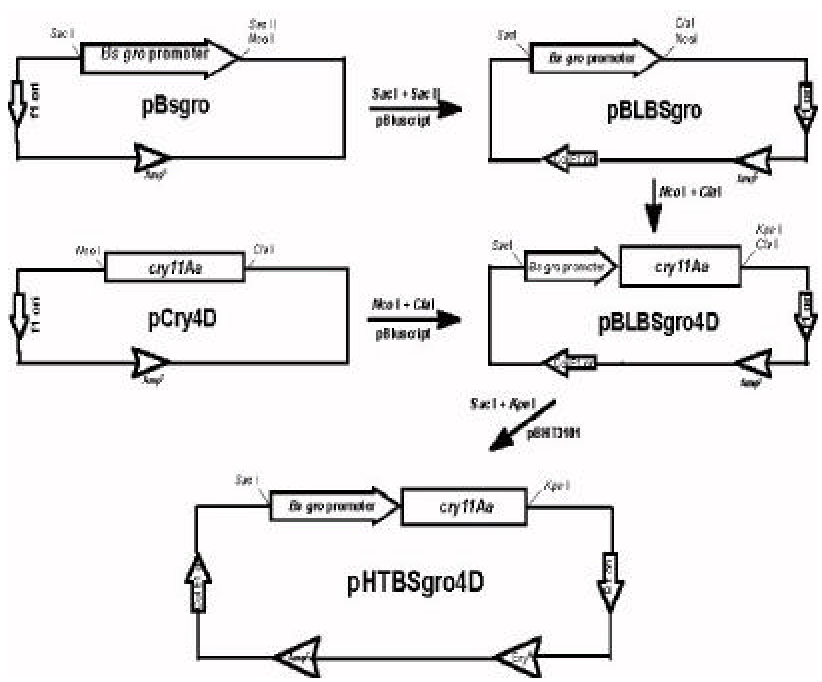


Fig. 14. Schemetic diagram of pBLBSgro4D and pHTBSgro4D vector construction.

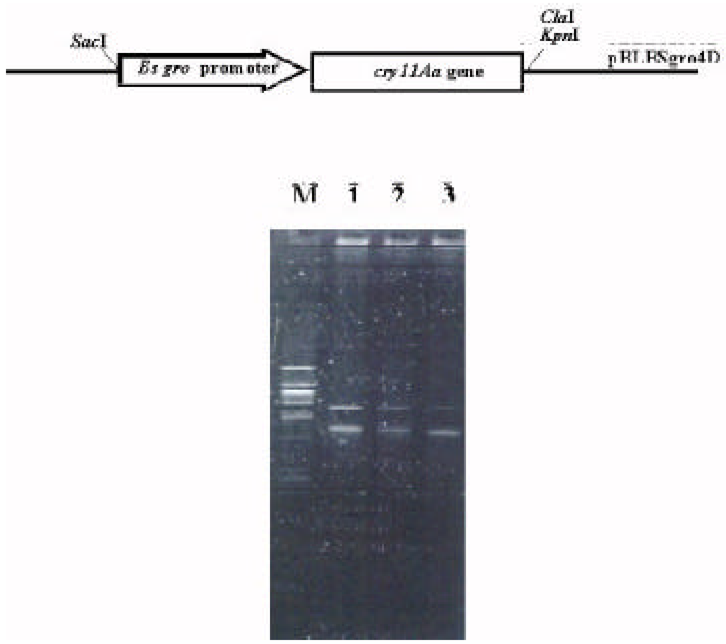


Fig. 15. Agarose electrophoresis (0.8%) of pBLBSgro4D.
M, λ DNA digested with *Hnd*III; 1, pBLBSgro4D digested with *Cla*I; 2, pBLBSgro4D digested with *Kpn*I; 3, pBLBSgro4D digested with *Sac*I.

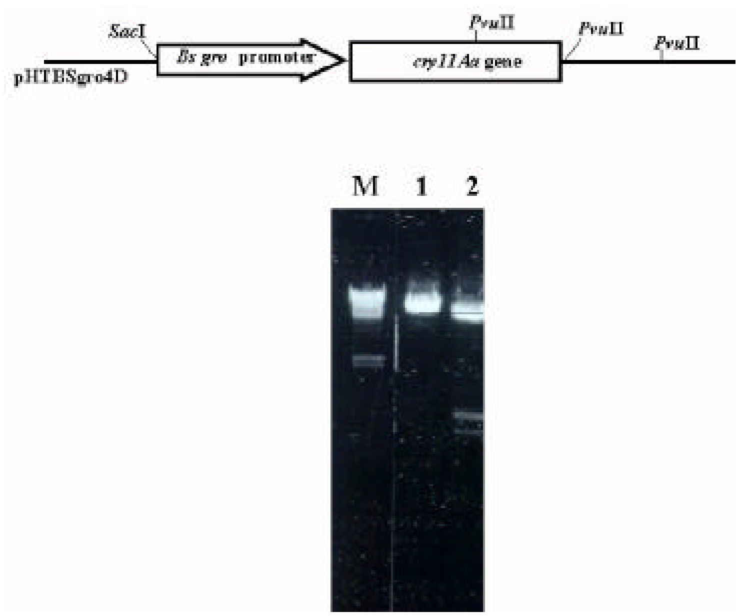


Fig. 16. Agarose electrophoresis (1.0%) of pHTBSgro4D. M, λ DNA digested with *Hin*dIII; 1, pHTBSgro4D digested with *Sac*I; 2, pHTBSgro4D digested with *Pvu*II.

pHTBSgro4D를 모기독성 Bt 185-1 균주와 Cry 단백질을 형성하지 않는 Bt subsp. *kurstaki* CryB$^-$에 형질전환시켜 콜로니를 1차 선발하였으며, 계대배양을 통하여 2차로 선발하였다 (Fig. 17). 형질전환된 Bt 185-1 균주를 *gro* 프로모터와 *cry11Aa* 유전자에 특이적인 PCR primer와 반응시켜서 각각 약 0.23 kb와 약 2.0 kb 크기의 DNA 절편을 얻어 *gro* 프로모터와 *cry11Aa* 유전자가 형질전환체에 존재한다는 것을 알 수 있었으며 (Fig. 18A), 형질전환된 CryB$^-$ 균주를 *cry11Aa* 유전자에 특이적인 primer와 반응시켜 2.0 kb DNA 절편을 얻어 *cry11Aa* 유전자의 크기와 일치하였다 (Fig. 18B).

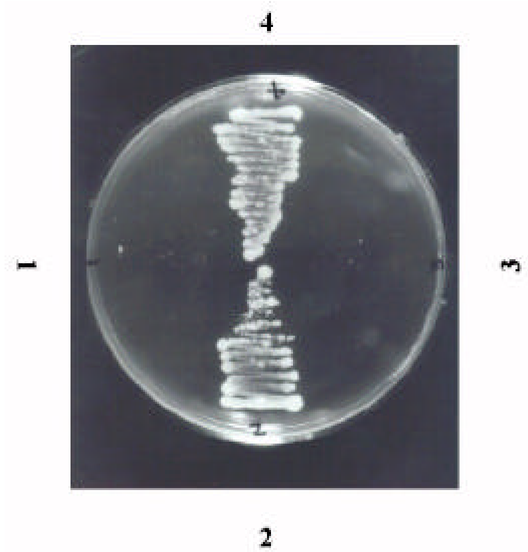


Fig. 17. Selection of transformed Bt 185-1 and subsp. *kurstaki* CryB^{-} with pHTBSgro4D. 1, Bt 185-1; 2, Bt 185-1 transformed with pHTBSgro4D; 3, subsp. *kurstaki* CryB^{-}; 4, subsp. *kurstaki* CryB^{-} transformed with pHTBSgro4D

