



신규 살충성 천연물질 개발 연구(1)

Studies on the Development of New Insecticides
from Natural products(1)

연구기관
한국과학기술연구원
부설 유전공학연구소

과 학 기 술 처

제 출 문

과학기술처장관 귀하

본 보고서를 “신규 살충성 천연물질 개발 연구(1)”사업의 1년차 보고서로 제출합니다.

1991년 7월

주관연구기관 : 한국과학기술연구원 부설 유전공학연구소

연구책임자 : 김정일 (한국과학기술연구원 부설 유전공학연구소 책임연구원)

연구원 : 이형규 (" " 선임연구원)

박승환 (" " 선임연구원)

박호용 (" " 선임연구원)

반재구 (" " 선임연구원)

구분탁 (" " 연구원)

신병식 (" " 연구원)

오세량 (" " 연구원)

최수근 (" " 연구원)

연구조원 : 한창훈 (" " 기능원)

여 백

요 약 문

I. 제 목 : 신규 살충성 천연물질 개발 연구(1)

II. 연구개발의 목적 및 중요성

농업생산성 향상을 위하여 벼멸구, 이화병나방등을 비롯한 해충방제에 수많은 종류와 많은 양의 화학합성 농약을 사용해 오던 현대 과학적 농법은 이제 그러한 농약의 과도한 사용과 축적 또는 잔류성에 의해서 새로운 사회문제를 야기하게 되었고(독성, 환경오염, 생태계 파괴 등), 한편으로는 기존 농약에 대한 해충들의 내성이 나타나기 시작하므로써 해충방제에 보다 더 진보된 기술을 필요로 하게 되었다. 이러한 문제는 비단 우리의 경우만이 아니고, 미국, 일본등을 비롯한 선진국에서도 마찬가지여서 새로운 해결 방안 모색에 노력을 기울이고 있다. 그 방법중의 하나로 미생물의 대사산물을 이용한 해충방제를 시도해 오고 있으며, 성공적인 연구 결과로 avermectins, tetranactin, milbemycins 등의 살충제가 산업화 되었거나 산업화 과정에 있다. 이 분야의 연구는 선진국에서도 아직 개발 초기 단계에 있고, 산업화의 성공적인 예가 있어서 새로운 살충제 개발의 가능성은 매우 크다고 볼 수 있다. 더구나, 토양 방선균의 분포는 지역환경에 따라 매우 다양한 양상을 보이므로 우리의 자연환경 중에 분포된 방선균을 대상으로 연구를 한다는 것은 그 가능성을 더욱 높여준다고 할 수 있다.

따라서 본 연구의 1년차 단계에서는 우리나라 각 지역의 토양을 채취하여 방선균을 분리하고, 일정한 조건하에서 배양하여 살충성 검정을 행하고자 하였다. 또한 본연구의 중요 기술 부분인 살충성 검정 방법을 확립하였다.

Ⅲ. 연구 개발의 내용 및 범위

1. 방선균 분리용 토양시료를 전국을 대상으로 각 지역에서 각각 다른 환경의 토양을 채취하였다.
2. 각 토양의 성질 (site, pH, moisture)에 따라 분리된 방선균 type 균주 수를 비교 조사하였다.
3. 벼멸구에 대한 살충성 검정을 위한 대상 방선균 선별 과정으로서의 1차 검정방법을 확립하였다.
4. 1차 검정후 선발된 살충성 균주에 대해서 기존의 항균성 균주를 제외시키기 위한 항균력 검정을 실시하였다.
5. 이상의 실험을 통하여 우수 균주를 선발하였다.

Ⅳ. 연구결과 및 활용에 대한 건의

1. 전국 각지역으로부터 총 941점의 토양시료를 채취하였다. 지역별 분포를 보면 서울·경기지역 127점, 충청남북도 지역 496점, 전라남북도 지역 218점, 강원도 지역 12점, 경상남북도 지역 88점이었다.
2. 각 토양별 종류로는 퇴비 부근 14%, 산림토양 35%, 농지토양 51%의 비율이었으며, pH 6 이하의 산성 토양이 전체의 70%를 차지했고, 특히 pH 5-6 사이에 전체의 40%가 포함되어 있었다.
3. 각 토양에서 분리된 방선균 수를 비교해 보면 퇴비에서 상대적으로 더 많은 방선균 type strain이 분리되었고, pH 별로는 pH 5-6 사이의 토양에서 가장 많았으며, 수분 함량과의 관계는 전반적으로 10-30%의 수분함량 토양에서 비슷한 수준의 방선균이 분리되었다.
4. 살충성 균주 선발 과정중 1차적 검정방법 설정을 위해서 벼멸구, 누에, 집파리 유충을 이용하여 살충력 재현성을 비교 검토한 결과 벼멸구의

경우가 재현성이 가장 낮았으며 파리 유충과 누에가 재현성이 양호하였다. 따라서 1차 검정방법으로 파리 유충과 누에가 좋은 것으로 확인되었으며, 두가지 방법중 공시충의 준비과정, 검정방법의 간편성 등을 고려할 때 파리 유충을 이용하는 방법으로 결정하였다.

5. 설정된 1차 검정방법에 따라서 살충력을 조사한 결과, 분리된 총 방선균 3,056주중 225균주가 살충력을, 12균주가 생장조절 효과를 나타내었다. 활성균주로 선발된 237균주에 대해서 항균력 검정을 실시한 결과, 21균주만이 항균력이 없는 것으로 나타나 총 균주의 0.7%의 수율을 보였다.

6. 최종적으로 선발된 우수 균주인 21 균주는 모두 벼멸구에 대해서 강한 살충력을 나타냈다.

이상의 연구 결과로 부터 벼멸구에 대해 살충력이 강한 우수한 균주를 선발할 수 있었다. 이로써 방선균 분리용 토양은 pH 5-6의 부식토나 퇴비지대가 유리하며, 살충력 검정의 정확성, 재현성, 신속성, 간편성 등을 고려할 때 1차 검정법으로 파리 유충을 이용하고, 다음에 누에, 벼멸구를 이용한 검정방법이 좋을 것으로 사료된다.

여 백

S U M M A R Y

I. Title

Studies on the Development of New Insecticide from Natural Products(1)

II. Objectives and Importance of the Research.

Agricultural chemicals which are used massively as insecticides, herbicides and etc. for increasing the agricultural production have brought the unexpected social-problems related with excessive use, abuse, cummulation, residue and etc., and further, induced resistant strains of pests. At present, the more improved techniques must be used for overcoming these problems.

Advanced nations including U.S.A. and Japan are trying to resolve these problems, and as a method, to use the metabolites of microorganisms for protection of crops, livestock and human. There are three cases of success from their research, that is, avermectins, tetranactin and milbemycins which were or is being commercialized by companies.

Because the research of this area is the early stage of development and there are successful examples, there is much possibility of development of the new pesticide. In addition, we have the advantage of natural circumstances which may have different strains of microorganisms from other countries.

In this research, we collected soil samples from various sites,

isolated different Actinomycetes morphologically, cultured the strains under experimental conditions and screened insecticidal activities.

We established the simple and more reproducible method of first screening for selecting active strains of Actinomycetes.

III. Scope and Contents of the Research

1. Soil samples of different circumstances were collected from various sites of the whole country.

2. The number of isolated Actinomycetes type strains were checked according to soil characters(site, pH, moisture).

3. The first screening method for selecting active strains of Actinomycetes against brown planthopper was established.

4. Antimicrobial tests with selected strains were carried for excluding known strains.

5. Promising strains as candidates for new insecticides were chosen through the above experiments.

IV. Results and Recommendations

1. The total number of soil samples from various sites was 941, which was composed of 127 from Seoul and Kyonggi-Do, 496 from Choongchung - Do, 218 from Chulla-Do, 12 from Kangwon-Do and 88 from Kyongsang-Do.

2. Collected soil samples were classified into three parts according to site characters, that is, humus soil 14 % , forest soil 35% and agricultural land 51 % . Seventy percents of total soils were

below pH 6, and 40% were in range of pH 5 to 6, especially.

3. The number of isolated type strains was the most in humus soils and soils of pH 5 to 6. In view of the water content, strain numbers from soils in range of 10 to 30% moisture content were much the same.

4. In order to establish the first screening method for selecting active strains, the reproducibility of insecticidal activity was examined using brown planthopper, larvae of Bombyx mori and Musca domestica. Cases of B. mori and M. domestica were better. But, considering preparing test insects and simplicity of screening, the use of M. domestica was the best.

5. When insecticidal activities were screened according to the above method, 225 strains showed insecticidal activities and 12 strains growth regulator activities, of total 3,056 strains isolated. Active strains (237) were checked on antimicrobial activity, and 21 strains showed no antimicrobial activity under experimental conditions (0.7% of the total strains).

6. Final 21 strains showed good insecticidal activities against brown planthopper.

In this research, we could select strains of Actinomycetes with good activity against brown planthopper. Humus soils or pH 5-6 soils is good for isolation of Actinomycetes strains. We concluded that the best screening method is the use of M. domestica first, and next B. mori and brown planthopper, considering reproducibility, simplicity and convenience of the bioassay.

여 백

CONTENTS

Chapter I. Introduction	15
Chapter II. Materials and Methods	25
1. Soil Sampling and Isolation of Actinomycetes	25
2. Test Insect and Bioassay Method	27
3. Screening of Insecticidal Activity	30
Chapter III. Result and Discussion	32
1. Soil Sampling and Culture of Isolated Actinomycetes ...	32
2. Establishment of Bioassay Method	37
3. Screening of Insecticidal Activity	40
References	49

여 백

목 차

제 1 장 서 론	15
제 2 장 재료 및 방법	25
제 1 절 토양 시료 채취 및 방선균의 분리·배양	25
1. 토양 시료의 채취	25
2. 방선균의 분리 및 배양	25
제 2 절 공시층의 확보 및 살충성 검정 방법 확립	27
1. 공시층의 확보	27
2. 살충성 검정 방법 확립	28
제 3 절 분리된 방선균의 살충성 검정	30
1. 1차 살충성 검정	30
2. 항균력 검정	30
제 3 장 결과 및 고찰	32
제 1 절 토양 시료의 채취 및 방선균의 분리·배양	32
1. 토양 시료의 채취	32
2. 방선균 분리 및 배양	32
제 2 절 살충성 검정 방법 확립	37
1. 벼멸구의 검정	37
2. 집누에 나방의 검정	37
3. 집파리의 검정	37
4. 각 검정 방법의 비교	38
5. 1차 살충성 검정 방법에 대한 건의	38

제 3절 분리된 방선균의 살충성 검정	40
1. 1차 살충성 검정	40
2. 항균력 검정	41
3. 살충력 우수 균주의 확보	41
참고문헌	49

제 1 장 서 론

오늘날 우리는 물질 특허제도의 도입으로 인하여 Royalty 지불 부담이 가중되었고, 우리나라를 강력한 경쟁대상국으로 여기고 있는 선진제국들에 대해서 경제적 예측상태로 갈 것인가 아니면 동등한 경쟁상태가 될 것인가 하는 중요한 시점에 이르게 되었다. 이러한 난관을 극복할 수 있는 방법으로서는, 천연자원이 부족한 우리의 여건으로 볼 때 높은 부가가치를 갖는 신물질 창출이 최선의 길이라 할 수 있다.

신물질 창출에는 여러가지 방법이 많이 있지만 그중에서도 미생물을 이용한 산업은 그 가능성이 높은 분야이며, 그동안 의약 부분에 있어서는 항생제, 항암제, 면역조절제, 효소저해제 등 다방면으로 집중연구가 이루어지고 있어서 개발된 산물도 상당수에 이르고 있다. 그러나 생물농약 부분에 있어서는 비교적 소극적 상태였던 관계로 많은 결과를 남기지 못하였으나, 근래에 들어서면서 적극적인 연구로 많은 관심을 불러 일으키고 있다. 토양 미생물중 특히 방선균은 수많은 생물학적 활성을 갖는 이차대사 산물을 생산하고 있어서 1930년대 이후 수천의 antibiotics들이 방선균에서 비롯된 것들이고¹⁾, 최근에는 살충제의 자원으로서까지 가능성을 보여줌에 따라 높은 부가가치 창출에 지대한 희망을 안겨주게 되었다.

기존 화학합성 농약에 대한 심각한 사회적 문제는 비단 우리만의 경우가 아니고 세계적인 추세에 있어서도 마찬가지여서 일본, 미국등을 비롯한 선진국에서도 미생물의 대사산물을 이용한 진보된 해충방제 기술 개발에 역점을 두고 연구중이며, 성공적인 연구결과로 avermectins, tetranactin, milbemycins 등의 살충제가 산업화 되었거나 산업화 과정에 있다. 이러한 생물농약의 특징은 극미량에서 우수한 살충력을 가지면서도 그외의 동식물에 대

해서는 아직까지 심각한 독성이 발견되지 않았다는 점이다.

이 분야에 대한 연구는 선진국에서도 개발 초기 단계에 있고, 산업화의 성공적인 예가 있어서 좋은 guide가 될 수 있으며, 더구나 토양중의 방선균은 각 지역적 특성에 따라 독특한 차이를 보이고 있으므로 자연 환경이 다른 우리나라의 방선균 분리에 많은 기대를 가질 수 있기 때문에 중점적인 지원이 된다면 새로운 살충제 개발, 즉 신물질 창출의 가능성은 매우 크다고 볼 수 있다.

