

GOVP1200515861

최 중  
연구보고서

*Verticillium lecanii* CS-626 균주를 이용한  
온실가루이 방제제 개발

Development of pest control agent  
for greenhouse whitefly  
using *Verticillium lecanii* CS-626 strain

한국삼공주식회사

농 립 부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “*Verticillium lecanii* CS-626균주를 이용한 온실가루이 방제제 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2003년 7월 28일

주관연구기관명 : 한국삼공(주)

총괄연구책임자 : 정 창 국

연 구 원 : 신 관 섭

연 구 원 : 정 종 희

연 구 원 : 박 은 희

협동연구기관명 : 고려대학교

협동연구책임자 : 윤 철 식

연 구 원 : 박 현 수

연 구 원 : 심 희 준

협동연구기관명 : 농업과학기술원

협동연구책임자 : 김 홍 선

연 구 원 : 이 민 호

연 구 원 : 조 점 래

연 구 원 : 김 정 준

# 요 약 문

## I. 제 목

*Verticillium lecanii* CS-626균주를 이용한 온실가루이 방제제 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

곤충병원성 곰팡이를 이용한 해충방제는 환경친화적인 방제수단으로 외국에서는 이미 일부 병해충에 대한 제품이 개발되어 시판중이다. 본 연구에서는 토마토의 주요 해충인 온실가루이를 효과적으로 방제할 수 있는, 곤충병원성 곰팡이 *Verticillium lecanii* CS-626 국내 토착균주를 이용하여 미생물살충제를 개발하고 실용화를 위한 연구를 수행하고자 하였다. 이를 위해서는 상기 균주의 포자를 대량생산하고 제제화하는 기술의 확립이 필요하였고 개발된 제제에 대한 포장에서의 방제효과 검정 및 효율적인 이용법의 개발이 요구되었다. 이와 더불어 살균제 저항성 유전자를 도입한 형질전환 균주를 개발하여 방제효율 및 이용 가능성을 최대화시키고자 하였다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

온실가루이에 대하여 고독의 살충력을 나타내는 *Verticillium lecanii* CS-626 균주를 이용하여 미생물살충제를 개발하고자, 주관기관인 한국삼공(주)에서는 포자의 대량 배양 조건을 탐색하여 최적배양조건을 구명하고 이를 통하여 생산된 포자를 건조와 고온 및 자외선 등에 잘 견딜 수 있도록 제형화하는 연구를 수행하였다. 이와 더불어

협동과제로 고려대학교 공학기술연구소에서는 생명공학기술을 이용하여 베노밀 살균제에 대한 저항성 유전자를 형질도입시킨 균주를 선발하여 제품 개발에 응용하고자 하였다. 또한 농업과학기술원 농업해충과에서는 상기 균주의 원제 및 제제의 살충력을 포장에서 검정하고, 이용 효율을 제고시키기 위하여 살충력과 관련된 생물적·환경적 요인을 구명하고 이를 바탕으로 효과적인 약제 처리 방법을 제시하였다.

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

*V. lecanii* CS-626 균주의 대량배양의 조건확립 결과는 경제적 배지를 이용하고 생산기술을 단순화 함으로써 생물농약의 개발에 종사하는 연구자들에게 많이 활용될 것으로 보이며 본 균주를 이용한 생물농약개발에 결정적인 정보를 제공할 것이다.

*V. lecanii* CS-626 균사체로부터 protoplast 제조기술을 확립하기 위하여 분해효소 선정과 적정농도 구명, 삼투압 안정제 선정 및 반응처리 시간을 구명하여 가장 적합한 조건을 조사한 결과, 20시간 배양한 0.1~0.2 g의 균사체를 10 mg/ml의 driselase 효소와 0.6 M KCl을 혼합하여 3시간 반응하는 것이 가장 효율적인 protoplast 제조 조건임을 알 수 있었다. 또한 이러한 방법으로 만들어진 protoplast의 재생 실험에서는 베노밀 저항성 유전자가 도입되어 형질전환된 protoplast를 선발하기 위해 기준이 되는 베노밀 농도가 4 ppm 이라는 것을 알 수 있었다.

CS-626 균주를 베노밀 계통의 살균제에 대한 내성 및 병원성이 향상된 균주로 개량하기 위하여 *V. lecanii*의 genomic library를 제작한 후 southern blotting 방법으로 Pr1의 promotor로 추정되는 DNA 단편을 분리하여 염기서열을 조사하는 방법으로 promotor 부분과 개시 코돈을 확인하였다. 또한 베노밀 계통 살균제에 대해 내성을 보이는 유전자인  $\beta$ -tubulin이 삽입되어있는 형질 전환용 vector pBRG-4의 뒷부분에 Pr1의 promotor와 ORF를 삽입하여 완전한 Pr1 유전자를 함유하는 새로운 형질전환용 vector를 제작하였고 CS-626 protoplast에 삽입한 후 선택배지에서 총 85개의 형질전환균주를 선발할 수 있었으며, 그 중에서 고농도의 베노밀을 포함하는 배

지에서도 활성을 유지하는 7개의 균주를 선발할 수 있었다. vector가 CS-626균주의 genomic DNA 내부에 삽입되어있다는 것을 최종 증명하기 위하여 형질전환균주를 vector 특이서열의 primer를 이용하여 PCR 증폭을 한 결과 형질전환전의 CS-626균주의 DNA에서는 vector 자체에서와 같은 크기의 단편이 확인되지 않았으나 형질전환 균주에서는 vector와 같은 크기의 단편이 증폭된 것을 확인할 수 있었다.

아울러 CS-626균주와 형질전환균주를 비교해 보았을 때 발아율에 있어, 형질전환균주는 고농도의 베노밀배지에서도 91.75%의 높은 발아율을 보였으며 성장률 역시 형질전환하지 않은 CS-626균주가 잘 자라지 못하는 고농도의 베노밀배지에서도 잘 자랐다. 이러한 차이는 형질전환균주에 들어있는 벡터의 베노밀 저항성 유전자에서 기인한다고 생각되어진다. 또한 이들 균주의 성장속도는 성장속도가 빠를수록 해충의 살상 속도를 높일 수 있기 때문에 곱팡이의 병원성을 결정하는 한 요인으로 생각할 수 있다.

수원 및 충남 부여에서 5회에 걸쳐 수행한 CS-626균주의 원제 및 제제의 포장검정 결과, 원제와 제제 모두 온실가루이에 대해 고독(70~92%)의 살충력을 나타내었으며, 특히 최종 개발된 제제는 약해나 심한 약흔을 보이지 않았다. 1주 간격으로 2회 분무처리시 약 3주간의 방제효과가 지속되었다. CS-626균주의 살충력에 영향을 미치는 생물적 요인으로 포장 및 토마토 주내의 온실가루이 성충 밀도, 토마토 소엽에 존재하는 약충 밀도 등을 조사하였으며 환경적 요인으로 포장 내의 온·습도 조건을 측정하여 살충력과의 관련성을 분석하였다. 본 연구에서 토마토 주내에서 온실가루이 증태별 수직분포양상과 상위엽 부근에서 성충의 집중분포로 인하여 CS-626균주의 방제효과가 토마토 주내 층위에 따라 상이하게 나타났다. 또한, 토마토 소엽에서 온실가루이 약충은 밀도가 증가함에 따라 공간분포 양상이 규칙적 분포(regular pattern)에서 집중분포(contagious pattern)으로 변화하는 것으로 확인되었다. 이처럼 소엽내 약충의 밀도 증가에 따라 층간의 평균 거리가 가까워져서, CS-626에 감염된 약충에서 형성된 2차 포자의 감염성이 높아짐에 따라 Log phase에서 살충력이 급격히 증가하였다. 이와 같은 결과는 온실가루이에 대한 미생물농약이나 천적곤충 등 생물적 방제제의 방제 효과를 보다 정확히 검정·평가하거나, 효율적인 처리 및 방제 방법을 개발하는데 중요한 자료로 활용될 수 있을 것으로 기대된다. 포장의 온·습도 조건은

재배기간 중에 크게 변동하였으나 제제의 살충력에는 크게 영향을 미치지 않았다. 상기의 다양한 포장검정 및 생물검정 실험을 통하여 토마토 주산지인 부여지역에서 봄작기 동안 온실가루이 방제를 위한 분무처리 시기 및 처리량을 제안하였다. 특히, 시제품 개발과 관련하여 안정적인 방제 효과를 나타내기 위해서는 분무처리 추천농도로  $1 \times 10^8$  CFU/ml 이상이 되어야 함을 확인하였다. 특히, 본 연구를 통하여 수행된 온실가루이에 대한 미생물농약의 약효 검정을 위한 조사방법 및 표본추출법에 대한 기초자료는 관련 연구자에게 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

## SUMMARY

Biological control using the entomopathogenic fungi is the environmental-friendly pest control method and microbial control products have been developed already in advanced countries. In this study, the *Verticillium lecanii* CS-626 strain, selected for the biological control of greenhouse whitefly, was developed and tested as a microbial pest control product. The CS-626 strain was mass-cultured, formulated, and the effective use of the strain was tested in the tomato field. Also a genetically transformed strain, resistant to benomyl fungicide, was developed as an effective pest control agent for the integrated pest management.

### 1. Mass production and formulation of the CS-626 strain

For mass production of the CS-626 strain, various nutrients and fermenting conditions were studied.

As a results, the optimal condition were as follows:

high fructose 4.68%, soybean sauce cake 1.63%, culture temperature 20°C, and pH 5.5.

And for formulation of the CS-626 strain, several surfactants and carriers were studied.

As a results, the physical properties of testing product were desirable for spraying.

### 2. Development of benomyl resistant transformant of the CS-626 strain

This experiments were designed to improve benomyl resistance and pathogenicity in *V. lecanii* by gene transformation system.

A standard procedure of protoplasts isolation was established using commercial lytic enzyme. Maximum protoplast yield was obtained when 0.1~0.2

g of 20 hrs-grown mycelia was incubated in a mixture of lytic enzyme, 10 mg dreselase/ml and an osmotic stabilizer, 0.6 M KCl at 30°C for 3 hrs.

The plasmid pBRG-4 contains a 3.4 kb  $\beta$ -tubulin gene originated from *Aspergillus flavus* which is resistant to benomyl. Approximately 1  $\mu$ g of modified pBRG-4 was introduced into the protoplasts by treatment with PEG (Polyethylene Glycol). Transformation experiments were carried out three times and 85 transformants were obtained.

Integration of the transforming DNA into the genomic DNA was confirmed by PCR amplification and Southern hybridization. The primers used in PCR amplification were designed on the basis of specific nucleotide sequence of the altered  $\beta$ -tubulin. PCR fragment, specifically amplified from genomic DNA of the each of seven transformants, was not amplified from that of wild type. For Southern blotting, a PCR fragment amplified from the plasmid was used as a probe. Hybridization signal appeared on blots of transformants but not on that of wild type. These results indicated that *A. flavus*  $\beta$ -tubulin was successfully integrated into the *V. lecanii* CS-626 genome, and consequently the CS-626 should be transformed into the benomyl-resistant strain.

Finally, characters of these transformants, including germination rate and growth rate, were compared with those of wild type. All transformants showed up to 90% germination rate. The T14 and T65 exhibited the highest growth rate on PDA medium containing 50  $\mu$ g benomyl/ml. The T41 revealed the highest growth rate on PDA medium lacking benomyl.

### 3. Test of control efficacy and use of the CS-626 strain

For the test of control efficacy by the CS-626 strain, we carried out total five greenhouse field trials using the MPCA (Microbial Pest Control Agent) or the MPCP (Microbial Pest Control Product) of the strain in Suwon and Buyeo. As a result, mortality of whitefly scales was high (70~ 92%) in both of the MPCA and the MPCP. Also, phytotoxicity was not shown in the final MPCP. When the



application of the strain was repeated one week after first application, the control efficacy was durable in 3 weeks.

Densities of whitefly adults in plot and tomato plant, and of scales in a leaflet of tomato were examined as biological factors related to the mortality by the strain. Temperature and relative humidity were also investigated and analyzed in the greenhouse as abiotic factor. Different density of whitefly in higher and lower leaf shelves in a tomato plant caused the different control efficacy in each leaf shelves. Spatial distribution of whitefly scales in a leaflet was changed from regular pattern to contagious pattern in relation to the increase of density of scales. Increasing of the density of scales in a leaflet caused the decreasing of the distance to the nearest scale, and the decreased distance between the scales might be a factor of infection by the second conidia during the log phase of the mortality test. Temperature and relative humidity were fluctuated severely in the greenhouse fields. However, the environmental factors were not restrictive to the high mortality by the MPCP.

In consequence of the field trials and bio-assays, we proposed the effective application method in the spring cropping season of Buyeo, the chief producing district of tomato in Korea.

# CONTENTS

## Chapter 1. Outline of the Research

### Section 1. Introduction

1. Characteristics of greenhouse whitefly and its damage
2. Biological characteristics of *Verticillium lecanii*

### Section 2. Purpose

### Section 3. Need

### Section 4. Scope

1. Mass production and formulation of the CS-626 strain
2. Development of benomyl resistant transformant of the CS-626 strain
3. Test for control efficacy and use of the CS-626 strain

## Chapter 2. Research Trends

### Section 1. Overseas trends

### Section 2. Domestic trends

## Chapter 3. Research Details and Results

### Section 1. Materials and methods

1. Mass production and formulation of the CS-626 strain

2. Development of benomyl resistant transformant of the CS-626 strain

#### 2.1.1. Establishment of appropriate protoplast formation of *Verticillium lecanii*

- 1) Fungal culture
- 2) Selection of optimum lytic enzymes
- 3) Determination of the optimum driselase concentration

- 4) Selection of appropriate osmotic stabilizer
- 5) Determination of enzymatic incubation time
- 6) Examination of regeneration rate of protoplast
- 2.1.2. Transformation of the CS-626 strain
  - 1) Manufacture of genomic library
  - 2) Confirmation of promoter
  - 3) Manufacture of shuttle vector
  - 4) Transformation of the CS-626 strain
- 2.1.3. Examination of characters of transformants
  - 1) Germination rate
  - 2) Growth rate
3. Test for control efficacy and use of the CS-626 strain
  - 3.1.1. Field test of MPCA of the CS-626
  - 3.1.2. Control efficacy and phytotoxicity by the MPCP of the CS-626
  - 3.1.3. Biological factors related to the mortality by the CS-626
    - 1) Density of whitefly adults in a tomato plant or a plot
    - 2) Spatial distribution pattern and density of scales in a tomato leaflet
  - 3.1.4. Environmental factors related to the mortality by the CS-626
  - 3.1.5. Effective use of the MPCP

## Section 2. Research Results

1. Mass production and formulation of the CS-626 strain
2. Development of benomyl resistant transformant of the CS-626 strain
  - 3.2.1. Establishment of appropriate protoplast formation of *Verticillium lecanii*
    - 1) Fungal culture
    - 2) Selection of optimum lytic enzymes
    - 3) Determination of the optimum driselase concentration
    - 4) Selection of appropriate osmotic stabilizer

- 5) Determination of enzymatic incubation time
- 6) Examination of regeneration rate of protoplast
- 3.2.2. Transformation of the CS-626 strain
  - 1) Manufacture of genomic library
  - 2) Confirmation of promotor
  - 3) Manufacture of shuttle vector
  - 4) Transformation of the CS-626 strain
- 3.2.3. Examination of characters of transformants
  - 1) Germination rate
  - 2) Growth rate
3. Test for control efficacy and use of the CS-626 strain
  - 3.3.1. Field test of MPCA of the CS-626
  - 3.3.2. Control efficacy and phytotoxicity by the MPCP of the CS-626
  - 3.3.3. Biological factors related to the mortality by the CS-626
    - 1) Density of whitefly adults in a tomato plant or a plot
    - 2) Spatial distribution pattern and density of scales in a tomato leaflet
  - 3.3.4. Environmental factors related to the mortality by the CS-626
  - 3.3.5. Effective use of the MPCP

#### Chapter 4. Achievement and Contribution

##### Section 1. Achievement of the object

1. Mass production and formulation of the CS-626 strain
2. Development of benomyl resistant transformant of the CS-626 strain
3. Test for control efficacy and use of the CS-626 strain

##### Section 2. Contribution to technological development of relative fields

#### Chapter 5. Plan to Applicate Research Results

1. Mass production and formulation of the CS-626 strain
2. Development of benomyl resistant transformant of the CS-626 strain

3. Test for control efficacy and use of the CS-626 strain

5.3.1. Journal publication

5.3.2. International symposium

5.3.3. Annual meeting

5.3.4. Public information

Chapter 6. Information Collected from Overseas

Chapter 7. References

# 목 차

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

### 1절 서론

1. 온실가루이의 특성 및 피해 상황
2. *Verticillium lecanii*의 생물적 특성

### 2절 연구개발의 목적

### 3절 필요성

### 4절 연구 범위

1. CS-626균주의 대량생산 및 제제화 연구
2. CS-626균주의 병원성 형질전환 균주 개발
3. CS-626 균주를 이용한 곰팡이 살충제의 효능검증 및 이용 방법 연구

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 1절 국외 현황

### 2절 국내 현황

## 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

### 1절 연구 방법

1. CS-626균주의 대량생산 및 제제화 연구
2. CS-626균주의 병원성 형질전환 균주 개발

#### 가. *Verticillium lecanii*에 적합한 Protoplast 제조기술 확립

- 1) 균사체 배양
- 2) 효소 선정
- 3) Driselase 적정농도 구명
- 4) 삼투압 안정제 선정
- 5) 효소 반응 처리 시간 구명
- 6) 베노밀 농도에 따른 protoplast 재생(regeneration)

나. 병원성유전자 도입을 통한 형질전환

- 1) *Verticillium lecanii*의 genomic library 제작 및 promotor 분리
- 2) Promotor 염기서열 조사
- 3) Shuttle vector 제작
- 4) CS-626균주의 형질전환

다. 형질전환 균주의 특성조사

- 1) 발아율
- 2) 성장속도

3. CS-626 균주를 이용한 곰팡이 살충제의 효능검증 및 이용 방법 연구

가. CS-626 원제의 살충력 포장 검정

나. CS-626 제제(수화제)의 분무처리 특성 및 살충력 포장 검정

다. CS-626 균주의 살충력에 영향을 미치는 생물적 요인

- 1) 포장 및 토마토 주내에서 온실가루이 성충의 분포 양상
- 2) 토마토 소엽내에서 온실가루이 약충 밀도 및 공간분포 양상

라. CS-626 균주의 살충력에 영향을 미치는 환경적 요인

마. CS-626 제제의 효율적 이용 방법 제안

## 2절 연구 내용 및 결과

1. CS-626균주의 대량생산 및 제제화 연구

2. CS-626균주의 병원성 형질전환 균주 개발

가. *Verticillium lecanii*에 적합한 Protoplast 제조기술 확립

- 1) 균사체 배양
- 2) 효소 선정
- 3) Driselase 적정농도 구명
- 4) 삼투압 안정제 선정
- 5) 효소 반응 처리 시간 구명
- 6) 베노밀 농도에 따른 protoplast 재생(regeneration)

나. 병원성유전자 도입을 통한 형질전환

- 1) *Verticillium lecanii*의 genomic library 제작 및 promotor 분리
  - 2) Promotor 염기서열 조사
  - 3) Shuttle vector 제작
  - 4) CS-626균주의 형질전환
- 다. 형질전환 균주의 특성조사
- 1) 발아율
  - 2) 성장속도
3. CS-626 균주를 이용한 곰팡이 살충제의 효능검증 및 이용 방법 연구
- 가. CS-626 원제의 살충력 포장 검정
- 나. CS-626 제제(수화제)의 분무처리 특성 및 살충력 포장 검정
- 다. CS-626 균주의 살충력에 영향을 미치는 생물적 요인
- 1) 포장 및 토마토 주내에서 온실가루이 성충의 분포 양상
  - 2) 토마토 소엽내에서 온실가루이 약충 밀도 및 공간분포 양상
- 라. CS-626 균주의 살충력에 영향을 미치는 환경적 요인
- 마. CS-626 제제의 효율적 이용 방법 제안

#### 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

##### 1절 연구개발 목표의 달성도

1. CS-626균주의 대량생산 및 제제화 연구
2. CS-626균주의 병원성 형질전환 균주 개발
3. CS-626 균주를 이용한 곰팡이 살충제의 효능검증 및 이용 방법 연구

##### 2절 관련분야 기술발전예의 기여도

#### 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. CS-626균주의 대량생산 및 제제화 연구
  2. CS-626균주의 병원성 형질전환 균주 개발
  3. CS-626 균주를 이용한 곰팡이 살충제의 효능검증 및 이용 방법 연구
- 가. 학술지 게재
- 나. 국제 심포지움 발표



다. 국내 학술회의 발표

라. 신문 및 잡지 기사 게재

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 참고문헌

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 1절 서론

### 1. 온실가루이의 특성 및 피해 상황

온실가루이(Greenhouse whitefly; *Trialeurodes vaporariorum* Westwood)는 1977년 사우디아라비아나 일본을 통하여 유입된 것으로 추정되는 난대성 해충으로 분류학적으로 매미목 가루이과에 속하며, 현재는 전국적으로 분포하여 여름철에는 야외에서도 발생하고 있다(Choi *et al.* 1991; 한 1999). 특히 시설재배 토마토나 오이에서 큰 문제를 일으키는 주요해충으로 야외에서 월동은 못하지만 최근 비닐하우스나 온실 등 시설재배면적이 급격히 증가하여 충의 월동과 번식에 좋은 조건을 제공하고 있을 뿐만 아니라, 기주범위가 넓고 시설내에서 발생세대수가 많아서 급격히 피해밀도를 형성하고 살충제에 대한 내성도 쉽게 획득하여 관리가 어려운 해충이다(김 등 1999; 박 1999). 또한, 온도가 따뜻해지는 3, 4월부터 왕성한 번식을 시작하여 5~6월이 되면 시설하우스에서 작업을 하는데 불편할 정도로 번성하여 농작업을 기피하는 원인이 되기도 한다(한 1999). 온실가루이는 알, 1령충~4령충(유충), 번데기와 성충 등의 단계를 거치며, 18~30℃의 온도조건에서 발육기간이 알 7.8일, 1~4령충이 각각 5.0, 4.6, 4.4, 6.7일로 난부터 유충까지는 총 22.2일이 소요된다(박 1999). 온실가루이의 기주식물은 우리나라에서 27과 39종이 조사되었으며 국내 침입 초기에는 란타나, 포인세티아 등 관엽 및 관상식물에 피해가 많았으나 최근에는 토마토 등의 가지과 작물과 오이, 멜론, 호박 등 박과작물, 거베라와 같은 화훼류의 시설재배에서 피해가 심하다(박 1999). 온실가루이는 토마토, 오이 등의 작물의 잎 뒷면에 발생하여 1령을 제외한 약충 시기와 번데기 동안 한곳에 정주하고, 엽육조직을 흡즙하여 감로(honeydew)를 분비하므로 식물 잎과 과실에 그을음병을 유발하고 식물병원성 바이러스를 매개함으로써 2차적인 피해를 입힌다(Brown, 1990). 성충은 토마토 주간 및 주내 집중분포하며, 특히 신성충은 상위엽으로 이동하여 집중 분포한다고 보고되었다(김 등 1999).

토마토나 오이는 생식용으로 많이 이용되기 때문에 화학농약의 사용만으로 번식력이 강한 온실가루이를 방제하는데 어려움이 있고, 최근에는 일본 등지로 토마토를 수출하는 과정에서 화학농약 잔류 등의 문제가 발생할 수 있어서 농가에서도 화학농약의 사용을 최소화하려고 노력하는 상황이므로 천적곤충인 온실가루이좀벌(*Encarsia*

*formosa*)을 이용한 생물적 방제 연구가 최근 국내에서도 많이 수행되고 있다(한 1999; 박 등 1998). 현재 온실가루이좀벌은 세계 20여개 국가에서 4천 헥타 이상의 시설재배에서 이용되고 있으며, 유럽의 시설재배 농민은 천적을 이용한 방제방법이 화학농약보다 훨씬 더 효과적인 방제수단으로 생각하고 있다(Lenteren 1989). 온실가루이좀벌은 성충시기를 제외하고 알부터 유충과 번데기 기간을 모두 온실가루이의 약충이나 번데기의 체내에서 기생 생활을 한다. 온실가루이 방제를 위한 생물적 방제수단으로 온실가루이좀벌이 모든 경우에 가장 효과적인 수단은 아니다. 온실가루이 밀도가 높거나 오이와 같이 잎에 털이 많은 작물의 경우에는 온실가루이좀벌의 행동이 방해를 받아 방제효율이 떨어진다(Fransen *et al.* 1987). 또한 낮은 온도와 일장이 짧을 때 온실가루이좀벌의 활동력이 떨어진다. 18℃ 이상에서만 온실가루이좀벌이 날 수 있으며 그 이하의 온도에서는 날지 못하고 걷기만 하기 때문에 이동에 시간이 더 걸리게 되어 기생률이 현저히 낮아지게 된다(한 1999).

이와 같은 온실가루이좀벌의 단점과 화학농약 위주의 방제에서 나타나는 문제점에 대한 대안으로써, 우리나라 온실 환경에 잘 적응하고 온실가루이에 대해 고독의 살충력을 갖고 있는 국내 토착 *Verticillium lecanii* 균주를 수집·선발하여 CS-626균주를 확보하고(이 등 2000; Lee *et al.* 2002), 이를 이용하여 온실가루이 방제용 미생물농약으로 개발하고자 본 연구를 수행하였다.

## 2. *Verticillium lecanii*의 생물적 특성

곤충병원성 곰팡이 *Verticillium lecanii*는 1861년 Nieter에 의해 철모각지벌레(*Saissetia coffeae*)의 병원성 곰팡이로 처음 보고되었고(Rombach and Gillespie 1988), 그 후 Zimmermann이 다시 1898년 인도네시아에서 각지벌레의 일종인 *Coccus viridis* (Green)의 병원성 곰팡이로 보고하였다(Hall 1976). *V. lecanii*는 *Cephalosporium lecanii*, *C. aphidicola* 등의 이름으로 불리다가(Samson and Rombach 1985), 분생포자형성세포(conidiogenous cell)의 배열 형태 때문에 Gams(1971)에 의해 분류학상 *Verticillium* 속으로 분류가 되었다. *Verticillium*속은 분생자병이 영양균사체와 구분되지 않고, 분생포자형성세포가 나선형으로 균사상에 부착되어있으며 분생포자형성세포의 옆이나 끝에 2개에서 6개의 분생포자를 형성한다. 분생포자는 무색으로 단세포이며 끈끈한 점액으로 둘러싸여져 있는 형태적 특징을 갖고 있다(Humber 1997). 우리

나라에서는 윤생결가지포자균으로 명명된 바 있다(성 1996). *V. lecanii*는 균주간에 형태적으로나 생화학적인 성질에서 변이가 다양한 중복합체(species complex)로 알려져 있다. 이것의 포자는 균주에 따라 짧은 구형에서부터 타원형과 원통형에 이르기까지 형태 및 크기가 다양하다.