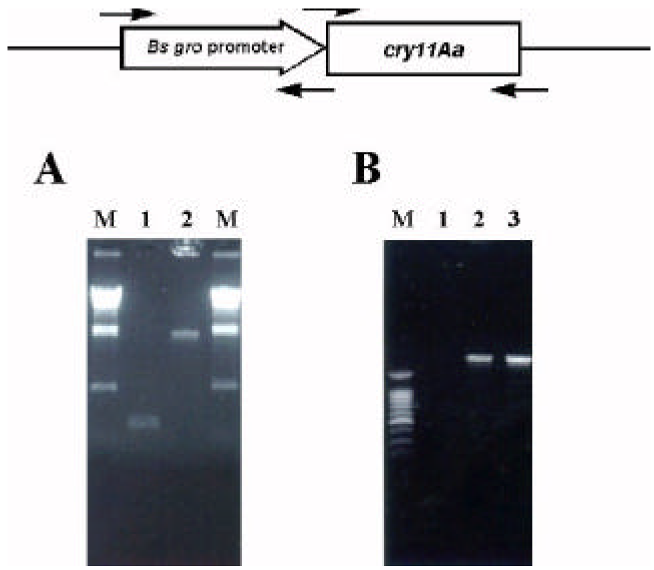


Fig. 18. *cry11Aa* gene and *gro* promoter detection using specific PCR primers in transformed Bt 185-1 (A) and subsp. *kurstaki* CryB^{-} (B).
(A) M, λ DNA digested with *Hin*dIII; 1, *gro* promoter detection; 2, *cry11Aa* gene detection. (B) M, 100 bp ladder molecular size marker; 1, *cry11Aa* gene detection in subsp. *kurstaki* CryB^{-}; 2, *cry11Aa* gene detection in transformed subsp. *kurstaki* CryB^{-}; 3, *cry11Aa* gene

형질전환체에서 *cry11Aa* 유전자가 발현되는 것을 조사하기 위해, 형질전환체를 GYS 배지에 접종하고, 각각 30℃, 37℃, 45℃ 조건으로 배양하면서 매 30분마다 시료를 채취하여 SDS-PAGE를 통해 Cry11Aa 단백질 발현을 조사하고, 빨간집모기 3령유충에 대해 살충성을 검정하였다. 형질전환된 Bt 185-1 균주의 경우, 정상배양온도인 30℃에서 내독소 단백질은 접종 후 120분에서 발현되기

시작하였으며, 모기 유충에 대한 살충성은 접종 후 1시간에서 12%였고, 이후 완만히 증가하여 접종후 5시간에서 19%를 나타냈으며, 최대 살충성 증가율은 접종 후 2시간이었다 (Fig. 19). 37℃에서는 Cry11Aa 단백질은 접종 후 60분부터 약하게 발현되기 시작하여, 시간이 지남에 따라 발현양은 증가하였다. 모기유충에 대한 살충성은 30℃에 비해 크게 증가하여, 접종 후 5시간에서 56.4%를 보였으며, 접종 후 2시간에서 최대살충성 증가율을 나타냈다 (Fig. 20). 45℃에서도 37℃의 결과와 비슷하게 Cry11Aa 단백질이 접종 후 60분부터 발현되기 시작하여 이후 발현양도 증가하였다. 모기유충에 대한 살충성은 37℃보다 높아져 접종 후 5시간에서 71.1%였고, 접종 후 2시간에서 가장 높은 살충성 증가율을 보였다 (Fig. 21).

gro 프로모터를 이용한 *cry11Aa* 유전자는 내독소 단백질의 발현을 통하여 포자형성 신호와는 독립적으로 영양세포상태에서 생성된다는 것을 알 수 있었다. 정상온도에서 *cry* 유전자의 발현은 균주에 따라 차이는 있었으나, 고온보다 발현의 정도는 낮았으며, 빨간집 모기 유충에 대한 독성은 대조구에 비하여 높은 경향을 보였다. 온도를 높이고, 배양시간을 연장함에 따라 살충력도 증대되었으며, 최대 살충력 증가는 배양 2시간에서 나타났으며, 이후 살충력은 증가하였으나, 증가경향은 완만하였다.

이상의 결과는 *gro* promoter를 이용하여 내독소단백질 형질전환체를 제작할 경우 포자형성기 뿐만 아니라 영양세포기에도 내독소단백질을 생산할 수 있어 Bt의 배양시간을 앞당길 수 있을 것으로 예상할 수 있었다. Bt 185-1 형질전환체는 원 균주의 단백질 합성에는 영향을 미치지 않는 범위에서 Cry11Aa가 발현되어 모기

에 대한 독성효과가 극대화된 재조합 균주임을 확인할 수 있었으며, 이후 폭넓은 활용이 기대된다.

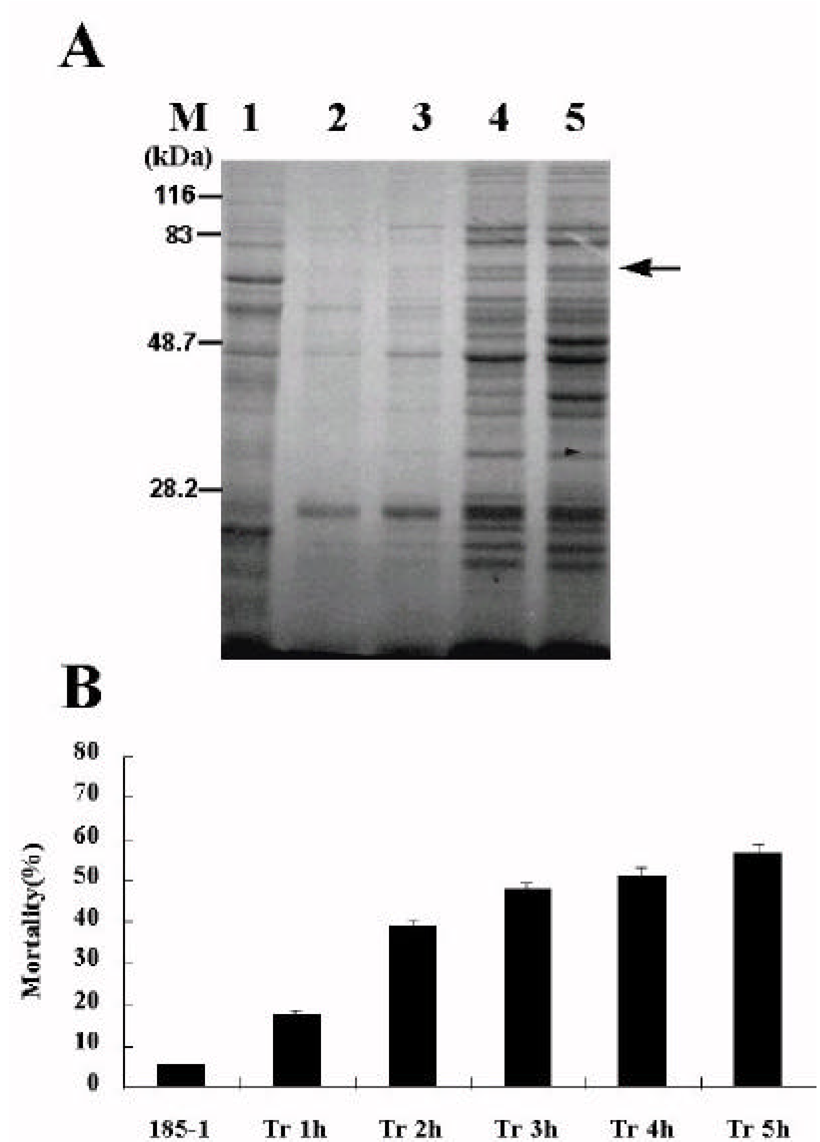


Fig. 20. Cry11Aa protein expression in transformed Bt isolate 185-1 at 37℃ (A) and mortality against *C. pipiens pallens* third instar larvae (B).

4) **대량배양체계의 개선**

1**차년도의 실험을 통하여 농가부산물로서 저렴하고 수급이 용이한 대두박과 밀기울을 이용하여 대량배양배지를 개발하고자 하였다**. **질소공급원으로서 대두박과 탄소공급원으로서 밀기울의 조성비율을** 0:5**에서** 5:0**까지 조성비를 달리하여** 7**종류 배지를 제작하였다** (Table 9).