【 병충해와 농약 】

농업에 있어서 농약 사용은 생산성 향상에 필수적 요소이다. FAO의 보고에 의하면 만일 농약을 사용하지 않을 경우 세계적으로 33.8%의 감수율을 보이게 되며 특히 아시아 지역(43.3%)이 더욱 심하게 피해를 입게 된다고 하였다.²⁾ 1980년 미국에 있어서 병충해 잡초에 의한 손실은 insects 13.0%, diseases 12.0%, weeds 12.0% 등 총 37.0%로서(농약을 사용했음에도) 금액으로 볼 때 780억불에 이르고 있으며³⁾ 그중 해충에 의한 피해액은 점차 증가한다고 하였다. 이러한 상황에 대해서 원인 분석을 한 것을 보면 1) 품종 개량된 작물이 곤충에 대해 감수성이 증가 하였거나, 2) 해충의 천적이 소멸되므로서 살충제의 사용이 더 필요하게 되었고, 3) 살충제에 대한 저항력이 증가되었다. 4) 단일작물의 계속적인 재배증가로 작물의 윤작이나 종(種) 변화가 감소되었고, 5) 폐기된 작물이나 과일등의 방치로 곤충의 서식처를 제공하게 되는 비위생적인 환경 등을 지적하였다. 우리나라의 경우 1960년대 이후 소위 현대 과학적 농법이라 하여 벼멸구, 이화명 나방등을 비롯한 농작물의 해충을 없애기 위해서 수 많은 종류와 많은 양의 살충제를 사용하게 되었고, 그로 인해서 농업 생산성을 상당한 수

준으로 높일 수 있었으나, 오늘에 이르러서는 그러한 농약의 독성, 오·남용, 축적 또는 환경 잔류성등이 새로운 사회 문제로 대두하게 되었다. 한해 농약으로 인한 중독 사망자가 약 1,400명에 이르고 있고 농민의 절반정도가 만성 중독 증세를 보이고 있으며, 환경오염에 의한 생태계의 변화로 자연계의 균형이 파괴되어 가고 있는 실정이다. 또한 기존 농약의 비선택적 살충성에 의한 해충의 천적 생물을 비롯한 유익 곤충의 격감과 농약에 대한 내성 발현 등으로 농약 사용량의 증가를 초래하였고, 최근에 이르러서는 농산물의 잔류 농약으로 인한 공해 식품 문제가 대두되면서 구매력의 감소가 발생하는 등 이제는 반드시 해결해야 할 커다란 사회문제가 되어버린 상황이다.

우리나라의 수도(水稻) 병충해 발생상황을 보면⁴⁾ (표 1), 중국으로 부터 비래되는 해충으로서 매년 문제가 되는 방제 대상인 멸구류의 발생지역이 약 60만ha에 이르고, 나방류의 발생지역만도 30만ha 이상이며, 이들을 방제하기 위해서 연면적이 거의 4-10 배에 이르고 있어서 매년 농약살포에 많은 인력과 경비가 소요되고 있는 실정이다. 1989년도의 국내 농약 수급 상황을 보면 농약 매출액은 총 2,945억원으로 전년도에 비해 10.7% 증가되었고, 그중 살충제가 1,126억원으로 38.2%를 차지하고 있으며 생산량을 볼 때에도 전년도에 비해서 12%의 증가를 보였다.⁵⁾ 수입된 약제를 살펴 보면⁶⁾ (표 2) 原劑(99,344,000불)중 살충제가 33.5%(33,253,000불)를 차지하고 있고 기타 합성원료나 완제품을 포함시킨다면 액수는 더욱 늘어날 것이다. 한편, 세계의 농약시장은 1990년에 185억불로 추정되고 있고, 그중에서 살충제가 33.4%로 약 62억불에 이를 것으로 내다보았다.(표 3)

표 1. 수도(水稻)병충해 발생 및 방제 상황

(단위: 만ha)

	1987년		1988년		1989년	
	발생	방제	발생	방제	발생	방제
멸구류	63.5	322.6	64.8	256.0	59.4	222.1
이화병나방	9.3	405.1	8.7	429.1	16.3	439.4
흑명나방	8.1		10.0		0.4	
기타	14.4		14.8		41.2	
도열병	10.6	423.4	7.0	355.7	14.4	354.9
잎집무늬마름병	52.2	233.8	65.7	201.3	52.7	173.3
흰잎마름병	4.3	87.7	2.0	47.7	2.4	46.4
기타	2.7	3.1	0.4	6.3	0.7	8.6

표 2. 약제별 수입상황 ('89년도)

(unit: US 1,000 \$)

구분	내용	비율(%)	
원제(原劑)	살충제	33,253(33.5%)	18.4
	살균제	36,502(36.7%)	20.2
	제초제	28,692(28.9%)	15.8
	생장조절제	720(0.7%)	0.4
	전착제	177(0.2%)	0.1
	소계	99,344(100%)	54.9
합성원료	78,474	43.3	
완제품	3,330	1.8	
계	181,148	100	

표 3. 세계의 농약 시장 추이 예측

년	1980	1981	1982	1983	1984	1985	1986	1990예측*
살충제	4,025	4,300	4,350	4,280	4,400	5,000	5,450	6,175
살균제	2,175	2,850	2,925	2,820	2,500	2,800	3,250	3,940
제초제	4,750	5,100	5,250	4,950	5,950	7,075	7,600	7,100
식물성장 조절제 기타	650	750	775	750	900	1,025	1,100	1,285
합계	11,600	13,000	13,300	12,800	13,750	15,900	17,400	18,500

* 1983년을 기준으로 한 예측치

【 미생물이 생산하는 살충성분 】

1963년 Streptomyces mobaraensis에서 piericidin이 분리된 이후 미생물을 이용하여 살충성 물질을 찾으려는 연구는 외국의 우수한 농약업체 (Merck, Sharp & Dohme, Bayer, Pfizer, Sandoz 등)와 연구소 (Kitsato 연구소 등)를 중심으로 차츰 활기를 띠게 되었고, 특히 방선균의 대사산물로 부터 상당수 (20여가지)의 살충성 물질이 분리·보고 되었다.

(Table 4)

지금까지 발견된 살충성 물질들은 거의 대부분이 누에, 진드기, 기생충 등 생물체를 직접 검정에 적용하여 그 활성을 조사한 후 얻어진 결과였으며, 작용기작의 일부를 이용한 Chitinase, Chitin synthetase 등의 inhibitor는 각 enzyme을 곤충에서 직접 추출하거나 시판하는 시약을 이용한 경우도 있었다.

PIERICIDINS : 1963년 Tamura⁷⁾ 등이 Streptomyces mobaraensis 에서 piericidin A (= A₁) 와 B (= B₁) 를 처음 분리한 이후 1977년 Yoshida 등⁸⁾ 이 Streptomyces pactum 으로부터 많은 수의 piericidins (A₁₋₄, B₁₋₄, C₁₋₄, D₁₋₄) 를 분리 보고하였다. 본 화합물은 치환된 pyridine ring 에 불포화 측쇄 (unsaturated side chain) 가 결합된 형태로서 구조상 Coenzyme-Q 와 매우 유사한 관계로 mitochondrial transport system 에서 competitive inhibitor 로 작용, 매우 낮은 농도에서도 respiration 을 차단하여 살충성을 나타낸다. 그러나 이러한 respiration 차단 효과는 다른 동물에서도 현저하게 일어나기 때문에 실용화 되지는 못하였다.

Table 4. Some Pesticidal Compounds from microorganisms.

compound	structure classification	microorganism	activity	remark
piericidins ^{7) 8)}	alkaloid	<u>Streptomyces mobaraensis</u> <u>S. pactum</u>	insect	highly toxic to mammals
aureothin ⁹⁾	aliphatic nitrobenzene	<u>S. thioluteus</u>	insect mites	//
tetranactin ¹⁰⁾	cyclic polyester (macrotetrolide)	<u>S. aureus</u> S-3466	nematodes insects	commercialized in Japan (1973)
avermectins ¹¹⁾	macrolide lactone	<u>S. avermitilis</u> MA 4680	nematodes insects	commercialized by Merck & Co. (1986)
milbemycins ¹²⁾	macrolide lactone	<u>S. hygroscopicus</u> subsp. <u>aurelofaciens</u>	insects acarides	commercializing in Japan
nikkomycins ¹³⁾	nucleoside peptide	<u>S. tendae</u> Tu-901	insects acarides mites	chitin synthase inhibitor

(Continued)

compound	structure classification	microorganism	activity	re remark
isariins ¹⁴⁾	cyclodepsipeptide	<u>Isaria felina</u> (imperfect fungus)	insects	
L-681,110 ¹⁵⁾	macrolide lactone	<u>Streptomyces</u> sp. MA-5038	insects nematodes	Na ⁺ -K ⁺ ATPase inhibitor
L-alanosine ¹⁶⁾	N-nitroso amino acid	<u>Streptomyces</u> sp.	insects	chitinase inhibitor
leucanicidine ¹⁷⁾	macrolide lactone	<u>S. halstedii</u>	insects	
L-155,175 ¹⁸⁾	macrolide lactone	<u>S. hygrosopicus</u> MA-5285	insects	
allosamidine ¹⁹⁾	aminoglycoside	<u>Streptomyces</u> sp. No.1713	insects	chitinase inhibitor

DESTRUXINS 와 **BASSIANOLIDE** ; Kodaira²¹⁾ : Tamura²²⁾ 등, Suzuki²³⁾ 등이 곤충의 병원성 곰팡이류인 Metarhizium anisoplias의 배양액에서 살충 성분으로 19-membered depsipeptide류인 destruxins를 분리 보고하였고, Kanaoka 등이²⁴⁾ 누에의 병원성 곰팡이류인 Beauveria bassiana로부터 누에 유충의 근육을 이완시키고 결국에는 폐사시키는 성분으로서, D- α -hydroxyisovaleric acid와 L-N-methylleucine이 차례로 4분자 축합된 cyclic depsipeptide 성분을 분리하여 bassianolide라 명명하였다.

이들 성분들은 접촉독성이 아니고, 또한 antifeedant effect가 있으며 온혈동물에도 독성이 강해서 살충제로서는 실용성이 없었으나, 최근 들어서는 destruxin류가 insect model에서 immunodepressant activity를 나타냈고²⁵⁾, 임상적으로 쓰이고 있는 면역억제제인 cyclosporin과 구조적 유사성도 있기 때문에 destruxins의 새로운 용도 연구가 진행중이며, bassia-

nolide는 각종 동물 실험을 통해서 근육 수축 작용을 갖는 약물(acetylcholine, carbachol, pilocarpine, histamine, prostaglandin E₂ 등)에 대해서 길항작용을 나타낸다는 사실이 밝혀져²⁶⁾ 새로운 관심을 불러 일으키고 있다.

TETRANACTIN : 1971년 Ando 등은^{27) 28)} 팥바구미(Azuki bean weevil)를 실험곤충으로 하여 살충제를 검색하던중, 일본 Saitama의 Tsurugashima에서 채취한 토양으로부터 Streptomyces aureus S-3466를 분리하였고, 그것의 배양 filter cake으로부터 살충성이 뛰어난 tetranactin을 찾아내었다. 본 화합물은 응애(Tetranychus telarius)에도 양호한 살충력을 나타냈으며, Gram(+)균과 몇가지 식물병원성 fungi에도 효력을 나타냈으나 고등동물에는 거의 독성이 없는 것으로 보고(LD₅₀ > 15 g/kg, mouse)되어, 1973년 상업화되었다. 상업화이후 tetranactin의 acaricidal activity는 우수했으나 ovicidal effect는 미약했기 때문에 이를 극복하기 위해서 유기인제, carbamate 등을 혼합한 synergism을 이용한 상품이 만들어지기도 하였다. (예를들면, Mitecidin-C[®]는 tetranactin과 4-chlorophenyl 4'-chlorobenzene sulfonate의 혼합물이고, Mitecidin-B[®]는 Carbamate와의 혼합물임).