*V. lecanii*는 처음에 진딧물, 가루이 및 깍지벌레와 같은 매미목의 병원성 곰팡이로 알려졌으나 그 후 거의 모든 곤충 중에 발병하는 것으로 확인되었다. 이와 더불어 *V. lecanii*는 곤충이외에 거미류 등의 절지동물에 대한 병원성 곰팡이로도 보고되었고(Kanagaratnam *et al.* 1981) 식물병원성 곰팡이인 녹병균(*Uromyces dianthi*, *U. appendiculatus*, *Puccinia graminis*)과 흰가루병균의 중복기생균으로도 보고되었다(Hall 1981; Deacon 1983). 그러나 포유동물에는 감염을 일으키지 않으며 강한 알레르기 반응을 유발하지도 않는 것으로 알려졌다(Hall 1981).

*V. lecanii*의 포자발아, 균사체 성장 및 충체 속으로 침입하기 위해서는 여러 가지 환경조건이 필요하다. 특히 Hall(1981)은 포자발아를 위해서 최소한 10~12시간의 높은 습도조건이 필요하다고 보고하였는데, 실제로 고습조건이 필요한 시간은 *V. lecanii* 균주에 따라 다양하다. 상대습도에 비해서 온도에 의한 영향은 다소 적은 편이다. 15~30°C 범위에서 포자발아와 균사체 성장이 정상적으로 일어나며 23~25°C 범위에서 균총(colony)의 성장이 가장 빠르다고 보고되었다(Osborne and Landa 1992). 다른 연구자의 경우에는 11°C 이하에서 균사체 성장이 멈추고 32°C 이상에서 포자발아가 정지한다는 보고가 있었으나(Hall 1981; Gillespie 1984; Franssen 1987), 본 연구진에 의해 수집된 국내 토착균주의 경우에 35°C에서 포자 발아속도는 다소 감소되었으나 발아 자체는 정상이었으며, 그중 CS-626균주가 고온에 대해 가장 적응이 뛰어났다(Lee *et al.* 2002). 온·습도 외에 빛에 의해서도 곰팡이 생장이 영향받을 수 있는데, *V. lecanii*의 균총에 형광등을 조사한 결과 포자생산이 유의적으로 증가했다고 보고된 바 있다(Gillespie 1984).

*V. lecanii*는 온실가루이의 모든 태에 발병한다. 충체에 포자가 전달되는 경로와 기작은 상세히 밝혀지지는 않았지만, 일반적인 곰팡이 포자의 전달과 비슷하게 공기나 물의 흐름 또는 다른 곤충이나 응애 등에 의해 전파되며 이병충 주변에 뺨친 균사체로부터 생산된 포자가 2차 감염을 시키는 것으로 알려져 있다(이와 윤 1999). 기주 곤충 표피에 붙은 포자는 발아를 한 뒤 충체 외부에서 사물기생적(saprophytic)으로

성장하다가 기주 충체를 물리적 및 화학적 방법에 의해 침입하거나 충체 표면에 자연적으로 존재하는 구멍이나 체절 부위를 통해 침입하는 것으로 추측하고 있다(Osborne and Landa 1992). 본 연구진의 연구 결과로는 온실가루이 충체 표면에 접종된 CS-626균주는 25℃, 75% 이상의 상대습도 조건에서 6시간 이내에 이미 포자발아를 시작하고 54시간 이후부터 부착기(appressorium)를 형성하여 충체 내로 침입하는 것이 관찰되었다(이 등 2000). *V. lecanii*의 일부 균사가 온실가루이 충체 속으로 침입하여 내생포자(blastospore)를 만들어 증식을 시작하고, 충체 내에서 발아된 내생포자는 균사를 형성하여 충체 밖으로 균사체를 뺏어내며 이로 부터 2차 포자를 만들고 전형적인 이병충의 모양이 된다.

## 2절 연구개발의 목적

토마토 주산단지의 시설하우스 내에서 CS-626균주의 원제(MPCA: Microbial Pest Control Agent) 및 제제(MPCP: Microbial Pest Control Product)의 분무처리에 따른 온실가루이 살충력을 검정하고, 포장검정 시험을 통하여 얻어진 환경조건 및 방제 효과와 관련된 생물적 요인을 구명, 제제의 효율적인 이용 방법을 개발하고자 하였다. 이와 더불어, 향후 온실가루이에 대한 미생물농약을 개발하는 데 필요한 약효검정 방법을 확립하고 기준이 될 수 있도록 해충 밀도 조사법, 살충률 조사법, 분무처리법 등에 대하여 다양한 조사를 수행하고자 하였다.

## 3절 필요성

온실가루이 약충과 번데기는 작물의 잎 뒷면에 존재하며 왁스를 내어 외부를 보호하므로, 화학적 방제가 매우 어려운 해충이다(Byrne *et al.* 1986). 그러므로 온실가루이 방제를 위하여 발생예찰 및 발생밀도의 정확한 추정기술이 매우 중요하며(김 등 1999), 화학적 방제 이외에도 황생점착트랩, 천적곤충인 온실가루이좀벌(*Encarsia formosa*) 등을 이용한 방제기술(Ekbom 1980; Gillespie and Quiring 1987; 김 등 1999) 및 *V. lecanii* 등 미생물을 이용한 생물적 방제법의 연구(Hall 1982; Lee *et al.* 2002)가 활발히 진행되어오고 있다. 외국에서는 이미 *V. lecanii*를 이용하여 온실가루이

이 방제용으로 Mycotal, Vertalec 등의 제품이 개발되어 사용되고 있다. 유럽이나 일본 등의 친환경농업을 수행하는 많은 농민들에게 이들 제품들이 이미 많이 사용되고 있는 상황이라, 국내에서도 이들 국외 제품이 수입되어 미생물농약 등록을 완료하게 되면 많은 농가에서 사용할 것으로 예상된다. 그러나 국내 토착균주인 CS-626과 비교하여 볼 때 이들 제품에 사용된 균주는 온도차가 심하고 고온상태가 오래 지속되는 우리나라 온실 환경에서 적응력이 다소 떨어지는 것으로 나타났다(Lee *et al.* 2002). 그러므로 CS-626과 같은 국내 토착균주를 제품으로 개발하여 우리나라 시설재배지에서 사용하면 외국의 미생물농약 제품보다 안정적이고 높은 방제 효과를 기대할 수 있을 것이다.

예비실험에서 외국 회사제품(Mycotal) 균주보다 우수한 발아율, 병원성, 고온에 대한 내성이 입증된 국내 토착균주인 *V. lecanii* CS-626균주를 이용하여 온실가루이 방제용 곰팡이살충제를 실용화하기 위해서는 병원성이 향상된 균주로의 개량이 필요하다. 왜냐하면 *V. lecanii* CS-626균주의 살충력이 포장에서는 실내실험에서보다 저조하기 때문에 실제 농가에서의 실용화를 위해서는 유전공학적인 방법 등에 의하여 살충력이 증가한 균주 개량이 시급하다. 또한 본 CS-626 균주의 도용을 방지하여 산업체가 안정적인 생산을 하기 위해서는 다른 균주와 차별할 수 있는 유전자 지표의 도입이 필수적이다. 제 농가에서 배노밀계통의 살균제와 병행처리가 가능하리라 판단된다.

미생물농약을 개발, 실용화하기 위해서는 미생물농약 등록절차에 따른 적합한 실험 방법에 의거하여 특정 해충에 대한 살충력을 검정함으로써 해당 균주 및 제제가 농업적으로 이용 가능함을 입증해야 하며, 단순한 환경조건의 실험실 안에서 수행한 생물검정만으로는 포장에서 유효한 방제효과를 단정할 수 없으므로 포장조건에서 방제효과를 검정할 필요가 있다(농촌진흥청 1997, 2000). 이에 따라 본 연구에서는 토마토 주산지인 충남 부여를 위주로 일반적인 토마토 작기 동안의 시설하우스 내의 온·습도 조건, 토마토 품종 등을 고려하여 CS-626균주의 원제(MPCA) 및 제제(MPCP)의 온실가루이(*Trialeurodes vaporariorum*)에 대한 방제효과를 검정하고자 하였다.

이와 더불어 포장에서 발생한 데이터를 종합적으로 분석하여 살충력에 영향을 미치는 다양한 요인을 조사하고 이를 바탕으로 처리시기, 처리량 등을 결정함으로써 효율적인 이용방법을 제시하고자 하였다. CS-626균주는 온실가루이에 대하여 약충과 성

층에 모두 살충력을 보이지만, 이동성이 거의 없는 약충기에 살충 효과가 크다. 이와 같이 온실가루이의 생물적 특성을 고려하여 살충력을 최대로 발휘할 수 있는 적절한 시기 및 처리 방법 등을 제시하여 농가에서 본 개발 미생물농약을 효율적이고 안전하게 사용할 수 있도록 지침을 제공할 필요가 있다.

#### 4절 연구 범위

본 연구는 효율적인 연구 수행을 위하여 3개의 세부 및 협동과제로 구성되어 있다. 주관기관인 한국삼공(주)에서는 1개의 세부과제로 CS-626균주의 대량배양 조건과 기술을 확립하고, 포자의 활력 및 생물적 특성에 안정적이면서 작물에 약해가 없도록 제제화하는 것이고, 제1 협동과제는 병해충 종합적 관리 차원에서 살균제를 처리하였을 때 저항성을 나타낼 수 있도록 원 균주를 형질 전환하고자 하며, 제2 협동과제는 CS-626균주의 원제 및 제제의 살충력을 검정하고 효율적인 이용 방법을 개발하는 것이 주요 내용이다.

단계별 연구범위는 다음과 같다.

구 분	주요개발내용 및 범위
1단계(기초연구)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ CS-626균주의 시설하우스 내 살충력 검정</li> <li>○ 균주의 대량배양을 위한 배지 및 배양법 확립</li> <li>○ 제제화를 위한 보조제 선발</li> <li>○ <i>V. lecanii</i>에 적합한 protoplast 제조 기술 확립</li> </ul>
2단계(응용연구 및 시제품제작)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 포자 대량생산 및 제제화 기술 확립</li> <li>○ 병원성 유전자 도입 형질전환 균주 개발</li> <li>○ 제제화된 균주의 방제효과 조사</li> </ul>
3단계(시제품완성)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 병원성 증진 균주의 안정성 검정 및 시제품 완성</li> <li>○ 시제품의 시설하우스 내 방제효과 및 이용법</li> </ul>

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 1절 국외 기술개발 현황

곤충병원성 곰팡이를 이용하여 해충을 방제하려는 시도는 이미 오래전부터 시작되어 Metchnicoff는 1897년에 *Metarhizium anisopliae*를 이용하여 밀에 발생하는 풍뎅이, 사탕무우에서 바구미를 방제하려고 하였으며 일본에서도 大正말기에 송충나방에 대해 *Beauveria bassiana*의 사용이 검토되어 1933년에 방제를 시도하였다(농촌진흥청 1997). 그러나 현재까지 미생물농약으로 개발되어 시판되는 것은 많지 않다. 2000년 현재 시판중인, 곤충병원성 곰팡이를 이용한 미생물농약으로 전 세계 11개 회사에서 9종 18균주를 이용한 18제품이 있는 것으로 조사되었다. 이들 제품의 원 재료인 곰팡이 종은 대부분 *B. bassiana*, *M. anisopliae*, 그리고 *V. lecanii* 등 수종에 불과하다. 이는 유용한 곤충병원성 곰팡이 종의 수집과 분리·동정, 기주범위 확인 등의 기초 연구도 부족한 편인데다(농림부 1998), 미국을 비롯한 OECD 선진국에서도 미생물농약을 제품으로 개발하는데 필요한 제반 기술이 어렵고 약효 및 약해 검정 결과가 각국에서 정해놓은 일정 기준을 충족시켜야 하며 인축 및 생태계에 대한 안전성 등이 보장되어야 하기 때문이다(농촌진흥청 1997, 2000).

이와 더불어 아직까지 미생물농약의 효율적이고 적절한 이용 기술에 대한 연구는 매우 부족한 편이다. 특히 각각의 해충이나 병원균 종에 따른 정확한 약효의 검정 방법이 설정된 것이 아닌데다가(농촌진흥청 2000) 정량적인 측정 기술이 대단히 부족하여 미생물농약의 약효에 대한 기준이 나라마다 다르고 모호한 부분마저 있는 상황이다. 이는 미생물농약의 개발이나 사용을 더디게 하는 주요한 요인이 되고 있으므로 정확한 약효 검정 및 미생물농약 균주의 생태계에서의 기능, 비표적 생물에 대한 안전성 등을 보다 정량적으로 검정할 수 있는 기술의 심도있는 연구가 전 세계적으로 시급히 요청되고 있다(Thomas and Willis 1998). 이와 함께 Lacey 등(2001)은 미생물농약의 개발과 이용을 증진시키기 위해서는, 1) 원제 자체의 독성 및 살충력 증진, 2) 저온 및 건조 등 환경에 대한 적응력 개선, 3) 대량 생산 체계의 효율 증진, 4) 환경 저항력 및 생존력 증진을 위한 제형의 개선, 5) 기타 IPM 요소들과의 상호작용에 대한 이해 증진 및 복합처리 기술 개발, 6) 농민과 공공의 올바른 이해 증진 등이 선행되어야 한다고 제시하였다.



그럼에도 불구하고 지속적인 연구의 결과로 곤충병원성 곰팡이를 이용한 미생물 농약의 수는 급증할 것으로 예상되며 IPM의 일환으로 이용 기술의 발전도 기대되고 있다. 특히 영국을 비롯한 미생물농약 개발 선진국에서는 1980년대 초반부터 *V. lecanii*를 천적이거나 화학농약과 복합적으로 사용하려는 시도를 많이 해오고 있으며 그 결과도 성공적이었다(Ekbom 1979; Rombach and Gillespie 1988; Hoddle *et al.* 1998; Askary and Brodeur 1999). 그러나 이미 언급한 바와 같이 재배환경과 조건이 상이한 우리나라에서 외국의 특정한 농업환경에 적합하게 개발된 미생물농약의 제제나 이용 방법이 최적의 방제 효율을 나타낼 것으로 기대하기는 어렵다. 그러므로 우리나라 농업환경에 맞도록 미생물농약과 그 이용법을 개발하는 것이 중요하다.

## 2절 국내 기술개발 현황

최근 국내에서도 농업적으로 유용한 곤충, 미생물 및 병원성 천적 등을 이용하여 해충을 효과적으로 방제하는 생물적 방제에 관한 연구가 많이 이루어져 왔다. 주로 시설내에서 재배되는 작물에서 문제해충인 응애류, 진딧물류, 가루이류, 총채벌레류 등의 방제에 토착 및 외래 천적이 활용되어 부분적으로 효과를 거두고 있으나 아직까지 해당 분야의 산업적 기반이 취약한 우리나라에서는 선도적인 기술개발이 활발히 이루어지지 못하고 있는 실정이다. 이에 따라 현재까지 미생물농약을 포함하여 대부분의 생물적 방제제 개발 및 이용 기술은 국가기관 및 유관 연구소에서 수행되었다. 이러한 관주도의 연구는 기술 보급의 관점에서는 효율성을 높일 수 있지만, 제품의 집중적인 개발과 개선의 어려움, 적용 작물과 해충 등 이용방법 확대에 대한 연구 부진, 개발된 제품의 품질에 대한 책임 소재 결여 등의 많은 문제점을 내포하고 있다. 이는 비단 우리나라만의 문제는 아니고 여러 선진국에서도 동일하게 나타나는 문제점으로 파악되고 있다.

본 연구와 관련하여서도, 1997년부터 2000년까지 농업과학기술원(이하 농과원) 농업해충과에서 *V. lecanii* 토착균주의 수집, 선발 및 생물적 특성 연구 등 기초 기반 연구가 선행되었으며, 이로부터 선발된 CS-626균주를 이용하여 본 과제를 수행할 수 있었다(이 등 1999; Yoon *et al.* 2000; 이 등 2000; Lee *et al.* 2002). 해당 기간동안 농과원 농업해충과에서는 3종 이상의, 살충력이 높은 곤충병원성 곰팡이 균주를 선발하

여 실용화 연구를 수행하였으며, 대상 해충은 배추좀나방, 온실가루이, 진딧물, 식물기생 선충 등 주로 시설재배지에서 문제가 되는 해충 종들이다. 이는, 노지 환경보다는 시설내의 조절 가능한 환경 조건에서 미생물농약의 방제 효과가 충분히 발휘될 수 있기 때문이다. 그러나 상기에서 언급한 바와 같이, 기업체의 적극적인 역할 분담이 없이는 미생물농약의 제품화에 성공하기 어려운 상황이다. 이와 더불어 농과원 농업해충과에서는 CS-626균주를 포함하여 곤충병원성 곰팡이에 대한 화학농약의 영향(이 등 1999; Kim *et al.* 2001) 및 이들 균주를 화학농약과 복합처리하거나 식물성 정유를 보조제로 첨가하여 살충력을 증진시키고자 하는 연구를 수행하였다(이 등 2002). 이와 같은 IPM 요소들 간의 상호작용에 대한 기작과 복합처리 기술은 향후에도 많은 연구가 수행되어 미생물농약의 이용 효율을 높이고 생태계의 안전성을 강화시킬 수 있도록 추진되어야 할 것이다.

## 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

### 1절 연구 방법

#### 1. CS-626 균주의 대량생산 및 제제화 연구

##### 가. CS-626 균주의 고체배양

CS-626의 포자를 대량생산하기 위한 최적영양원 구명하고자 온도, pH, 그리고 수분함량의 배양조건을 확립하고 탄소원, 질소원, 미량원소 등 최적영양원을 구명하고자 다음의 처리내용과 방법으로 실험을 수행하였다.

	요인	처리내용	실험방법	조사방법
배양 조건	온도	23, 26, 30, 35 °C	PDA	균총의 직경 측정
	pH	4, 5, 6, 7, 8	PDA	균총의 직경 측정
	수분함량	52,4 67,7 75,6 80.4%	곡물배지	포자생산량
영양 원	유기 탄소원	벼짚, 밀짚, 왕겨, 현미	곡물배지	포자생산량
	유기 질소원	soy bean meal yeast extract corn steep liquor	현미배지	포자생산량
	무기 이온	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , NH <sub>4</sub> Cl, KNO <sub>3</sub> , NaNO <sub>3</sub> , NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> , (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	현미배지	포자생산량
	금속 이온	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , CoSO <sub>4</sub> , ZnSO <sub>4</sub> , CuSO <sub>4</sub> MgSO <sub>4</sub> , FeSO <sub>4</sub> , MnCl <sub>2</sub>	현미배지	포자생산량

##### 나. CS-626 균주의 액체배양

CS-626의 포자를 대량생산하기 위한 액체배양의 최적조건인 질소원, 탄소원, 온도, pH 등의 배양조건을 구명하고자 다음의 처리내용과 방법으로 실험을 수행하였다.

최적화 요소	비교
탄소원	저당, 포도당, 산화전분, 당밀과 비교 후 선정. RSM에 의한 농도 결정
질소원	CSL, 양조효모, yeast extract와 비교 후 선정. RSM에 의한 농도 결정
온도	20℃, 25℃, 30℃, 35℃와 비교 후 결정
pH	pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0과 비교 후 결정

#### 다. 제제화 연구

	처리내용	조사방법
분산제선발	Dispers101, Teric168	슬라이드배양 (26℃, 12시간) 후 포자발아율 조사 수화성조사
습윤제선발	TerWet1004, PVP K-15, 30	
증량제선발	Attagel-40, Bentonite, Cellite-281	

## 2. CS-626균주의 병원성 형질전환 균주 개발

### 가. *Verticillium lecanii*에 적합한 Protoplast 제조기술 확립

*V. lecanii* CS-626균주의 형질전환을 위해서는 우선적으로 protoplast의 제조 기술확립이 선행되어야 한다. 따라서 본 연구에서는 CS-626균주에 적합한 protoplast 제조 조건을 아래와 같은 방법으로 조사하였다.

Protoplast를 제조하기 위해 상업적으로 판매되는 효소를 사용하였다. 단일 효소를 우선 실험한 후 효과가 있는 효소를 선별하여 혼합 효소액을 만들어 가장 효과가 있는 효소액을 선별하였으며 선별된 효소액의 적정 농도를 결정하였다. Protoplast를 안정시키기에 적합한 삼투압 안정제를 선별하기 위해 여러 종류의 삼투압 안정제를 사용하여 protoplast에 안정한 삼투압 안정제를 선정하였다. 또한 protoplast를 제조하는데 적절한 균사체의 양과 효소액 처리 시간을 구명하기 위하여 균사체의 양과 효소 처리 시간을 다르게 하여 각각 반응시킨 후 protoplast 생성 수를 조사하였다.

### 1) 균사체 배양

본 실험에 사용된 *V. lecanii* CS-626균주의 균사체는 포자현탁액 ( $5 \times 10^7$  conidia/ml) 5 ml을 100 ml의 PDB(Potato Dextrose Broth)가 함유된 삼각 플라스크에 접종하여 25°C, 200 rpm의 배양조건으로 20시간 배양하였다. 배양액을 진공펌프를 사용하여 glass fiber filter로 걸러 여과액을 버리고 filter에 걸러진 균사체를 수분을 제거한 후 실험에 사용하였다.

### 2) 효소 선정

CS-626균주의 균사체로부터 protoplast를 제조하기 위해서 상업적으로 판매되는 효소를 사용하였다. 본 실험에 사용된 효소의 종류와 농도는 5 mg lysing enzyme/ml, 10 mg driselase/ml, 0.5 mg cellulase/ml, 0.1 mg  $\beta$ -glucuronidase/ml, 5 mg pectinase/ml, 10 mg chitinase/ml이었으며, 0.6 M KCl을 삼투압 안정제로 사용하였다. 각각의 효소를 위의 농도와 균사체 0.2 g, 0.6 M KCl을 혼합하여 5 ml의 반응용액을 만든 후 각각 driselase와 lysing enzyme은 30°C, cellulase와  $\beta$ -glucuronidase는 37°C, pectinase와 chitinase는 25°C shaking incubator에서 50 rpm으로 3시간동안 반응하였다. 반응용액은 muslin filter로 세포벽 찌꺼기를 분리한 후 여과액을 10분간 원심분리(1000 × g)하여 protoplast의 pellet을 수확하였으며, 5 ml의 삼투압 안정제를 첨가하여 세척하였다. 이를 다시 원심분리한 후 용액을 버리고 pellet을 1 ml의 삼투압 안정제로 현탁하여 안정시킨 후 hemacytometer로 protoplast의 수를 세어 각 효소별 protoplast 생성 수를 조사하였다.

### 3) Driselase 적정농도 구명

위 실험에서 protoplast 생성에 가장 효과적인 효소로 구명된 driselase의 농도를 2 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml로 하고, 다른 조건은 위의 실험과 동일하게 하여 protoplast 생성 수를 조사하여 가장 적합한 효소의 농도를 선정하여 다음 실험에 적용하였다.

### 4) 삼투압 안정제 선정

Protoplast를 안정시키기에 적합한 삼투압 안정제를 선별하기 위해 10 mg driselase/ml과 0.2 g의 균사체를 각각의 삼투압 안정제(0.6 M KCl, 0.6 M MgSO<sub>4</sub>, 1.2 M Sucrose, 1.2 M Sorbitol, 1.2 M Mannitol)와 혼합하여 위의 실험조건으로 반응하여 protoplast의 생성 수를 조사하였다.

### 5) 효소 반응 처리 시간 구명

일정한 균사체 양에 대해서 우수하다고 판명된 lysing enzyme과 driselase의 배양 시간을 구명하기 위하여 5 mg lysing enzyme/ml, 10 mg driselase/ml과 0.1 g의 균사체를 혼합, 현탁시킨 후 30°C shaking incubator에서 50 rpm의 속도로 1, 2, 3, 4, 5시간 동안 각각 반응시킨 후 protoplast 생성 수를 조사하였다.

### 6) 베노밀 농도에 따른 protoplast 재생(regeneration)

CS-626균주의 protoplast를 균사체로 재생하고, 베노밀 살균제에 대한 저항성 및 병원성이 향상된 균주로 전환된 균주를 일차적으로 선별하기 위해서는 형질전환된 균주선발에 필요한 베노밀 농도를 우선적으로 구명해야 한다. 따라서 본 실험에서는 0.6M KCl 용액에 10종류의 베노밀 농도(0~9 ppm)가 함유된 각각의 PDA(Potato Dextrose Agar) 배지를 만들어 각각의 배지에  $1 \times 10^4$  protoplast/ml 현탁액 100 $\mu$ l를 도말한 후 7일간 배양하여 균총의 형성여부를 조사하여 protoplast의 재생이 저지되는 베노밀의 농도를 조사하였다.

## 나. 병원성유전자 도입을 통한 형질전환

병원성 유전자 Pr1을 다른 균주에서 그리고 여러부분에서도 발현시키기 위해서는 promotor를 포함하는 전체 유전자를 분리하여 클로닝 하는 것이 유리하여 다음과 같이 실험을 수행하였다.

### 1) *Verticillium lecanii*의 genomic library 제작 및 promotor 분리

Pr1 promotor를 분리하기 위해 PDB 배지에 1주일간 액체 배양한 *V. lecanii*의 genomic DNA를 추출한 다음 정량후 2가지 제한효소 *Eco*R1과 *Bam*H1으로 각각 처리하여 Lambda ZAP에 클로닝 하여 genomic library를 제작하였다. promotor를 포함하는 DNA 단편의 확보와 확인을 위하여 Lambda ZAP의 sense primer(S1)와 Pr1의 upstream 부분에서 디자인된 anti-sense primer(A1:caactctgccgtagttgg)를 이용하여 위에서 ligation된 Lambda ZAP mixture를 PCR 증폭하였다(PCR program: (i) 94°C 20sec (ii)94°C 20 sec-65°C 1min-72°C 2min: 30 cycle (iii)72°C 5min). 또한 위 반응액을 전기영동하여 PCR 증폭유무와 증폭된 DNA 단편의 크기를 조사한 다음 증폭된 DNA 단편의 크기가 800bp 이상이 되는 반응액을 선별하여 southern blotting 방법으로 promotor 부분을 확인하였다.