Table 9. Seven fermentation media (g/L) for the production of Bt 185-1 crystal protein

Ingredient	Medium[a]						
	SW11	SW05	SW14	SW23	SW32	SW41	SW50
Soybean cake	25	0	10	20	30	40	10
Wheat bran	25	50	40	30	20	10	40

[a]pH was adjusted to 7.0 with 2N NaOH before autoclaving

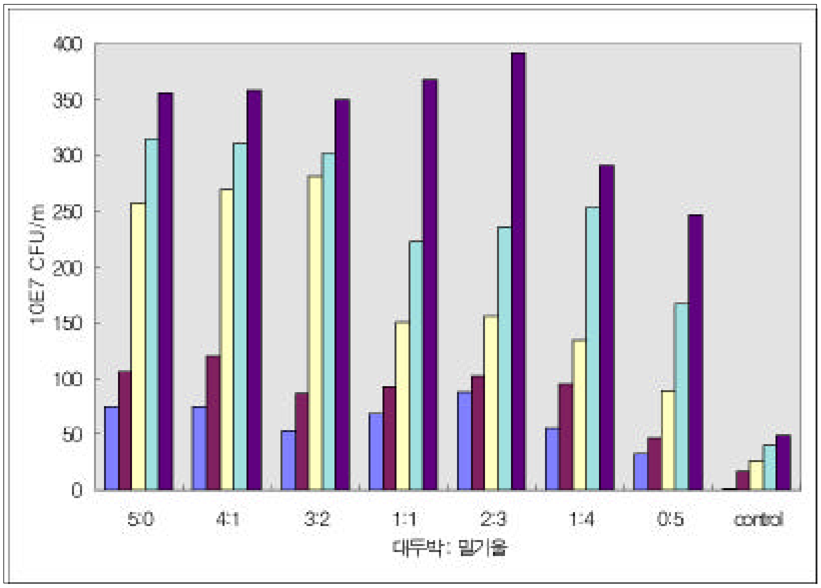


Fig. 22. Spore productions of Bt 185-1 at 7 SW media

Bt 185-1 균주를 30℃에서 5일동안 배양하며 포자형성을 조사한 결과 대조구로 사용된 GYS배지에 비하여 SW배지가 배양효율이 뛰어났으며, 5일째 대두박과 밀기울의 비율이 2:3인 배지 (SW23 배지)에서 3.9×10^9 CFU/㎖를 얻었으며, 대조구인 GYS 배지보다는 약 8배 (4.9×10^8 CFU/㎖)의 높은 성장율을 보였다 (Fig. 22).

SW23배지에서의 Bt 185-1 균주의 배양특성을 배양중의 pH 변화와 sporulation 양상을 통하여 관찰하였다. pH 변화는 초기 조정해 놓은 pH 7에서 배양 12시간 까지는 감소하는데 이는 영양세포의 성장 및 분열에 따른 대사산물에 의한 것으로 생각되며 72시간 이후에 pH 7.5에서 안정화되는 양상을 보여 기존에 보고되어 있는 배양중의 pH 변화와 유사하게 나타났다 (Fig. 23).

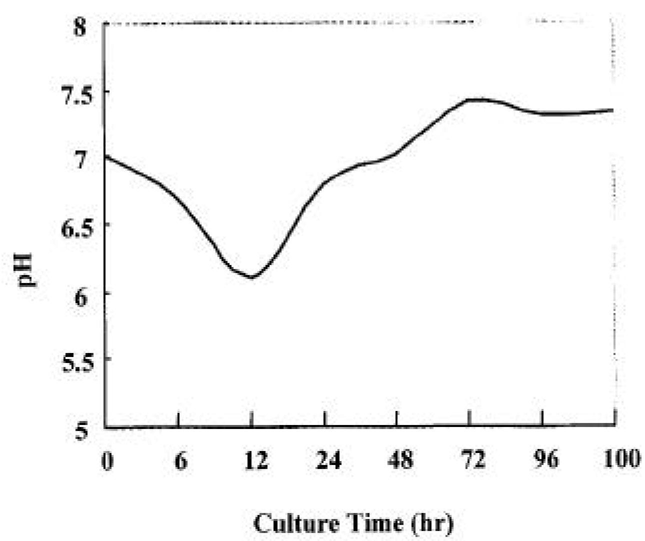


Fig. 23. Change in pH during growth and sporulation of Bt 185-1 at SW23 medium

spore 생산정도와 시간을 알아보기 위하여 SW23배지에서 7일 동안 배양하며 전체 colony수와 spore수를 비교하였다. 전체 colony수는 무처리로, spore 수는 영양세포의 제거를 위해 85℃, 30분 처리후 조사하였다 (Fig. 24). 배양 1일째부터 spore가 만들어지기 시작하여 3일째 모든 영양세포가 sporulation을 거쳐 lysis되어 spore 상태로 존재함을 알 수 있었다. spore 농도는 약 10^9 CFU/ml 이었으며 3일째가 spore와 내독소단백질을 수거하기에 가장 효율적인 시기로 생각되었다.

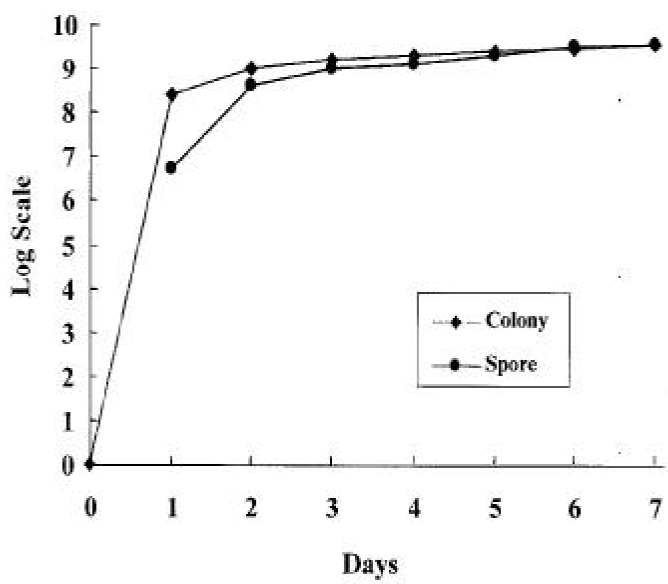


Fig. 24. Growth of viable cells and spores of Bt 185-1 at SW23 medium

SW23배지의 배양효율을 증대시키기 위하여 spore형성에 영향

을 주는 것으로 알려져 있는 무기염을 미량 첨가하여 그 영향을 조사하였다 (Table 10). $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnSO_4 \cdot 5H_2O$등을 배지의 0.01%, 0.001% 혼합하여 첨가한 후 3일 후의 spore 생산량을 비교하였다. 이중 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$는 포자형성유도 효과가 컸으며, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$는 특기할 만한 효과는 나타나지 않았고 첨가시 포자형성을 억제하는 역효과가 있을 것으로 예상되었다 (SW23+B 배지). $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$는 그 양을 0.001%로 줄일 경우에도 그 효과에는 큰 변화가 없어 0.001% 정도면 충분하였다 (SW23+D 배지). Bt spore 형성에 기여하는 것으로 알려진 Mn2+ 이온의 첨가는 포자형성에 단일 무기염 첨가로는 가장 효과가 있었으며, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$과 함께 첨가할 경우 (SW23+F 배지) 효율이 가장 높아 일반 SW23배지에 비해 약 2.8배 정도까지 포자형성을 증대시키는 것을 확인하였다.

Table 10. Effects of metal ions on sporulation of Bt 185-1

Ingredient / Medium	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	$MnSO_4 \cdot 5H_2O$	Spore Production (CFU/ml)
SW23	-	-	-	3.9×10^9
SW23+A	0.01	-	-	4.3×10^9
SW23+B	-	0.01	-	2.7×10^9
SW23+C	0.01	0.01	-	3.2×10^9
SW23+D	0.001	-	-	4.5×10^9
SW23+E	-	-	0.001	7.3×10^9
SW23+F	0.001	-	0.001	10.9×10^9
SW23+G	0.001	0.001	0.001	5.2×10^9

이상의 결과를 정리하면 농가부산물을 이용한 배지인 대두박 밀기울 2 : 3 혼합배지인 SW23 배지가 GYS 배지에 비하여 효율이 높으며, 무기염인 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$과 $MnSO_4 \cdot 5H_2O$의 미량보강 (0.001%)을 통하여 포자형성 효율이 증대된 대량배양배지를 선발하였다.