AVERMECTINS : 토양방선균에서 1979년 avermectin류가 분리 보고되면서^{11) 33) 34)} 살충제 연구는 새로운 전기를 맞이하게 되었다. Merck, Sharp and Dohme Research Laboratories에서는 기생충의 일종인 Nematospiroides debius를 mouse에 감염시킨 동물 모델을 이용하여 직접 activity screening을 하였고, 일본의 Kitasato 연구소에서는 토양으로부터 독특한 토양방선균을 선발하여 제공하던중, Shizuoka, Ito city, Kawana에서 채취한 토양으로부터 형태학적으로 전혀 다른 Stereptomyces avermitilis MA-4680

을 분리하였고, 여기에서 역사적인 avermectins가 발견되게 되었다. 이 program에 동원된 Screening System에서 특기할 사항은 독특한 방선균의 선발과 bioassay를 지적할 수 있다. 특히 bioassay는 처음부터 동물실험을 행함으로써 많은 노력, 시간 및 경비가 소요되었지만 물질의 효능과 독성을 동시에 확인할 수 있는 장점이 더 효과적으로 작용하였다. 따라서 여기에서 여과된 물질들은 합리적인 약리효과를 가지면서도 독성이 거의 없을 가능성이 매우 클 것이라고 생각하였고, 실제로 그렇게 되었다.²⁹⁾

Avermectins는 구조적으로 16-membered macrolide lactone을 기본골격으로 하여 2개의 oleandrose를 갖고 있는 형태의 화합물로서 가축의 주요기생충, 선충류(nematodes), 절족동물(Arthropods: insect, lice, mite, tick)에 대해서 모두 활성을³⁰⁾ 나타내며, 또한 기존의 구충제에 내성이 있는 기생충에도 효력을 나타낸다. 이것은 avermectin의 작용기전이 GABA에 의한 neurotransmission 중재를 차단하는 새로운 기전이기 때문이며^{31) 32)}, 따라서 GABA system이 결여되어 있는 platyhelminthes(편형동물문: 촌충류, 흡충류)에는 효력이 없다. nematode 기생충에 대해서는 기존의 구충제인 fenbendazole, levamisole, thiabendazole 등에 비해서 2-3 order 이상의 강력한 potency를 갖는다.

Avermectin series 화합물중 그 활성 강도로 볼 때 A-series 보다는 B-series가 더 생리활성이 강하고, B-series 중에서도 Arthropod pest에 대해서는 B_{1a}가 더 활성이 강하며, corn rootworm인 Diabrotica undecimpunctata에 대해서 B_{2a}가 제일 활성이 강하게 나타났다. 이러한 사실들에 따라서 avermectin B₁은 작물 보호용(농업용)으로 개발되었다. 이후 avermectin B₁의 구조중 C22와 C23 사이의 이중결합을 화학적으로 환원시킨 22, 23-dihydro avermectin은 수의용과 의약용으로 개발하

게 되었고 그 명칭도 Ivermectin이라고 하였다. 최근에는 Ivermectin 을 African river blindness라고 알려진 onchocerciasis (사상충증)의 원인 microfilaria인 회선사상충 (Onchocerca volvulus, 사람의 피하조직에 기생하여 피부종양, 구진성 피부염, 안질등을 유발시킴)의 구제에 human drug (MECTIZAN[®])으로 사용되고 있다.³⁵⁾ 1979년 avermectin 보고 이후 7년후인 1986년 미국의 Merck, Sharp & Dohme Co.에서 상품화 되어 시장에 출하하게 되었고 세계 살충제 시장을 크게 차지할 것으로 예상하고 있다.

MILBEMYCINS : 1974년, Sankyo Laboratories에서 기존의 어떤 insecticide나 acaricide 보다도 더 강력한 biocidal activity를 갖는 macrolides를 crude한 상태로 분리하였다고 하였다.³⁶⁾ 이 화합물은 일본의 Hokkaido지방 Kuttian에서 채취한 토양으로 부터 분리된 Streptomyces strain B41-146에 의해서 생산된 것이었으며, 후에 본 균주를 분류하는 과정에서 aerial mycelia상에 “golden-yellow teardrops” 모양의 삼출물을 생성한다는 뜻에서 그 학명을 Streptomyces hygrosopicus subsp. aureolacrimosus라고 명명하였다.³⁷⁾ 본 균주로부터 활성 물질 분리를 시도한 결과, 1980년 13개의 milbemycin (α_1 - α_{10} , β_1 - β_3)을 분리하였고³⁸⁾, 1983년에 추가로 milbemycin D와 H를 분리하였다.³⁹⁾ 그후 mutant를 이용한 다른 유도체들이 속속 분리 보고되었다. milbemycins는 구조적으로 avermectins와 아주 유사한데, 가장 큰 차이는 C13 위치에 α -L-oleandrosyl- α -L-oleandrosyl group이 없다는 점이다. milbemycins의 활성은 Acarus (진드기 속), Aphids (진딧물) 및 insects 등에 모두 살충성을 갖고 있으며 현재 일본에서 산업화 과정에 있다.

제 2 장 재 료 및 방 법

제 1 절 토양시료채취 및 방선균 분리·배양

1. 토양 시료의 채취

우리나라 전역의 토양을 대상으로 주로 농지 토양, 산림 퇴적물, 농가의 부식토 등을 채취하였다. 지표면으로 부터 5-10 cm 깊이의 토양을 취하여 지명, 날짜, 채취 장소 등을 기입, 실험실에 보관하였다. 토양 시료의 특성을 살펴보기 위하여 토양과 동일 부피의 증류수를 토양 시료에 가해 현탁시킨 후 측정된 pH를 토양의 pH로 하였고 토양의 수분 함량은 건열 건조시킨 토양의 무게를 이용하여 측정하였다.

2. 방선균의 분리 및 배양

토양 시료 0.5 g을 멸균된 생리 식염수 5 ml에 넣고 충분히 교반한 후 0.5 ml씩을 취해 0.05% SDS와 6% yeast extract가 첨가된 용액 4.5 ml에 가해 40 °C 항온조에서 20 분간 방치하였다. 멸균된 증류수에서 10^3 - 10^6 으로 희석하고 희석액 0.1 ml씩을 50 mg/l의 cycloheximide와 20 mg/l의 nalidixic acid가 첨가된 방선균 배지에 도말하였다. 방선균 분리용 선택 배지 (starch-casein-KNO₃ 배지)의 조성은 Table 5와 같다. 도말된 방선균 분리 배지는 30 °C 항온 배양기에서 7일간 배양 시키고 여기에서 나타난 방선균 colony들은 백금이를 사용하여 Bennet's agar 배지에 순수 분리하였다. 30 °C에서 7일간 배양시킨 각 균주들은 4 °C에서 보관하였다. Bennet's agar 배지의 조성은 Table 5와 같다.

Table 5. Media used for the isolation and cultivation of actinomycetes

Media	composition(g/l)	
Starch-Casein-KNO ₃	soluble starch	10
	casein	0.3
	KNO ₃	2.0
	NaCl	2.0
	K ₂ HPO ₄	2.0
	CaCO ₃	0.02
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.05
	FeSO ₄ * 7H ₂ O	0.01
Bennet's agar medium	glucose	10.0
	peptone	2.0
	beef extract	1.0
	yeast extract	1.0
	agar	15.0

제 2 절 공시충의 확보 및 살충성 검정방법 확립

1. 공시충의 확보

미생물의 신규 살충성 물질 개발을 위한 연구에서 검정용 곤충으로 사용되는 벼멸구와 집누에 나방은 유전공학연구소 실험곤충실에서 분양받아 사용하였으며 집파리는 본 연구실에서 계대 사육하면서 실험에 사용하였다.

1) 벼멸구 (Nilaparvata lugens)

벼멸구의 기주 식물로써 추정벼의 유묘를 사용하여 온실 (22-23 °C, 16 L : 8 D, R.H 75 %)에서 계대 사육하면서 실험에 사용하였다.

2) 집누에 나방 (Bombyx mori)

검정시 유충은 plastic petri dish에 넣어 25 °C, 18 L : 6 D, R.H. 65% 조건으로 실내에서 사육하면서 screening 하였고 먹이로는 동 실험실에서 제조한 인공사료를 공급하였다.

3) 집파리 (Musca domestica)

충청북도 청주 근교의 농가에서 집파리 20 마리를 포집하여 실험실에서 계대 사육하였다. 집파리 성충의 사육온도는 25 °C - 28 °C 정도이며 습도는 75% 정도로 유지하였다. 먹이는 우유에 설탕을 조금 넣어 공급하였으며 산란 배지는 쌀겨를 물에 반죽하여 사용하였다. 집파리 유충의 먹이로는 송아지 사료와 쌀겨를 1 : 1 정도로 섞어 공급하였으며 습도는 약간 건조한 상태를 유지하였다. 집파리의 계대는 실험실에서 매우 안정하게 유지되었으며 번데기가 되기 직전의 유충을 실험에 사용하였다.

2. 살충성 검정방법 확립

1) 벼멸구와 집누에 나방의 검정용 시료의 조제

① 배 양

분리된 방선균 균주를 soybean-starch medium (Table 6) 5 ml에 접종하여 shaking incubator에서 28-30℃로 6일간 진탕 배양하였다.

② 추 출

배양액을 원심분리 (10,000 rpm, 10 min, 4℃)하여 균체와 배양 상등액을 분리하고, 균체는 acetone 20 ml을 첨가하여 충분히 교반한 후 유용성 물질을 추출하였다. 아세톤 추출액은 감압 농축하여 배양 상등액과 함께 검정용 시료로 사용하였다.

2) 집파리 검정용 시료의 조제

분리된 방선균 균주를 GAPY 고체배지 (Table 7)에 접종한 후 28℃의 incubator에서 7 - 10일간 배양하여 집파리 유충의 검정에 직접 사용하였다.

3) 공시충 처리

① 벼멸구

흡충관으로 성충 10마리를 포집하여 CO₂ gas로 2초간 마취시킨 후 침지용 용기에 넣고 시료에 1분간 침지시켜 배양액 성분을 체내에 흡수시킨 다음 꺼내어, 발아 후 3 - 5일 된 벼유묘 6 - 7주를 넣은 시험관 (∅3 × 20 cm)에 넣어 사육하였다. 수도 유묘 시험관은 25℃, 16L:8D, R.H. 65%의 항온기에 보관하였으며 24, 48, 72시간 후의 벼멸구 사충율을 조사하였다.

Table 6. Composition of soybean-starch medium

Ingredient	Quantities(g)
soluble starch	10
glucose	20
soybean powder	25
beef extract	1
yeast extract	1
NaCl	2
K ₂ HPO ₄	0.05
H ₂ O	1,000 ml

Table 7. Composition of GAPY solid medium

Ingredient	Quantities(g)
glucose	10
soluble starch	20
yeast extract	5
bacto soytone	5
CaCO ₃	1
Agar	15
H ₂ O	1,000 ml

② 집누에 나방

Petri-dish에 3령 유충 10마리와 일정량의 인공사료를 넣고 시료액 200 μ l를 인공사료에 처리한 다음 벼멸구와 동일한 시간에서 사충율을 조사하였다.

③ 집파리

GAPY 고체배지에 배양된 방선균 시료에 번데기가 되기 직전의 유충 10마리를 넣어 4일후에 사충율을 조사하였다. 또한 처리 유충이 번데기가 된 지 7일후 성충으로의 탈피율을 조사하였다.

제 3 절 분리된 방선균의 살충성 검정

1. 1차 살충성 검정

살충성 검정의 실험 곤충으로 집파리를 사용하였다. 토양에서 분리한 방선균을 GAPY 고체배지에 7-10일간 배양한 후, 이를 1/2로 절단하여 각각에 번데기가 되기 직전의 유충을 10마리씩 넣고 4일후에 사충율을 조사하였다. 또한 처리 유충이 번데기가 된지 7일후에 성충으로의 탈피율을 조사하였다.

2. 항균력 검정

1차 살충성 검정에서 살충력이 인정되는 균주들에 대한 항균력 검정을 Escherichia coli, Bacillus subtilis, Candida albicans 등 세가지 미생물을 대상으로 실시하였다.

1) Agar plug 방법

LB 고체 배지위에 test 균주를 포함한 0.75% top agar를 부어 굳힌 후, 방선균이 배양된 GAPY 고체배지의 agar를 한조각 떼어 top agar 위에 올려놓고 E. coli, Bacillus는 37℃에, Candida는 28℃에서 incubation 하여 생긴 생육저지환으로 항균력 판정을 하였다.

2) Paper disk 방법

Agar plug 방법에서 항균성을 나타내지 않은 균주들을 대상으로 paper disk 방법을 행하였다. 방선균이 배양된 GAPY 고체배지에 acetone을 넣고 충분히 교반한 후 추출물을 농축하여 agar plug 방법때와 마찬가지로 top agar 위에 paper disk를 올려 놓은 후 농축된 방선균 추출물을 20 μ l 정도 paper disk 위에 떨어뜨려 생긴 생육저지환으로 항균력을 판정하였다.

제 3 장 결과 및 고찰

제 1 절 토양시료 채취 및 방선균 분리·배양

1. 토양 시료의 채취

전국의 각 지역을 대상으로 90년 9월부터 91년 6월에 걸쳐 총 941점의 토양 시료를 채취하였다. 주요 지역별 토양 시료 채취현황은 Fig. 1과 같다. 지역별로는 서울·경기지역 127점, 충청남·북도 496점, 전라남·북도 218점, 강원도 지역 12점, 경상남·북도 88점등이었다. 토양의 종류별로는 농가의 퇴비등이 전체의 14%였고, 산림토양 35%, 농지 토양 51% 등이었다. 한편 각 토양의 pH를 측정해 본 결과로는 pH 5-6 토양시료가 전체의 약 40% 정도로 많은 분포를 나타내었으며 pH 6 이하의 산성 토양은 전체의 약 70%를 차지하였고 pH 7 이상의 토양은 약 6% 정도로 극히 적은 것으로 나타났다.