## 2) Promotor 염기서열 조사

pBRG-4 vector를 *NdeI*으로 처리하여 *pyr-4* 유전자에 해당되는 부분을 제거한 후 vector말단에 T를 붙여서 T-vector를 제작하였다. 1차 선발된 PCR 단편들을 T-vector에 도입시킨 후 *E. coli*에 transformation하였다. promotor가 도입된 형질 전환균주를 선발하기 위해서 특이 primer를 제작하였다. sens primer는 T-vector 염기서열을 바탕으로 제작하였으며, anti-sense primer는 RACE product의 5' 부분에서 디자인하여 제작하였다. 이러한 primer를 이용하여 PCR 증폭하여 promotor를 포함하는 클론을 확인할 수 있었으며 또한 promotor 부분의 염기서열을 확인할 수 있었다.

## 3) Shuttle vector 제작

Pr1의 promotor가 ORF에 올바르게 연결된 상태로 vector내에 존재해야만 제 기능을 발휘할 수 있다. 따라서 Pr1의 promotor 부분과 ORF의 염기서열을 조사하여 양 말단의 접합에 적합한 제한효소가 *Apal*임을 확인하였다. Vector를 제한효소 *Apal*으로 2시간 처리한 후 CIP를 1시간 처리하여 self-ligation을 방지하였다. ORF도 제한효소 *Apal*으로 처리한 뒤 전기영동하여 ORF부분을 확인하였다. band가 있는 부분의 gel을 잘라 DNA purification kit으로 정제하여 vector와 ligation하였다. 반응물을 competent cell에 transformation 한 뒤 transformants를 확보하여 배양한 뒤 형질 전환용 vector를 회수하였다. vector를 promotor 말단 부분의 염기서열에 기초하여 제작된 primer1 (5'-actctgataaaagtacc-3') 과 ORF의 앞부분의 염기서열에 상보적으로 디자인된 primer5 (5'-aatggattggtgtcgaacg-3')를 이용하여 promotor 말단에 ORF가 방향이 맞게 삽입되었는지를 확인하였다. 확인된 vector를 함유한 형질전환균주를 배양하여 형질전환용 vector를 다량 확보하였다.

## 4) CS-626균주의 형질전환

1차년도에 확립한 방법으로 CS-626 균주의 protoplast를 제작한 다음 200 $\mu$ l의 원형질체 수용액에 40 $\mu$ l의 25% PEG(Polyethylene glycol 8000)와 1 $\mu$ g의 형질전환용 vector를 첨가한후 잘 섞어주었다. 얼음에 넣고 30분간 정치시킨 후 2ml의 같은 PEG 용액을 넣고 상온에서 15분간 처리하여 vector가 protoplast 안으로 삽입되도록 하였다. 위의 반응용액을 4ml의 삼투압 안정제 (0.6M KCl, 50mM CaCl<sub>2</sub>)로 희석시킨 뒤 0.5ml을 삼투압 안정제와 4 $\mu$ g/ml 베노밀을 함유하는 PDA 선택배지에 도말한 후 25 $^{\circ}$ C 배양기에서 7~10일간 배양후 colony 생성을 확인하였다. Protoplast의 발아를

저지시키는 베노밀의 최소 농도가 4ppm이기 때문에 4ppm 베노밀 선택배지에서 colony를 형성하는 균주는 vector가 삽입되었다고 할 수 있다. colony를 형성하는 균주를 다양한 농도의 베노밀을 함유하는 선택배지에 순차적으로 배양하여 가장 높은 농도에서 colony를 형성하는 균주를 선발하여 southern blotting 실험을 수행하였고 이 실험을 통해 vector의 삽입을 확인하였다.

#### 다. 형질전환 균주의 특성조사

##### 1) 발아율

각각의 형질전환균주의 포자 발아율은 1,000배 배율의 현미경으로 관찰하였다. 슬라이드 글라스 위에 PDA를 얇게 도포한 뒤  $2 \times 10^6$  농도의 포자 현탁액 1방울을 배지 위에 떨어뜨린 뒤 25°C 배양기에서 12시간 배양시킨 후 슬라이드 글라스에 아닐린 블루 염색약을 떨어뜨려 발아를 멈추게 한 다음 현미경으로 발아비율을 측정하였다.

##### 2) 성장속도

도말한지 4일 되는 균사체를 코르크보어로 자른 뒤 다양한 농도의 베노밀을 함유하고 있는 선택배지에 접종하였다. 25°C 배양기에서 7일간 배양한 뒤 colony의 지름을 측정하였다.

### 3. CS-626 균주를 이용한 곰팡이 살충제의 효능검증 및 이용방법 연구

미국에서는 미생물농약 등록시에 원제(MPCA) 및 제제(MPCP)의 기주에 대한 병원성, 길항성, 감염유발 약량, 전염성 및 작용기작 등을 약효와 관련하여 자료로 제출하도록 되어있다. OECD 소속 대부분의 나라에서도 살포량과 약효발현과의 상관관계를 구명해야 등록을 허락하고 있으며 병해충의 종합관리체계 하에서의 미생물농약의 활용성과 그의 효과에 대한 성적을 요구하고 있다. 그럼에도 불구하고 아직까지 선진국에서도 각각의 해충과 미생물농약에 대해 약효시험 방법이 설정된 것은 없다. 다만, 실내·외 시험이 필수로 요구되고 그 방법은 국제적으로 널리 사용되는 일반적인 방법을 따르게 되어있다. 온실가루이를 비롯한 매미충류, 진딧물류, 응애류 등의 미소해충은 약효조사에 상당한 어려움이 따르기 때문에 일반적으로 사전밀도를 조사하여 처리구와 무처리구간의 생충수를 비교, 평가하는 밀도조사법을 사용한다. 또한 곤충병원



성 곰팡이와 같이 진균류의 조사기간은 8~10일 이상을 넘지 않는 것으로 되어있어서 국내에서도 이 기준을 적용하여 미생물농약 등록시 약효검증 성적을 요구하고 있다. 본 연구가 미생물농약 등록을 위한 시험으로 수행된 것은 아니지만, 향후 온실가루이에 대한 미생물농약을 개발하는 데 필요한 약효검정 방법을 확립하고 기준이 될 수 있도록 해충 밀도 조사법, 살충률 조사법, 분무처리법 등에 대하여 다양한 조사를 수행하였으며 또한 본 연구재료인 CS-626균주를 이용하여 미생물농약으로 개발하는데 필요한 기초 자료를 획득하고자 하였다.

이를 위하여 3년간 총 5회의 포장검정 실험을 수행하였으며 살충력과 관련된 생물적 요인 분석 등을 위한 실내 생물검정을 수행하였다. 포장검정 실험은 매회 특별한 목적과 다양한 조사 내용으로 이루어졌다(Table 1).

#### 가. CS-626 원제의 살충력 포장검정

포장에서 *Verticillium lecanii* CS-626균주 원제의 온실가루이(greenhouse whitefly: *Trialeurodes vaporariorum*) 살충력을 검정할 목적으로 2000년 6-7월 수원의 토마토(반축성 대과종) 비닐하우스 재배지에서 검정시험을 수행하였다. 시험구 면적은 약 100m<sup>2</sup> (처리구당 토마토 30주)이었고 망사를 설치하여 해충의 출입을 방지하였다. 처리구에는 1x10<sup>8</sup> CFU/ml 농도의 포자현탁액(0.01% Tween20, 1% Soybean oil) 2L를 토마토 주당 100ml씩 처리하였으며, 대조구에는 포자를 첨가하지 않은, 동량의 0.01% Tween20 수용액(1% Soybean oil)을 분무처리하였다. 분무처리는 1.5L용량의 간이분무기를 이용하였고 실험 기간 중 하우스내의 온·습도 조건을 HOBO(Onset computer corp., USA)를 이용하여 측정하였다. 본 수원에서의 포장검정 실험을 위하여 2000년 6월 8일 토마토 주당 평균 43마리의 온실가루이 성충을 접종하여 18일이 경과한 날에 2-3령 약충 발생을 확인한 후, 포자현탁액을 분무처리하고 처리 후 1주일간 처리구당 1일 9소엽씩을 표본 추출하여 살충률을 조사하고 LT<sub>50</sub>을 Abbott 공식(Abbott 1925)과 Probit 분석 프로그램(Raymond 1985)을 이용하여 계산하였다.

수원에서의 포장검정과 더불어 지역 및 계절, 토마토 품종, 재배 양식 등에 따른 살충력 차이 등을 검정할 목적으로 2001년 1월부터 4월까지 충남 부여군 농업기술센터내의 연동비닐하우스 재배지에서 포장실험을 수행하였다. 시험구 면적은 약

20m<sup>2</sup> (처리구당 토마토 20주)이었고 양액재배, 원줄기 2열 돌림재배법(재식간격 20cm)으로 방울토마토(품종명 : 꼬꼬)를 재배하였다. 수원 포장검정실험과 동일한 방법으로 포자현탁액을 처리하되, 1주 간격으로 2회 분무처리하고 처리 후 온실가루이 성충 우화율(처리구 당 토마토 9주)을 육안조사와 점착트랩 조사를 병행하였다.

#### 나. CS-626 제제(수화제)의 분무처리 특성 및 살충력 포장검정

CS-626균주의 제제의 포장검정 실험은 2년차(2002. 4-7월, 수원)와 3년차(2003. 5-6월, 부여) 두 번에 걸쳐 시도하였으나, 2년차 실험에서는 제제의 물리성이 좋지 않아 약해 및 약흔이 발생하여 정상적인 검정이 이루어지지 않았다. 3년차에는 제제의 물리성이 크게 개선되어 부여군 농업기술센터내의 하우스에서 포장검정 실험을 수행하였는데, 이를 위하여 2003년 3월부터 2003년 6월 말까지 방울토마토(품종명 : 꼬꼬)를 재배하며 약 150m<sup>2</sup> (망사로 3개 처리구 구획, 처리구당 50m<sup>2</sup>)의 시험구를 조성하고 제제를 1×10<sup>8</sup> CFU/ml, 5×10<sup>7</sup> CFU/ml의 포자농도로 각각 분무처리 후 10일 동안 토마토 소엽에 존재하는 온실가루이 약충의 살충률 및 LT<sub>50</sub>을 조사하였다. 대조구에는 0.01% Tween20 수용액(1% Soybean oil)을 처리하였다. 1회 분무처리 2주 후 처리구에 1회 처리와 동일한 포자 농도로 반복처리하여 성충의 밀도 변동을 점착트랩으로 조사하였다.

#### 다. CS-626 균주의 살충력에 영향을 미치는 생물적 요인

포장에서 CS-626균주에 의한 온실가루이의 방제 효과는 대상 작물의 종류, 품종 및 해충의 생물적 특성 등에 의해 변이가 크게 나타날 수 있다. 본 연구에서는 토마토의 품종을 대과종과 방울토마토로 변경해가면서 포장검정시험을 수행하여 방제 효과를 비교 분석하였다. 그러나 본 연구에서 CS-626균주의 살충력에 영향을 미치는 생물적 요인 중 보다 중점적으로 조사가 이루어진 것은 대상해충인 온실가루이 약충 및 성충의 생물적 특성이었다.

##### 1) 포장 및 토마토 주내에서 온실가루이 성충의 분포 양상

CS-626 균주를 분무처리할때 토마토 주내에서 온실가루이 성충의 분포 양상에 따라 살충 효과의 차이가 있는지를 조사할 목적으로, 1년차에 수원의 하우스 포장에서 토마토 잎 부위를 상위엽(지상 60~120cm)과 하위엽(지상 120~150cm)으로 구

분하여 온실가루이 성충 밀도를 조사하고 포자현탁액 분무처리 후 밀도 변화를 관찰하였다. 이와 더불어 포장에서 온실가루이 성충의 밀도에 따라 CS-626 균주의 살충력의 차이가 있는지를 조사하기 위하여, 2년차에 부여의 실험포장에서 방울토마토를 재배하며(2001. 10월~2002. 5월) 처리구별로 서로 다른 수의 온실가루이 성충을 인위적으로 접종하고, 방사 5주후부터 발생하는 온실가루이 약충과 성충의 밀도, CS-626균주의 분무처리에 따른 약충 살충률 및 성충 발생률을 조사하였다.

또한, 토마토 하우스 포장 내에서 온실가루이 발생 밀도가 다른 경우에 CS-626균주의 방제효과를 비교·조사할 목적으로 2년차에 부여군 농업기술센터 내 방울토마토 양액재배 하우스 포장에 각 40m<sup>2</sup>의 망사처리구 4개를 설치하고 2002년 1월 중순 온실가루이 밀도를 저·중·고밀도로 달리하여 방사하였다. 포자분무처리 대조구와 저밀도구에는 토마토 주당 성충 2마리, 중밀도구에는 주당 5마리, 고밀도구에는 주당 10마리씩 투입하여 인위적으로 1세대 약충 밀도를 형성시키고, 이들 약충이 2-3령 시기일 때 CS-626균주의 포자현탁액( $1 \times 10^8$  CFU/ml)을 분무처리 하였으며 처리 후 10일간 살충률을 조사하여, 처리구간의 살충률 차이 여부를 SAS로 통계분석하였다(SAS 1988). 분무처리 조사기간 종료 후 2주간 각 처리구에 점착트랩을 설치하여 채집된 온실가루이 성충 수를 조사하였다. 또한 분무처리 6주 후 토마토 소엽에 발생한 차세대 온실가루이 난 및 약충 발생수를 조사하였으며 포장실험 기간 중 각 처리구별 온·습도를 측정하였다.

## 2) 토마토 소엽내에서 온실가루이 약충의 밀도 및 공간분포 양상

상기의 포장 내 온실가루이 밀도에 따른 CS-626균주의 살충력 변화 결과를 이해하기 위하여, 포장시험구내의 토마토 소엽에 존재하는 온실가루이 약충의 밀도와 약충 간의 평균 최단거리 등을 조사하였다. 포장에서의 조사와 더불어 보다 정밀하게 온실가루이의 밀도와 살충력간의 관계를 구명할 목적으로, 토마토 주당 서로 다른 수의 온실가루이 성충을 접종하여 다양한 약충 밀도를 갖는 토마토 소엽을 만들고, 이로부터 소엽의 뒷면에 붙어있는 약충들의 공간분포지도(spatial map)를 작성한 후 최근거리추정법(Nearest Neighbour method; Clark and Evans 1954)에 의거하여 엽면적, 약충 밀도, 약충간의 최단거리 평균 및 공간분포 유형 등을 조사하였으며 이들 소엽에 CS-626 균주의 포자현탁액  $1 \times 10^7$  CFU/ml을 분무처리하여 소엽내 약충 밀도와 CS-626에 의한 약충 살충률간의 상관관계를 분석하였다.

개체군내 개체들의 공간분포는 규칙적 분포(regular pattern), 임의분포(random pattern)와 집중분포(contagious pattern)로 크게 구분될 수 있다. 개체가 일정 지역에 분포하고 있는 공간분포지도(spatial map)를 갖고 있으면 그 개체군의 밀도를 조사하여 분포양상을 측정할 수 있다(Krebs 1999). 이와 같은 분포지도를 분석하는 방법으로 처음 제안된 것이 Clark와 Evans(1954)의 최근거리추정법(Nearest-neighbor method)이다. 분포지도에서 일정 지역 내에 존재하는 하나의 개체로부터 가장 근접한 다른 개체까지의 거리의 평균을 계산할 수 있다.

$$r_A = \text{Mean distance to the nearest neighbor} = (\sum r_i) / n$$

Clark와 Evans(1954)는 아래와 같이 개체군의 밀도를 이용하여 최근거리 기댓값을 계산하였고,

$$\rho = \text{Density of organisms} = \text{Number in study area} / \text{size of study area}$$

$$r_E = \text{Expected distance to nearest neighbor} = 1/2\sqrt{\rho}$$

이를 통하여 조사하는 개체군의 분포 양상이 임의분포에서 얼마나 편차가 있는가를 알 수 있는 집중지수를 구할 수 있다.

$$R = r_A/r_E = \text{Index of aggregation}$$

규칙적 분포는 개체들이 서식공간에서 일정 간격으로 균등하게 분포하는 형태로, 집중지수 R값이 2.15에 근접하는 특성을 보인다. 규칙적 분포는 동질적인 환경하에 있는 서식공간에서 종내경쟁으로 인해 각 개체가 일정 세력권(territory)을 확보하는 상황에서 나타난다. 임의분포란 서식공간에서 각 서식단위별 개체수가 임의적으로 분포되어 있는 형태로 수리적으로 이항분포형(binomial distribution)을 따르나 서식단위에서의 평균밀도가 낮은 경우 포아송분포형(poisson distribution)을 따르게 된다(류와 이, 2002). 이 경우 이론적으로 서식단위 별 평균밀도(m)와 분산값( $\sigma^2$ )이 동일하므로 임의적 분포 여부 추정의 기본척도가 되어, 임의분포하는 개체군의 집중지수 R값은 1이 된다. 임의분포는 특정 개체의 존재 또는 활동이 다른 개체의 영향을 받지 않는 경우에 나타나는 형태로 이 조건을 충족시키기 위해서는 서식환경이 균질적이어야 한다. 집중분포는 임의분포와 달리 특정 개체의 행동이 다른 개체들의 행동에 영향을 주어 특정 서식단위에 개체들의 집중이 유발되는 경우에 나타나는 형태로 서식단위별 평균밀도보다 분산값이 큰 특성을 지니며 수리적으로 부의 이항분포형(negative binomial distribution)을 따른다(류와 이, 2002).

특정 개체군의 집중지수값의 유의성은 평면 공간에서 최근거리 기댓값의 표준 오차를 구하여 계산할 수 있다.

$$z = (r_A - r_E) / S_r$$

$z$  = Standard normal deviate

$S_r$  = Standard error of the expected distance to nearest neighbor  
=  $0.26136/\sqrt{np}$

#### 라. CS-626 균주의 살충력에 영향을 미치는 환경적 요인

CS-626 균주의 원제 및 제제의 방제 효과를 분석하기 위한 자료로 이용할 목적으로 모든 경우의 포장실험에서 하우스내의 온·습도를 HOB(O onset computer corp., USA)를 사용하여 측정하였으며, 부여군의 양액재배 연동하우스 농가포장(규암면 용대리 태양농장)과 본 연구를 수행한 농업기술센터의 하우스 포장의 토마토 봄작기 동안 온·습도 조건을 측정, 비교하였다.

#### 마. CS-626 제제의 효율적 이용 방법 제안

본 연구에서 개발한 CS-626 균주의 제제를 농가 포장에서 효율적으로 이용할 수 있도록 하기 위하여, 상기와 같은 포장검정 및 실내 생물검정의 결과를 바탕으로 분무처리 시기 및 처리량 등을 제안하였다.

## 2절 연구 내용 및 결과

### 1. CS-626 균주의 대량생산 및 제제화 연구

#### 가. CS-626 균주의 고체배양

##### 1) 배양조건

온도 및 pH의 영향 : PDA 평판배지상에서 균주를 배양한 결과 Table 1에서 보는 바와 같이 23 ℃와 26 ℃에서 최적성장을 보였으며, 30 ℃에서는 성장이 약간 떨어졌고 35 ℃에서는 전혀 성장하지 못하였다.

한편 초기 pH 4.0에서는 균의 성장이 저조하였으며 25 ℃와 28 ℃에서는 pH 5.0 이상에서 좋은 성장을 보였으나 그 차이는 크게 나타나지 않았다. 이러한 결과를 기초로 최적성장 온도와 pH는 일반적으로 *Verticillium lecanii*의 배양시 많이 사용되는 25℃와 6.0으로 결정하였다

Table 1. 온도와 pH가 균체성장에 미치는 영향 (균총직경 : mm)

온도, ℃	pH				
	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0
23	17	20	24	24	23
26	20	22	25	23	23
30	16	16	19	19	19
35	No Growth				

## 2) 영양원

탄소원의 영향 : 대량배양에 사용될 탄소원으로 경제성과 이용 편의성을 고려하여 벵짚, 밀짚, 왕겨 및 현미이용 가능성을 검토하였으며, 배양시 적용할 수분함량을 결정하기 위하여 벵짚과 실험대상 중 특성이 다른 현미에 대한 수분함량의 영향을 조사하였다.

Table 2와 같이 수분함량이 67.7% 일 때 포자생산량이 최대를 보여 이후의 실험에서 현미를 제외한 모든 곡물배지의 경우 이를 적용하였다.

현미의 경우 Table 3에서 보는 바와 같이 24시간을 불렀을 경우 최대 포자생산량을 보였으나 12시간의 처리와 거의 차이가 없어 이후 실험에서 12시간을 적용하였다.

별균시간은 121℃에서 15분의 경우 모든 처리에서 오염이 일어났으며 60분과 90분은 차이가 별로 없었으므로 이후 실험에서 60분을 적용하였다.

Table 2. 수분함량이 포자생산에 미치는 영향 (벼짚)

Rice straw (g)	Seed (ml)	Water content (%. w/w)	Spore conc. ( $\times 10^8$ )
50	5	52.4	142
		67.7	173
		75.6	124
		80.4	40

Table 3. 현미의 불림시간과 멸균시간의 영향

불림시간 (hr)	멸균시간 (min)	Spore conc. ( $\times 10^8$ )
0	15	-
	60	54.9
	90	52.7
6	15	-
	60	123.9
	90	130.1
12	15	-
	60	150.5
	90	152.6
24	15	-
	60	157.2
	90	155.8

위의 수분함량조건을 적용하여 각 탄소원간의 포자생산량을 비교 실험한 결과 Table 4와 같이 밀짚과 벼짚이 가장 우수하였으며 왕겨는 저조한 결과를 보였다. 그러나 밀짚은 재배면적이 좁고 구입상의 문제점이 있으며 벼짚은 화학농약의 과다사용으로 인하여 균주의 안전성 확보가 불투명하다는 점과 최근 대부분의 농가가 탈곡 즉시 벼짚을 재투여한다는 점을 고려하여 포자생산성과 경제성이 다소 불리한 현미의 재사용 가능성을 실험하였다.

Table 4. 탄소원이 포자생산량에 미치는 영향

Carbon sources (50g)	Water content (%. w/w)	Spore conc. ( $\times 10^8$ )
벼짚	67.7	166.5
밀짚	67.7	171.0
왕겨	67.7	58.6
현미	12시간 불림	155.5

비닐팩에 12시간 물에 불린 현미를 250 g 넣고 증류수 88 ml를 가한 다음 121 °C에서 1시간 멸균 후 PDB에서 4일간 배양한 배양액 10 ml를 접종하여 25 °C에서 8일간 재배양한 결과 Table 4와 유사한 결과를 얻을 수 있었다.

1차 배양 후 포자를 획득하고 증류수만 다시 가하여 재배양한 결과 Table 5에서 보는 바와 같이 1차 배양과 거의 같은 수준의 포자가 생산되었다.

따라서 이후의 대량배양조건은 본 방법과 조건을 적용하였다.

Table 5. 재사용 현미의 포자생산량( $\times 10^8$ )

1차	2차	3차
160.2	165.5	155.7

기타 질소원과 금속이온의 영향 : 포자생산량을 증대시키기 위하여 여러 유기질소원과 무기질소원 및 금속이온의 영향을 조사한 결과 Table 6, 7, 8에서 보는 바와 같이 control에 비해 유의적인 증대 효과가 나타나지 않았으며, 일부는 더 저조한 성적을 나타내었다. 따라서 이후의 실험에서는 질소원과 금속이온을 첨가하지 않았다.



Table 6. 유기질소원의 영향

Organic nitrogen sources	gram or ml	Spore conc. ( $\times 10^8$ )
Control	-	157
Soybean meal	1.0	158
	2.0	165
	3.0	159
Yeast extract	0.5	161
	1.0	165
	2.0	170
Corn steep liquor	0.2	159
	0.6	165
	1.0	164

Table 7. 무기질소원의 영향

Inorganic nitrogen sources	gram	Spore conc. ( $\times 10^8$ )
Control	-	156
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.4	153
KNO <sub>3</sub>	0.4	162
NaNO <sub>3</sub>	0.4	157
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.4	166
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.4	106
NH <sub>4</sub> Cl	0.4	164

Table 8. 금속이온의 영향

Metal ions	gram	Spore conc. ( $\times 10^8$ )
Control	-	154
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2	162
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2	137
CoSO <sub>4</sub>	0.1	48
ZnSO <sub>4</sub>	0.1	155
CuSO <sub>4</sub>	0.1	88
MgSO <sub>4</sub>	0.1	143
FeSO <sub>4</sub>	0.1	97
MnCl <sub>2</sub>	0.1	160

#### 나. CS-626 균주의 액체배양

##### 1) 성장곡선

미생물의 성장곡선은 균주의 특성을 알기 위한 가장 기본적인 정보로서 균의 접종시간 및 배양기간을 결정하는데 중요한 변수가 된다.

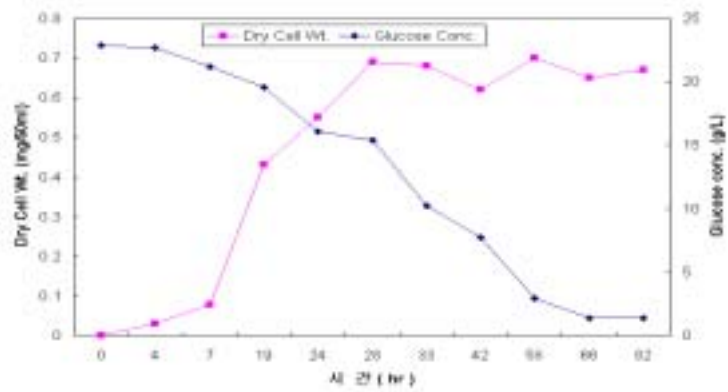


Fig. 1 CS-626 균주의 성장곡선

Fig. 1에서 보여지는 것처럼 본 균주는 약 48시간에서 포자의 수가 최대가 되었다. 이때 pH는 최소를 나타내었으며 당은 거의 고갈이 된 것으로 나타났다. 따라서 본 실험에서는 균주의 최적 배양시간을 48시간으로 정하였다.