5) 제형의 개선과 유용 Bt 균주를 이용한 시제품 제작

야외 적용에서 보다 효과적인 방제를 위한 시작품을 제작하기 위하여 Bt 원제와 야외 환경에서 불활화를 막기 위한 자외선 차

단제, 물리성을 향상시키기 위한 계면활성제 및 증량제 등의 비율을 달리하여 시작품을 제작하고 그 물성을 확인하였다 (Table 11).

Table 11. Several formulation types using Bt 185-1 technical powder

Product	Technical powder	Carrier		Surfactant		UV protector
1	50%	White carbon	30%	NX-250L	10%	Tixolex 10%
2	50%	White carbon	25%	NX-250L	10%	Tixolex 15%
3	50%	White carbon Kaoline	15% 10%	NX-250L	10%	Tixolex 15%
4	50%	White carbon Kaoline	15% 15%	NX-250L	10%	Tixolex 10%
5	50%	White carbon Kaoline	15% 10%	NX-250L NK-STP	5% 5%	Tixolex 15%
6	50%	White carbon Kaoline	15% 10%	NK-STP	10%	Tixolex 15%
7	50%	White carbon Kaoline	15% 10%	NK-SLS	10%	Tixolex 15%
8	50%	Sucrose	25%	NK-250L	10%	Tixolex 15%
9	50%	$CaCO_3$	25%	NK-SLS	10%	Tixolex 15%
10	50%	Na_2SO_4	25%	NK-SLS	10%	Tixolex 15%

제품생산에 직접 활용할 수 있도록 유기합성농약과 동일한 농도개념으로 환산하여 적용하였으며, 전체 제품의 무게비에 대한 Bt 원제의 비율은 50%로 고정하였다. 다른 부가제의 경우 국내 부가제 공급업체인 (주) 코씰의 제품을 사용하여 처방하였다. 증량

제로는 white carbon, kaoline, sucrose, Na_2SO_4, $CaCO_3$등을 사용하였으며, 계면활성제는 NX-250L, NK-SLS, NK-EPB등을 사용하였으며 자외선 차단제로는 tixolex25를 고정하여 사용하였다.

제작된 10종의 시제품을 대상으로 하여 물리성을 확인하기 위하여 수화성과 현수성을 측정하였다. 측정방법으로는 수화성의 경우 1차 증류수를 이용하여 20℃로 미리 준비한 후 250 ㎖ 메스실린더에 100 ㎖ 넣고 시제품을 0.5 g 첨가하여 물에 완전히 수화되는 시간을 측정하였고, 현수성은 메스실린더를 5회 전도하여 현탁시킨 뒤 침전관에 넣고 30 분 후에 그 침전량을 측정하여 평가하였다. 입자크기는 325 mech의 sieve를 이용하여 확인하였다 (Table 12).

Table 12. Physical characteristics of Bt 185-1 formulations

Formulation type	Wetting ability	Suspensibility	Partial size*
1	+	+	PASS
2	++	++	PASS
3	+++	+++	PASS
4	++	++	PASS
5	+	+	ND*
6	++	++	PASS
7	+	+	ND
8	+	+	ND
9	+	+	ND
10	+	+	ND

+++, excellent; ++, good; +, acceptable.

*ND, not determined.

수화성 및 현수성, 입자크기를 조사한 결과 증량제로는 white carbon과 kaoline을 각각 15%와 10% 첨가한 것이 물성이 우수하였으며, kaoline의 비중을 높이거나 white carbon만을 사용할 경우 물성이 다소 나빠지는 것을 확인할 수 있었다. 계면활성제로는 NX-250L 10%가 물성이 뛰어났으며 tixolex의 첨가량은 물성에 크게 영향을 주지 않는 것으로 판단할 수 있었다. 이상의 결과로 시제품 3 (white carbon 15%, kaoline 10%, NX-250L 10%, tixolex 15%)이 물성면에서 가장 뛰어났으며 입자크기 또한 적정하여 Bt 185-1에 적합한 제제처방으로 선발하였다.

인용문헌

Birnboim, J. C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7: 1513-1523.

Bone, E. J. and D. J. Ellar. 1989. Transformation of *Bacillus thuringiensis* by electroporation. FEMS Microbiol. Lett. 58: 171-178.

Donovan, W. P., M. J. Rupar, A. C. Slaney, T. Malvar, M. C. Gawron-Burke and T. B. Johnson. 1992. Characterization of two genes encoding *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins toxic to Coleoptera species. Appl. Environ. Microbiol. 58: 3921-3927.

Kalman, S., K. L. Kiehne, J. L. Libs and T. Yamamoto. 1993. Cloning of a novel cryIC-type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae*. Appl. Environ. Microbiol. 59: 1131-1137.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

Lauriere, M. 1993. A semidry electroblotting system efficiently transfers both high- and low-molecular weight proteins separated by SDS-PAGE. Anal. Biochem. 212: 206-211.

Li, M and S. L. Wong. 1992. Cloning and characterization of the *groESL* operon from *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 174: 3981-3992.

Martin, P. A. W and R. S. Travers. 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. Appl. Environ. Microbiol. 55: 2437-2442.

Ohba, M and K. Aizawa. 1978. Serological identification of *Bacillus thuringiensis* and related bacteria isolated in Japan. J. Invertebr. Pathol. 32: 303-309.

Park, S. H., B. T Koo, B. S. Shin, S. K. Choi, Y. M Jeong, J. G. Pan and J. I. Kim 1997. Characterization of 1,925 *Bacillus thuringiensis* isolates from plants in Korea. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 25: 159-165.

Ragni, A., I. Thiery and A. Delecluse. 1996. Characterization of six highly mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* strains that do not belong to H-14 serotype. Curr. Microbiol. 32: 48-54.

Roh, J. Y., H. W Park, B. R. Jin, H. S. Kim, Y. M. Yu and S. K. Kang. 1996. Characterization of novel non-toxic *Bacillus thuringiensis* isolated from Korea. Lett. Appl. Microbiol. 23: 249-252.

Thomas, W. E. and D. J. Ellar. 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal δ-endotoxin: effects on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. J. Cell Sci. 60: 181-197.

제 4 세부과제

천적 선충 탐색 및 개발 분야

세부연구책임자 : 경상대학교 추호렬

제 5 장. 천적 선충 탐색 및 개발 분야

제 1절. 서설

곤충기생성선충은 형태적으로는 단순하지만 다양한 서식처를 가지고 있는 풍부한 동물군으로서, 토양, 수중 및 농작물등의 해충들에 높은 기생율을 보이며, 경우에 따라서는 90% 이상의 치사율을 보이고 있다. 또한 이들은 환경오염이나 부작용없이 효율적으로 해충을 방제할 수 있는 생물적억제 인자로서 해충에게 내외적인 결정적 영향을 주어 치사시키기나 악영향을 미친다. 즉, 정상적인 행동의 억제로 인한 피해 감소, 번식력 감소로 인한 개체군 밀도 감소, 생활사 단축, 우화지연, 비산력 감소로 인한 분산범위제한, 변태실패, 지방층의 축소, 전위벽 손상 등에 의한 기주치사를 초래한다.

특히, Rhabditida 목 Steinernematidae과의 *Neoaplectana* spp.와 Heterorhabditidae과의 *Heterorhabditis* spp.는 해충에 대한 병원성이 높고 기주범위도 대단히 넓을뿐 아니라, 인축에 대한 해가 없으며 기주감염능력이 뛰어나, 과실내나 수목의 천공성, 권엽성 및 노양해충등 농약의 침투가 제한적인 곳의 해충방제에 효과적인 것으로 알려져 있다. 또한 인공사육에 의한 대량증식과 보존이 용이하여 해충의 생물학적방제 수단으로서 중요시되고 있다.