2. 방선균 분리 및 배양

토양의 종류에 따라 분리된 방선균의 종류의 수를 조사한 결과 농지 토양이나 퇴비의 경우가 산림 토양에 비해 동일 조건하에서 상대적으로 더 많은 종류의 방선균을 분리할 수 있는 것으로 나타났다.

한편, Fig.2는 각 토양의 종류별로 토양의 pH에 따른 분리된 방선균의 종류의 수를 측정한 결과로서 pH 5-6의 토양 시료의 경우가 상대적으로 많은 종류의 방선균을 분리해 낼 수 있는 것으로 나타났다.

Fig.3은 같은 방법으로 토양의 수분 함량에 따른 분리된 방선균의 종류

의 수를 측정 한 결과이다. 전반적으로 10-30%의 수분함량을 갖는 토양들로부터 비슷한 정도의 방선균의 종류의 수를 얻을 수 있었다.

분리된 방선균의 총개체수와 이로부터 분류한 서로 다른 방선균의 종류 수를 도표화 한 결과 Fig.4와 같았다. 일정한 분리 방선균의 총개체수로부터 얻을 수 있는 서로 다른 방선균의 종류의 수는 퇴비의 경우가 삼림 토양이나 농지 토양의 경우 보다 우월한 것으로 나타났다.

이상의 결과들로부터 보다 다양한 방선균을 분리하기 위해서는 pH 5-6의 농가 부식토 또는 퇴비의 경우가 유리하다는 것을 알 수 있었다.



Fig. 1. Distribution of soil sampling sites

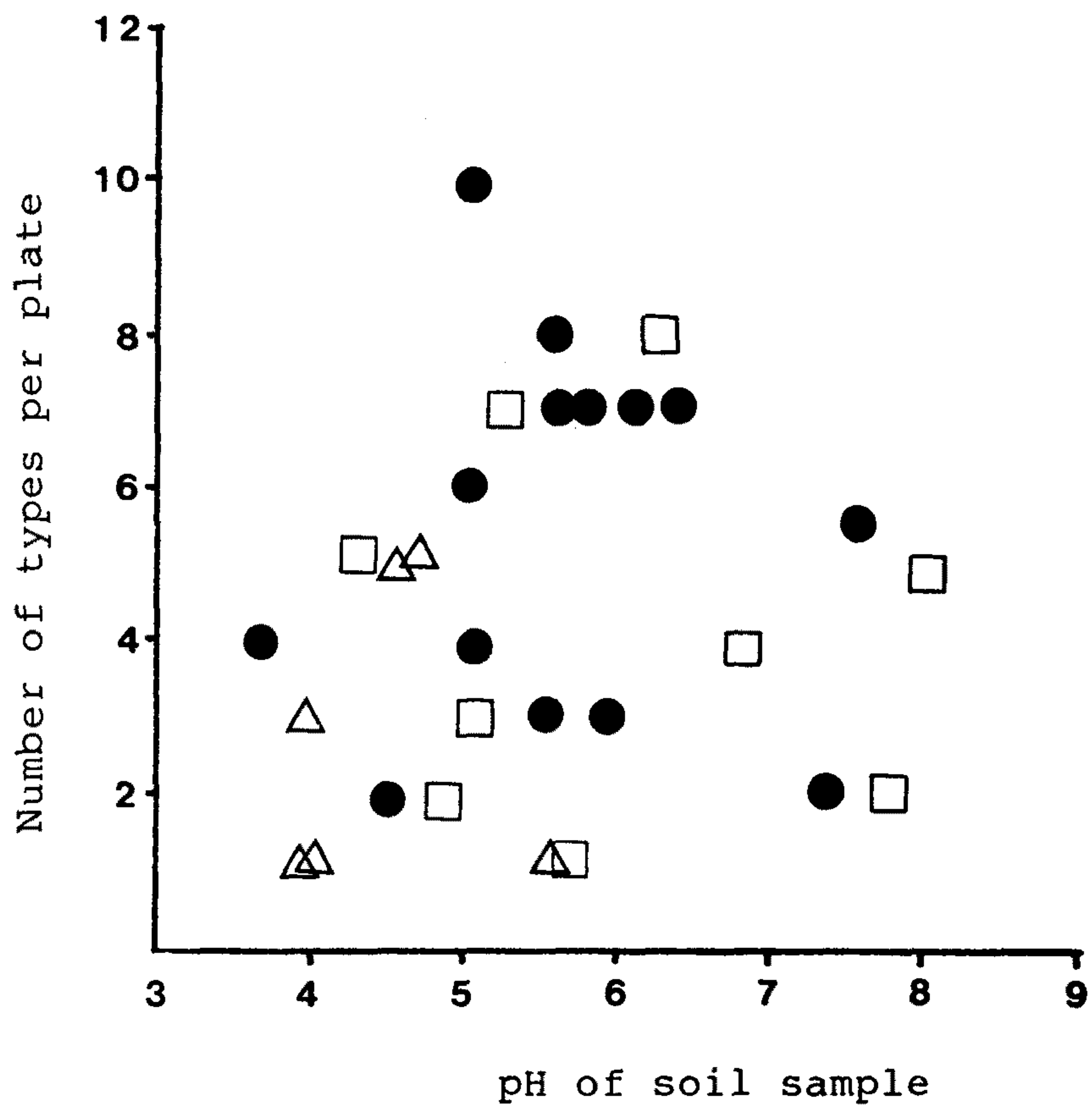


Fig. 2. Effect of soil pH on number of types of actinomycetes. Δ , forest soil; \square , grass vegetation; \bullet , cultivated soil

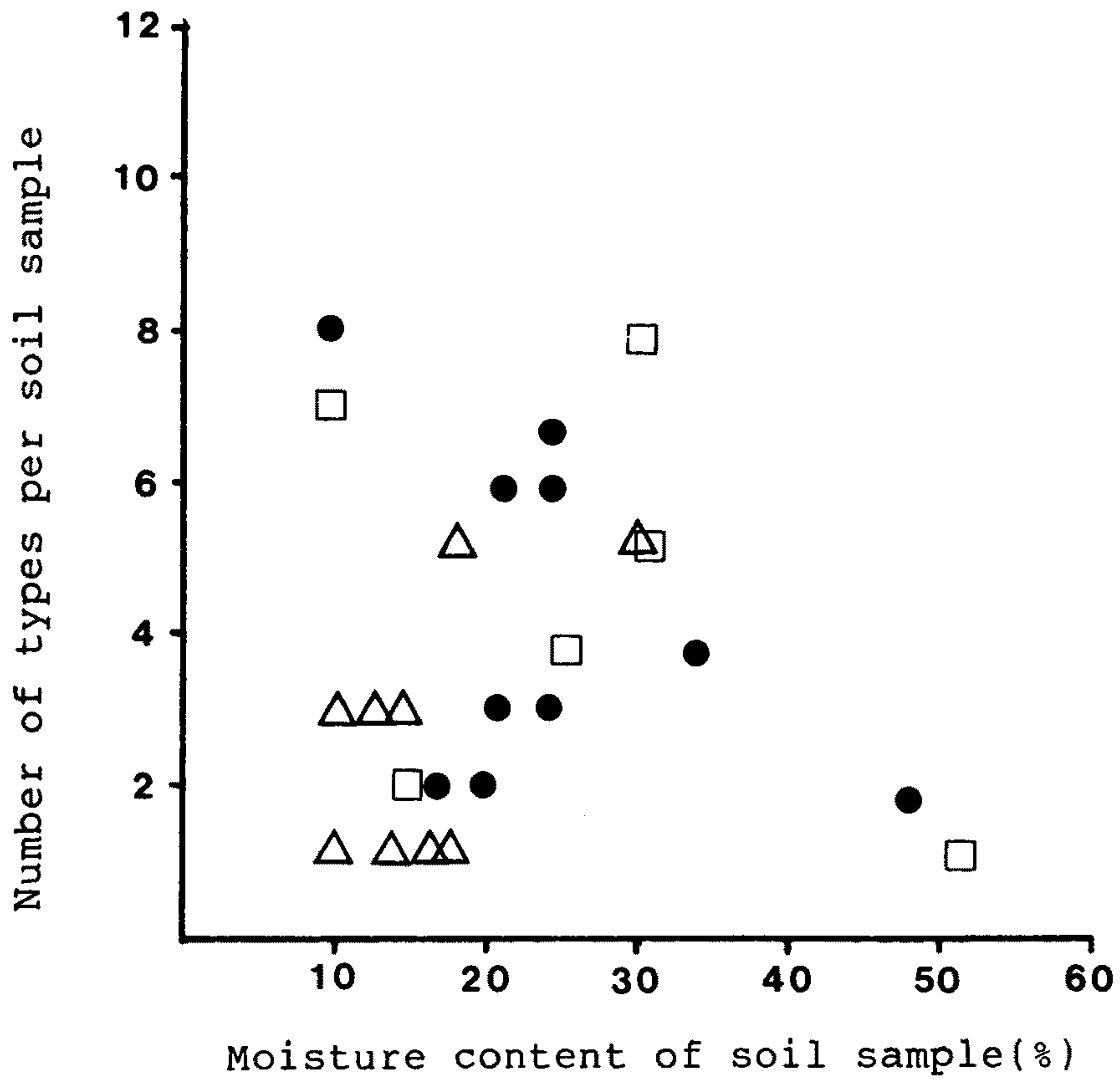


Fig. 3. Effect of soil moisture content on number of types of actinomycetes. Δ , forest soil ; \square , grass vegetation; \bullet , cultivated soil

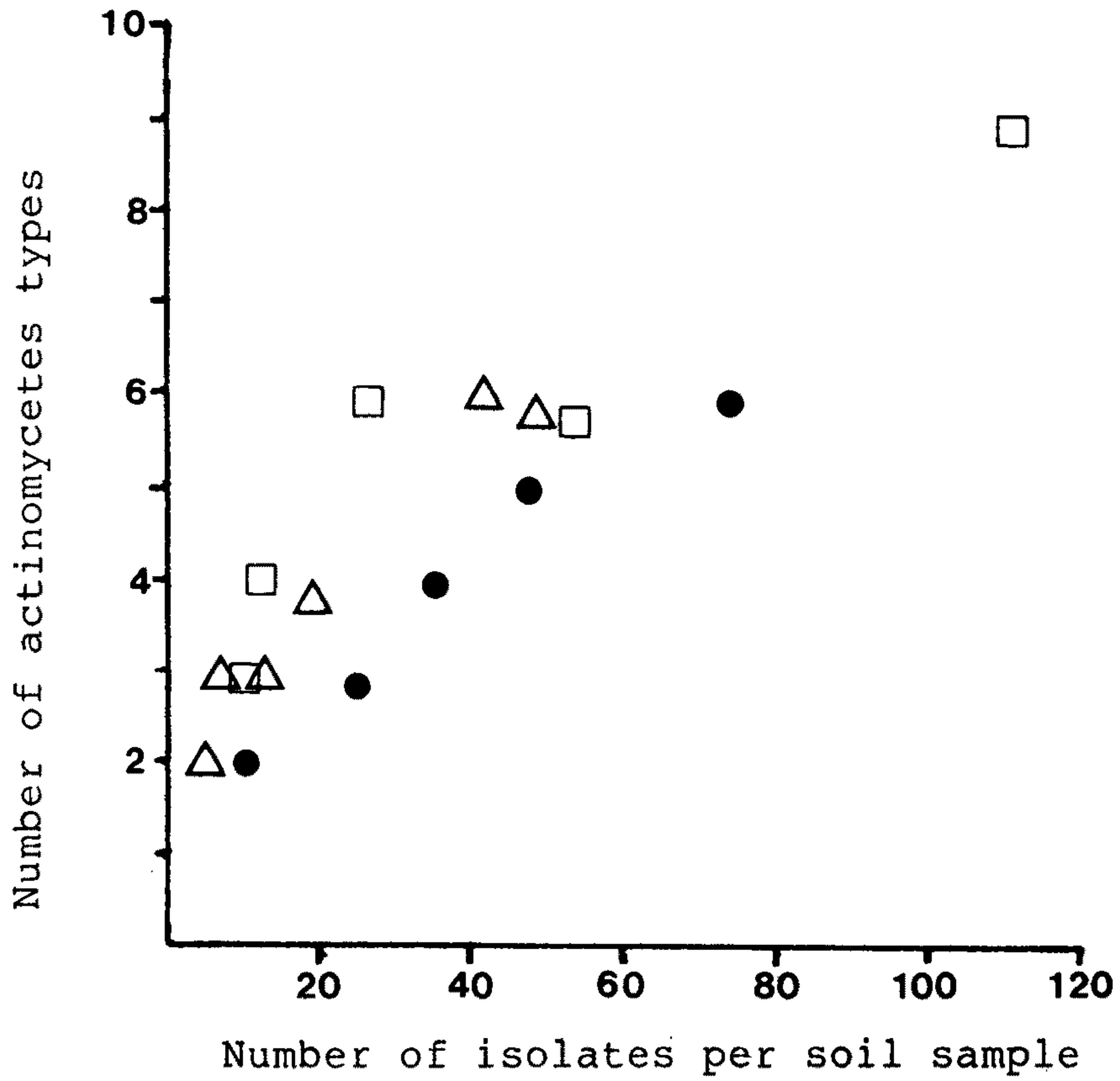


Fig. 4. Number of different types of actinomycetes in soil samples in relation to the number of isolated strains. ●, cultivated soil; Δ, forest soil; □, grass vegetation

본 연구에서는 총 941점의 채취된 토양 시료로부터 총 3,056주의 방선균을 분리하였다.