## 2) 탄소원의 선정

미생물은 에너지원으로 여러 종류의 탄소원을 이용할 수 있는데, 이것은 미생물마다 특정한 당을 탄소원으로 사용하기 때문이다. 따라서 여러 종류의 탄소원(고과당, 저당, 산화전분, 포도당, PDB)을 이용, 배양하여 포자의 생산이 가장 높은 탄소원 종류를 선별하는 실험을 하였다.

탄소원 종류의 영향을 관찰하기 위하여 탄소원의 농도를 각각 2%(w/v)로 고정하여 실험하였다. 이때 질소원으로는 yeast extract의 농도를 1%로 고정하여 사용하였다. 이후 48시간 동안 배양후의 포자수를 비교 조사하였다.

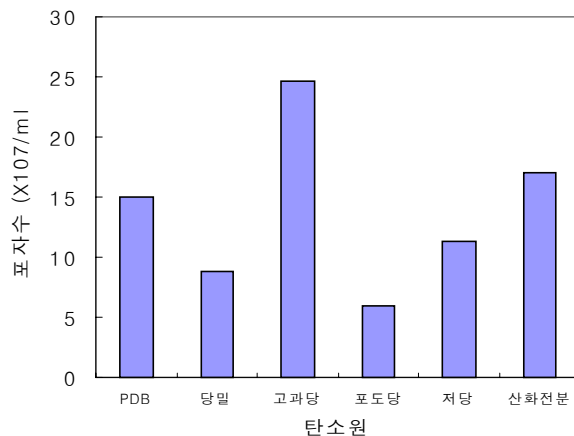


Fig. 2 탄소원의 종류가 포자수에 미치는 영향

Fig. 2에서 보여지는 것처럼 고과당을 탄소원으로 이용하였을 때 가장 높은  $2.5 \times 10^8$ 의 포자수를 나타내었으며, 이 값은 대조군으로 사용한 PDB( $1.5 \times 10^8$ )에서 보다 높은 포자수를 나타낸 것이다.

이후의 실험에서는 탄소원을 고과당으로 결정을 하였는데, 고과당은 1kg당 550원의 단가로 경제성도 좋은 것으로 사료된다.

### 3) 질소원의 선정

질소원으로 사용되는 것은 대부분 불용성 고형분임을 감안하여 양조효모는 산가수분해를 하여 사용하였으며, 장유박은 온수 추출하여 상징액을 질소원으로 사용하였다.

CSL은 가수분해가 되어 그대로 사용을 하였다. 대조군으로 일정 함량으로의 제조가 가능한 1%의 yeast extract를 사용하였으며, 탄소원으로는 미리 선정된 2%의 고과당을 사용하였다.

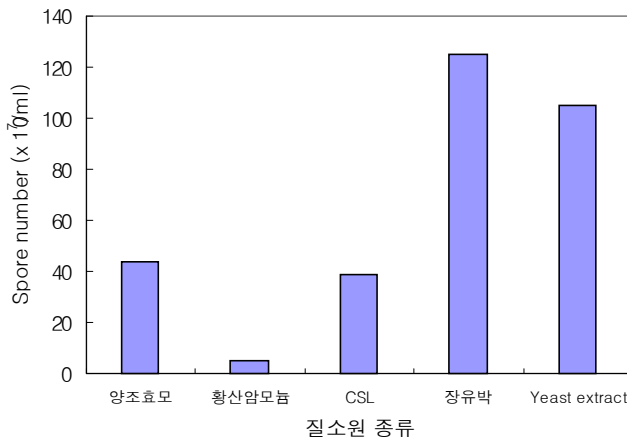


Fig. 3 질소원이 포자생산에 미치는 영향

Fig. 3은 배양 48시간후의 질소원 종류에 따른 포자수를 나타낸 것이다. 장유박을 제외한 나머지의 질소원에서 배양된 배양액에서는 기준 질소원인 yeast extract 보다 낮은 포자수를 보였으며, 이 포자수는 PDB에서보다 약 8배 증가한 것으로 다른 질소원들과 비교해서 장유박의 질소이용율이 가장 높은 것으로 나타났다.

본 연구에서는 탄소원으로 고과당을 질소원으로는 장유박의 온수 가수분해물을 적절한 산업용 배지로 선정하였다.

### 4) 탄소원과 질소원의 농도에 대한 포자수

Fig. 4에서는 질소원을 yeast extract(1%)로 고정한 후 고과당의 농도 변화에 따른 포자수의 변화를 관찰하였다. 고과당의 농도가 증가함에 따라 포자수는 미

량으로 증가하다가 어느 농도(5%) 이상에서는 포자의 수가 감소됨에 따라 당 농도의 증가에 따른 기질 억제 영향을 받는 것을 알 수 있었다.

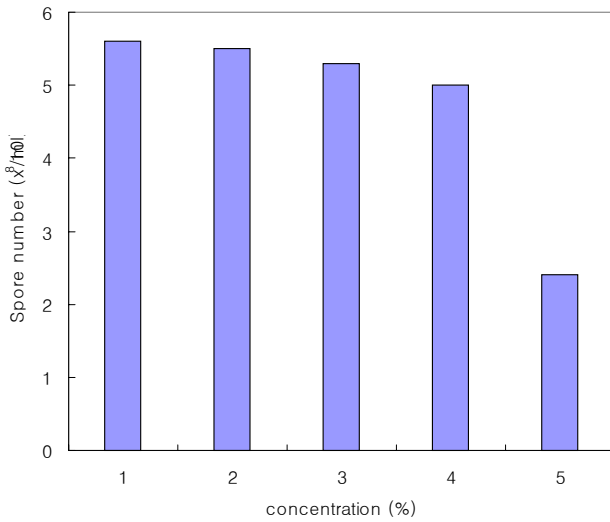


Fig. 4 고과당 농도가 포자수에 미치는 영향

Fig. 5는 탄소원으로 glucose(2%)를 고정하고 장유박의 농도를 변화시켰을 때 포자수의 변화를 나타내었다. 탄소원의 경우와 마찬가지로 장유박의 농도가 증가함에 따라 포자의 생산도 증가하였지만 장유박의 농도가 4% 이상으로 되면 장유박의 뭉침현상이 나타나 배양액의 혼합이 용이하지 못함에 기인하여 포자수가 급격하게 떨어지는 것으로 나타나 실험실내의 실험으로는 장유박 농도가 4%를 넘지 못하였다.

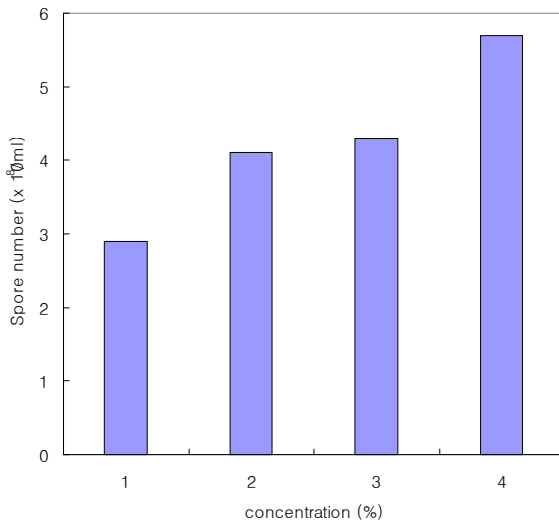


Fig. 5 장유박 농도가 포자수에 미치는 영향

#### 5) 탄소원과 질소원의 농도 최적화

예비실험에서 선정된 고과당과 장유박의 농도를 독립변수로 하여 이들 변수들간의 상호작용, 그리고 포자수의 최대생산을 위한 발효배지의 농도를 최적화 시키고자 하였다.

2개 변수의 3수준설계인 2<sup>3</sup> fractional factorial design에 따라 4개의 스타포인트와 4중심점을 포함하여 총 12가지의 조건에서 실험을 수행하였다.

실험결과는 SAS(Statistical Analysis System)를 이용하여 통계학적으로 분석되어 종속변수(배양물의 포자수)에 대한 회귀방정식을 얻어 고과당 농도와 장유박의 농도에 대한 상호관계 및 최대 포자수 생산을 위한 고과당, 장유박의 농도 조합을 얻을 수 있었다.

독립변수인 고과당의 농도는 5%를 기준으로 하여 2.27~7.78%까지, 장유박의 농도는 2%를 중심으로 하여 0.6~3.4%까지 변화시켜가면서 변수들간의 영향을 관찰하였다.

반응표면분석 결과 Fig 6에서 보여지는 것처럼 최고점에서 최적반응표면을 얻었으며, 이것은 고과당의 농도를 6~7%로 할 경우 급격한 포자수의 감소로 그 농도를 최대 5%로 할 수 있으며, 그 이하의 범위에서 4.68%로 결과 값이 나왔으며, 장유박 역시 실험실내의 실험에서 약 4%까지 농도를 올릴 수 있었는데, 그 범위를 기준으로 하여 약 1.68%에서 가장 높은 포자를 생산하였다. 이 조건에서 예상 포자의 생산량은

$6.32 \times 10^9$ 으로 기대되었다. 이후의 실험에서는 이 농도를 기준으로 실험을 진행하였다.

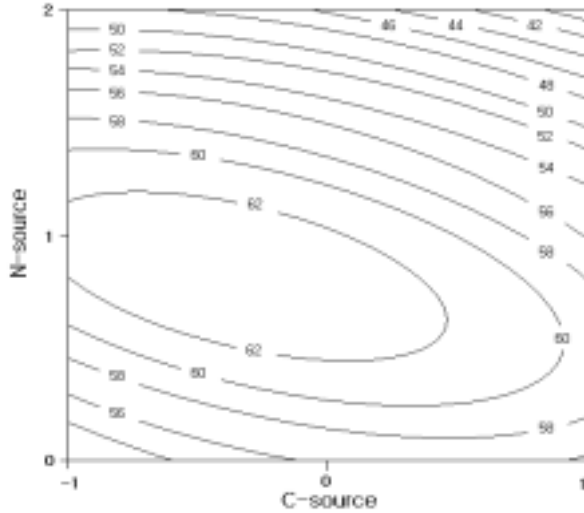


Fig. 6 탄소원과 질소원의 농도변화가 포자수에 미치는 영향

#### 6) 온도와 pH의 영향

발효환경의 온도 및 pH는 미생물의 생리적 성질에 직접적인 영향을 끼치며 이외에도 온도는 에너지와 직접적인 관련이 있으며, pH는 균주의 삼투압에 중요한 변수가 됨으로 발효공정의 중요 요소로 작용을 한다.

Fig. 7은 반응온도 20°C에서의 pH변화에 따른 포자수의 변화를 비교한 것과 pH의 변화에서 보여지듯이 pH 5.5에서 가장 높은 포자수를 보여주었다.

Fig. 8 (25°C)에서는 20°C에서보다 포자의 수가 감소함을 알 수 있었으나, 역시 pH가 5.5 일 때 최대 포자수를 나타내고 있었다.

Fig. 9 (30°C)에서는 25°C보다 감소량이 더욱 커짐을 알 수 있었으며 Fig. 10 (35°C)에서는 포자의 수가 거의 늘어나지 않음을 알 수 있었다.

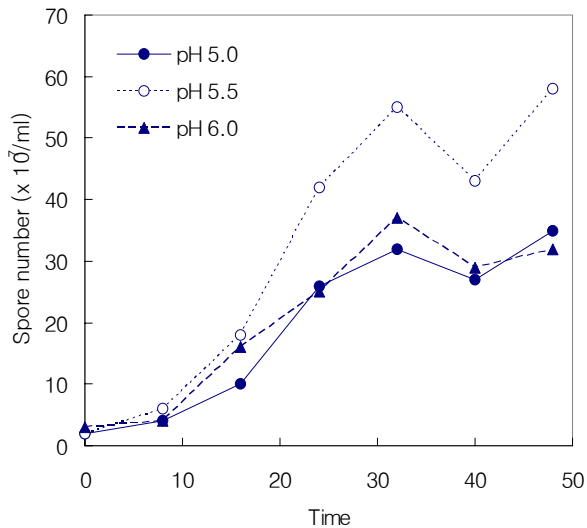
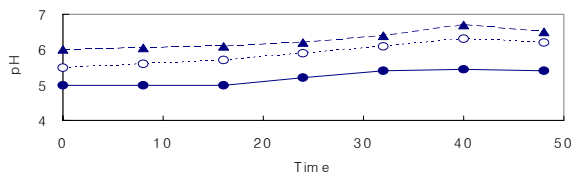


Fig. 7 20°C에서의 pH변화에 따른 포자수의 변화

따라서 온도가 일정온도 이상이 될 경우 균주가 온도의 영향으로 인하여 급격하게 활성을 보이지 못하는 것을 알 수 있었다. 그러나 모두 pH 5.5에서 높은 포자 생산량을 보여 이를 통하여 pH는 5.5에서 가장 높은 포자생산을 보이는 것으로 나타낸다. 모든 온도에서 pH는 급격하게 변화하지 않는 특성을 보였는데 이같은 원인으로서는 장유박의 농도가 pH를 결정하는데 있어서 중요한 역할을 하며 또한 완충용액처럼 작용을 하였기 때문인 것으로 사료된다.

Fig. 11은 반응온도와 pH의 영향을 동시에 나타낸 것으로 반응온도 20°C에서 가장 높은 포자수를 나타내었으며, pH 5.5에서 역시 가장 많은 포자를 생산함을 보였다.



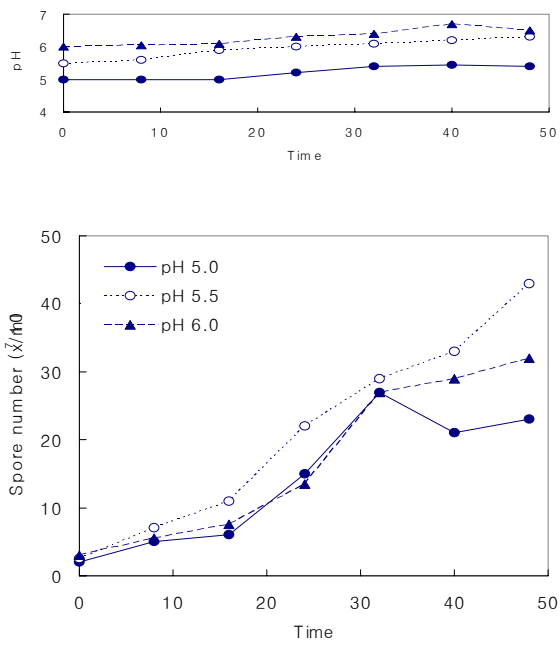


Fig. 8 25°C에서의 pH변화에 따른 포자수의 변화

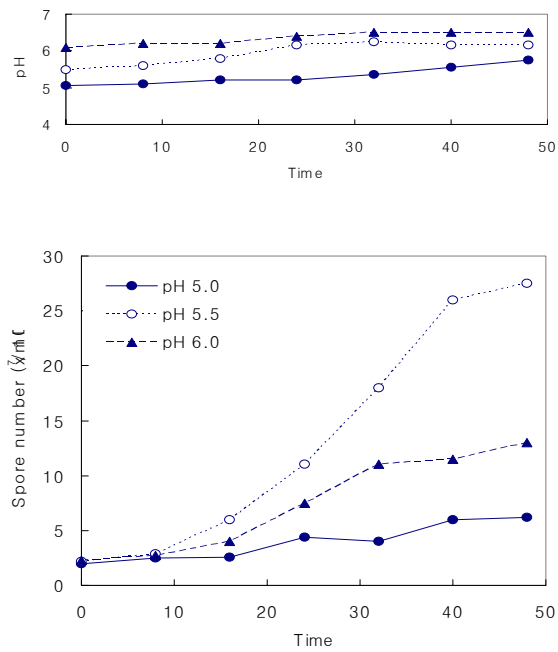


Fig. 9 30°C에서의 pH변화에 따른 포자수의 변화

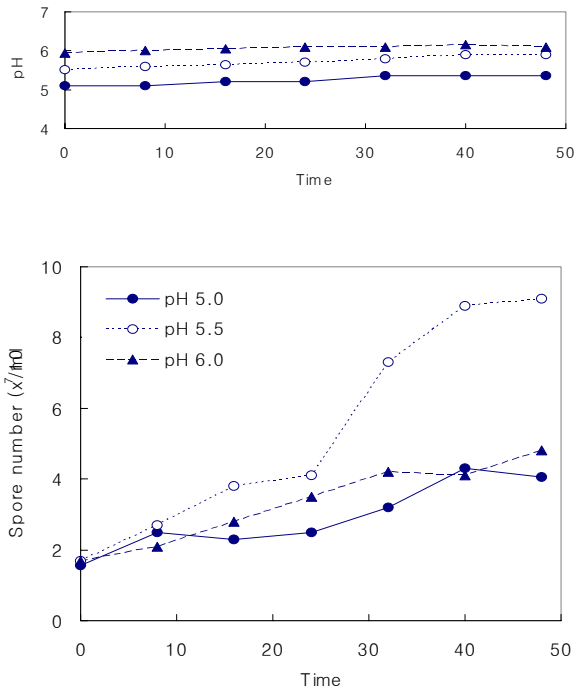


Fig. 10 35°C에서의 pH변화에 따른 포자수의 변화

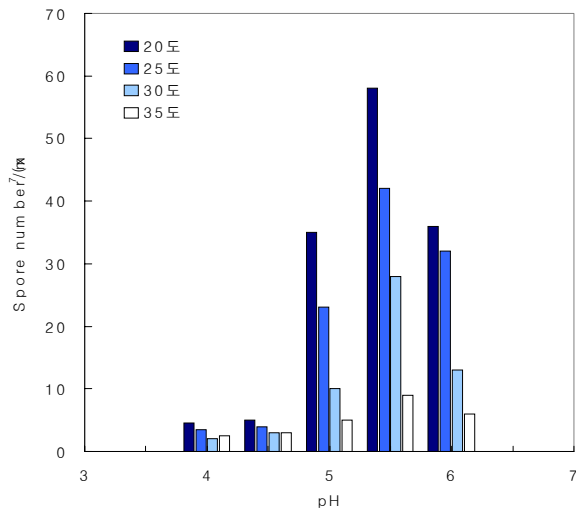


Fig. 11 온도와 pH변화에 따른 포자수의 변화

## 다. 제제화 연구

### 1) 보조제선발

제제를 위한 보조제를 선별하기 위하여 많이 사용되어지는 습윤제 분산제 증량제들의 포자의 초기 발아에 대한 영향을 조사하기 위하여 한천 배지에 각각의 성분을 2%로 처리하여 발아억제율을 조사한 결과 Table 9에서 보는 바와 같이 습윤제로는 TERWET1004가 가장 유리할 것으로 판단되었으며 분산제로는 Teric168이 가장 양호하였으나 포자발아억제율이 높아 사용이 바람직하지 못할 것으로 판단 되었다. 증량제로는 Bentonite, Celite 281이 발아억제율이 가장 낮았으나 Celite 281 쪽이 가비중 면에서 혼합에 유리할 것으로 판단되었다.

Table 9. 보조제가 포자발아율에 미치는 영향

보조제	발아율, %	
	8 hr	12 hr
control	92	94
습윤제 TERWET1004	87	91
PVP K-15	83	85
분산제 TERIC168	85	86
DISPERSE 101	81	81
증량제 Bentonite	90	92
Attagel 40	87	91
Celite 281	89	92

### 3) 시제품제작

액체배양물의 동결건조 후 최종 포자함량은  $3.1 \times 10^{10} - 1.2 \times 10^{11}$  cfu/ g 정도 수준이었다.

제제의 살충력을 확보하고 사용상의 편의를 위하여 최종 살포액 중의 포자함량의 수준을  $10^7 - 10^8$  cfu/ ml로 맞추기 위해 제제 중 포자 함량을 20%로 확정하였다.

나머지 부제들은 물리성을 조사하며 함량을 증감하였으며 최종시제품의 제조처방은 Table 10에서 보는 바와 같으며 수화제의 수화성은 만족할 만한 수준이었으며 분말도 기준인 325 mesh(95% up)를 얻기 위하여 air mill로 최종 혼합 분쇄하였다.

Table 10 시제품 제조처방서

Ingradient	content %
CS-626	20
TERWET1004	15
White carbon	15
Dextrose	15
Celite 281	rest
Total	100

## 2. CS-626균주의 병원성 형질전환 균주 개발

### 가. Protoplast 제조기술 확립

#### 1) 효소 선정

각각의 효소 또는 효소 혼합에 따른 protoplast 생성 효율을 조사한 결과 driselase를 사용하였을 때 가장 많은 protoplast가 생성됨을 알 수 있었다. 하지만 cellulase와  $\beta$ -glucuronidase를 사용하였을 때는 protoplast가 전혀 생성되지 않았다. 또한 driselase와 lysing 효소를 혼합하여 반응한 결과 protoplast 생성효율이 오히려 driselase만 반응했을 때 보다 저조하였다. 이러한 결과를 미루어 볼 때 driselase가 CS-626균주의 균사체로부터 protoplast를 제조하기에 가장 적합한 효소로 사료된다.

Table 1. Productivity of protoplast according to type of enzyme

Enzyme	No. of protoplast/g
Lysing enzyme	$1.50 \times 10^8$
Driselase	$6.11 \times 10^8$
Cellulase	$1.39 \times 10^7$
$\beta$ -glucuronidase	$2.78 \times 10^7$
Chitinase	$1.25 \times 10^8$
Pectinase	0

#### 2) Driselase 적정농도 구명

Driselase 효소의 적합한 농도를 구명하기 위해서 농도별 protoplast 생성 수를 조사해 본 결과 15 mg/ml 농도에서 가장 많은 protoplast가 생성되었으나 10 mg/ml 과 비교할 때 큰 차이가 없었고 경제성을 감안 할 때 10 mg/ml이 적합한 농도임을 알 수 있었다.

Table 2. Productivity of protoplast according to concentration of driselase

Concentration of driselase (mg/ml)	No. of protoplast/g
2	$1.8 \times 10^8$
5	$3.1 \times 10^8$
10	$6.2 \times 10^8$
15	$6.4 \times 10^8$

### 3) 삼투압 안정제 선정

CS-626균주의 protoplast 제조에 적합한 삼투압 안정제를 선발하기 위해서 5 종류의 삼투압 안정제에 대하여 실험한 결과 0.6 M의 KCl을 사용하였을 때 가장 많은 protoplast가 생성됨을 알 수 있었다. 1.2 M의 sorbitol과 mannitol의 경우는  $5 \times 10^8$  개 정도의 protoplast 생성이 있었으며, 1.2 M의 sucrose는 거의 protoplast를 생성하지 못하였다. 결론적으로 본 실험을 통해서 0.6 M의 KCl가 CS-626균주의 protoplast의 생산에 가장 안정적임을 알 수 있었다. (Fig. 1)

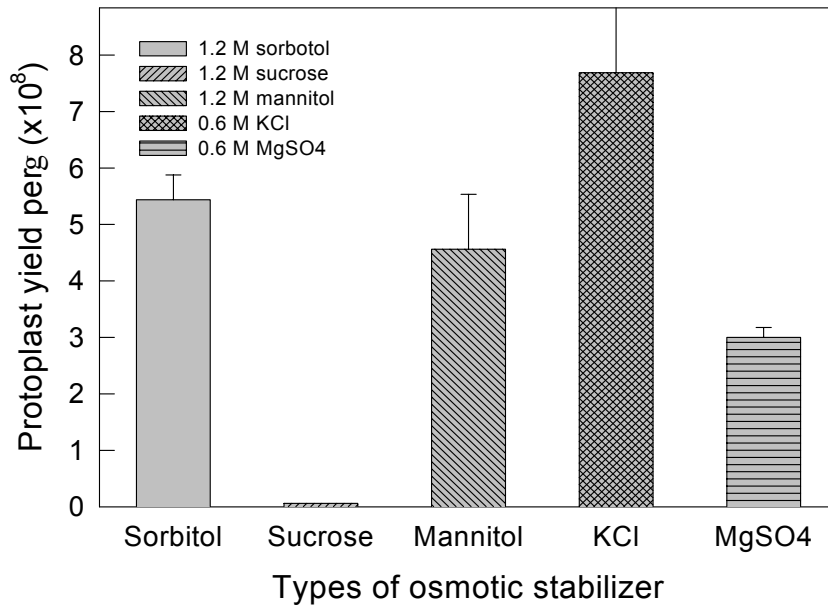


Fig. 1. Effect of osmotic stabilizer of the release of protoplasts from mycelia of *V. lecanii* CS-626 when 0.2 g of mycelia were incubated at 30°C with driselase.

#### 4) 효소 반응 처리 시간 구명

Protoplast 제조반응에 효소 반응 처리 시간을 구명하기 위해서 0.1 g의 균사체를 driselase와 lysing enzyme에 대해 1, 2, 3, 4, 5시간 동안 각각 반응하였을 때, 3시간 동안 driselase로 반응 처리했을 때 가장 많은 protoplast가 생성되었다. 3시간 이후엔 protoplast의 수가 감소하는 현상이 나타났으며, 균사체의 양이 증가될수록 생성되는 protoplast는 증가하지만, 0.3 g 이상의 균사체를 사용하는 경우 반응용액 속에 많은 양의 균사체로 인하여 반응용액의 균질한 혼합이 어렵고 그에 따라 protoplast 크기가 균일하지 않음이 관찰되었다. 0.1~0.2 g의 균사체를 사용하였을 때는 반응용액의 균질한 혼합이 용이하며 또한 균일한 크기의 protoplast가 생성되었다. 따라서 이러한 결과를 볼 때 0.1~0.2 g의 균사체를 driselase 효소와 3시간 반응할 때 효율적으로 protoplast를 제조할 수 있음을 알 수 있었다. (Fig. 2)

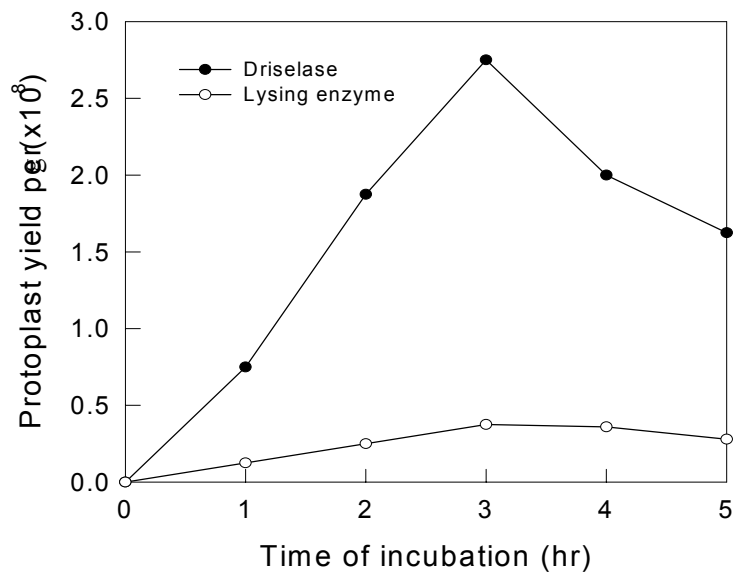


Fig. 2. Time course of the release of protoplasts from mycelia of *Verticillium lecanii* CS-626 when 0.1 g of mycelia were incubated at 30°C with driselase or lysing enzyme in 0.6 M KCl.