곤충기생성선충을 이용한 농업해충의 방제는 부분적이나마 구미각국에서 행하여지고 있으나 우리나라에서는 거의 찾아볼 수 없

는 실정이다. 본 연구는 선충에 의한 우리나라 농업해충의 생물학적 방제가능성을 탐색하고 종합방제의 기초를 마련하기 위하여 수행하였다.

1. 연구방법

가. 한국산 곤충병원성선충의 탐색과 병원성 및 생태 연구

1) 한국산 곤충병원성선충의 탐색

우리나라 전역의 산림에 분포하는 곤충병원성선충을 탐색하기 위하여 2 4㎡내의 채집점에서 5지점을 임의로 설정하여 토양 800g을 채취하였다. 채집한 토양을 플라스틱 백에 넣어 실내로 가져와 잘 섞은후 300g들이 플라스틱통에 250g씩 넣고 꿀벌부채명나방(*Galleria mellonella*) 노숙유충 10마리씩을 넣어 25±2℃에서 7일간 보관하였으며, 처리 7일후 곤충병원성선충에 감염된 치사유충중 일부는 해부하여 선충의 감염에 의한 치사를 확인하였고, 나머지는 White trap을 이용하여 선충을 수확하였다. 수확된 선충은 꿀벌부채명나방 노숙유충을 이용하여 재증식시켜 250㎖ tissue culture container에 넣어 10±2℃ 냉장고에 보관하였다. 그리고 분리된 곤충병원성선충의 분류·동정은 미국 University of California Davis 선충학과의 분류학자와 공동으로 수행하였다.

2) 탐색된 곤충병원성선충의 병원성과 생태

15×10㎜ petri dish에 여과지 1장(wattman #2)을 깔고 꿀벌부채명나방 노숙유충 한 마리씩을 각각 넣었다. 그리고 논산에서 분리된 한국산 곤충병원성선충을 꿀벌부채명나방 유충 한 마리당 5, 10, 20, 40, 80, 160마리 농도로 0.5㎖을 접종하여 13℃, 18℃, 24℃, 30℃ 항온기에 보관하면서 온도의 영향을 조사하였다. 처리는 10반복으로 하였다.

나. 탐색된 한국산 곤충병원성선충과 공생세균의 대량증식 연구

1) 곤충병원성선충 공생세균 분리

꿀벌부채명나방 노숙유충을 filter paper를 깐 petri dish에 넣고 *S. longicaudum*를 접종시킨다. 1일후 치사한 유충을 95% ethyl alchol에 표면살균시킨 다음 1.5㎖ tube에 0.5㎖의 살균수와 함께 넣은다음 마쇄하여 그 추출액을 NA media에 pleating시킨 후 30℃ incubator에 넣고 2일간 배양시킨다. 배양후 생긴 세균을 순수분리한다.

2) 인공배지를 이용한 곤충병원성선충과 공생세균의 증식

가) 처리내용 :

(1) YS broth + 논산, 동래산 선충
(2) YS broth + 세균(논산 2종, 동래 1종) + 논산, 동래산 선충
(3) YS broth + 스폰지 + 논산, 동래산 선충
(4) 소간 + 스폰지 + 논산산 선충
(5) 돼지내장 + 스폰지 + 논산산 선충

나) 방법

(1) YS broth 처리구는 100㎖ 삼각플라스크에 30㎖씩 분주후 살균기에 넣어 살균하고, 소간 또는 돼지내장 처리구는 소간과 돼지내장을 마쇄한 후 100㎖ 삼각플라스크에 30㎖씩 넣어 살균하였다.

그리고 스폰지(2-3㎤) 처리는 각 처리물을 동일한 처리량(30㎖)으로 스폰지에 완전히 스며들게 하여 살균하였다.

(2) PDA배지에 자라고 있던 논산과 동래산 선충에서 분리된 세균을 1㎝ 코르크 천공기로 잘라 9㎖ 살균수가 든 Test-tube에 넣어 교반하였다.

(3) Test-tube에서 세균 1㎖씩을 뽑아 30㎖의 살균한 인공배지가 든 삼각플라스크에 넣고 25℃에서 1300rpm shaker로 교반하였다. 그리고 2일간 세균을 배양하였다.

(4) 배양된 세균에 논산산 선충은 1,700마리/0.5㎖을 동래산 선충은 900마리/0.5㎖의 선충을 접종한 3주후 선충의 증식유무를 해부현미경하에서 조사하였다.

3) 꿀벌부채명나방 유충 액기스를 이용한 곤충병원성선충과 공생세균의 증식

꿀벌부채명나방 노숙유충과 물을 1:2 비율로 섞어 살균한 다음 꿀벌부채명나방 유충을 믹서기로 마쇄한 후 0.02㎜체에 걸러서 액기스를 추출하였다. 그리고 액기스와 YS broth를 이용하여 100㎖ 삼각플라스크에 각각 30㎖씩의 다음과 같은 배지를 조성하였다.

가) 액기스 원액
나) 액기스 1/2 희석액
다) 액기스 1/2 희석액 ＋ YS broth
라) YS broth

조성한 배지에 미리 NA 배지에 배양시켰던 bacteria Ⅰ과 Ⅱ

를 직경 1㎝ 코르크 천공기로 떼어내어 10㎖ 살균수에 넣고 흔든 다음, 1㎖씩을 삼각플라스크에 넣고 1일동안 shaker에 넣어 배양 시켰다. 그리고 황산스트렙토마이신 1g과 증류수 1,000㎖을 혼합하여 만든 용액에 논산산 선충을 넣고 2-3시간 동안 표면살균 시킨 다음, 3500g에서 10분간 원심분리 시켜 상등액을 버리고 다시 같은 방법으로 3회 반복해서 원심분리 시켰다. 원심분리 시킨 선충 1,100마리를 1일 동안 세균 배양시킨 각각의 배지가 든 삼각플라스크에 넣었다. 처리 2주후 *S. longicaudum* 논산과 공생세균의 증식수를 조사하였다.

4) 인공배지의 종류에 따른 *S. longicaudum*의 시기별 증식수

논산산 선충의 공생세균은 논산산 선충에 감염되어 치사한 직후의 꿀벌부채명나방 노숙유충에서 체액을 뽑아 NBTA, MacConkey Agar로 공생세균임을 검증한 세균을 사용했다. 대량증식을 위한 배지는 모두 9가지를 사용하였으며, 그 조성은 아래와 같다 (Table 1).

Table 1. **인공배지의 종류**

	배 지 조 성
Media A	**돼지사료** 8.8% Peptone 1.2% Agar 0.2% with buffer
Media B	**닭사료** 8.8% Peptone 1.2% Agar 0.2% with buffer
Media C	**소사료** 8.8% Peptone 1.2% Agar 0.2% with buffer
Media D	**개사료** 8.8% Peptone 1.2% Agar 0.2% with buffer
Media Ⅰ	**콩기름** 50% **옥수수기름** 30% **올리브유** 5% Lard 15%
Media Ⅱ	**닭내장** 87.8% **누에번데기** 12.2%
Media Ⅲ	**콩기름**26.66% **옥수수기름** 26.66%**누에번데기** 26.66%Lard 20%
Media Ⅳ	**두유** 30% **분유** 40% Pepton 1.2%Lard 28.8%
Media Ⅴ	**미강추출물** 30% **분유** 40% Lard 30%

* buffer(Sörensen phosphate buffer : 33mM KH_2PO_4 : 33mM Na_2HPO_4 = 7 : 3 pH 6.5)

이렇게 만든 배지중 Media A, B, C, D**는** petri dish **에 분주하여 사용하였고**, Media Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ, Ⅴ**는** 250㎖ **삼각플라스크에 오아시스** 2g**을 직사각형 모양으로 잘라서 배지와 함께 넣어 사용하였다**. **분리한 공생세균은** Ys broth**에** 2**일동안 증식시켜서 조성된 배지에 넣고 다시 하루동안 증식시켰다**. **그리고 황산스트렙토마이신** 1g**과 증류수** 1,000㎖**로 만든 용액에 논산산 선충을 넣어** 2 3**시간 동안 표면살균 시킨 다음** 3500g**에서** 10**분간 원심분리 시킨 다음 상등액을 버리고 다시 같은 방법으로** 3**회 반복해서 원심분리 시켰다**. **원심분리 시킨 논산산 선충** 1×10^6**을 접종한 다음** 25℃ **항온기에 넣었다**. **처리는** 3**반복하였다**.