제 2 절 살충성 검정 방법 확립

1차 살충성 검정 방법을 확립하기 위한 실험곤충의 선정, 배양 조건의 정립등을 조사하기 위하여 액체 배양한 시료를 사용하여 벼멸구와 집누에 나방을 검정한 결과와 고체 배양한 시료를 사용하여 집파리를 검정한 결과를 서로 비교하였다.

1. 벼멸구의 검정

검정용 시료는 독립적으로 2회에 걸쳐 조제했으며 각각 2회에 걸쳐 살충성 검정을 실시하여 총 4반복의 실험을 수행하였다. (Table 8). 그결과 4반복에 걸쳐 모두 살충성을 나타내는 균주는 5가지로 조사되었으며 총 균주수에 대한 확률은 1.6%로 나타났다. 그러나 침지법을 이용한 벼멸구의 살충성 검정은 매우 재현성이 낮음을 알 수 있었으며 살충성이 우수한 균주를 선발하기 위해서는 많은 반복실험에 따른 노력과 시간이 요구되었다. 이외에도 벼를 침지시키는 방법, 벼에 시료를 침투시키는 방법등을 이용하여 검정을 실시했으나 검정방법으로 적절치 않은 것으로 판명되었다.

2. 집누에나방의 검정

검정용 시료를 독립적으로 2회에 걸쳐 조제하여 각각을 살충성 검정에 사용하였다. (Table 8). 그결과 재현성있게 살충력을 나타내는 균주는 5가지였으며 총 균주수에 대한 확률은 1.6%였다.

3. 집파리의 검정

독립된 2개의 고체시료를 각각 절반으로 절단하여 총 4반복의 검정을 실

행하였다 (Table 8). 이때 살충력이 인정되는 균주 뿐만 아니라 집파리의 탈피를 억제하는 균주도 함께 조사하였다. 그결과 4반복 모두 살충력 또는 탈피 억제력을 보이는 균주는 11 균주였으며 3.5%의 확률로 나타났다. 이중 604-004 번 균주는 4번 모두 탈피 억제력을 보였다.

4. 각 검정방법의 비교

벼멸구, 집누에나방과 집파리의 살충성 검정에서 살충력의 재현성이 인정되는 균주들을 서로 비교하였다 (Table 9). 그 결과, 액체 배양 시료를 사용한 벼멸구와 집누에나방의 경우 살충력이 인정되는 균주는 각각 5 균주인데, 비배양 고체 배양 시료를 사용한 집파리의 경우는 11 균주로 나타났다. 또한 벼멸구와 집누에나방에서 선발된 균주들은 대부분 집파리 검정의 결과에서도 선발됨을 알 수 있다.

5. 1차 살충성 검정방법에 대한 건의

이상의 결과에서 알 수 있듯이 벼멸구의 경우 재현성이 매우 떨어지기 때문에 1차 살충성 검정의 실험곤충으로는 적합하지 않다고 사료되며 집누에나방과 집파리를 비교해 볼때 집파리가 다음과 같은 여러가지 장점을 가지고 있다.

첫째, 집파리의 검정은 살충성 물질의 추출 과정없이 고체 배지상에서 바로 검정할 수 있기 때문에 적은 노력으로 짧은 시간내에 많은 수의 방선균을 검정할 수 있다.

둘째, 고체 배지를 사용함으로써 액체 배양에 비해 살충성 물질의 생산이 용이하며 또한 살충력의 재현성이 뛰어나다.

셋째, 역시 고체 배지를 사용함으로써 액체 배양에 비해 살충력이 인정되는

균주를 많이 선발할 수 있다.

Table 8. Bioassay results of reproducibility of insecticidal activity*

(Actinomycetes test strain total:317)

insect \ positive No.	once	twice	3 times	4 times
brown planthopper (1)	104 (32.8 %)	40 (12.6 %)	6 (1.9 %)	5 (1.6 %)
<u>B. mori</u> (2)	23 (7.3 %)	5 (1.6 %)	—	—
<u>M. domestica</u> (3)	20 (6.3 %)	9 (2.8 %)	3 (1.0 %)	11 (3.5 %)

* The positive activity means the above 70 % death rate per a treatment group except the above 50 % in case of B. mori.

(1) liquid culture;broth and acetone extract of mycelia;immersion assay method.

(2) liquid culture;broth and acetone extract of mycelia;application with diet

(3) solid culture;direct application with culture media

Table 9. Comparison of bioactive strains against test insects

	BPH	<u>B. mori</u>	<u>M. domestica</u>
404-001	+	-	+
409-002	+++	+++	++
410-001	-	-	+++
414-001	++	+	++
604-001	+++	+++	+++
604-004	-	-	+++
102-001	-	-	+++
102-006	++	++	-
104-002	-	-	+++
417-003	-	-	+++
708-004	-	++	-
106-005	-	-	+++
431-002	-	-	+++
Total	5(1.57 %)	5(1.57 %)	11(3.47 %)

* +, ++, +++ mean activity potencies

네째, 집파리는 번식력이 다른 곤충에 비해 매우 뛰어나기 때문에 많은 수의 개체수를 손쉽게 확보할 수 있다.

다섯째, 집파리의 생활 주기(life cycle)가 짧기 때문에 유충에 대한 살충력 검정 뿐만 아니라 성장 조절 인자(growth regulator)의 검정에도 유용하다.

여섯째, 집파리의 유충에 대한 검정 뿐만 아니라 성충에 대한 검정도 손쉽게 할 수 있기 때문에 살충력이 인정되는 균주들의 grouping이 용이하다.

이상과 같은 이유로 살충성 물질의 탐색을 위한 1차 검정방법으로는 집파리를 사용하는 것이 유용하다고 판단되어 이 방법을 사용하여 살충성 물질 탐색 연구를 수행하다.

제 3 절 분리된 방선균의 살충성 검정

1. 1차 살충성 검정

토양에서 분리된 3,056 주의 방선균을 대상으로 집파리에 대하여 1차 살충성 검정을 실시하였다. 검정 방법은 재료 및 방법에 나와 있는 것과 동일하다. 살충력이 인정되는 균주의 선발은 유충의 50%가 치사를 나타내는 LD₅₀으로, 또한 번데기의 50%가 성충으로 깨어나지 못하는 균주를 positive로 선발하였다. 그 결과, 3,056 주중에서 살충력이 인정되는 균주는 225 균주로써 7.36%의 수율로 나타났으며 곤충의 성장조절인자를 생산하는 균주는 12 주로써 0.39%의 수율로 나타났다. (Table 12)

이중, 1차 screening에서 positive로 판정된 균주들을 대상으로 항균력 검정을 실시하였다.

2. 항균력 검정

새로운 살충성 물질로의 접근에 있어서 항균력을 나타내는 균주는 제외시키는 것이 일반적인 추세인데⁴⁰⁾ 그 이유는 항균력을 나타내는 물질은 기존 물질일 가능성이 높으며 또한 그 균주 역시 많은 연구가 수행되었을 가능성이 높다. 따라서 새로운 신물질의 개발을 위해서는 항균력을 나타내는 균주를 제외시키는 것이 좋다고 판단되어 본 실험에서도 1차 screening에서 positive로 판정된 균주들에 대하여 항균력 검정을 실시하였다 (Table 13).

항균력 검정은 agar plug (Fig.5)와 paper disk 방법으로 행하였으며 검정 대상 미생물로는 Gram negative인 E. coli와 Gram positive인 Bacillus subtilis, eukaryote인 Candida albicans를 사용하였다.

결과에서 알 수 있듯이 1차 screening에서 살충력이 인정되는 균주들 중 상당수가 antimicrobial activity가 있으며 항균력을 나타내지 않는 균주는 21 주로써 살충력을 나타내는 균주에 대한 수율은 8.86%이며 토양에서 분리된 총 방선균 수에 대한 확률은 0.69%이다.

3. 살충력 우수 균주의 확보

토양에서 분리한 총 3,056 주의 방선균을 1차 screening을 통하여 살충력 검정을 실시하고 positive strain들을 대상으로 항균력 검정을 실시하여

Table 12. Assay result of first screening

total assay number of Actinomycetes	number of positive strains	number of strains containing insect growth regulator
3,056	225(7.36 %)	12(0.39 %)

Table 13. Result of antimicrobial test

number of insecticidal positive strains	positive against <u>E. coli</u>	positive against <u>Bacillus subtilis</u>	positive against <u>Candida albicans</u>	negative
237	42 (17.7 %)	156 (65.8 %)	144 (60.8 %)	21 (8.86 %)

항균력을 나타내지 않는 21 균주를 선발하였다. 이들 균주들은 집파리 (Fig.6)뿐만 아니라 누에와 벼멸구 (Fig.7)에도 우수한 살충효과를 나타내었으므로 벼멸구의 방제를 위한 신물질 개발에 1차 screening으로써 집파리를 사용한 것이 타당하다고 판단되며 앞으로 이들 21 균주들에 대하여, 물질 분리 및 정제, 구조분석, 균주 동정등을 통한 지속적인 연구를 수행할 것이다.