##### 5) 베노밀 농도에 따른 protoplast 재생

베노밀을 0 ppm부터 9 ppm까지 10 개의 농도를 달리한 PDA plate에 앞선 실험에서 결정한 방법으로 제조된 protoplast를  $1 \times 10^4$  protoplast/ml의 농도로 100  $\mu$ l 도말하여 protoplast의 재생을 저지하는 베노밀의 농도를 조사한 결과를 Table 3.에 나타내었다. Table 3.에서 보면 알 수 있듯이 베노밀 농도 4 ppm 첨가된 plate에서 protoplast 재생이 저지됨이 확인되었다. 이러한 결과는 fig. 3에서 확연하게 관찰되어지며, 형질전환된 균주를 선별할 때 기준 농도로 베노밀 4 ppm을 사용하였다.

Table 3. Protoplast regeneration according to different concentrations of benomyl

Concentration (ppm)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Regeneration remark	O	O	O	O	X	X	X	X	X	X







Fig. 3. Effect of benomyl on the regeneration of protoplast of *V. lecanii* CS-626. They were grown on PDA plate containing various concentration of benomyl ranged from 0 to 5 ppm and were incubated at 25°C for 7 days.

#### 나. 병원성유전자 도입을 통한 형질전환

##### 1) *Verticillium lecanii*의 genomic library 제작 및 promotor 분리

Lambda ZAP의 sense primer(S1)와 Pr1의 upstream 부분에서 디자인된 anti-sense primer(A1)를 이용하여 각각의 클론들을 PCR 증폭하였다. 위 실험 결과 *EcoRI*으로 처리한 클론에서 1000bp 이상의 단편들이 증폭되었음을 확인할 수 있었다. Pr1의 5' RACE 단편을 probe로 하여 promotor부분이 존재하는 것으로 추정되는 단편들을 southern blotting방법을 이용하여 확인하였다. Fig. 4에서와 같이 *EcoRI*으로 처리한 클론으로부터 PCR 증폭된 약 1200bp 단편에서 promotor부분으로 추정되는 Band가 확인되었다.

*EcoRI*      *BamHI*

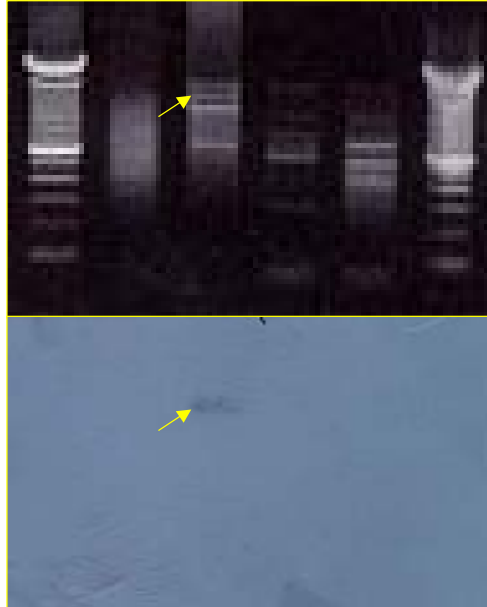


Fig. 4. PCR 증폭된 클론과 RACE 특이적인 probe에 의해 나타난 Southern blotting signal.

## 2) Promotor의 염기서열 조사

Promotor 부분의 염기서열을 auto sequencer로 조사하였을 때 782bp 위치에 있는 Pr1의 개시 코돈 (ATG) 의 -193bp에서 TATA BOX를 확인할 수 있었다.

```
1   AGA CCA TAT GAC CGG TCC ATT CTA TTC AAG GCT TGA CAT ATT GTG AAA CTA TCG TTC TCT
61  CAC AAT ATC CAG GAA AGC TAC CTT CTT TAC TTG GTT ATG ATT TCC AGT TCG TAG TCC AAC
121 CAT CGT TTA CAG ATG TTT CTT ACC GTT CCT ATT GTC TAA AGT TAG CGC CGT CAA GCG TAG
181 GTT GGA GTA ATT CCA CCT TGA CAT ATT GTG AAG TCC CGA TCG GAT TCT CAG CAT AGC TAT
```

241 CGA CTA CAC AGT CAT GAC AGT CCA TGC ACT GTC GTT CTC TCA CAA TAT CCT TTA CAA CTT  
 301 CGC TTA CGG AAA CTT ACG CAT GTC AAG TCC GTG GCA TGC TGC TTT TCA GGA CAA AAC TGC  
 361 CGT ACG TCC CGA TCG TTC GAC AAC CAA TCC ATT CTT CTC AAG TAG TGA TGC TAA CAT CTA  
 421 AGT AAA GAG GCT CTC AAT TGC TTT TAC GTT TCC AGA TCT ATC GAC AAT CAT TAT TTG GTT  
 481 GCA TGG CTA CGT CCG TCC GCT GTT GAT ATC CTT ATT ATA TAA GTC AAG CAA TCG TTC TTC  
 541 CTA CTT ACT AAA TTT GCC ACT CTG ATA AAA GTA TCA CCC ACT TTA CGT **TAT AAT** ATG TAG  
 601 CTA CTT TAC GTA TTC ATC CCA ACT ACA TAC TTA TCT **CAT** ATG TAA GTT ACG TAC AAC GTT  
 661 TAC TTA CTT ACG ATT TAC TTA TCT AAT ATC AAT GGC TAC GTC CGT CCC ATC ATC CAG CCT  
 721 TCT CAA ACA TGT AGT CGA CTG TCA CTG CAT GCG GTT GCA TGG CTA CGT CCG TCC GAT CGT  
 781 **CAT** GCA TCT TAG TTT CAT CGC CA

Fig. 5. Transformant에서 확인한 Promotor 부분의 염기서열. (붉은색 굵은 부분이 개시코돈과 TATA box)

### 3) Shuttle vector 제작

pBRG-4 내의 promotor 말단에 Pr1의 ORF를 접합하여 형질 전환용 vector를 제작하였다. Fig. 6은 형질전환용 vector, pBRG-4에 삽입된 유전자의 배치를 나타내고 있다.

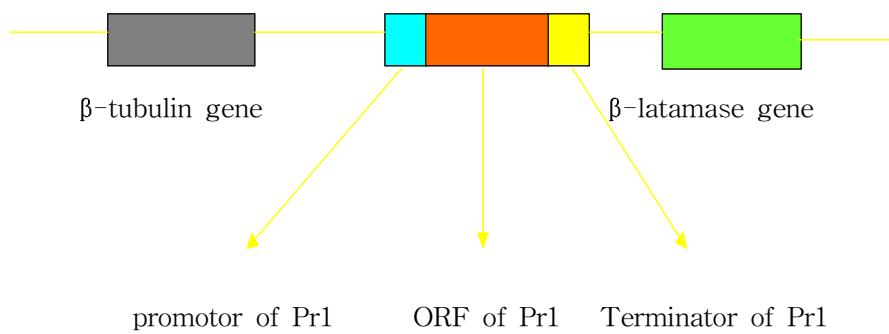


Fig. 6. 형질 전환용 vector인 pBRG-4에 삽입한 Pr1 gene의 배치.

Transformant에서 Pr1의 ORF를 PCR 반응으로 최종적으로 확인하였을 때 Fig. 7에서와 같이 약 500bp의 단편을 확인할 수 있었다.

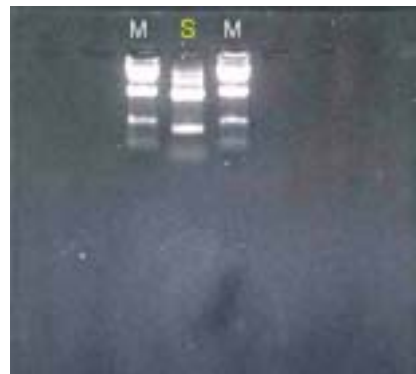


Fig. 7. Pr1의 ORF RACE product에서 디자인한 primer로 PCR 증폭하여 약 500bp의 단편 확인. (M: size marker - 맨 아래부터 125bp, 564bp, 2027bp, S: screening된 단편)

#### 4) CS-626균주의 형질전환

형질전환용 vector를 protoplast에 삽입한 후 선택배지에서 총 85개의 형질 전환균주를 선발할 수 있었으며, 그 중에서 고농도의 베노밀을 포함하는 배지에서도

활성을 유지하는 T-14, 34, 36, 41, 65, 69, 79등 7개의 균주를 선발할 수 있었다. vector가 CS-626균주의 genomic DNA 내부에 삽입되어있다는 것을 최종 증명하기 위하여 vector 특이서열의 primer로 증폭된 DNA 단편을 probe로 하여 Southern blot analysis를 수행한 결과, Fig. 8과 같이 상응하는 DNA단편이 형질전환균주에 존재함을 확인할 수 있었다.

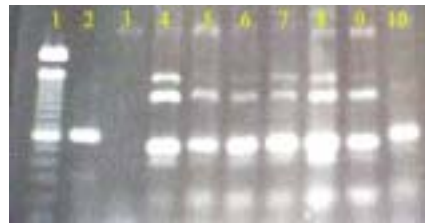


Fig. 8. PCR analysis of transformants using  $\beta$ -tubulin-specific primers.

형질전환균주를 vector 특이서열의 primer를 이용하여 PCR 증폭 한 결과 형질전환전의 CS-626균주의 DNA(line3)에서는 vector 자체(line2)에서와 같은 크기의 단편이 확인되지 않았으나 형질전환균주(line4~10)에서는 vector와 같은 크기의 단편이 증폭된 것을 확인할 수 있었다.

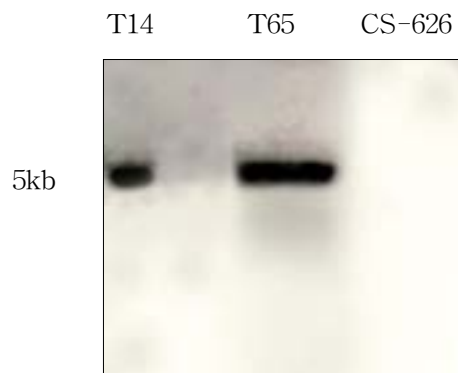


Fig. 9. Southern hybridization analysis of *V. lecanii* CS-626, transformant T14 and T65.

PCR로 증폭된 vector의 특이적인 단편을 probe로 하여 Southern blot analysis를 한 결과 형질전환균주의 약 5kb 위치에서 vector 단편을 확인할 수 있었다. 위의 결과는 형질전환용 vector가 CS-626의 genomic DNA 사이에 삽입되었음을 의미한다.

#### 다. 형질전환 균주의 특성조사

##### 1) 발아율

형질전환 균주의 포자 발아율을 비교할 때 발아의 기준은 포자의 폭과 같은 길이 혹은 그 이상의 발아관이 관찰 된 것으로 하였다. 베노밀이 없는 PDA 배지에서 12시간 배양 후 현미경으로 관찰하였을 때 발아율은 90% 이상이었다. 50 $\mu$ g/ml 농도의 베노밀 배지에서 T-36의 발아율은 91.75%에 이르렀다. 0~50 $\mu$ g/ml 농도의 베노밀 배지에서 형질전환 균주 사이의 발아율의 차이는 크게 없었지만 T-34의 경우 18.7% 라는 낮은 발아율을 보였다(Fig. 10).

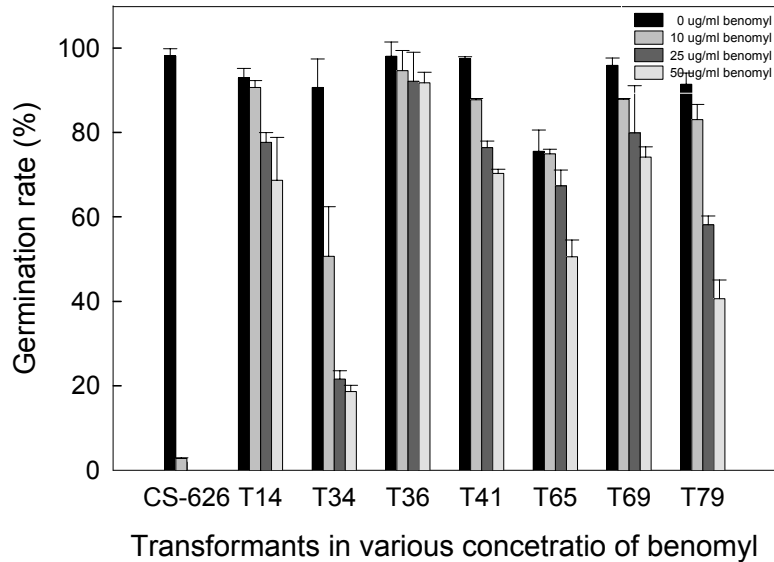


Fig 10. Inhibitory effect of benomyl on spore germination of *V. lecanii* CS-626 and transformants.

## 2) 성장속도

베노밀에 대해 큰 저항성을 보이는 7개의 균주는 서로 다른 성장속도를 보였으며 그 중 T-14와 T-65는 50 $\mu$ g/ml의 베노밀을 함유한 선택배지에서 높은 성장속도를 보였다. 7일 배양후 콜로니의 지름은 평균15.0  $\pm$  1.0 mm였다(Fig. 11). 그러나 형질전환하지 않은 CS-626은 같은 배지상에서 형질전환균주보다 성장하지 않았다. 이러한 차이는 형질전환균주에 들어있는 벡터의 베노밀 저항성 유전자에서 기인한다고 생각되어진다. 또한 이들 균주의 성장속도는 성장속도가 빠를수록 해충의 살상 속도를 높일 수 있기 때문에 곰팡이의 병원성을 결정하는 한 요인으로 생각할 수 있다.

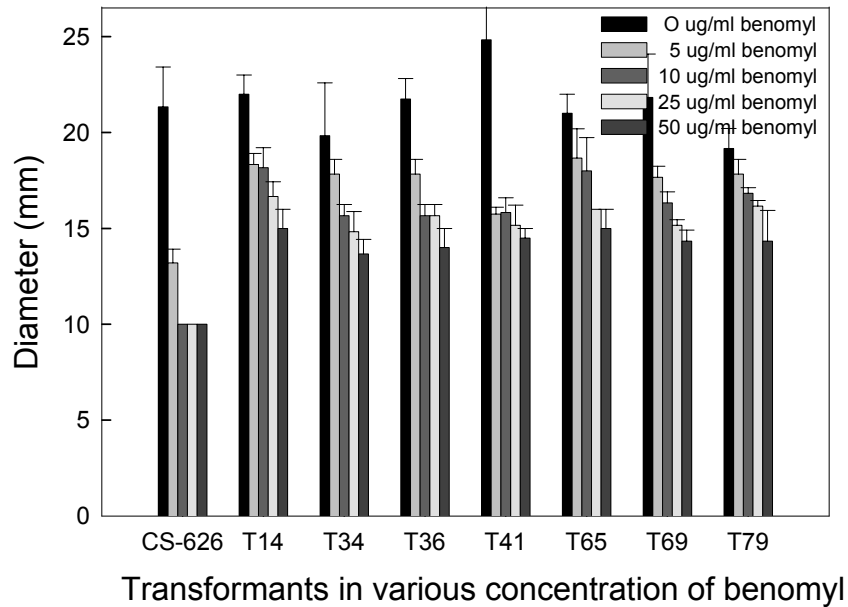


Fig. 11. Inhibitory effect of benomyl on growth of *V. lecanii* CS-626 and transformants.

### 3. CS-626 균주를 이용한 곰팡이 살충제의 효능검증 및 이용방법 연구

3년간의 연구 수행에 따라 총 5회의 포장검정 시험을 시도하였으며 이 중 4회의 실험이 정상적으로 이루어져서 아래와 같은 다양한 결과를 얻을 수 있었다. 이들 포장실험의 내용을 정리하면 Table 1과 같고, Fig. 1에서 각 포장실험을 수행하고 있는 하우스의 모습을 보여준다.

Table 1. List of field trials for the control efficacy of the *V. lecanii* CS-626 strain on greenhouse whitefly (2000~2003)



Year	Site	Plant (Planting)	Temp. °C (mean±SD)	R.H.(%)	Tests
Jun. 2000	Suwon	Tomato (mulching)	28.3±6.7	72.9±33.6	Mortality of scales, Adult densities in leaf strata of a tomato
Mar. 2001	Buyeo	Cherry tomato (nutriculture)	17.0±7.8	66.5±22.9	Change of whitefly adults density after treatment
Mar. 2002	Buyeo	Cherry tomato (nutriculture)	15.0±7.9	87.5±14.6	Spacial distribution pattern of scales in tomato leaflet, Control efficacy related to the whitefly density
Jun. 2003	Buyeo	Cherry tomato (nutriculture)	22.5±6.0	78.3±22.3	Mortality and control efficacy of the MPCP



Fig. 1. Photographs of the greenhouses in which the field tests were carried out from 2000 to 2003. A & B: Suwon at 2000, C~H: Buyeo at 2001 (C, D), 2002 (E), and 2003 (F-H).

### 가. CS-626 원제의 살충력 포장검정

수원의 하우스 검정실험에서 온실가루이에 대한 CS-626 포자현탁액 1회 분무 처리 결과,  $LT_{50} = 5.88(\text{일})$ 이었으며(95%신뢰구간, 5.84~5.93), 약충 살충율은 분무처리 7일차에  $69.4 \pm 10.5\%$ 를 나타내었다(Fig. 2, 3). 실험 수행 기간 중 하우스 내 온·습도의 변화는 심하였으며 특히, 낮기간 동안  $30^{\circ}\text{C}$  이상의 고온이 지속되었다. 이러한 조건에서 약 70%의 살충율을 나타낸 것은 CS-626균주의 강한 온도 저항력 때문으로 판단되었다.



Fig. 2. Scales and adults of whitefly infected by the CS-626 strain in tomato leaflet.

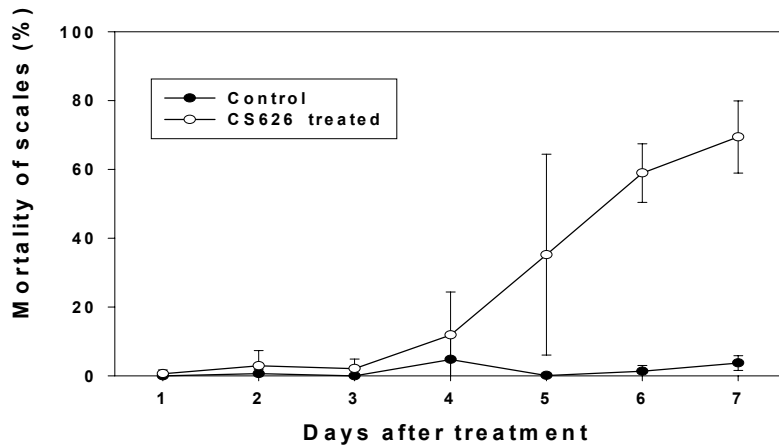


Fig. 3. Mortality (%) of whitefly scales by the conidial suspension of the CS-626 (June 2000, Suwon).

상기의 검정실험에서 CS-626포자현탁액에 의한 약충의 살충력은 증명할 수 있었으나, 환경조건 및 재배 방식의 변화에 따라 얼마만큼 방제효과가 나타날 것인지 조사할 필요가 있었으므로 부여군 농업기술센터의 연동식 하우스에서 2차 검정실험을 수행하였다. 토마토 5주 간격으로 점착 트랩을 설치하여 포획된 성충수와 토마토 잎에 발생한 성충수를 지속적으로 비교·조사한 결과, 포자 1회 분무처리에 의한 온실가루이 성충 발생 억제율이 토마토 상위엽에서 72%정도로 1차 수원실험과 동일하게 양호한 방제효과를 나타내었으나 지속력이 약하여 1주 간격으로 2회 분무 처리하였을 때 약 3주간의 방제 효과를 유지할 수 있었다(Fig. 4, 5). 이와 같은 약효의 지속력은 CS-626 균주가 하우스 환경조건에 잘 적응할 수 있도록 제제화될 필요가 있음을 보여주는 것이었다. 분무처리 실험 기간 중 온도  $17.0\pm 7.8^{\circ}\text{C}$ , 상대 습도  $66.5\pm 22.9\%$ 로써 변동이 심하였으며 3월 중순까지 야간에 하우스 내 평균 온도는  $15^{\circ}\text{C}$  이하를 나타내었다. 상기 온도 조건 및 양액재배방식으로 인한 낮은 상대습도는 CS-626 포자 활성을 다소 저해하는 요소로 작용하였다. 본 실험에서 점착 트랩과 육안조사를 병행하여 비교한 결과, 육안조사 결과와 점착트랩에 의한 온실가루이 밀도 변동 양상에 차이를 나타내었다(Fig. 4, 5). 향후 보다 정확하면서도 간편한 해충 밀도조사 기술과 도구의 개발이 미생물농약의 처리효과를 최대화하는 데 필수적으로 요구될 것으로 전망되었다.

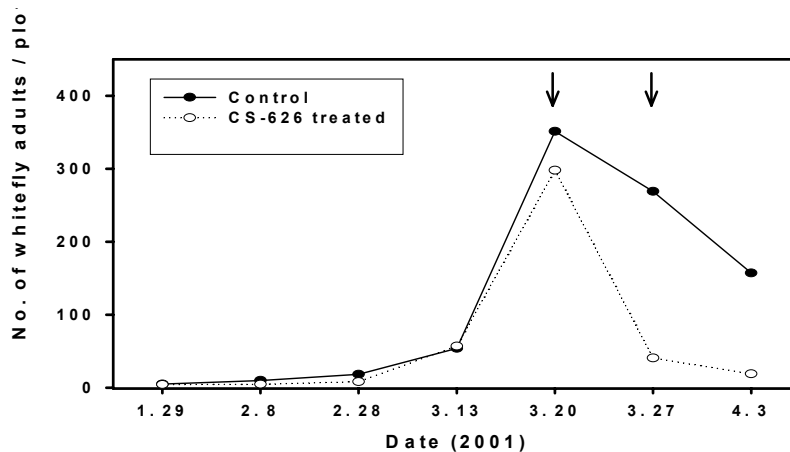


Fig. 4. Density of whitefly adults in higher shelves of cherry tomato plants in a

greenhouse. Temperatures are  $17.0 \pm 7.8^\circ\text{C}$ , and relative humidity was  $66.5 \pm 22.9\%$  at the first application. Arrows: application of conidial suspension of the CS-626 strain (2001, Buyeo).

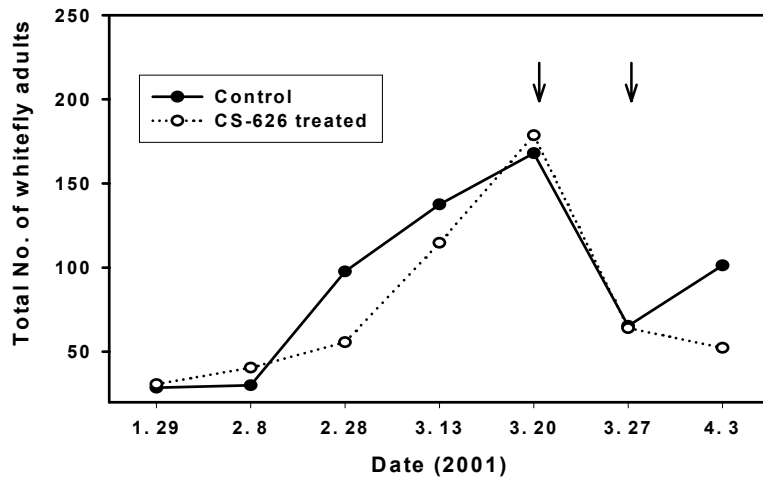


Fig. 5. Total number of whitefly adults attached to sticky traps. Arrows: treatments of conidial suspension of the CS-626 strain (2001, Buyeo).

#### 나. CS-626 제제(수화제)의 분무처리 특성 및 살충력 포장검정

본 과제의 주관기관인 한국삼공(주)에서 개발한 제제(수화제)의 온실가루이 살충력 검정을 2년차와 3년차에 수원과 부여 하우스 포장에서 수행하였으나, 2년차에는 개발된 제제의 점도가 높아 토마토 잎에 심하게 들러붙어 호흡을 저해하여 약해가 발생함에 따라 지속적인 검정실험을 수행하지 못하였다. 그러나 3년차에 다시 개발한 제제는 물리성이 많이 개선되어, 분무처리 후 약흔이 심하게 나타나지 않고 약해도 전혀 없었기에 살충력 검정시험을 성공적으로 수행할 수 있었다(Fig. 6).