5) 인공배지(YS broth)에서 *S. longicaudum*의 시간 경과별 증식수

100㎖ 삼각플라스크에 30㎖씩 YS broth를 넣고 살균한 다음 NA 배지에서 증식시킨 bacteria Ⅰ과 Ⅱ를 1㎝ 코르크 천공기로 떼어내 10㎖ 살균수가 든 시험관에 주입후 흔든 다음 각각의 삼각플라스크에 1㎖씩 넣어 1일간 shaker로 배양한 후 황산스트렙토마이신 1g과 증류수 1,000㎖로 만든 용액에 논산산 선충을 넣었다. 그리고 2 3시간 동안 표면살균 시킨 다음 3500g에서 10분간 원심분리 시킨 다음 상등액을 버리고 다시 같은 방법으로 3회 반복해서 원심분리 시켰다. 원심분리 시킨 선충 1,100마리를 각각의 삼각플라스크에 넣고 2주, 3주, 4주째 선충의 증식수를 조사하였다.

6) 공생세균의 온도별 colony 크기

30℃ 항온기에서 NA 배지에 미리 배양시킨 bacteria Ⅰ과 Ⅱ를 직경 1㎝ niddle로 떼어내어 각 NA 배지에 하나의 colony만 찍어 넣었다. 그리고 bacteria Ⅰ과 Ⅱ를 15℃, 20℃, 25℃, 30℃ 항온기에 넣어 2일후 생장 반경을 측정하였다.

7) *S. longicaudum*의 대량증식 후 꿀벌부채명나방 유충에 대한 Bacteria Ⅰ, Ⅱ의 병원성 검정

100㎖ 삼각플라스크에 30㎖씩 YS broth를 넣고 살균한 다음 NA 배지에서 증식시킨 bacteria Ⅰ과 Ⅱ를 1㎝ 코르크 천공기로 떼어내 시험관에서 5.2×10^{12} 농도로 희석한 후 1㎖ Disposable syringe-1을 이용하여 0.05㎖씩 꿀벌부채명나방 유충에 접종하여 치사유무를 검정하였다. 처리는 10마리씩 3반복하였으며, 무처리는 살균수만 처리하였다.

8) 꿀벌부채명나방 유충과 인공배지에서 증식된 *S. longicaudum*의 병원성 비교

87×15㎜ petri dish에 여과지 1장(wattman #2)을 깔고 꿀벌부채명나방 노숙 유충과 무잎벌레 유충을 petri dish 당 각 10마리씩 넣었다. 그리고 꿀벌부채명나방 노숙 유충과 YS broth를 이용하여 대량 증식한 *S. longicaudum* 유충을 꿀벌부채명나방 유충 한 마리당 0, 5, 10, 20, 40, 80, 160마리 농도로 1㎖을 접종하여 25℃ 항온기에 보관하면서 병원성을 조사하였다. 처리는 3반복으로 하였다.

2. 결 과

가. 한국산 곤충병원성선충의 탐색과 병원성 및 생태 연구

1) 한국산 곤충병원성선충의 탐색

충청남도 논산의 산림지에서 곤충병원성선충인 *Steinernema longicaudum*, 경상북도 경상의 대구골프장에서 *Heterorhabditis* sp., 부산광역시 소재 동래 베네스트골프장에서 *Heterorhabditis* sp., 그리고 진주시 지수면 소재 방어산에서 *Steinernema* sp.가 분리되어 현재 분류·동정중이며, 처리하지 못한 채집된 토양은 냉장고에 보관중이다.

2) 탐색된 곤충병원성선충의 병원성과 생태

Steinernema longicaudum 논산 strain의 온도와 농도에 따른 병원성 결과는 다음과 같다. 처리농도에 따라서는 20마리에서부터

160마리까지 별 차이를 보이지 않았으며, 온도별에서는 24℃와 30℃에서 비슷한 양상을 보였다 (Fig. 1).

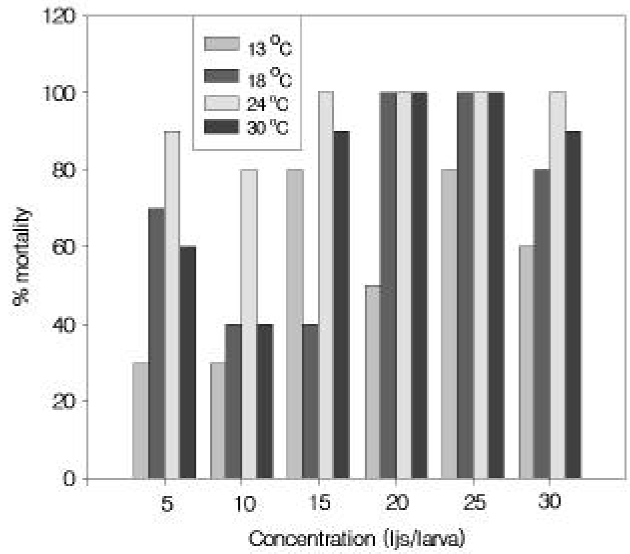


Fig. Pathogenicity of entomopathogenic nematode, *Steinernema longicaudum* depending on various temperatures.

Fig. 1. Pathogenicity of entomppathogenic nematode, Steinernema longicauolum depending on various tempreature

그러나 전체적으로 24℃에서 보다 높은 병원성을 나타내고 있다. 논산산 선충의 병원성을 나타내는 최초치사일수와 전체치사일수는 전반적으로 농도에 의해서는 크게 차이가 없었으나 온도가 높아질수록 최초치사일수와 전체치사일수가 짧아지는 경향이었다. 즉, 최초치사일수가 1-3일, 전체치사일수가 2-3일이었다.

Table 2. **온도별** *S. longicaudum* **논산의 최초치사일과 전체치사일수**

Temperature (℃)	Concentration (Ijs/larva)											
	5		10		15		20		25		30	
	F*	T#	F	T	F	T	F	T	F	T	F	T
13	8	5	6	7	9	4	6	7	6	4	7	5
18	5	5	5	8	6	2	6	5	5	8	7	7
24	2	3	3	7	2	3	2	3	2	3	2	7
30	1	3	3	3	1	8	1	3	1	3	11	2

*First day of death, #Total lethal period.

논산산 *S. longicaudum*의 온도별 증식량을 조사한 결과 13℃에서는 전혀 증식이 되지 않았고 18℃에서는 처리후 15 35일까지 비교적 긴 기간동안 증식이 이루어졌으며, 24℃에서는 5 18일까지, 30℃에서는 3 10일까지 증식이 이루어졌다. 증식수는 24℃에서 가장 많았으며 온도가 높아짐에 따라 전체 증식기간 및 최초증식일수 모두 상당히 빨라지는 경향을 나타내고 있었다 (Table 2). 논산산 선충의 각 온도와 농도별 전체 증식수는 24℃를 제외한 18℃와 30℃에 있어 40 160마리 농도의 처리구에서는 비슷하였지만, 24℃에서는 40 160마리 농도에 비해 20마리 농도에서 월등히 높게 나타남에 따라 논산산 선충의 증식 최적조건 및 농도는 24℃, 20마리가 가장 적합하였다.

논산산 선충의 최초증식일수와 전체증식기간을 알아본 결과 농도에 따라서는 차이가 크게 나지 않았고, 온도가 높아질수록 최초증식일수와 전체증식기간이 상당히 단축되는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 2, Table 3). 특히, 전체증식일수는 온도가 높아질수록 상당히 짧아지는 것으로 보아, 대량증식시에 짧은 시간동안 많은 선충을 필요로 할 경우 이러한 점을 활용할 수 있을 것으로 본다.