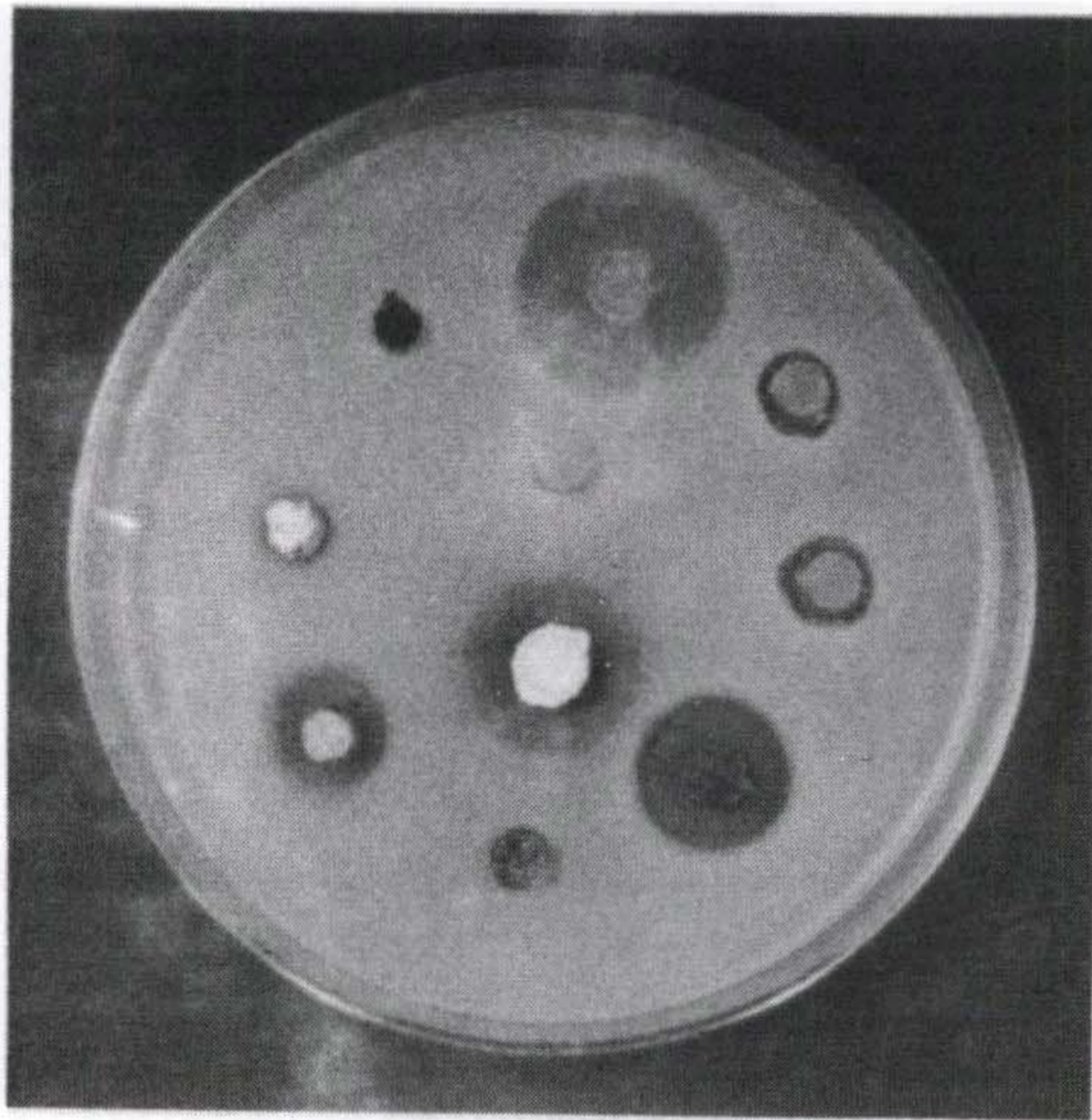


Fig 5. Agar plug test for antimicrobial activity

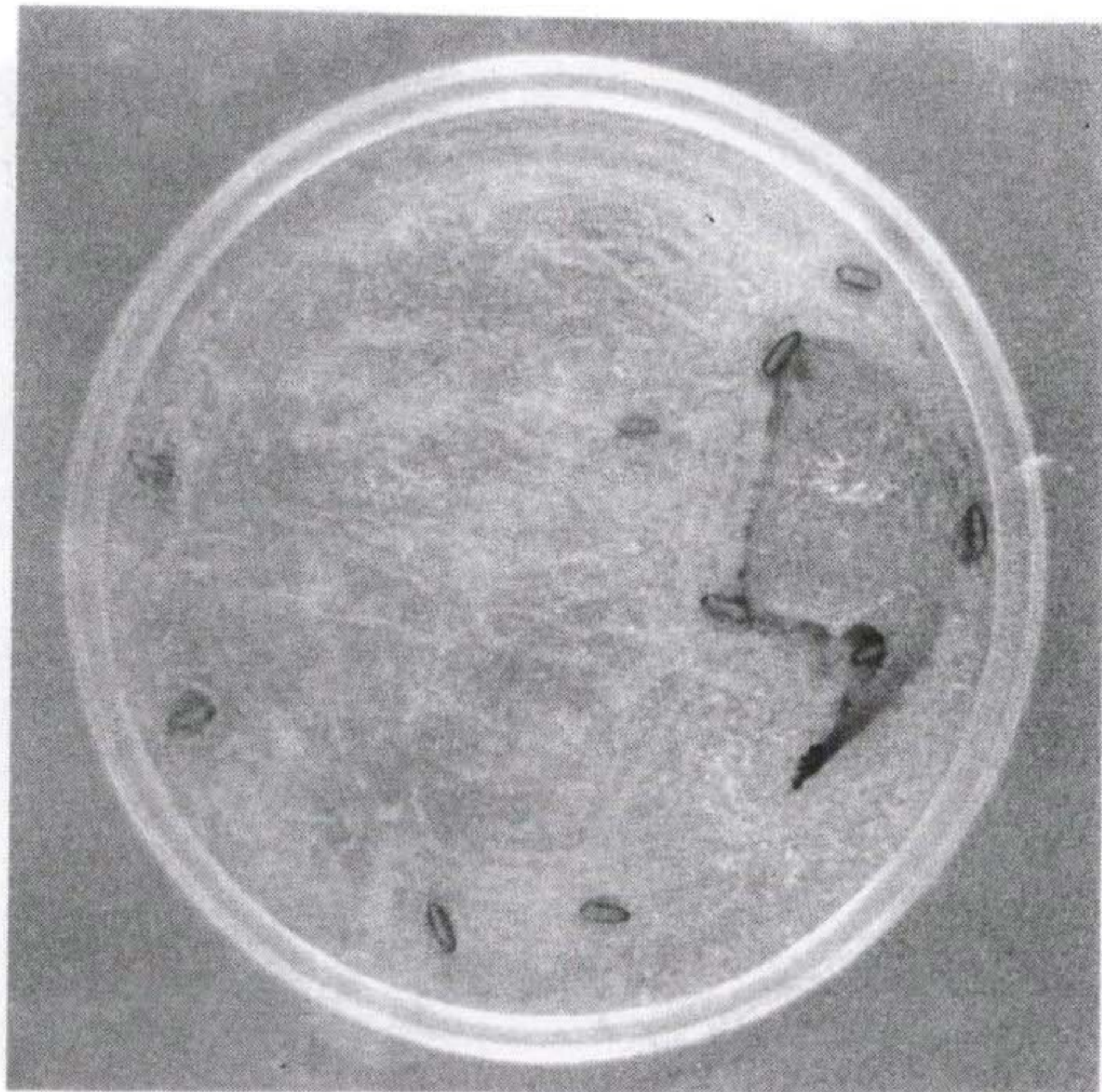


Fig. 6-1. Bioassay result of control against M. domestica

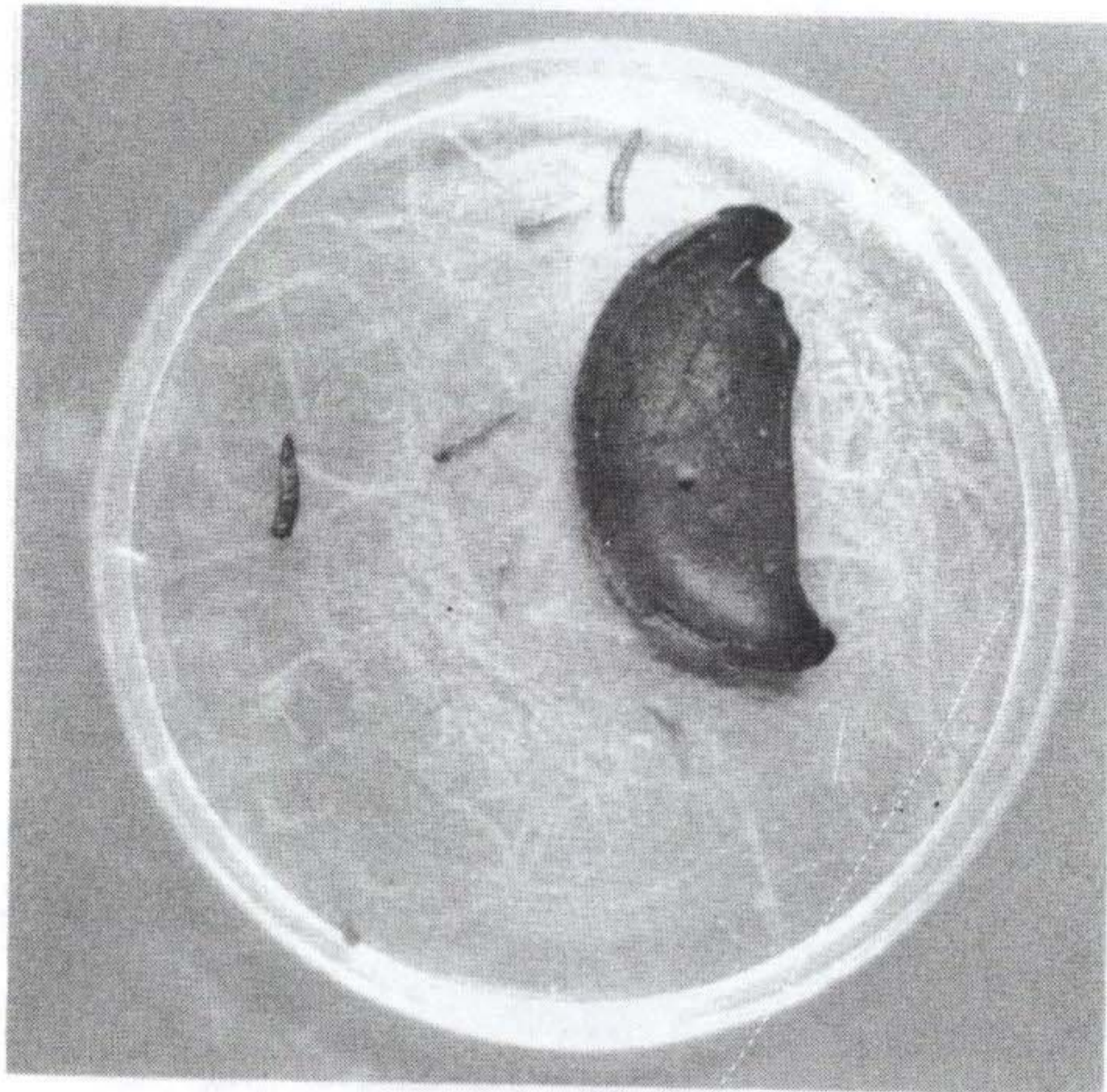


Fig. 6-2. Bioassay result of positive strain (431-002) of insecticidal activity

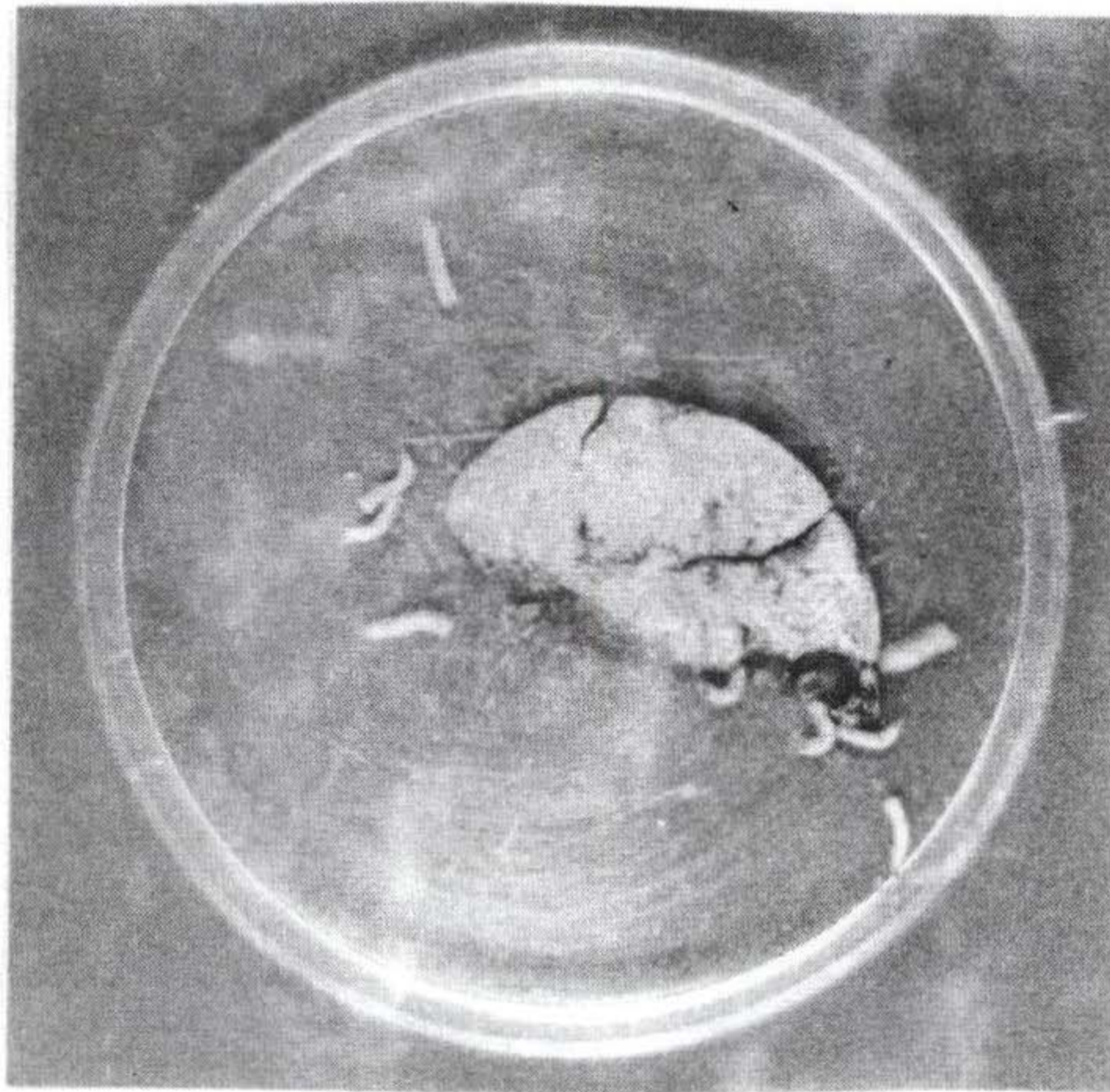


Fig. 6-3. Bioassay result of positive strain (604-004) of insect growth regulator