CS-626균주의 원제와 제제의 살충력을 비교하기 위하여 우선 실내 생물검정을 하여 제제도 원제와 동일한 살충력을 보유하고 있음을 확인하였다. Table 2에서는 원제와 제제의 실내 및 포장에서의 살충력 검정 결과를 비교하여 나타내었는데, 생물검정에서는 분무처리 초기에 제제의 살충력이 원제보다 낮았으나 포장검정에서는 이와 반대로 초기 살충력이 크게 높았다. 이는 균주의 대량배양 및 제제화하는 과정에

서 원균주 이외의 다른 균에 오염되어 실내 생물검정에서 살충력을 저해하는 요인으로 작용하였고, 포장에서는 제제에 사용된 보조제의 역할로 분무처리 초기에 살충력이 높게 나타나는 결과를 얻은 것으로 판단되었다. 포장검정에서는 제제의 처리 농도를  $1 \times 10^8$  CFU/ml과  $5 \times 10^7$  CFU/ml 두가지로 구분하여 실험한 결과, 분무처리 10일차에 두 처리구간에 25.1%의 살충률 차이를 보임에 따라 효율적인 방제 효과를 위해서는  $1 \times 10^8$  CFU/ml 이상의 포자농도를 유지할 필요가 있다고 평가되었다(Fig. 7).  $1 \times 10^8$  CFU/ml 처리구에서  $LT_{50}$ 은 5.4일(95%신뢰구간, 4.8~5.9)이었다. 이와 더불어 Fig. 8에서 볼 수 있듯이 제제의 분무처리에 따른 온실가루이 성충의 밀도 변동을 점착트랩으로 조사하였다. 1회 분무처리 후 대조구와 비교하여 처리구에서 성충 밀도가 급격히 감소하였으나, 분무처리 20일 이후 시험구에 발생한 흰가루병으로 인해 대조구에서도 전체적으로 해충밀도가 감소하여 반복처리에 의한 효과를 정확하게 볼 수 없었다. 본 검정에서 성충발생억제율은 1회 분무처리 후 10일차에 최대로 200%에 달하였다. 한편, 위에서 언급한 바와 같이 현재까지 개발된 CS-626균주의 제제는 기타 균들에 의해 오염이 많이 되는 상태이다(Fig. 9). 높은 살충력과 제제의 개선된 물리성에도 불구하고 향후 작물체 및 과실에 유해한 미생물의 발생을 방지하기 위해서는 제제의 잡균 오염을 감소시킬 수 있도록 배양기술과 제품의 개선이 필요하다.



Fig. 6. Comparison of phytotoxicity test between the application of the MPCA (A), the MPCPs (B, D), and the chemical pesticides (C; buprofezin and furathiocarb). A: clean and healthy, B: severely injured by the first formulated product at 2002,

C: marks by chemical pesticide treatment, D: negligible marks by the final formulated product at 2003.

Table 2. Comparison of the mortality (%) between the MPCA and the MPCP of the CS-626 strain\*

DAT	Bio-assay		Field test	
	MPCA	MPCP	MPCA	MPCP
3	41.3 ± 9.1	24.5 ± 6.9	–	–
5	87.6 ± 6.5	72.1 ± 19.4	16.7 ± 11.4	44.8 ± 20.7
7	99.6 ± 0.4	94.3 ± 2.4	84.1 ± 9.7	79.8 ± 14.2
10	–	–	88.6 ± 7.8	91.5 ± 5.2

\*Conidial concentration :  $1 \times 10^8$  CFU/ml.

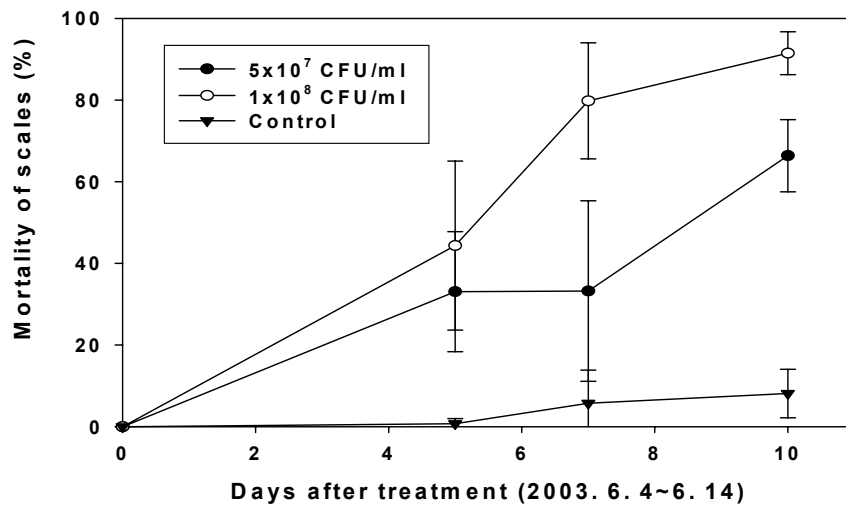


Fig. 7. Mortality (%) of whitefly scales in cherry tomato leaflets by application of

the MPCP.

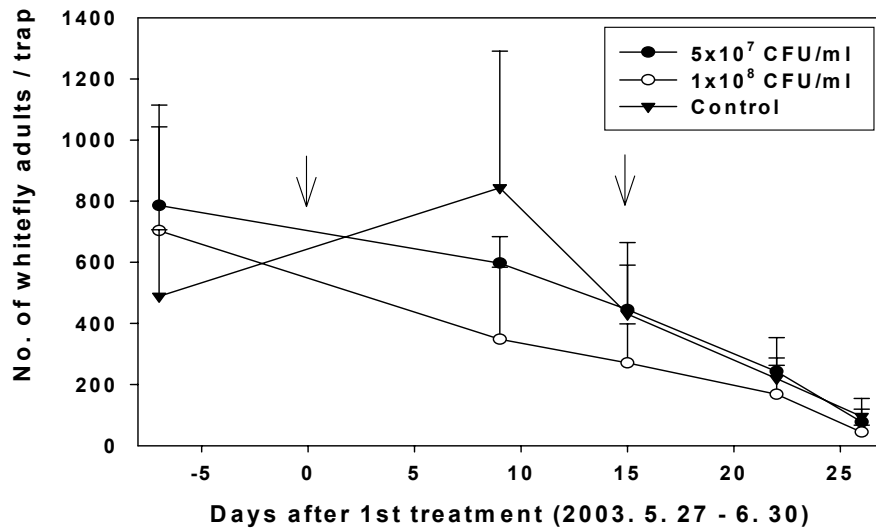


Fig. 8. Change in number of whitefly adults per sticky trap during the field test of the MPCP. Arrow: the first (6. 4) and second (6. 19) application.

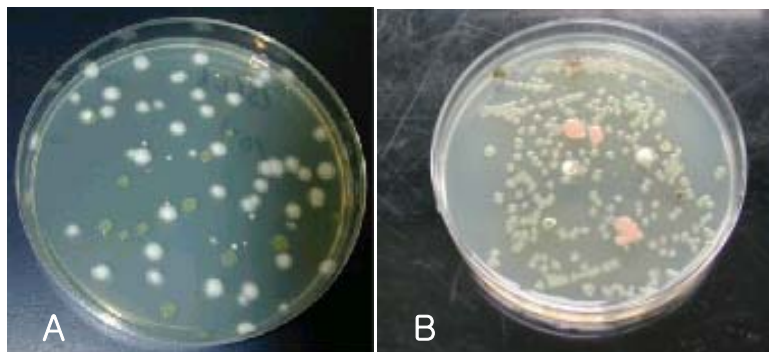


Fig. 9. Culture of microbes in the MPCP of the CS-626 strain. A: from the first product at 2002, B: from tomato leaflets treated by the final product at 2003. All of the MPCPs were contaminated severely by bacteria and fungi. the solution of each MPCP was diluted and cultured in the PDA containing 100ppm streptomycin.

## 다. CS-626 균주의 살충력에 영향을 미치는 생물적 요인

온실가루이에 대하여 높은 살충력을 나타내는 CS-626균주를 실내 생물검정으로 선발하고 이의 특성을 조사하는 과정에서 연구되어 온 사항은 약충에 대한 단순한 살충력(LT<sub>50</sub>, LC<sub>50</sub> 등), 분비 효소 활성화도, 화학농약에 대한 균주의 저항성 등 주로 균주 자체의 생물적 특성에 초점이 맞추어져 왔다(이 등, 2000; Lee *et al.* 2002; 이 등, 2003). 또한 포장내의 온·습도, 자외선 등 환경조건이 살충력에 미치는 영향은 많이 보고가 되었으나, 천적이나 해충 등 생물적 요인이 *V. lecanii*의 살충력에 미치는 영향은 거의 연구가 이루어지지 않았다. 작물체 주변의 미기상, 작물의 구조 및 형태적 특성, 해충의 밀도 등은 모두 곤충병원성 곰팡이의 포자가 기주인 해충에 전달, 부착되어 발병하는데 중요한 요인들이다. 특히, 대상 해충과 미생물농약의 상호 관계에 대한 이해는 미생물농약의 약효를 정확히 평가하는데 중요한 단서를 제공한다. 그러나 온실가루이의 생리·생태적 특성이 *V. lecanii*의 살충력 및 방제 효과에 미치는 영향에 대한 연구는 거의 보고된 바 없다. *V. lecanii*는 감염충 표피를 뚫고 균사체가 나와 2차 포자를 형성하여 주변의 다른 충을 감염시키므로 감염충 개체의 위치는 살충 효율에 중요한 요인이 될 수 있다. 이와 같은 조사가 진딧물 해충인 *Acyrtosiphon pisum*과 이의 병원성 곰팡이인 *Pandora neoaphidis*에서 이루어졌는데, 감염충의 분포와 이동성은 이 병원균의 전염력에 크게 영향을 미쳤다(Jensen *et al.* 2001).

그러므로 본 연구에서는 온실가루이에 대한 미생물농약의 포장검정을 수행하는 동안 포장, 토마토 주내 또는 소엽 내에서 약충 및 성충의 분포 양상과 밀도에 따라 살충력에 차이가 있는지를 조사함으로써, 미생물농약의 방제효과에 미치는 생물적 요인을 분석하고 그 중요도를 파악하고자 하였다.

### 1) 포장 및 토마토 주내에서 온실가루이 성충의 분포 양상

토마토 주내에서 온실가루이의 분포 양상이 다른 잎의 위치에 따라 CS-626 균주의 분무처리에 따른 살충 효과가 차이를 나타내는 지 조사할 목적으로, 연구 1년 차에 수원의 하우스포장 실험에서 토마토 잎의 분포 층위를 하위엽(지상 60-120cm)과 상위엽(지상 120-150cm)으로 구분하고 분무처리 전후의 온실가루이 성충 우화율을 조



사하였다. 이는 온실가루이가 포장 전체에서뿐만 아니라 토마토 주내 집중 분포한다고 알려져 있기 때문이다(Eggenkamp *et al.* 1982; Noldus *et al.* 1986; Martin and Dale 1989; Xu 1991; Van Lenteren and Noldus 1989; Jiang *et al.* 1999; 김 등 1999). 성충 밀도 조사는 온실가루이의 분산 및 활동이 줄어드는 오후 4~6시에 수행하였다. 그 결과 상위엽에서 60.9%, 하위엽에서 72%의 성충 발생이 감소하였다(Table 3, 4). 포자를 첨가하지 않은 동량의 용액을 분무한 대조구와 비교하였을 때, 성충 발생 억제 주요한 요인이 CS-626 포자현탁액의 분무처리 효과임을 알 수 있다.

1차년도 부여의 하우스포장 실험에서도 상기 수원에서의 실험과 동일하게 토마토 잎의 분포 층위별로 상위엽과 하위엽을 구별하여 성충 밀도를 조사하였으며, 토마토 5주 간격으로 점착 트랩을 설치하여(Fig. 1-D) 포획된 성충수와 토마토 잎에 발생한 성충수를 지속적으로 비교·조사하였다(Fig. 4, 5). 그 경향은 1차 수원 실험과 동일하였는데, 대조구와 비교하여 성충 발생억제율로 보정을 하면 상위엽에서의 72%의 방제 효과를 얻을 수 있었다.

상기 실험 결과와 같이 토마토 주내 엽층위(leaf stratum)에 따라 살충력이 다르게 나타나는 것은, 온실가루이가 층태에 따라 토마토 주내에서 분포를 달리하고 있기 때문이다. 김 등(1999)은 온실가루이가 층태에 따라 방울토마토 주내에서 분포가 달라짐을 관찰하였다. 즉, 상위 2-4번 엽에는 1-2령충, 8-12번 엽에는 3-4령충이 집중 분포하고 성충은 상위 2번엽에서 높은 밀도로 존재하였으며 나머지 엽에서는 낮은 밀도로 균일하게 분포하는 것을 확인하였다. 이러한 온실가루이의 기주내 수직분포특성은 온실가루이 성충이 산란시 상단부위 어린잎을 선호하는 특이한 생활사와 방울토마토의 줄내림방식 재배에서 기인된 것으로 보고되었다(Van Lenteren and Noldus 1989; Martin and Dale 1989). 즉, 줄내림방식에 의한 방울토마토 재배로 인해 온실가루이 층태별 방울토마토 주내의 밀도분포는 식물체의 위치에 따라 온실가루이 층태별 수직분포가 고정되는 현상을 보였다. 본 연구에서는 줄내림방식에 의한 방울토마토 재배에서 뿐 아니라 지주로 고정시킨 대과종 토마토에서도 동일한 온실가루이의 분포 양상을 보였으며, 특히 성충이 상위엽에 집중분포하는 현상으로 인해 상위엽 부위에 존재하는 성충 수만으로 미생물농약의 방제 효율을 평가하면 상대적으로 저평가되는 경우가 발생할 수 있음을 알 수 있었다(Table 3, 4).

Table 3. Change of number of whitefly adults in each leaf stratum after the CS-626 treatment

	Number of whitefly adult (n/leaf)*			
	Innoculated no. of adults	1day before treatment	1 week after treatment	
			Higher shelves	Lower shelves
Control	0.58±0.07 (114)	0.11±0.05 (110)	35.31±23.78 (2,860)	11.26±4.84 (912)
CS-626 treated	0.53±0.07 (89)	0.21±0.21 (210)	26.35±10.97 (2,134)	6.03±3.85 (488)

\* mean±SD; Numbers in brackets are the total no. of whitefly adults counted.

Table 4. Emergence and control ratio (%) of whitefly adults in each leaf stratum one week after treatment of the CS-626

	Emergence ratio (%)		Control ratio (%)*	
	Higher shelves	Lower shelves	Higher shelves	Lower shelves
Control	321	102.4	0	0
CS-626 treated	125.5	28.7	60.9	72

\* Control ratio (%) = 100 - [(Ratio of emergence ratio of the CS-626 treated plot to the control plot) x 100].

토마토 하우스 포장 내에서 온실가루이 발생 밀도가 다른 경우에 CS-626균주의 방제효과를 비교·조사할 목적으로 부여의 방울토마토 양액재배하우스에 각 40m<sup>2</sup>의 망사처리구 4개를 설치하고(Fig. 1-E) 2002년 1월 중순 온실가루이 밀도를 저·중·고밀도로 달리하여 방사하였다. 포자분무처리 대조구와 저밀도구에는 토마토 주당 성충 2마리, 중밀도구에는 주당 5마리, 고밀도구에는 주당 10마리씩 투입하여 인위적으로 1세대 약충 밀도를 형성시킨 결과, 성충 방사 1개월 후 처리구별 토마토 엽당 약충수가 대조구 9.8±5.0, 저밀도구 9.2±2.1, 중밀도구 14.6±7.8, 고밀도구 18.7±3.8 마리였고 주당 약충수와 주당 약충발생엽수는 Table 5와 같다. 초기 성충방사 5주 후, CS-626균주의 포자현탁액 1×10<sup>8</sup> CFU/ml을 분무처리 하였으며 처리 후 10일간 살충률을 조사하였다. 그 결과, 고밀도구에서는 88.6%의 살충률을 보였고 저밀도구와 중밀도구에서 각각 47.9, 49.9%의 살충률을 나타내어(Fig. 10), 분무처리 후 살아남은 약충수는 Table 6과 같고 이를 엽당 살아남은 약충수로 계산하면 대조구 9.2±5.8, 저밀도구 4.7±2.5, 중밀도구 8.2±7.0, 고밀도구 2.0±1.3 마리였다. 고밀도구에서는 분무처리 5~7일차(Log phase)에 살충율의 급격한 증가를 보인 반면, 저·중밀도구에서는 Log phase 동안 살충율의 급상승이 나타나지 않았다.

Table 5. No. of whitefly released and emerged from the first releasing in each plot

Plot	No. of plant surveyed	No. of the first releasing per plant	No. of emerged scales per plant	No. of infested leaves per plant
Control*	10	2	7.17±8.93	2.00±1.91
Low density	12	2	6.92±8.52	1.77±1.54
Middle density	13	5	16.67±17.39	2.83±2.21
High density	12	10	19.67±18.42	3.00±2.66

\* Control for the mortality test by the application of the CS-626 strain.

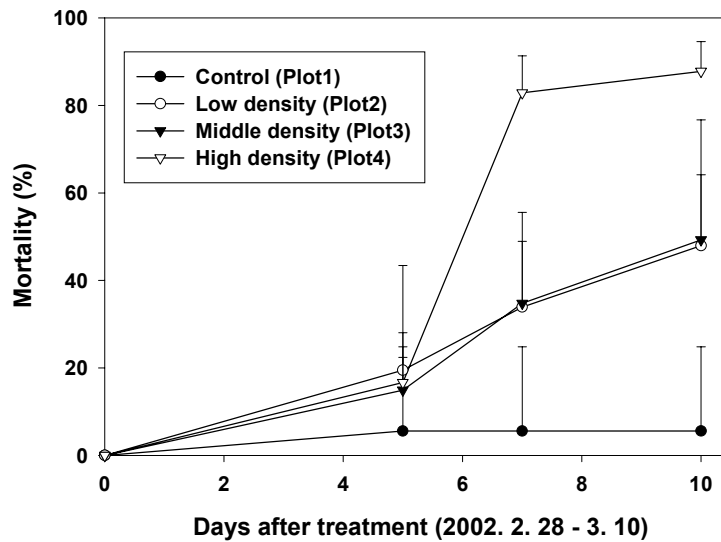


Fig. 10. Mortality (%) of whitefly scales in tomato leaflets after the application of the CS-626 strain in each plot of different whitefly density.

Table 6. No. of survived whitefly scales 10 days after treatment of the CS-626 strain

Plot	No. of plant surveyed	Total No. of scales	Total No. of survived scales	No. of scales survived per plant*
Control	12	99	95	14.8±4.1a
Low density	6	55	28	8.5±3.7ab
Middle density	6	110	61	9.4±6.5ab
High density	8	141	16	2.4±0.9b

\* Tukey's test: df=14; F=6.16; Pr>F=0.0068.

분무처리 조사기간 종료 후 2주 동안 점착트랩에 채집된 온실가루이 성충 수는 Table 7에서 볼 수 있듯이 방제효과에 의한 처리구별 성충 발생량의 차이를 확인할 수 있었다. 또한 다음 세대 온실가루이 발생수도 대조구와 비교하여 모든 분무처리구가 현저히 적어 Table 8에서 볼 수 있듯이 대조구와 비교하여 고밀도구의 총 발생량은 23.6% 수준이었다. 이를 소엽당 충수로 계산하면, 대조구  $26.8 \pm 18.0$ , 저밀도구  $16.3 \pm 12.5$ , 중밀도구  $18.3 \pm 19.7$ , 고밀도구  $5.9 \pm 7.3$  마리였다. 상기 실험 기간동안 각 처리구별 온도와 상대습도를 측정하였는데 처리구 간에 온·습도 차이는 크게 일어나지 않았으며 분무처리 조사기간 중 평균 온도는  $15.0 \pm 7.9$  °C, 상대습도  $87.5 \pm 14.6\%$  로 살충력을 나타내는데 크게 저해하지는 않았음을 알 수 있었지만, 새로운 세대의 온실가루이가 발생하였던 3월말 이후부터는 평균온도가 급상승하여(Table 9) 온실가루이의 세대기간이 짧아지고 발생량이 증가하면서 발생 양상이 복잡해졌으므로 단순 1회 분무처리만으로 지속적인 방제효과를 유지할 수는 없었다.

Table 7. No. of whitefly adults attached to sticky traps during 2 weeks after the mortality test of 10 days\*

Plot	No. of whitefly adults per trap
Control	101
Low density	42
Middle density	36
High density	20

\* One sticky trap (30cm x 15cm) was installed in a plot.

Table 8. No. of newly emerged whitefly 6 weeks after the application of the CS-626 strain\*

Plot	Total No. of whitefly			No. of whitefly per leaf
	Sum.	Egg	Scale	
Control**	1,227	810	417	136.3 ± 70.6
Low density	816	525	291	90.7 ± 36.2
Middle density	676	476	200	75.1 ± 68.2
High density	289	218	71	32.1 ± 13.6

\* Counting date: April 5, 2002; Survey was carried out in the higher leaf shelves, 34~39th leaves from the underside, of three cherry tomato plants.

\*\* Control for the mortality test by the CS-626 strain.

Table 9. Temperature and relative humidity during the experiment

Period	Temperature (°C)			R. H. (%)		
	Mean±SD	Max.	Min.	Mean±SD	Max.	Min.
2 weeks after the first releasing of adults (1. 16-1. 30)	13.0±0.4	34.9	6.6	93.2±1.4	100	35.4
Egg ~ 3rd scale (1. 31-2.27)	14.2±7.0	37.4	7.0	87.9±10.8	100	24.6
Conidial treatment (2. 28-3. 1)	13.0±4.9	27.1	9.0	90.9±14.7	100	31.2
After treatment (3. 1-3. 11)	15.0±7.9	42.0	6.2	87.5±14.6	100	27.7
Newly emerged scales (4. 1-4. 15)	18.3±7.6	42.5	6.2	76.8±25.3	100	22.3

## 2) 토마토 소엽내에서 온실가루이 약충의 밀도 및 공간분포 양상

포장 내 온실가루이 밀도에 따른 살충력의 차이를 나타낸 원인을 조사하기 위해, 부여 하우스포장실험에서 살충력 검정시험이 수행된 각 시험구내 토마토의 소엽을 표본추출하여 소엽 내 존재하는 약충 수를 조사하고(Fig. 11) 한 소엽 내 전체 약충 간의 거리 평균 및 밀도를 측정하였다(Table 10). 그 결과 초기 온실가루이 성충 방사량이 많은 시험구일수록 토마토 주내에서 약충이 10마리 이상 발생한 소엽의 수가 많았다(Fig. 11). 즉 초기 온실가루이 방사 밀도에 의해 각 처리구내 토마토 소엽에 발생한 약충의 밀도에 차이를 보였으며, 이들 소엽내 약충간 평균거리도 처리구에 따라 큰 차이가 있었다(Table 10). 특히, 고밀도구에서 약충간 거리가 짧고 소엽의 일정 면적 내에 더 많은 약충이 존재하고 있었다. 즉, 살충력의 차이와 소엽 내 약충간 평균거리의 차이에는 부(negative)의 관계가 있었는데, 이에 따라 많은 수의 약충들이 서로 가까이 분포하였던 고밀도구에서 분무처리에 따른 살충률 Log phase 동안에

(Fig. 10) CS-626균주의 2차감염이 빠르게 일어나 고독의 살충률을 나타내었다고 추정되었다.

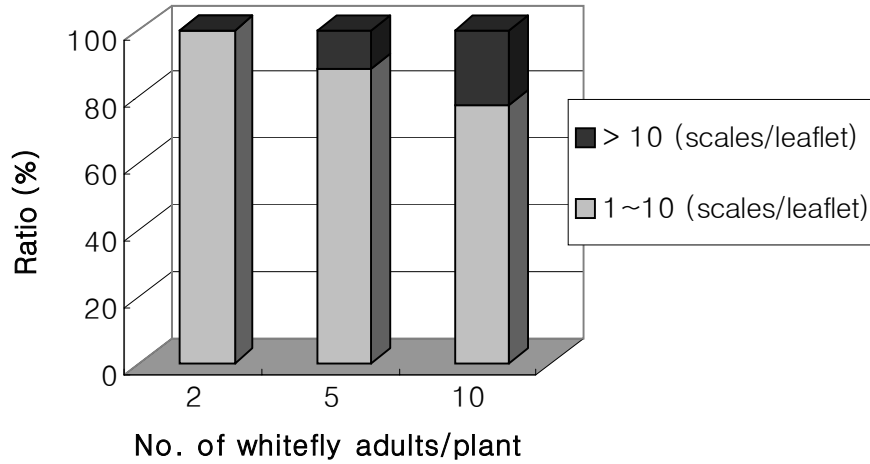


Fig. 11. Ratio (%) of the leaflets of different numbers of scales 1 month after the first releasing of whitefly adult.

Table 10. Density of whitefly scales in a cherry tomato leaflet sampled for the mortality test by the CS-626 strain

Plot	Density of scales (No./cm <sup>2</sup> )	Mean distance ± SD (cm)
Low density	1.62±1.04	1.71±0.73
Middle density	2.48±0.15	1.27±0.13
High density	3.63±0.96	0.74±0.28



포장에서의 조사와 더불어 보다 정밀하게 온실가루이의 밀도와 살충력간의 관계를 구명하고자, 토마토 주당 2~20마리의, 서로 다른 수의 온실가루이 성충을 접종하여 다양한 약충 밀도를 갖는 토마토 소엽을 만들었다. 그 결과, 성충 접종량이 증가함에 따라 산란된 소엽수가 증가하였으며(Table 11) 상기 부여의 포장실험 결과와 동일하게 약충 발생 수가 많은 소엽의 수도 증가하였다. 이들 소엽의 뒷면에 붙어있는 약충들의 공간분포지도(spatial map)를 작성(Fig. 12)한 후 최근거리추정법(Nearest Neighbour method; Clark and Evans, 1954)에 의거하여 엽면적, 약충 밀도, 약충간의 최단거리 평균 및 공간분포 유형 등을 조사하였다(Table 12). 그 결과, 토마토 소엽내의 약충은 밀도가 증가함에 따라 층간의 최근거리가 감소하였으며(Fig. 13), 밀도가 일정 수준 이상이 되면 규칙적 분포에서 집중 분포로 공간분포 양상이 변화하였다(Table 12).

Table 11. No. and ratio (%) of infested leaflets by injection of the different no. of whitefly adults per tomato plant

No. of adults innoculated	Total No. of leaflets	Total No. of infested leaflets	Ratio (%) of infested leaves (Mean ± SD)*
2	123	10	8.33±5.16a
5	113	19	16.84±8.43ab
10	124	25	19.62±10.51b
20	116	42	36.92±10.00c

\*LSD test : df=20; F=11.21; Pr>F=0.0002.



Fig. 12. Spatial map of the whitefly scales in a tomato leaflet. red point: site of each scales; Data from 4 sample sites surrounded by the veins were pooled for the spatial analysis.