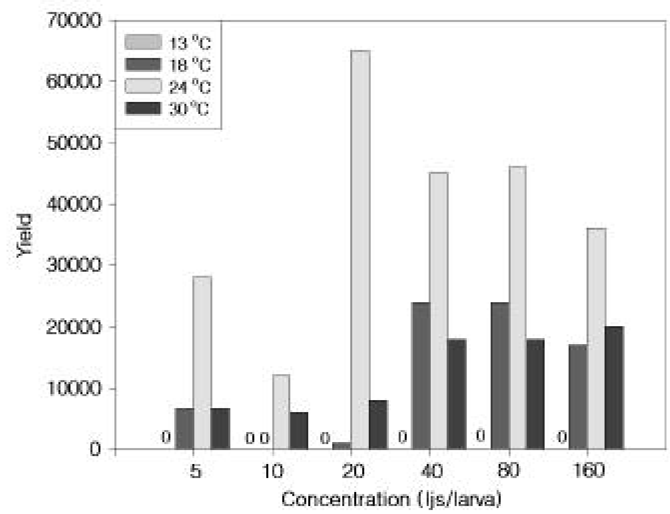


Fig. Yields of entomopathogenic nematode, *Steinernema longicaudum* with different concentration according to various temperatures.

Fig. 2. Yields of entomopathogenic nematode, *Steinernema longicaudum* with different concentration according to various temperature

Table 3. **온도에 따른** *S. longicaudum* **논산의 최초증식일과 전체 증식일수**

Temperature (℃)	Concentration (Ijs/larva) 5		10		15		20		25		30	
	F*	T#	F	T	F	T	F	T	F	T	F	T
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	5	5	5	8	6	2	6	5	5	8	7	7
24	8	13	7	14	6	19	8	18	9	12	6	19
30	5	6	6	6	5	4	4	7	5	7	44	6

*First day of harvest, #Total period of harvest.

Table 4. **인공배지에서 곤충병원성선충의 증식과 병원성**

Treatment	Nematode species	Concentration of bacteria(cfu)	Number of neamtodes propagated	mortality (%)
YS broth	*S. longicaudum*	6.7×10^{10}	2250	100
YS broth + bacteria Ⅰ	〃	1.3×10^{13}	2430	100
YS broth + bacteria Ⅱ	〃	1.1×10^{5}	6290	100
YS broth + sponge	〃	6.6×10^{12}	2190	100
YS broth	*S. glaseri*		970	100
YS broth + bacteria	〃		1010	100
YS broth + sponge	〃		950	0
소간 + sponge	〃		0	0
돼지내장 + sponge	〃		0	0

곤충병원성선충의 증식은 YS broth와 논산산 선충에서 분리된 bacteria II를 혼합한 배지에서 증식수가 가장 많았다(Table 4). 즉, 접종한 1,700마리보다 6290마리로서 약 4배의 증식을 보임으로써 한국에서 분리된 곤충병원성선충이라도 그 증식량에 있어서는 이미 외국에서 밝혀진 효과가 아주 우수하고 상품화되고 있는 선충과 비교하여 그 차이를 볼 수 없었다. 그러나 소간이나 돼지 내장과 같은 방법들은 조사결과 곤충병원성선충을 확인 할 수 없었으며, 확인이 되는 몇안되는 선충은 100%가 치사된 상태였다. 이러한 점들은 외국의 사례들과 상이한 결과를 얻어 앞으로 인공배지로서 구하기 쉽고, 경제적이며 무엇보다도 선충의 증식에 보다 효율적인 배지를 지속적으로 연구 개발하고 있다. 그리고 실험결과 대량증식이 성공한 바 효과적인 배지선발과 함께 상품화를 대비하여 보관성이 우수한 보관용기의 개발도 병행하고 있다.

Table 5. 꿀벌부채명나방 유충 액기스에서의 곤충병원성선충과 공생세균의 증식

Treatment	Bacteria density(CFU) $\times 10^{15}$		Number of nematode Ijs	
	Bacteria I	Bacteria II	Bacteria I	Bacteria II
꿀벌부채명나방 유충 액기스 원액	27.4	33.0	0	0
꿀벌부채명나방 유충 1/2 희석액	12.7	23.0	0	0
YS broth	1.97	14.9	1,600	1,980
꿀벌부채명나방 유충 액기스 1/2 희석액 ＋YS broth	16.3	22.4	0	0

곤충병원성선충의 증식에 이용되는 꿀벌부채명나방 유충의 액기스 농도에 따른 공생세균과 선충의 증식수를 조사한 결과 *S. longicaudum* 논산의 bacteria I을 꿀벌부채명나방 유충 액기스 원액에 처리했을 때 증식수가 27.4×10^{15}였으며 꿀벌부채명나방 유충 1/2 희석액에 처리했을 때 12.7×10^{15}, YS broth에 처리했을 때 1.97×10^{15}, 꿀벌부채명나방 유충 액기스 1/2 희석액 ＋ YS broth에 처리했을 때 16.3×10^{15} 농도로 증가하였으나, 선충 증식은 YS broth를 제외한 처리에서는 전혀 이루어지지 않아 꿀벌부채명나방유충 액기스를 선충의 증식을 위한 대체 인공배지로 이용하기에는 부적당한 것으로 나타났다(Table 5).

Table 6. 인공배지의 종류에 따른 *S. longicaudum*의 시기별 증식수

	Number of nematodes propagated		
	2 weeks	3 weeks	4 weeks
Media A	0	진행중	
Media B	0	진행중	
Media C	0	진행중	
Media D	0	진행중	
Media Ⅰ	450,000	진행중	
Media Ⅱ	275,000	진행중	
Media Ⅲ	486,700	진행중	
Media Ⅳ	385,000	진행중	
Media Ⅴ	266,000	진행중	

다양한 인공배지의 종류에 따른 *S. longicaudum*의 증식수를 알아본 결과 Media A, B, C, D는 증식이 전혀되지 않았으며, Media I, II, III, IV는 450,000, 275,000, 486,700, 385,000, 266,000마리로서 각각 4.5배, 2.8배, 4.9배, 3.9배, 2.7배의 증식율을 보였다. Media A, B, C, D에서 증식이 되지 않은 것은 가축의 사료에 항생제와 같은 화학물로 인해 선충이 영향을 받은 것으로 생각되며, 기타의 배지들은 대량 증식에 우수한 배지로 조사되었으며, 현재 조사가 계속되고 있음으로 보다 우수한 배지가 선정될 것으로 기대하고 있다(Table 6).

Table 7. 인공배지(YS broth)에서 *S. longicaudum*의 시간 경과별 증식수

Bacteria type	Concentration (Ijs/30㎖)	Number of nematodes propagated		
		2 week	3 week	4 week
Bacteria I	1,100	2950	2600	2750
Bacteria II	1,100	4880	3650	3290

YS broth에 *S. longicaudum* 논산을 두 공생세균이 배양되어 있는 삼각플라스크에 동일하게 1,100마리 처리한 후 2, 3, 4주에 걸쳐 선충의 증식수를 조사한 결과 bacteria I은 2주째 2950마리, 3주째 2600마리, 4주째 2750마리로서 인공배지에 선충을 처리한 후 2주째가 가장 많은 증식수를 나타내었다. 그리고 bacteria II도 2주째 4880마리, 3주째 3650마리, 4주째 3290마리로서 bacteria I과 동일한 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 선충의

증식은 공생세균의 활성기간과 깊은 연관을 가지고 있는 것으로 나타났으며 앞으로 선충의 대량증식에 있어 효과적인 증식기간을 추정하는 기초가 될 것으로 본다(Table 7).