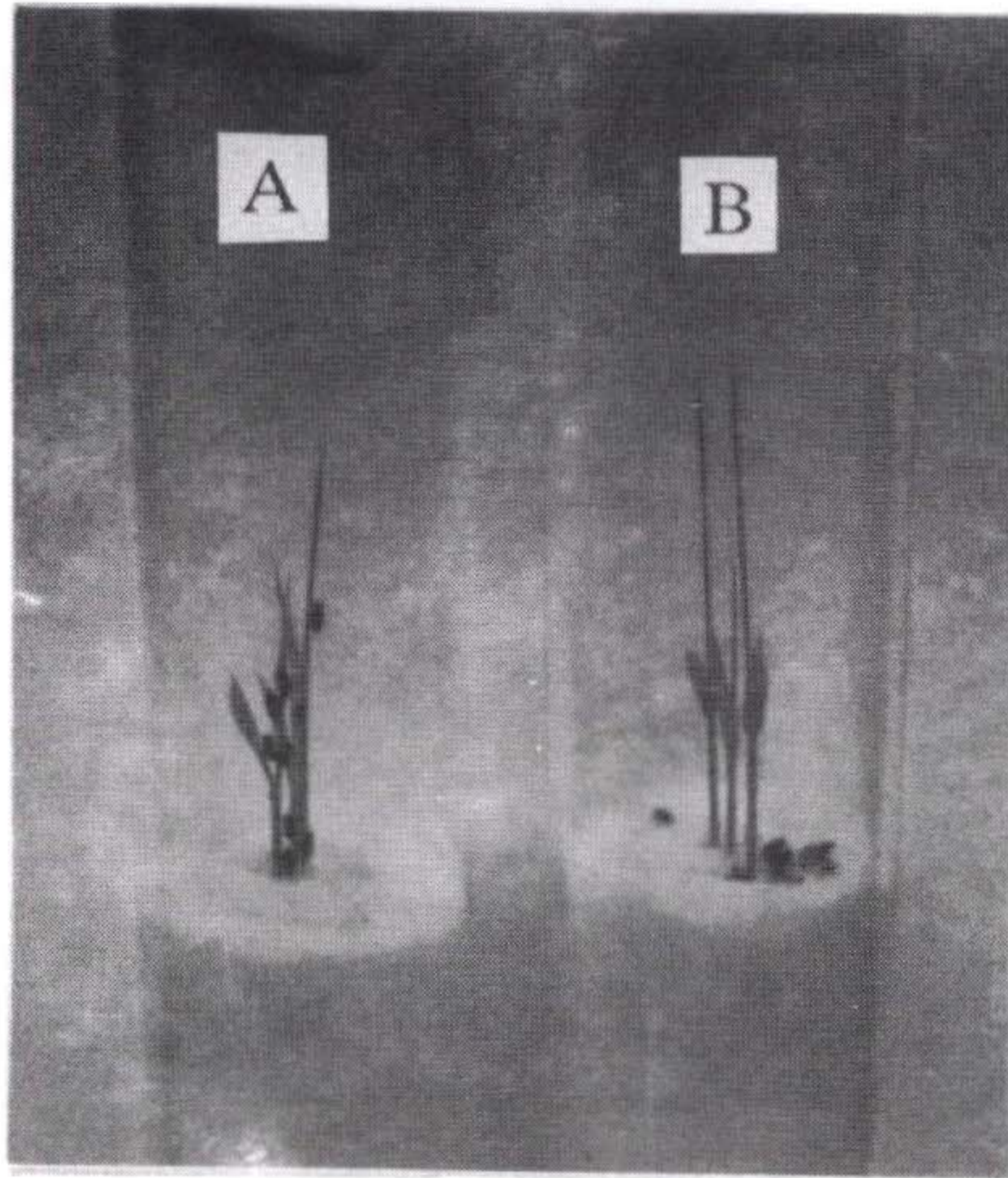


Fig 7. Bioassay results against brown planthopper
A, control ; B, positive strain (431-002) of
insecticidal activity.

여 백

References

1. M. S. Verrall, :Discovery and Isolation of Microbial Products, Ellis Horwood Ltd. p.9 (1985).
2. 이승찬 : 식물보호연구 제 5 호 p.24(1990).
3. N.B. Mandava :Handbook of Natural Pesticides :Methods, Vol. 1, p.3 (1985).
4. 농약공업협회 : 농약년보— 1990 — p.409
5. " : " " p.4
6. " : " " p.228
7. S.Tamura, N.Takahashi, S.Miyamoto, S.Suzuki and J.Nakatsu ; Agric. Biol. Chem., 27(8), 576(1963).
8. S.Yoshida, K.Yoneyama, S.Shiraishi, A.Watanabe, and N.Takahashi ; Agric. Biol. Chem., 41(5), 849(1977).
9. H.Oishi, T.Hosokawa, T.Okatomi, K.Suzuki and K.Ando ; Agric. Biol. Chem., 33(12). 1790(1969).
10. K.Ando, H.Oishi, S.Hirano, T.Okutomi, K.Suzuki, H.Okazaki, M.Sawada and T.Sagawa ; J. Antibio. 14(6), 347(1971).
11. R.W.Burg, B.M.Miller, E.E.Baker, J.Birnbaum, S.A.Currie, R.Hartman, U.L.Kong, R.L.Managhan, G.Olson, I.Putter, J.B.Tunac, H.Wallick, E.O.Stapley, R.Oiwa and S.Omura ; Anti-microb. Agents and Chemother. 15(3), 361(1979).
12. Y.Takiguchi, H.Mishima, M.Okuda and M.Terao ; J.Antibio. 33(10), 1120(1980).

- 13 . U.Dahn, H.Hagenmaier, H.Hohne, W.A.König, G.Wolf and H.Zähner ; Arch. Mikrobiol., 107, 143(1976).
- 14 . R.Baute, D.G.Deffieax, M.A.Merlet and A.Neveu ; J. Antibio. 34, 1261(1981).
- 15 . L.Huang, G.Albers-Schonberg, R.L.Monaghan, K.Jakbas, S.S. Pong, O.D.Hensens, R.W.Burg, D.A.Ostlind, J.Conroy and E.O. Stapley ; J. Antibio. 37(9), 970(1984).
- 16 . S.Matsumoto, S.Sakuda, A.Isogai and A.Suzuki ; Agric. Biol. Chem., 48(3), 827(1984).
- 17 . A.Isogai, S.Sakuda, S.Matsumoto, M.Ogura, K.Furihara, H.Seto and A.Suzuki ; Agric. Biol. Chem. 48(5), 1379(1984).
- 18 . M.A.Goetz, P.A.McCormick, R.L.Monaghan and D.A.Ostlind ; J. Antibio. 38(2), 161(1985).
- 19 . S.Sakuda, A.Isogai, S.Matsumoto and A.Suzuki ; J. Antibio, 40(3), 296(1987).
- 20 . Gy.Matolcsy, M.Nadasy and V.Andriska ; Pesticide Chemistry, Elsevier, p.41(1988).
- 21 . Y.Kodaira ; Agric. Biol. Chem. 25, 261(1961).
- 22 . S.Tamura, S.Kuyama, Y.Kodaira, nd S.Higashikawa ; Agric. Biol. Chem. 28, 137(1964).
- 23 . A.Suzuki, H.Taguchi and S.Tamura ; Agric. Biol. Chem. 34, 813 (1970).
- 24 . M.Kanaoka, A.Isogai, S.Murakoshi, M.Ichinoe, A.Suzuki and S. Tamura ; Agric. Biol. Chem. 42, 629(1978).

25. J.R. Steiner and C.L. Barnes ; Int. J. Pept. Protein Res. 31(2), 212(1988).
26. S.Nakajyo, K.Shimizu, A.Kometani, K.Kato, J.Kamizaki, A.Isogai and N.Urakawa ; Japan. J. Pharmacol. 32, 55(1982).
27. K.Ando, H.Oishi, S.Hirano, T.Okatomi, K.Suzuki, M.Sawada and T.Sagawa ; J. Antibio. 24(6), 347(1971).
28. K.Ando, Y.Murakami and Y.Nawata ; J. Antibio. 24(7), 418(1971)
29. G.H.Wagman and R.Cooper ; Natural products Isolation, p.350 (1989).
30. G.Albers-Schonberg, H.Wallick, R.E.Ormond, T.W.Miller and R.W.Burg ; U. S. Patent 4,310,519(1982).
31. S.Kass, C.C.Wang, J.P.Walrond, A.O.W.Stretton, ; Proc. Nat'l Acad. Sci. USA. 77, 6211(1980).
32. L.C.Fritz, C.C.Wang, A.Gorio ; ibid. 76, 2062(1979).
33. J.R.Egerton, D.A.Ostlind, L.S.Blair, C.H.Eary, D.Suhayda, et al ; Antimicrob. Agents Chemother. 15, 372(1979).
34. T.W.Miller, L.Chaiet, D.J.Coli, J.E.Flor, R.T.Goegelman, et al ; Antimicrob. Agents Chemother. 15, 368(1979).
35. J.A.Lasota and R.A.Dybas ; Annu. Rev. Entomol. 36, 91(1991).
36. H.Mishima, M.Kurabayashi, C.Tamura, S.Sato, H.Kuwano, a.Saito and A.Aoki ; Abstract Papers 18th Symp. Chem. Nat. prod., Kyoto, p.309(1974) [H.G.Davies and R.H.Green ; Nat. prod., reports 3, 87(1986)]
37. T.Okazaki, M.Ono, A.Aoki and R.Fukude ; J. Antibio., 36, 438 (1983).

- 38 . Y.Takiguchi, H.Mishima, M.Okuda, and M.Terao ; J. Antibio., 33, 1120 (1980) .
- 39 . Y.Takiguchi, M.Ono, S.Muramatsu, J.Ide, H.Mishima and M.Terao ; J. Antibio. 36, 509 (1983) .
- 40 . B.Fabre, E.Armou, G.Etienne, f.Legendre and G.Tiraby ; J. Antibio. 61(2), 212 (1988) .

1991 년 (1 차년도) 위탁연구보고서 - I

1. 본 과 제 명 : 신규 살충성 천연물질 개발
2. 위탁연구과제명 : 해충의 AchE와 MFO활성에 관한 연구
3. 주 관 연 구 기 관 : 한국과학기술연구원 부설 유전공학연구소
4. 본과제 연구책임자 : 김 정 일
5. 위탁연구책임자 : 부 경 생
6. 계획 대 진도표 : (1990.7 - 1991.6)

구 분 연구내용	연 구 개 발 기 간										진도율 (%)	
	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6		
1) 문헌조사												100
2) 인공사육												100
3) MFO활성검정												100
4) AchE 활성검정												100
5) 보고서작성												100
총 진 도 율											100	

당초계획 ;

진 도 ; _____

7. 연구내용 및 결과

1) 서론

MFO (mixed function oxidase 또는 cytochrome P-450 reductase)는 곤충을 포함한 모든 생물들(포유류, 어류, 절지동물, 식물, 진균류 등)에 존재하며, 서로 비슷하여 매우 오래전부터 발달된 것으로 보인다. MFO는 단일효소가 아니며 P-450, cyt. b₅ 및 NADPH-cyt. P-450 reductase로 구성되어 있고 구성비율은 종마다 다르다. 또한 이들은 여러 종류의 동위효소(isozyme)형태로 존재하며, 체내에 침입한 외래물질의 제독대사등을 담당하는 것으로 농약과 생물과의 관계에 있어서 매우 중요하다.

이들의 산화기작은 먼저 산화형 P-450과 기질이 결합해서 P-450 - 기질 복합체가 형성된다. 이 복합체는 NADPH로부터 cytochrome 환원효소를 통해 전자를 1개 받아 P-450 이 환원형으로 되며, 산소분자와 결합해서 P-450 - 기질 - O₂ 복합체를 형성한다. 더우기 NADPH등으로부터 한개의 전자를 다시 받아서 O₂가 활성화 되어 기질의 산화된다. 이렇게 해서 기질에 산소원자 1개가 첨가되어 P-450은 다시 산화형으로 된다.

이들이 작용할수 있는 기질범위는 매우넓어 살충제(DDT류, 카바메이트제, phosphorothioate류, cyclodiens류, 피레트린제), 제초제 및 1,3-benzodioxide류의 상승제(synergist)들은 물론 benzopyrene과 같은 환상구조가 많은 방향족 탄화수소류, biphenyl들, 돌연변이 유발물질(nitrofurazone, dimethylnitrosamine, cyclophosphamine, 2-acetylaminofluorene, vinyl chloride 등), 방향성 아민화합물, nitroaromatics들, 여러가지 약품, 심지어 자체내의 스테로이드, 유약호르몬, 페로몬 등이다.

곤충 중추신경계의 흥분성 전달물질인 ACh (acetylcholine)는 신경연접 후 세포 선단에 위치하는 수용체인 ACh receptor 와 떨어진 후 Acetylcholinesterase에 의해 acetate 와 choline으로 가수분해되어 acetate는 주변으로 확산되고 choline은 연접 전 돌기에 능동흡수되어 ACh합성에 재 이용된다. 살충제의 대부분을 차지하는 유기인제와 카바메이트제 들은 모두 AChE와 결합하여 그 작용을 억제하기 때문에 한 번 방출된 ACh이 분해되지 못하고 오랫동안 연접 후 세포를 자극하는 결과를 가져온다. 한편 담배독인 니코틴은 ACh수용체와 결합하여 ACh와 똑같이 연접 후세포막에 있는 양이온 통로를 활성화 시킨다. 반대로 cartap은 ACh수용체와 결합하여 ACh길항제로 작용한다. 결국 이런 살충제들은 신경자극전달 기구를 교란시켜 곤충을 최종적으로 죽음에 이르게한다.

AChE활성의 저해력은 살충제의 화학구조에 의해 크게 좌우되며 또한 AChE 자체도 생물종류에 따라 성질이 조금씩 다르기 때문에 선택독성의 기구 검토에도 중요하다. 뿐만 아니라 AChE는 유기인제와 카바메이트제에 대한 저항성의 한 방편으로 관여하는 경우도 있다. 저항성계통의 끝동매미충 AChE는 감수성계통의 AChE 보다도 N-methylcarbonate로 저해되기 어렵지만, N-propylcarbonate는 거꾸로 저항성계통이 가지고있는 변이형 AChE를 특히 잘 저해한다. 이처럼 AChE는 유기인제와 카바메이트제의 작용점으로서, 살충제의 선택독성이라든가 저항성기구에도 관여하고있어 농약연구상 극히 중요한 효소이다.