Table 12. Spatial distribution pattern of whitefly scales in the sample area on a leaflet

Range of density	Individuals/cm <sup>2</sup> (Mean ± SD)	Distance (mm) (Mean ± SD)	R* (Mean ± SD)	Dispersion**
< 10	7.2 ± 2.4	2.7 ± 0.6	2.2 ± 0.9	Regular
10~20	15.2 ± 4.4	2.0 ± 0.3	1.1 ± 0.3	Regular
> 20	22.1 ± 2.8	1.6 ± 0.2	0.7 ± 0.1	Clumping

\* Index of aggregation, \*\* P<0.001.

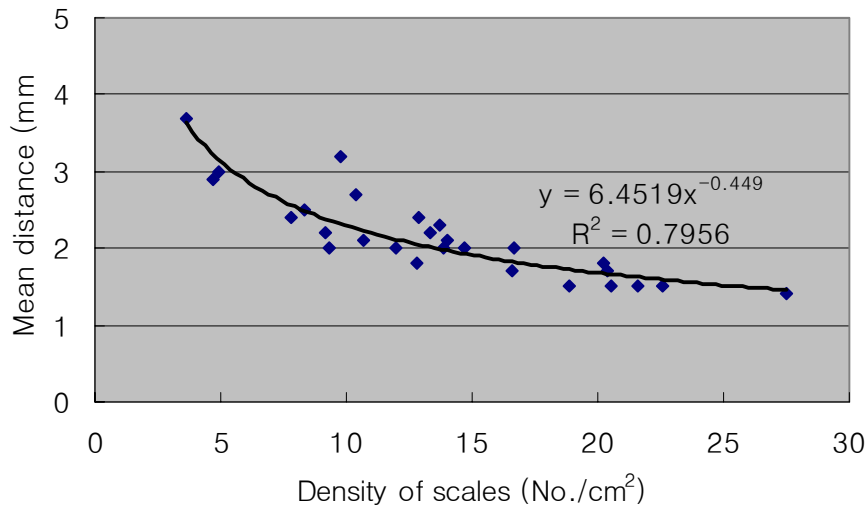
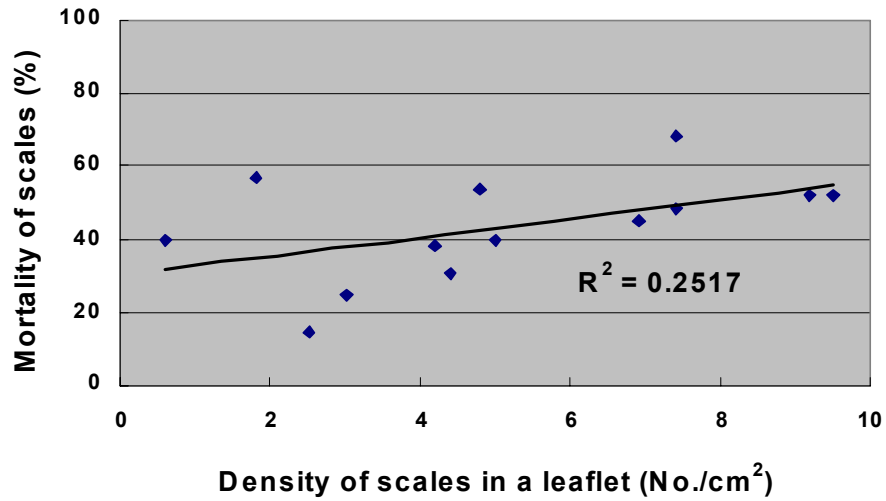


Fig. 13. Relationship between the mean distance to the nearest scale and the density of scales in the sample area on a leaflet.

또한, 이들 소엽에 CS-626 균주의 포자현탁액  $1 \times 10^7$  CFU/ml을 분무처리하여 소엽내 약충 밀도와 CS-626에 의한 약충 살충률간의 상관관계를 분석하였다. 본 실험내 생물검정에서는 분무처리 포자농도를 일반적으로 처리하는 농도( $1 \times 10^8$  CFU/ml)보다 낮게 처리해서 감염 및 이병기작의 상세한 관찰을 용이하도록 하였다. 토마토 소엽내 약충 밀도와 살충률간의 상관 관계는 Fig. 14와 Fig. 15에서 볼 수 있듯이 분무처리 초기에는 상관관계가 적었지만 분무처리 후기에는 높은 상관 관계를 나타냈으며 이러한 상관성은 저밀도에서보다 고밀도에서 더 높게, 그리고 보다 이른 시기에 보였다.

A



B

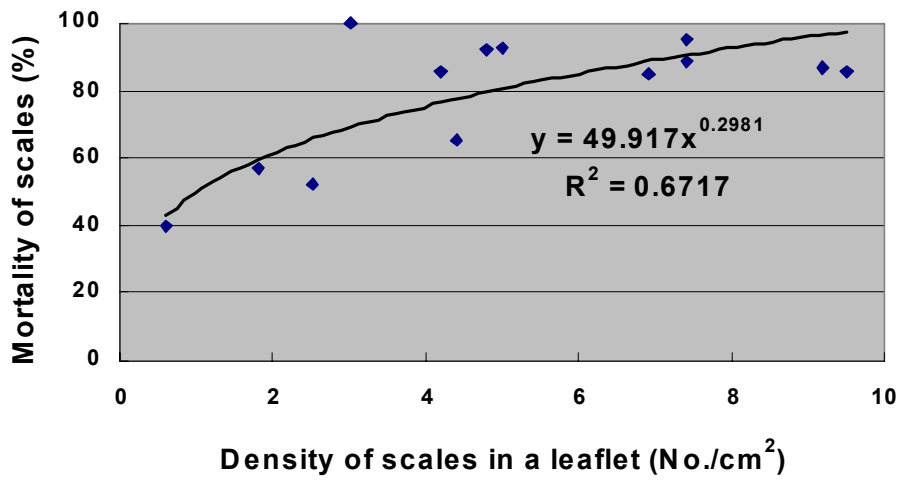
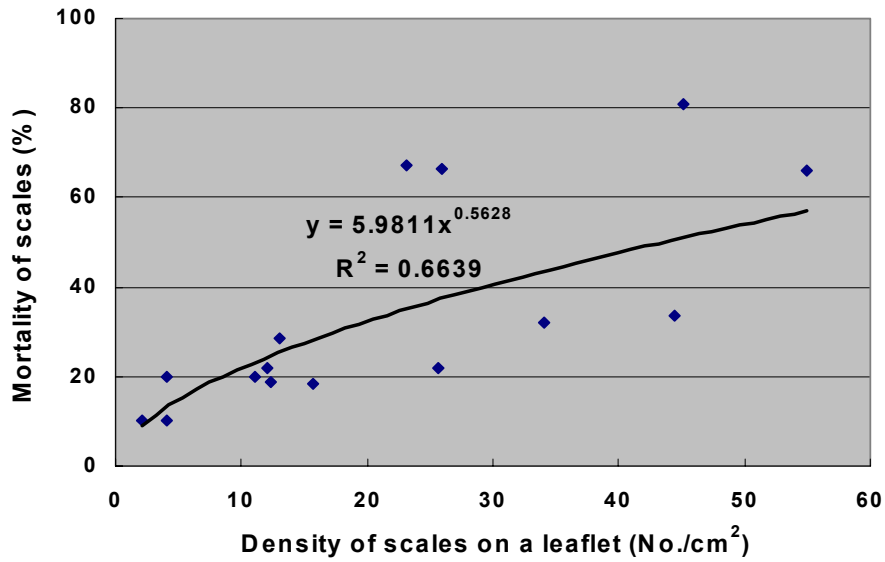


Fig. 14. Relationship between the mortality of whitefly scales by CS-626 strain and the low density of scales on a leaflet. A: 5 DAT, B: 7 DAT.

A



B

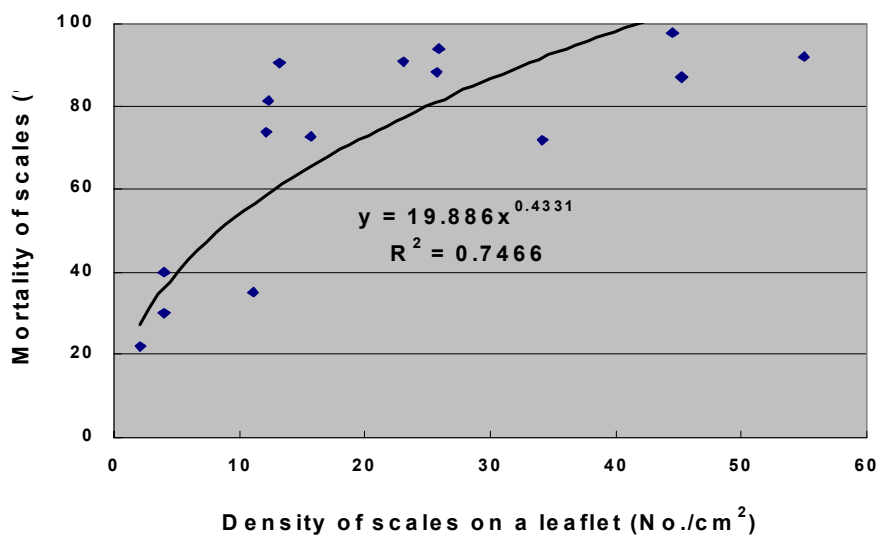


Fig. 15. Relationship between the mortality of whitefly scales by the CS-626 strain and the high density of scales on a leaflet. A: 3 DAT, B: 5 DAT.

토마토 소엽 내 약층의 밀도가 일정 수준 이상이 되면 규칙적 분포에서 집중 분포로 공간분포 양상이 변화하였는데(Table 12), 이러한 현상은 동질적인 환경 하에 있는 서식공간인 토마토 소엽 내에서 약층의 발생 수가 적을 때에는 각 개체가 일정 세력권(territory)을 확보하기 때문에 규칙적 분포를 할 수 있지만, 약층의 수가 많아지면 특정 개체의 존재 또는 행동이 다른 개체들의 행동에 영향을 주어 특정 서식단위에 개체들의 집중이 유발되는 경우에 나타나게 된다(류 와 이 2002). 그러므로 본 연구에서는 소엽에 존재하는 엽맥들로 둘러싸인 평평한 공간을 토마토 소엽 내에서 자연적으로 존재하는 특정 서식단위로 파악하고 이 부분을 표본추출 단위로 하여 면적과 해당 공간에 존재하는 약층의 위치 및 수를 조사하였다(Fig. 12). 이러한 특정 서식단위에서 존재하는 약층의 위치와 거리는 CS-626균주의 감염력에 중요한 요인으로 작용하였는데, 엽맥을 사이에 두고 가까이 위치한 약층보다는 엽맥이 가로놓이지 않은 평평한 공간에 위치한 약층간에 전염성을 보이는 경우가 높았다(Fig. 16). 즉, 토마토 소엽의 형태 및 구조가 CS-626균주의 감염 및 살충력에 크게 영향을 미쳤음을 알 수 있었다.

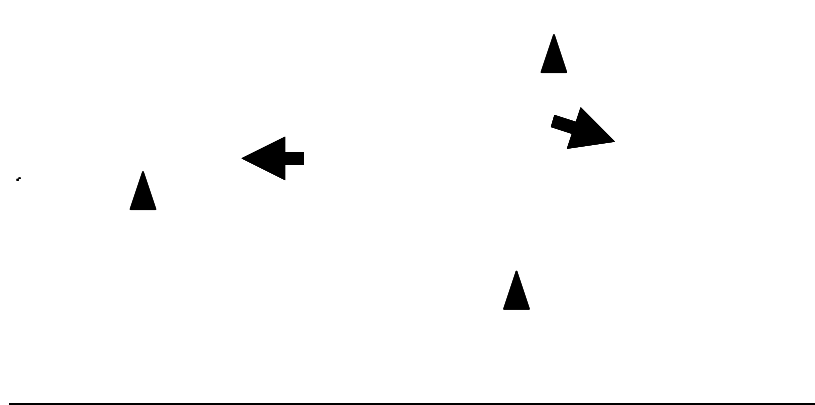
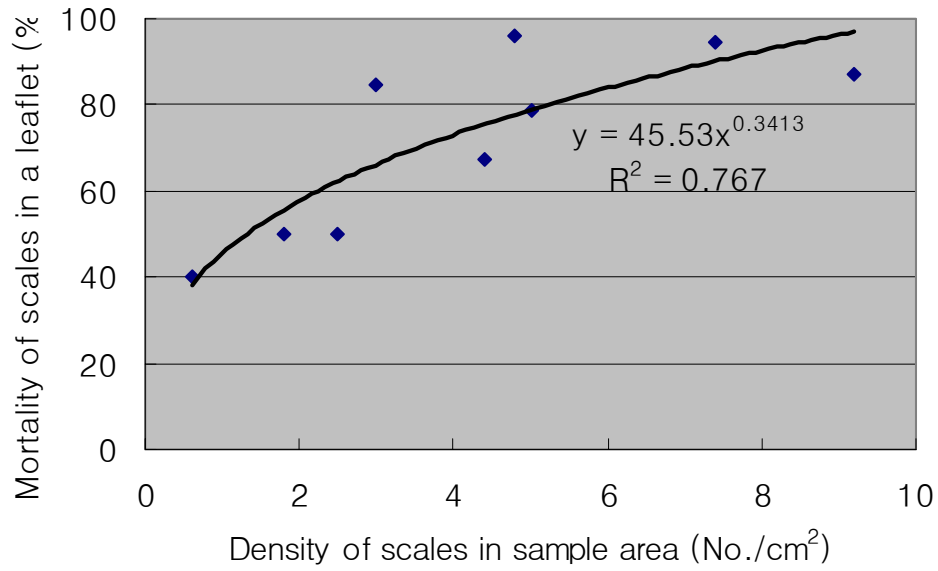


Fig. 16. Effect of veins and distance between the scales on infection by the CS-626 strain in a tomato leaflet. Arrow: veins as structural barrier to the infection. Arrow head: infected scale.

상기의 결과를 종합해 볼 때, 토마토 소엽에 존재하는 약충의 살충률이 토마토 주내 및 포장 전체에 발생한 온실가루이에 대한 CS-626의 방제 효과에 직접적인 영향을 미치는 것임을 알 수 있었다. 이와 더불어 본 연구에서 수행한 표본추출 방법은 토마토 소엽 내 온실가루이 약충에 대한 곤충병원성 곰팡이의 살충력을 정확히 평가하는데 효율적이었다. 소엽 내 전체 약충의 살충력은 소엽 전체의 약충 밀도보다는 소엽의 엽맥에 의해 형성된 자연적인 서식단위를 기준으로 표본추출한 약충의 밀도와 보다 높은 상관관계를 나타냈다(Fig. 17). 이는 소엽 내 엽맥으로 둘러싸인 평평한 공간에 존재하는 약충간에 거리가 가까울수록 CS-626균주에 감염된 약충에서 형성된 2차 포자가 전염될 가능성이 높아지고, 엽맥에 의해 포자의 전달에 제한을 받으므로 소엽내 전체 약충 밀도보다는 표본추출 단위 공간에 존재하는 약충 밀도가 살충 효과를 보다 정확히 설명할 수 있는 요인으로 평가되었다.

그러므로 향후 온실가루이에 대한 미생물농약의 보다 정밀한 약효 검정시험과 방제 효과의 원인구명을 위해서는 소엽내 약충 발생밀도를 달리하여 집중분포한 경우와 규칙적 분포를 한 경우의 살충률을 각각 구할 필요가 있다고 판단된다. 다만, 미생물농약 등록을 위한 약효검정시험에서는 포장에서의 방제효과 검정은 살충력을 최적으로 발휘할 수 있는 조건에서 구한 살충률을 시험성적으로 제출토록 되어 있으므로 포장내 성충 밀도를 고밀도로 하여 검정시험을 수행하면 될 것으로 제안하고자 한다.

A



B

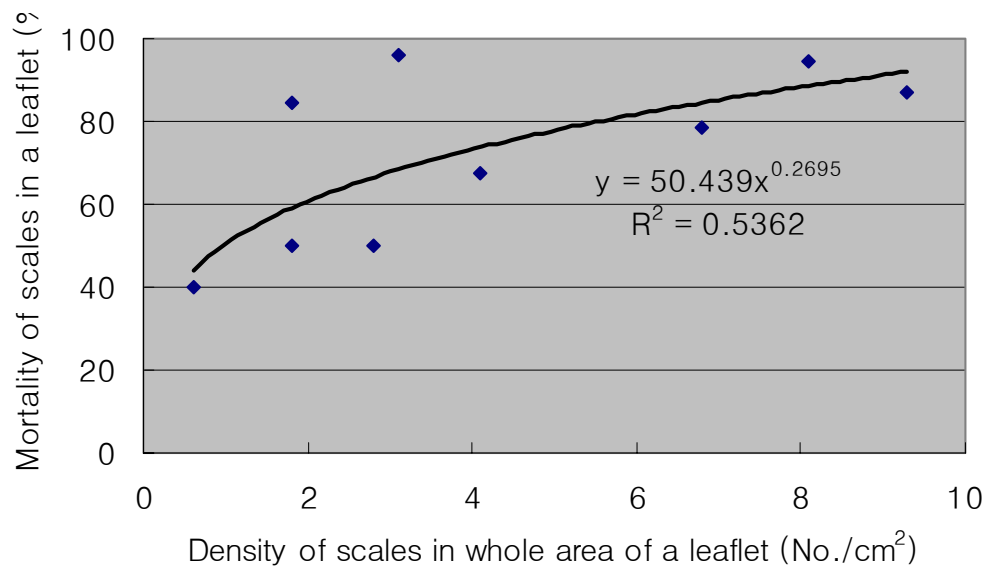


Fig. 17. Comparison of the density of scales in sample area (A) and the density in whole area of a leaflet (B) in related to the mortality of scales in a leaflet.

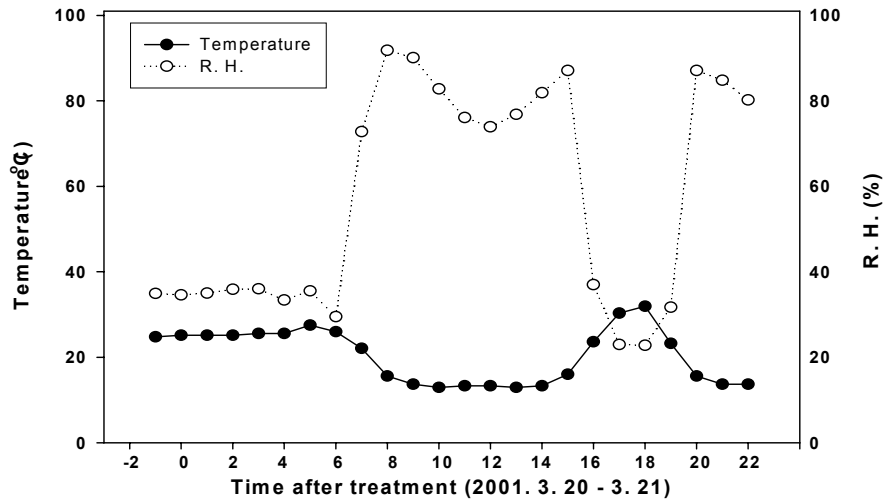


## 라. CS-626 균주의 살충력에 영향을 미치는 환경적 요인

CS-626 균주는 15~35℃의 온도범위에서 국내외 수집 5 균주 중 가장 포자 발아력이 높고 살충력이 높았으며 특히 35℃의 고온에서도 81.8%의 살충력을 갖는 것으로 평가되었다(Lee *et al.* 2002). 그러나 실내 생물검정과 달리, 포장에서는 하루 중 온·습도의 변화가 급격하기 때문에(Table 9, Fig. 18) 포자의 발아 및 살충력에 큰 영향을 받을 수 있다. *V. lecanii*를 포함한 곤충병원성 곰팡이는 포자발아 및 균사체 성장을 위하여 적절한 온·습도조건이 요구되며(Kanagaratnam *et al.* 1982; Griggs *et al.* 1999; Wraight *et al.* 2000) 이는 또한 곤충병원성 곰팡이가 대상해충을 감염 시키거나 침입하고자 할 때 곰팡이로부터 분비하는 각종 분해효소들의 활성화에도 중요한 요인이 된다. 특히, 포장에서 고온과 저습 조건은 포자발아와 살충력 발휘에 큰 저해 요소로 작용한다(Wraight *et al.* 2000). CS-626균주는 분무처리 후 6시간부터 포자 발아가 관찰되며 12시간이 지나면 25℃ 적온에서 95%이상, 35℃에서 70% 정도의 포자 발아력을 보였다(Lee *et al.* 2002). 또한 1년차 부여 포장실험에서 3월 중 포자처리 기간 동안(상대습도: 66.5±22.9%, 성충 발생억제율: 7일차에 72%)과 2년차 처리기간 중(상대습도: 87.5±14.6%, 약충 살충률: 7일차에 84.1%) 방제가를 비교해보면, 상대습도가 높을수록 살충률이 높아지는 것으로 판단되었다.

그러므로 분무처리 후 12~24시간동안 온·습도 조건이 살충력에 미치는 영향을 조사하기 위하여, CS-626균주의 원제 및 제제를 처리한 경우에 분무처리 직후 온·습도 조건을 비교하였다(Fig. 18). 분무처리 후 24시간이 경과하는 중, 다음날 오전이 시작되는 15시간 이후부터 온도가 상승하여 3월에는 최고 30℃, 6월에는 37℃가 되었으며 상대습도는 모두 32%까지 급감하였다. 이와 같은 발아 초기의 온·습도 조건에 의해, 원제를 처리한 경우에는 온도가 비교적 낮고 상대습도가 높은 편이었던 3월 중에 처리하였지만 72%의 방제 효과(성충 발생억제율)를 보인 반면(Fig. 4), 온도가 높게 지속되었고 상대습도가 74.2±22.8%로 비교적 낮은 편이었던 6월 중이지만 제제를 처리한 3년차 포장검정실험에서는 7일차에 79.8%, 10일차에 91.5%의 약충 살충률을 나타냈으며(Fig. 7) 처리후 10일차에 성충 발생억제율이 200%에 달하였다(Fig. 8). 이는 제제의 보습효과 등으로 발아된 포자의 활력을 유지할 수 있었기 때문으로 평가되었다.

A



B

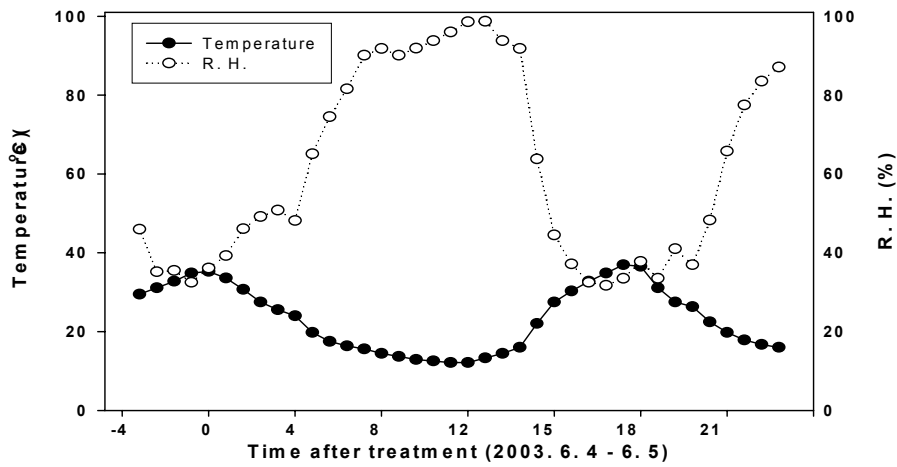


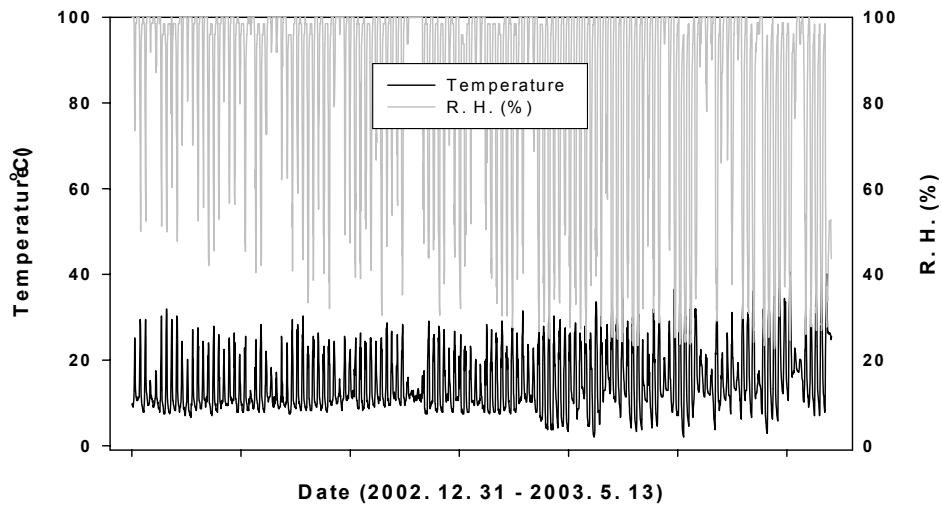
Fig. 18. Temperature (°C) and relative humidity (%) during 24hrs after treatment of the CS-626 strain. A: treatment of the MPCA (Mar. 2001); B: treatment of the MPCP (Jun. 2003).

3년간의 포장실험을 수행한 부여군 농업기술센터 내 하우스 포장과 농가포장의 환경조건을 비교하기 위하여, 2003년 봄 작기 동안(2002. 12. 31-5. 13) 인근 농가의 연동 비닐하우스를 선정하여 동일한 기간동안 온·습도 조건을 조사하였다(Table 13, Fig. 19). 인근 농가의 하우스 포장은 방울토마토를 멀칭재배 하였고 포장검정을 수행한 기술센터 내 포장은 양액재배를 하였다. 기술센터의 양액재배 포장은 작물이 어린 시기에 상대습도가 농가포장보다 낮았으나 온도조건은 오히려 편차가 적었다(Table 13). 2003년 봄에 방울토마토의 가격이 하락하면서 농가에서는 5월 중순에 작물을 제거하였으므로 하우스 온·습도 조건을 더 이상 비교, 조사할 수 없었으나 그 이후에도 기술센터 내 포장과 크게 다르지 않았을 것으로 예상되었다. 농가포장에서 상대습도가 평균 84%에 달하였으므로 CS-626균주의 제제가 농가에서 충분히 살충효과를 발휘할 수 있을 것으로 평가되었다(Table 13).