Table 8. *S. longicaudum* 논산 공생세균의 온도별 colony의 크기(㎜)

Bacteria type	Temperature(℃)			
	15	20	25	30
Bacteria Ⅰ	0.625	1.7	3.0	4.9
Bacteria Ⅱ	0.275	1.9	2.35	2.8

S. longicaudum 논산의 두 가지 공생세균의 온도별 colony의 반지름 크기를 조사한 결과 bacteria Ⅰ에서는 15℃에서 0.625㎜, 20℃에서 1.7㎜, 25℃에서 3.0㎜, 30℃에서 4.9㎜로서 온도가 높을수록 colony의 크기가 커지는 것을 알 수 있었으며 bacteria Ⅱ도 온도가 높을수록 유사한 결과를 나타내었다(Table 8). 이와같은 온도에 따른 colony의 크기 증가는 일반적으로 25 30℃에서 곤충병원성선충의 증식력과 병원성이 높게 나타나는 현상과 유사한 결과를 나타냄으로써 공생세균과 선충의 증식 적정온도가 25 30℃ 인 것을 알게되었다. *S. longicaudum*에서 분리한 Bacteria Ⅰ, Ⅱ를 꿀벌부채명나방 유충에 접종한 후 시간경과에 따른 치사유무를 조사한 결과 1시간째 10%, 23.3%, 2시간째 10%, 26.7%, 4시간째 13.3%, 36.7%, 8시간째 16.7%, 36.7%, 16시간째 33.3%, 53.3%, 24시간째 100%, 100%로서 접종 후 24시간이 지난 다음 Bacteria Ⅰ, Ⅱ에서 모두 100%의 치사율을 보였다(Fig. 3).

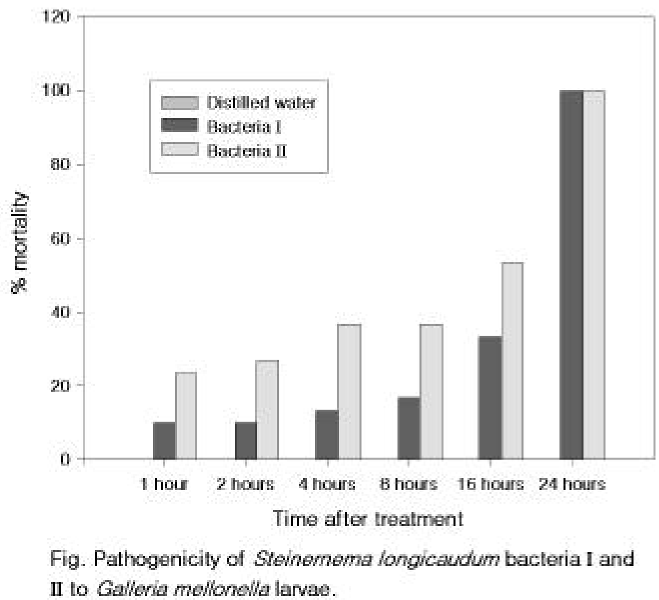


Fig. 3. Pathogenicity of *Steinernema longicaudum* bacteria I and II to *Galleria mellanella* larvae

그리고 병원성이 발현되는 시기도 매우 빨랐으며 이것으로 보아 본 선충의 병원성이 대단히 우수하다고 할 수 있으며, 치사된 꿀벌부채명나방 유충으로부터 같은 Bacteria**를 재분리됨으로서 이를 뒷받침 해 주었다.**

Table 9. **꿀벌부채명나방 유충과 인공배지**(YS broth)**에서 증식된** *S. longicaudum***의 병원성 비교**

Con. (Ijs/larva)	Propagation time					
	2 weeks		3 weeks		4 weeks	
	G mellonella	*P. brassicae*	*G mellonella*	*P. brassicae*	*G mellonella*	*P. brassicae*
0	0	0	0	-	0	-
5	100	100	100	-	100	-
10	100	100	100	-	100	-
20	100	100	100	-	100	-
40	100	100	100	-	100	-
80	100	100	100	-	100	-
160	100	100	100	-	100	-

꿀벌부채명나방 유충과 인공배지(YS broth)**에서 증식된** *S. longicaudum***을 꿀벌부채명나방 유충과 무잎벌레에 접종하여 병원성을 비교한 결과 증식시기에 관계없이 병원성이** 100% **유지되는 것을 볼 수 있었으며 이것으로 보아 적합한 배지에서 증식된 선충은 활력과 병원성이 매우 뛰어날 뿐 아니라 지속적으로 유지되는 것을 알 수 있었다**(Table 9).

인 용 문 헌

Blackshaw, R. P and C. R. Newell. (1987) Studies on temperature limitations to *Heterorhabditis heliothidis* activity. Nematologica 33:180-185.

Choo, H. Y., H. K. Kaya and S. P. Stock. (1995) Isolation of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from Korea. Japanese Journal of Nematology 25(1):44-51.

Converse, V. and P. S. Grewal. (1998). Virulence of entomopathogenic nematodes to the Western masked chafer (Coleoptera:Scarabaeidae). J. Econ. Entomol. 91(2):428-432.

Dunphy, G. B and J. M. Webster. (1986) Temperature effects on the growth and virulence of *Steinernema feltiae* strains and *Heterorhabditis heliothidis*. Journal of Nematology 18(2):270-272.

Flanders, K. L., J. M. Miller and E. J. Shields. (1996) In vivo production of *Heterorhabditis bacteriophora* 'oswego' (Rhabditida: Heterorhabditidae), a potential biological control agent for soil-inhabiting insects in temperate regions. J. Econ. Entomol. 89(2):373-380.

Henneberry, T. J., L. F. Jech, R. A. Burke and J. E. Lindegren. (1996) Temperature effects on infection and mortality of *Pectinophora gossypiella* (Lepidoptera: Gelechiidae) larvae by two entomopathogenic nematode species. Environ. Entomol. 25(1):179-183.

Mason, J. M and W M Hominick. (1995) The effect of temperature on infection, development and reproduction of heterorhabditids. Journal of Helminthology 69:337-345.

Milstead, J. E. (1981) Influence of temperature and dosage on mortality of seventh instar larvae of *Galleria mellonella* (Insecta: Lepidoptera) caused by *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: Rhabditoidea) and its bacterial associated *Xenorhabdus luminescens*. Nematologica 27:167-171.

Molyneux, A. S. (1985) Survival of infective juveniles of *Heterorhabditis* spp., and *Steinernema* spp. (Nematoda: Rhabditida) at various temperatures and their subsequent infectivity for insects. Revue Nématol., 8(2):165-170.

Molyneux, A. S. (1986) *Heterorhabditis* spp. and *Steinernema* (=*Neoaplectana*) spp.: Temperature, and aspects of behavior and infectivity. Experimental Parasitology 62:169-180.

Ricci, M, I. Glazer, J. F. Campbell and R. Gaugler. (1996) Comparison of bioassays to measure virulence of different entomopathogenic nematodes. Biocontrol Science and Technology 6:235-245.

SAS Institute. (1996) "SAS 6.11 for Windows" SAS Institute, Cary, NC.

Stock, S. P., H. Y. Choo, and H. K. Kaya. (1997a) First record of Steinernema glaseri Steiner, 1929 (Nematoda: Steinernematidae) in Asia, with notes on intraspecific variation. Nematologica 43:1-5.

Stock, S. P., H. Y. Choo, and H. K. Kaya (1997b) An entomopathogenic nematode, *Steinernema monticolum* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae) from Korea with a key to other species. Nematologica 43: 15-29.

Stock, S. P., H. Y. Choo, J. Heng, D. Hunt, A. P. Reid, and X. Shen (1999) Redescription of *Steinernema longicaudum* Shen & Wang (Nematoda: Steinernematidae) with notes on its geographical distribution and phenotypic variation among allopatric populations. Journal of Heminthology (in print).

Stuart, R. J., M. A. Hatab and R. Gaugler. (1998) Sex ratio and the infection process in entomopathogenic nematodes: Are males the colonizing sex? Journal of Invertebrate Pathology 72: 288-295.

Woodring, J. L and H. K. Kaya. (1988) Steinernematid and Heterorhabditid nematodes: a handbook of techniques. Southern Coop. Series Bull. 331, 30pp.