Table 13. Temperature (°C) and relative humidity (%) in the greenhouses in Buyeo during the spring (2002. 12. 31 - 2003. 5. 13)

Site	Temperature (°C)			R. H. (%)		
	Mean ± SD	Max.	Min.	Mean ± SD	Max.	Min.
Extension center	16.2 ± 6.6	38.8	7.4	73.6 ± 21.4	100	22.9
Farmer's greenhouse	14.7 ± 7.2	40.6	2.0	84.2 ± 22.8	100	22.6

A



B

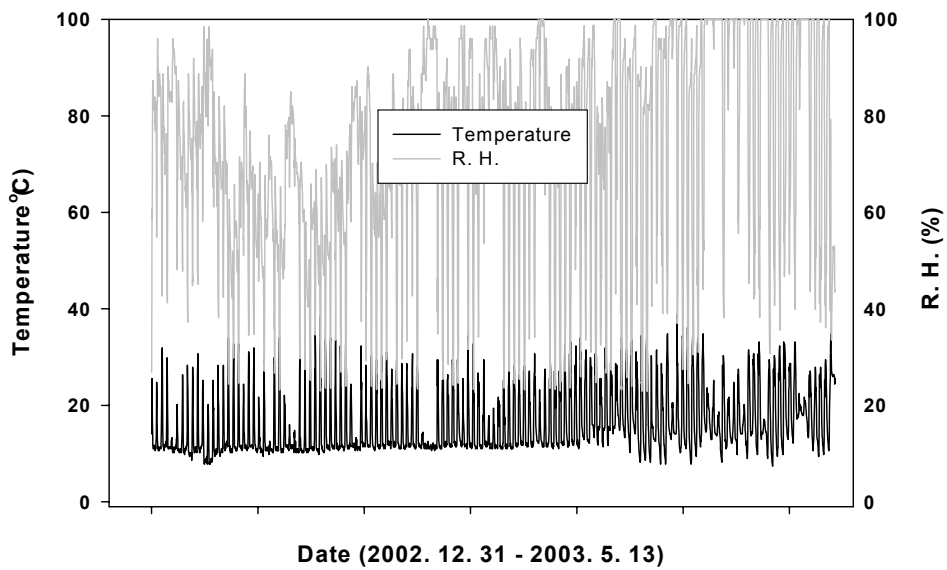


Fig. 19. Temperature (°C) and relative humidity (%) in the greenhouses in Buyeo during the spring (2003). A: farmers greenhouse; B: greenhouse in which mortality test of the CS-626 strain was investigated.

#### 마. CS-626 제제의 효율적 이용 방법 제안

3년간의 연구를 통하여 *V. lecanii* CS-626균주의 원제 및 제제의 포장 검정 시험을 수행한 결과, 국내의 토마토 농가포장에서 온실가루이에 대하여 CS-626 균주의 제제를 이용하여 충분히 방제 효과를 볼 수 있을 것으로 평가되었다. 그러나 여전히 개선되거나 해결해야 할 여러 가지 문제점이 있는데, 첫 번째는 대량배양 중 균주의 오염을 방지하고 품질을 균일하게 유지할 수 있도록 개선이 필요하다. 이용적인 측면에서는 전체 작기 동안 다양한 반복처리를 통하여 최적의 처리횟수 및 처리시기를 결정하는 연구가 보다 심도있게 진행될 필요가 있다. 또한 토마토에 발생하는 기타 해충에 대한 살충효과 검정, 천적곤충인 온실가루이좀벌과의 복합처리 기술 개발 등도 포장에서 충분히 시도해볼 필요가 있다. 이와 더불어 미생물농약의 안전 사용과 이용 효율을 높이기 위해서는 대 농민 교육도 중요한 요인이다. 그러므로 포장 검정 시험을 수행한 부여군 농업기술센터에서는 본 연구의 성과와 개발 기술을 군내 농민들에게 신속히 홍보·보급할 목적으로 CS-626 균주의 분무처리 과정을 동영상 촬영하여 기술센터의 웹사이트 동영상 게시판에 올려놓고 누구나 볼 수 있도록 하였다 (Fig. 20). 또한 2002년 농업기술 2월호에 온실가루이 방제용 미생물농약의 기초적인 사용법에 대한 농민 교육자료를 아래와 같이 제시한 바 있다.

- 효과가 느리게 나타난다(보통 7일 이상).
- 온실가루이 성충에는 효과가 적으므로 반복적으로 자주 처리해야 한다.
- 적절한 온·습도 등 환경조건이 유지되어야 한다.
- 식물병 관리를 위한 살균제 처리에 의해 방제효과가 떨어질 수 있다.
- 작물 잎 뒷면에 분무처리해야 하는 어려움이 있다.
- 제제화하지 않은 원제는 살충효과가 떨어질 수 있다.
- 미생물살충제를 실온에서 보관하면 쉽게 변질될 우려가 있다.

CS-626 균주에 대한 포장 검정시험을 종합하여 보다 자세한 이용법을 정리하면 Table 14와 같다. 부여에서 봄 작기 중 온실가루이가 문제되는 시기는 하우스 내 온도가 상승하는 3월 이후부터 6월까지 이므로, 실제로 미생물농약의 분무 처리가

필요한 기간은 4-5개월 정도이다. 2-3월 중에 발생을 시작한 온실가루이에 대해서는 2-3령 약충기에 1주일 이내 2회 처리, 또는 1회 처리 후 3주 뒤에 반복처리로 가능한 성충으로 우화되는 것을 억제하거나 다음 세대 약충을 방제하고, 4월부터 온도가 급상승하는 시기에는 온실가루이의 생활사가 빨라지므로(박 1999) 약충 발생 상황에 맞추어 2-3령기에 1주일 이내 2회 처리를 반복할 것을 제안한다. 이와 같은 방법으로 처리할 경우, 2월부터 6월까지 최대 28회를 처리해야하므로 향후 포자의 활력을 보다 장기간 유지할 수 있도록 제제의 개선이 필요하다.



Fig. 20. Internet education program of application method of the CS-626 strain.  
URL: <http://www.chungnam.rda.go.kr/cn06/dongyoung.asp>.

Table 14. Control efficacy and usage of MPCP of the CS-626 strain

Treatment		Description	
Crop	Tomato		
Target pest	Whitefly (Homoptera: Aleyrodidae)		
Concentration (A.I.)	1×10 <sup>8</sup> CFU/ml		
Application method	Spraying at 2nd-3rd scales, repeat application in a week or 3 weeks after the first spraying		
Field trial results	Application date (YY/MM/DD)	Control efficacy (%)	LT <sub>50</sub>
	03/06/04	91.5	5.39 (4.81 ~ 5.85)

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 1절 연구개발 목표의 달성도

#### 1. CS-626균주의 대량생산 및 제제화 연구

*V. lecanii*균주의 대량생산을 위한 경제적 영양원의 종류와 농도 및 온도와 pH, 배양시간 등 최적배양조건을 확립하였으며 원활한 살충효과 발현을 위하여 제제의 처방을 확립하는 등 진도를 100% 달성했다..

#### 2. CS-626균주의 병원성 형질전환 균주 개발

*V. lecanii*균주의 protoplast 형성에 적합한 효소, 농도, 배양시간 구명 및 regeneration 조건을 확립하였으며 병원력 증진 형질전환 균주 개발의 방법으로써 병원성 관련 유전자(Pr1 Gene) 도입으로 Pr1 gene을 multi-copy로 갖는 균주를 개발하였으며 형질전환된 균주의 특성조사를 하였다. 진도에 따라 100% 목표 달성하였다.

#### 3. CS-626균주를 이용한 곰팡이살충제의 효능검증 및 이용방법 연구

본 연구의 최종 목표인 CS-626 균주의 원제 및 제제의 약효에 대한 포장 검정 시험을 완료하였고 효율적인 이용 방법 연구를 수행하여 유효 분무 처리 농도, LT<sub>50</sub>, 처리 기간 등을 제안하였으며, 온실가루이에 대한 미생물농약의 합리적인 방제효과 검정방법 및 표본추출법 등을 개발·제시하였다. 그러므로 본 연구의 목표를 100% 달성하였다고 평가할 수 있었다.

### 2절 관련분야의 기술발전예의 기여도

#### 1. CS-626균주의 대량생산 및 제제화 연구

*V. lecanii*의 효율적인 대량생산조건을 확립함으로써 차후 동종에 대한 대량생산이 가능해질 것으로 전망되며 현재까지 확립된 제제처방은 향후 생물농약제제의 안정성 및 물리성 개선에 기초될 것으로 기대된다.



## 2. CS-626균주의 병원성 형질전환 균주 개발

*V. lecanii*의 효율적인 protoplast 제조기술 확립으로 향후 이 종에 대한 유전자 조작에 의한 균주개발이 용이하게 되었으며 병원성 향상 균주개발으로 곰팡이살충제의 살충효과 증진을 기대할 수 있게 되었다.

## 3. CS-626균주를 이용한 곰팡이살충제의 효능검증 및 이용방법 연구

현재까지 시설재배에서 주요한 문제해충인 온실가루이에 대한 미생물농약의 약효를 검정·평가하는 방법이 난해하여 합리적인 포장 검정법이 설정되어 있지 않은 상황이었으나, 본 연구를 통하여 온실가루이에 대한 합리적인 포장검정법과 표본추출법 등이 제시되어 향후 관련 연구자 및 미생물농약 개발자에게 유용한 기초 정보를 제공하였다고 예상된다. 그리고 본 연구에서 그 효능이 검증된 CS-626균주의 원제 및 제제의 제품 개발과정에서 요구되는 기초 정보와 문제점을 제공함으로써 보다 신속하고 고품질의 시제품을 생산할 수 있을 것으로 예상된다. 뿐만 아니라, 토마토 주산지인 부여군의 시설재배지 환경조건과 온실가루이 발생을 분석하여 기초 자료를 제시함에 따라 미생물농약을 포함한 생물적 방제법의 개발에 중요한 정보로 이용될 것으로 기대된다.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 1. CS-626균주의 대량생산 및 제제화 연구

*V. lecanii*의 효율적인 대량생산조건 및 제제기술을 차후 제품개발 및 제제의 처방개선에 활용할 계획이다.

### 2. CS-626균주의 병원성 형질전환 균주 개발

*V. lecanii*의 효율적인 protoplast 제조기술 확립으로 향후 이 종에 대한 유전자 조작에 의한 균주개발에 활용할 계획이며 연구결과를 통한 기술들은 국내외 학술지에 논문을 게재할 예정이며 이미 제 3세부과제와 공동으로 학술지 및 학술회의에 발표한 바 있다.

### 3. CS-626균주를 이용한 곰팡이살충제의 효능검증 및 이용방법 연구

본 연구개발 결과인 CS-626 원제의 온실가루이 살충 효능 자료는 CS-626 균주를 이용한 다양한 미생물농약 제제의 개발과 그 이용에 활용될 수 있으며, 개발된 미생물농약의 효율적인 사용법에 대한 안내 및 교육 자료를 작성하는데 다양하게 활용될 수 있을 것으로 예상된다. 또한 본 연구의 결과는 국내외 관련 연구자에게 유용하고 새로운 정보를 많이 제공할 것으로 사료되어 국제 학술지에 논문을 게재하거나 국제 학술회의에 참가하여 발표할 계획이다. 이미 CS-626 원제의 살충효능에 대한 연구 결과는 국제 심포지움(2001 유럽 온실가루이 국제 심포지움, 2001 FFTC-RDA 생물적 방제 국제 심포지움) 발표 2회, SCI 논문 1편 등 국제 학술지에 2편을 게재하였으며 온실가루이 밀도와 살충력간의 상관관계 및 소엽내 약충의 공간분포 연구 결과도 국제 학술회의(2003 한-일 국제공동 응용곤충학 및 동물학회)에서 구두 발표한 바 있다. 아래는 현재까지 본 연구 성과를 발표한 제목과 내용들이다.

#### 가. 학술지 논문 게재

1) Lee, M., C.S. Yoon, T.Y. Yun, H.S. Kim and J.K. Yoo. 2002. Selection of a highly virulent *Verticillium lecanii* strain against *Trialeurodes*

*vaporariorum* at various temperatures. J. Microbiol. Biotechnol. 12:145-148.

2) Kim, J.J., M. Lee, C.S. Yoon, H.S. Kim, J.K. Yoo, and K.C. Kim. 2001. Biological control of greenhouse pests: B. Control of cotton aphid and greenhouse whitefly with a fungal pathogen. FFTC Extension Bull. 502:8-15.

나. 국제 심포지움 발표

1) The 2001 European Whitefly Symposium (2001년, 포스터 발표) : Selection of a highly virulent *Verticillium lecanii* strain against *Trialeurodes vaporariorum* at various temperatures(Lee, M., C.S. Yoon, T.Y. Yun, H.S. Kim and J.K. Yoo)

2) FFTC-RDA International Symposium - Biological Control in Greenhouse (2001년, 연구논문 발표) : Biological control of greenhouse pests: B. Control of cotton aphid and greenhouse whitefly with a fungal pathogen (Kim, J.J., M. Lee, C.S. Yoon, H.S. Kim, J.K. Yoo, and K.C. Kim)

3) Korea-Japan Joint Meeting - Applied Entomology and Zoology (2003년, 구두 발표) : Control efficacy of *Verticillium lecanii* related to the density of greenhouse whitefly scale on tomato leaflet (Lee, M., S.W. Choi, J.R. Cho and H.S. Kim)

다. 국내 학술회의 발표

1) 2000년 한국곤충학회 · 응용곤충학회 합동 추계 학술회의(포스터 발표) : 시설하우스 내에서 *Verticillium lecanii* CS-626 균주의 온실가루이 방제효과 검증 (이민호, 윤철식, 박현수, 박창규, 김홍선, 유재기)

2) 2002년 한국곤충학회 · 응용곤충학회 합동 춘계 학술회의(구두 발표) : 시설재배 토마토에서 온실가루이 발생 밀도별 *Verticillium lecanii*의 살충효과 비교 (이민호, Tran D.P., 이도경, 권석주, 김홍선)

라. 신문 및 잡지 기사 게재

1) 농민신문 (2002. 3. 8) : “토착균주 이용 미생물 살충제 나온다”

2) 농업기술 (2002. 2월호) : “ 미생물을 이용한 온실가루이 생물적 방제 -  
처리효과와 처리방법 제대로 알고 사용하자”

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

본 연구를 수행하면서 곤충병원성 곰팡이의 재량생산 및 제제화, 균주 특성 및 형질전환 방법, 살충효과 포장 검정 및 이용법에 대한 국외 연구논문을 100 여 편 이상 확보하였으며, 특히 2001년 유럽 온실가루이 국제심포지움에 연구 결과를 발표하면서 학회 초록을 입수하여 온실가루이와 관련된 최신 연구 결과 300여 건을 확보하였다. 이는 온실가루이의 생물적 특성을 이해하는데 중요한 정보로 활용되어 본 연구 수행에 많은 도움을 주었다.

## 제 7 장 참고문헌

- Abbott, W.S. 1925. A method for computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18:265.
- Askary, H. and Brodeur, J. 1999. Susceptibility of larval stages of the aphid parasitoid *Aphidius nigripes* to the entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii*. J. Invertebr. Pathol. 73:129-132.
- Choi, K.M., S.B. Ahn, W.S. Cho, S.H. Lee, S.C. Han, and M.H. Lee. 1991. The illustrated guide to Korean vegetable insect pests. NongJinHoe. Suwon, Korea.
- Clark, P.J. and F.C. Evans. 1954. Distance to nearest neighbor as a measure of spatial relationships in populations. Ecology 35:445-453.
- Deacon, J.W. 1983. Microbial control of pests and diseases. In Aspects of microbiology 7. Van Nostrand Reinhold Co. Ltd., Wokingham, England. pp. 31-42.
- Edgankamp, Rotteveel Mansveld M.H., J.C. van Lenteren, J.M. Ellenbroek, J. Woets. 1982. The parasite-host relationship between *Encarsia formosa* (Hym., Aphelinidae) and *Trialeurodes vaporariorum* (Hom., Aleyrodidae): Population dynamics of parasite and host in a large, commercial glasshouse and test of the parasite-introduction method used in the Netherlands (First Part). Z. Ang. Ent. 93:113-130.
- Ekbohm, B.S. 1979. Investigation on the potential of a parasitic fungus (*Verticillium lecanii*) for biological control of the greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*). Swedish J. Agric. Res. 136-138.
- Ekbohm, B.S. 1980. Some aspects of the population dynamics of *Trialeurodes vaporariorum* and *Encarsia formosa* and their importance for biological control. Bull. SROP/WPRS III(3):25-34.
- Fransen, J. J., Winkelman, K., and Van Lenteren, J. C. 1987. The differential

- mortality at various life stages of the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae), by infection with the fungus *Aschersonia aleyrodis* (Deuteromycotina: Coelomycetes). *J. Invertebr. Pathol.* 50, 158-165.
- Fransen, J.J. 1987. *Aschersonia aleyrodis* as a microbial control agent of greenhouse whitefly. Doctoral thesis, Univ. Wageningen, 167 pp.
- Gams, W. [ed]. 1971. *Cephalosporium* - artige Schimmelpilze (Hyphomycetes). Gustav Fischer, Stuttgart.
- Gillespie, A.T. 1984. The potential of entomogenous fungi to control glasshouse pests and brown planthoppers of rice. Ph.D. thesis, Univ. of Southampton, 148 pp.
- Gillespie, D.R. and D. Quiring. 1987. Yellow sticky traps for detecting and monitoring greenhouse whitefly (Homoptera: *Aleyrodidae*) adults on greenhouse tomato crops. *J. Econ. Entomol.* 80:675-697.
- Griggs, M.H., J.D. Vandenberg, and A.J. Sawyer. 1999. Effect of relative humidity on viability of primary conidia of *Zoophthora radicans*. *J. of Invertebr. Pathol.* 73:315-320.
- Hall, R.A. 1976. A bioassay of the pathogenicity of *Verticillium lecanii* in the aphid, *Macrosiponiella sanborni*. *J. Invert. Pathol.* 27:41-48.
- Hall, R.A. 1981. The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphids and scales. *In* Burges, H.D. [ed], *Microbial control of pests and plant diseases*. Academic Press, London, pp. 483-498.
- Hall, R.A. 1982. Control of whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* and cotton aphid, *Aphis gossypii* in glasshouses by two isolates of the fungus, *Verticillium lecanii*. *Annal. of Appl. Biol.* 101:1-11.
- Hoddle, M.S., R.G. Van Driesche and J.P. Sanderson. 1998. Biology and use of the whitefly parasitoid *Encarsia formosa*. *Annu. Rev. Entomol.* 43:645-669.
- Humber, R.A. 1997. Fungi: identification. *In* Lacey, L.A. [ed], *Manual of techniques in insect pathology*. Academic press, p. 169.

- Jensen, M.A., J.E. Losey and A.E. Hajek, 2001. Altered behavior and distribution of pea aphids, *Acyrtosiphon pisum* (Homoptera: Aphididae), infected with *Pandora neoaphidis* (Zygomycetes: Entomophthorales). *BioControl* 46:337-343.
- Jiang, N., R. Xu, J.C. van Lenteren and H.J.W. van Roermund. 1999. Temporal and spatial analysis of greenhouse whitefly and its parasitoid *Encarsia formosa* in two types of greenhouse ecosystems. *J. Appl. Ent.* 123:547-554.
- Kanagaratnam, P., R. A. Hall, and H.D. Burges. 1981. New or unusual records of plant diseases and pests. *Plant Pathol.* 30:117-118.
- Kanagaratnam, P., R.A. Hall and H.D. Burges. 1982. Control of glasshouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*, by an 'aphid' strain of the fungus *Verticillium lecanii*. *Ann. appl. Biol.* 100:213-219.
- Kim, J.J., M. Lee, C.S. Yoon, H.S. Kim, J.K. Yoo, and K.C. Kim. 2001. Biological control of greenhouse pests: B. Control of cotton aphid and greenhouse whitefly with a fungal pathogen. *FFTC Extension Bull.* 502:8-15.
- Krebs, C.J. 1999. *Ecological methodology*, 2nd ed. Addison Wesley Longman, Inc. pp. 191-195.
- Lacey, L.A., R. Frutos, K. Kaya and P. Vail. 2001. Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future?. *Biological Control* 21:230-248.
- Lee, M., C.S. Yoon, T.Y. Yun, H.S. Kim and J.K. Yoo. 2002. Selection of a highly virulent *Verticillium lecanii* strain against *Trialeurodes vaporariorum* at various temperatures. *J. Microbiol. Biotechnol.* 12:145-148.
- Lenteren, J. C. van, and Woets, J. 1988. Biological and integrated pest control on greenhouses. *Ann. Rev. Entomol.* 33, 239-269.
- Osborne, L. S., and Landa, Z. 1992. Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. *Florida Entomologist* 75, 456-471.
- Rombach, M. C., and Gillespie, A. T. 1988. Entomogenous Hyphomycetes for insect and mite control on greenhouse crops. *Biocontrol News & Information* 9, 7-18.
- Steenberg, T., and Humber, R. A. 1999. Entomopathogenic potential of *Verticillium*



- and *Acremonium* species (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *J. Invertebr. Pathol.* **73**, 309–314.
- Yokomi, R. K., and Gottwald, T. R. 1988. Virulence of *Verticillium lecanii* isolates in aphids determined by detached-leaf bioassay. *J. Invertebr. Pathol.* **51**, 250–258.
- Yoon, C.-S., Sung, G.-H., Park, H.-S., Lee, S.-G., and Lee, J.-O. 1999. Potential of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* strain CS-1 as a biological control agent of *Plutella xylostella* (Lep., Yponomeutidae). *J. Appl. Ent.* **123**, 423–425.
- Martin, N.A. and J.R. Dale. 1989. Monitoring greenhouse whitefly puparia and parasitism: a decision approach. *New Zealand J. of Crop and Hort. Sci.* **17**:115–123.
- Noldus, L.P.J.J., R. Xu, M.H. Eggenkamp-Rotteveel Mansveld, J.C. van Lenteren. 1986. The parasite-host relationship between *Encarsia formosa* (Hymenoptera: Aphelinidae) and *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae). XX. Analysis of the spatial distribution of greenhouse whiteflies in a large glasshouse. *J. Appl. Ent.* **102**:484–498.
- Osborne, L.S. and Z. Landa. 1992. Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. *Florida Entomologist* **75**:456–471.
- Raymond, M. 1985. Presentation dun programmed analyse log-probit pour micro-ordinateur. *Cah. ORSTOM, Ser. Ent. Med. Parasitol.* **22**:117–121.
- Rombach, M.C. and A.T. Gillespie. 1988. Entomogenous Hyphomycetes for insect and mite control on greenhouse crop. *Biocontrol News & Information* **9**:7–18.
- Samson, R.A. and M.C. Rombach. 1985. Biology of the *Verticillium* and *Aschersonia*, In Hussey, N.W., and N.E.A. Scopes [eds], *Biological pest control - the glasshouse experience*. Cornell Univ. Ithaca Press, N.Y., pp. 34–42.
- SAS Institute. 1988. "SAS/STAT User's Guide," SAS Institute Inc., Cary, NC,

Version6.03, Vols. 1 and 2.

- Thomas, M.B. and A.J. Willis. 1998. Biocontrol-risky but necessary?. TREE 13:325-329.
- Van Lenteren, J.C. 1989. Implementation and commercialization of biological control in West Europe. In International symposium on biological control implementation. Proceedings and abstracts. NAPPO Bull. 6:50-70.
- Van Lenteren, J.C. and L.P.J.J. Noldus. 1989. Whitefly-plant relationships: behavioral and ecological aspects. In Gerling, D. [ed], Whiteflies: Bionomics, pest status and management. Wimborne, England. Intercept Ltd, 304 pp.
- Wraight, S.P., R.I. Carruthers, S.T. Jaronski, C.A. Bradley, C.J. Garza, and S. Galaini-Wraight. 2000. Evaluation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* for microbial control of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. Biological Control 17:203-217.
- Yoon, C.S., J.J. Kim and M. Lee. 2000. Current developments in the use of entomopathogenic fungi for the control of insect pests in Korea. International symposium - biological control for crop protection. pp. 135-153.
- Xu, R.M. 1991. The spatial-temporal dynamics of population. Beijing. Beijing Normal Univ. Press, 361 pp.
- 김종관, 박정준, 박천호, 박홍선, 조기중. 1999. 방울토마토 시설재배시 황색점착트랩을 이용한 온실가루이 관리. 한원지 40:549-553.
- 농림부. 1998. 곤충기생균을 이용한 무공해 미생물 살충제 개발. 농림특정연구사업보고서.
- 농촌진흥청. 1997. 생물농약 실용화를 위한 Guideline 설정 연구. 농업특정연구개발사업보고서.
- 농촌진흥청. 2000. 미생물농약 등록시험방법 및 기준 설명회 자료.
- 박종대, 김도익, 박웅. 1998. 시설내 온실가루이와 온실가루이좀벌의 발생 및 주내분포. 한응곤지. 37:117-121.
- 박종대. 1999. 온실가루이 생태와 온실가루이좀벌 이용. 천적의 사육과 이용. pp. 146-150.

- 성재모. 1996. 한국의 동충하초. 교학사. pp. 226-227.
- 이민호, 윤철식. 1999. *Verticillium lecanii*를 이용한 온실가루이 방제. 천적의 사육과 이용. pp. 151-160.
- 이민호, 윤철식, 김정준, 최병렬, 김홍선. 2000. 시설 해충에 대한 병원성 사상균 선발 및 해충 면역체계에 관한 연구. 작물보호연구. pp. 334-360.
- 이민호, 권오경, 권석주, 김정준, 이시우, 김홍선. 2002. 곤충병원성 사상균의 살충효과 증진 연구. 작물보호연구. pp. 168-184.
- 류문일, 이준호. 2002. 개체군생태학. 서울대학교출판부. pp. 12-14.
- 한만위. 1999. 온실가루이좀벌의 사육과 이용기술. 천적의 사육과 이용. pp. 136-145.