2) 재료 및 방법

가. 인공사육

담배거세미나방(*Spodoptera litura*), 파밤나방(*Spodoptera exigua*), 담배나방(*Helicoverpa assulta*) 및 흰불나방(*Hyphantria cunea*) 유충들은 인공사료(표1)로 사육하였는데 개체군 유지에 아무런 문제가 없었다.

Table 1. Ingredients of artificial diets for *Spodoptera litura*, *Spodoptera exigua*, *Helicoverpa assulta* and *Hyphantria cunea*

Ingredients	Species			
	<i>S. litura</i>	<i>S. exigua</i>	<i>H. assulta</i>	<i>H. cunea</i>
Kidney bean(g)	100	95		
Wheat germ(g)	90	95		
Corn(g)			90	
Soybean(g)			100	
<i>Morus</i> leaf powder(g)				300
Yeast(g)	40	40	24	
Milk(g)			6	
Agar(g)	15	15	24	
Salt mixture(g)	5	5		
Vitamin mixture(g)			4.3	
Ascorbic acid(g)	9	6	4.1	
Sorbic acid(g)	2.2	2.2	2.2	
Propionic acid(ml)				3.6
Metyl-p-Hydroxybenzoate(g)	3	3	2.4	
Hot pepper seed oil(ml)			4	
Formalin(35%)(ml)	2	2	2	
Distilled water(ml)	1000	950	1000	880

담배나방, 파밤나방 및 담배나방의 유충은 1-2령까지는 12x3cm(지름x높이)의 페트리접시에서 20마리씩 집단 사육하였고, 3령부터는 4x5cm의 페트리접시에서 개체 사육하였다. 흰불나방의 경우 인공사료 및 야외에서 채집한 뽕나무(*Morus alba*), 수양버들(*Salix babylonica*), 염주나무(*Tilia megaphyllo*)등의 잎으로 12x20x6cm의 플라스틱 용기에서 1-2령까지는 40마리씩, 3령부터는 20마리씩 집단사육하였다.

나. MFO(mixed function oxidase)의 활성검정

(1) 효소액준비

10% glycerol, 1mM ethylenediaminetetracetic acid, 0.1mM 4,4-dithio-DL-threitol 1mM 1-phenyl-2-thiourea (ethylene glycol monoethyl ether 에 녹임), 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (ethylene glycol monoethyl ether 에 녹임)들을 포함하는 0.1M sodium phosphate buffer (SPB) (PH7.2) 내에서 실험곤충의 증장조직을 절취하였다. 이 증장조직내에 있는 먹이등을 제거한 후 teflon homogenizer에 넣고, 한 마리당 0.5ml 의 비율로 위 인산완충액을 가한 후 잘 마쇄하였다. 지방체는 핀셋을 사용하여 가능한 한 모두 집어내어 역시 Teflon Homogenizer에 넣고, 한 마리당 0.5ml 의 0.1M SPB (PH 7.2)를 가한 후 마쇄하였다. 전 충체를 마쇄할 때는 체중 100mg당 400 μ l 의 비율로 0.1M SPB (PH 7.2)를 가했다. 마쇄된 시료들을 600g 에서 10분간 원심분리하고, 상청액을 10,000g에서 20분간 다시 원심분리하여 이로부터 얻어진 상청액을 효소액으로 사용하였다. 위의 전 과정은 2~4°C에서 수행되었고, 준비된 효소액은 즉시 활성검정에 사용되었다. 여기서 측정된 MFO의 활성은 cytochrome P-450 reductase 의 활성이다.

(2) 활성검정

MFO의 활성검정방법은 Hansen 과 Hodgson (1971) 및 Williams 와 Kamin (1962)의 방법을 비교한 결과 Williams 와 Kamin (1962)의 방법이 더욱 유용하였다. 따라서 Williams 와 Kamin (1962)의 방법에 준하여 파장 550nm, 30°C에서 Pye Unicam UV/VIS Spectrophotometer를 사용하여 cyt. P-450 reductase의 활성을 검정하였는데, 반응액의 조성은 표 2와 같다.

Table 2. Composition of the reaction mixture for MFO activity test

Cytochrome c 2mM	150 μ l
NADPH 30mM	150 μ l
NaCN 40mM	20 μ l
SPB 0.1M, PH7.2	200 μ l
Enzyme Extract	20 μ l

다. AChE 활성검정

(1) 효소액준비

실험곤충의 머리부위를 절취하여 teflon homogenizer에 넣고, 한 마리당 200 μ l의 비율로 0.1M SPB (PH 7.2)를 가하여 잘 마쇄한 후, 700g에서 10분간 원심분리하여 얻어진 상청액을 효소액으로 사용하였다. 위의 과정은 2~4°C에서 수행되었고, 준비된 효소액은 즉시 활성검정에 사용되었다.

(2) 활성검정

AChE의 활성검정을 파장 412nm; 30°C에서 실시했는데, Ellman 등(1961)방법에 준한 AChE활성검정의 원리는 acetylthiocholine(ATCh)의 가수분해에 의해서 생긴 thiocholine과 5,5'-dithiobis-2-nitro-benzoate(DTNB)를 반응시켜 생성하는 황색 물질인 5-thio-2-nitrobenzoate가 파장 412nm 에 흡광 극대를 가지는 것에 기인한다. 반응액의 조성은 표 3과 같다.

Table 3. Composition of the reaction mixture for AChE activity test

ATCh 0.075M	50 μ l
DTNB 0.01M	100 μ l
SPB 0.1M, PH7.2	300 μ l
Enzyme extract	50 μ l

라. 단백질정량

Cyt. p-450 reductase와 acetylcholinesterase활성을 검정한 조직들의 단백질정량에는 Bovine serum albumin 을 기준으로 하는 Lowry 등(1951)의 방법을 사용하였다.

3) 결과 및 고찰

표본의 준비 및 보관방법이 cyt. P-450 reductase activity 에 미치는 영향

Cyt. P-450 reductase는 보관방법에 따라 활성도의 손실이 다르게 나타났다. 적출한 증장을 50% glycerol이 포함된 SPB(PH 7.2)에 담근후 -18°C에서 냉동보관하였을 경우 활성감소는 점진적으로 일어나서 4주까지 90%의 활성을 보유하고있었다. 증장을 완충액속에 담그지 않은채 그냥 -70°C에 냉동보관했을 때, 냉동후 처음 활성검정시 가장 큰 활성감소를 나타내고 이후부터 감소는 매우 미약했는데 이는 얼리는 과정에서 cyt. P-450 reductase의 3차 구조가 많이 바뀌었기 때문일 것이다. 증장조직을 마쇄한 다음 10,000g에서 원심분리하고 상등액을 -70°C나 -18°C에 각각 보관하였을 때 얼리는 과정에서 많은 손실이 있었다. 이와 같이 활성도의 손실이 50%의 glycerol이 포함된 SPB에 증장을 보관한경우에 가장 적은 이유는, 조직이 얼 때 발생하는 단백질의 3차구조변화에 따른 활성감소를 막을수 있기 때문으로 풀이되었다. 또한 -70°C에 보관할 때에는 완충액을 가하지 않은 상태에서 증장조직을 보관하는 것이, 원심분리 후 수용액 상태로 보관하는 것 보다 활성도의 손실이 적은 이유는 훨씬 빠른시간내에 얼기때문에 조직이 파괴되는 것을 어느정도 막을 수 있기 때문인 것 같다. 이로 미루어 시료준비 후 즉시 활성검정을 하는 것이 가장 바람직하고 그렇지 못할 경우 50% glycerol이 포함된 SPB에 담근 다음 -18°C에 보관 후 1주일 내에 사용하는 것이 바람직하였다(그림 1). cyt. P-450 reductase의 활성은 원심분리할때의 RCF (relative centrifugal force)에 따라 다른 값을 갖는데, 10,000g에서 가장 높은 값을 나타내는 이유는 그 이상의 RCF에서는 cyt. P-450 reductase 분획이 침강하기 때문이므로 cyt. P-450 reductase extract를 준비하는 과정에서 일정한 RCF를 요구한다는 것을 알수있었다 (표 4).

증장과 지방체의 cyt. P-450 reductase activity

인공사육한 담배나방 말령유충과 용의 cyt. P-450 reductase activity를 살펴보았는데 총 활성(total activity)은 증장에 있어서 성숙단계에, 지방체에 있어서는 용화직 후에 가장 높은 활성을 보여주었다(그림 2-A). 이들의 활성은 단백질 함량변화(그림 2-B)와 비슷한 양상을 나타내어 이들의 활성증가는 cyt. P-450 reductase의 합성량 증가에 의한 것임을 알 수 있었다. 비 활성(specific activity)은 전반적으로 증장에

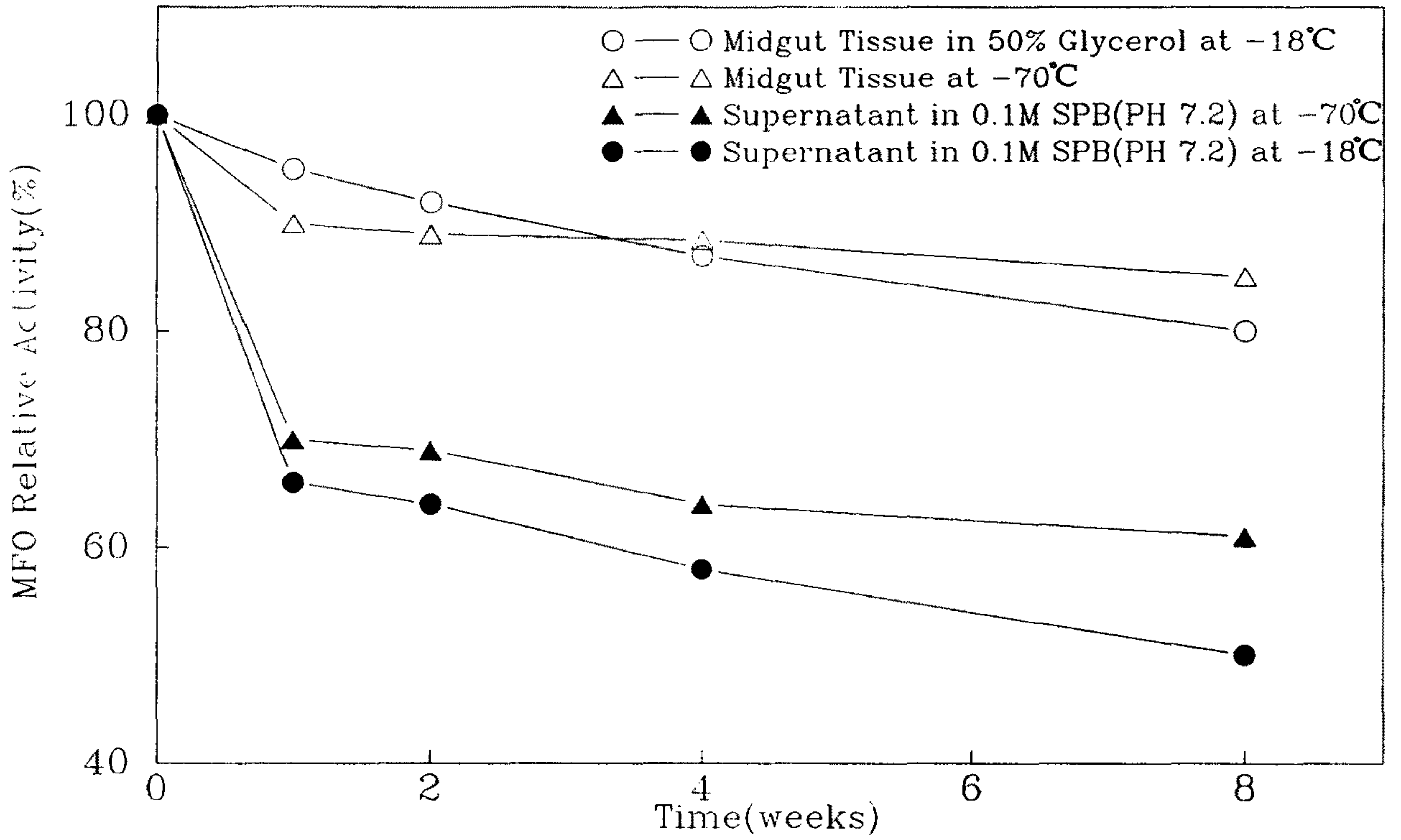


Fig. 1. Decrease of cytochrome P-450 reductase activity, depending on sample storage method and period, from the midgut of the last instar larvae in *Helicoverpa assulta*.

Table 4. Cytochrome P-450 reductase activity from the midgut of the last instar larvae^a of *Helicoverpa assulta*

Gut suspension ^b	Total protein (mg)	Total activity (Δ OD/insect/min)	Specific activity (Δ OD/mg protein/min)
600 g	12.542 \pm 1.227	6.321 \pm 0.983	0.504 \pm 0.103
10,000 g	9.721 \pm 0.895	6.134 \pm 0.724	0.631 \pm 0.089
25,000 g	7.425 \pm 0.764	4.210 \pm 0.637	0.567 \pm 0.064

^a 3 days after the last larval molt.

^b Samples were taken from the supernatant after centrifugation at the RCF (relative centrifugal force) indicated.

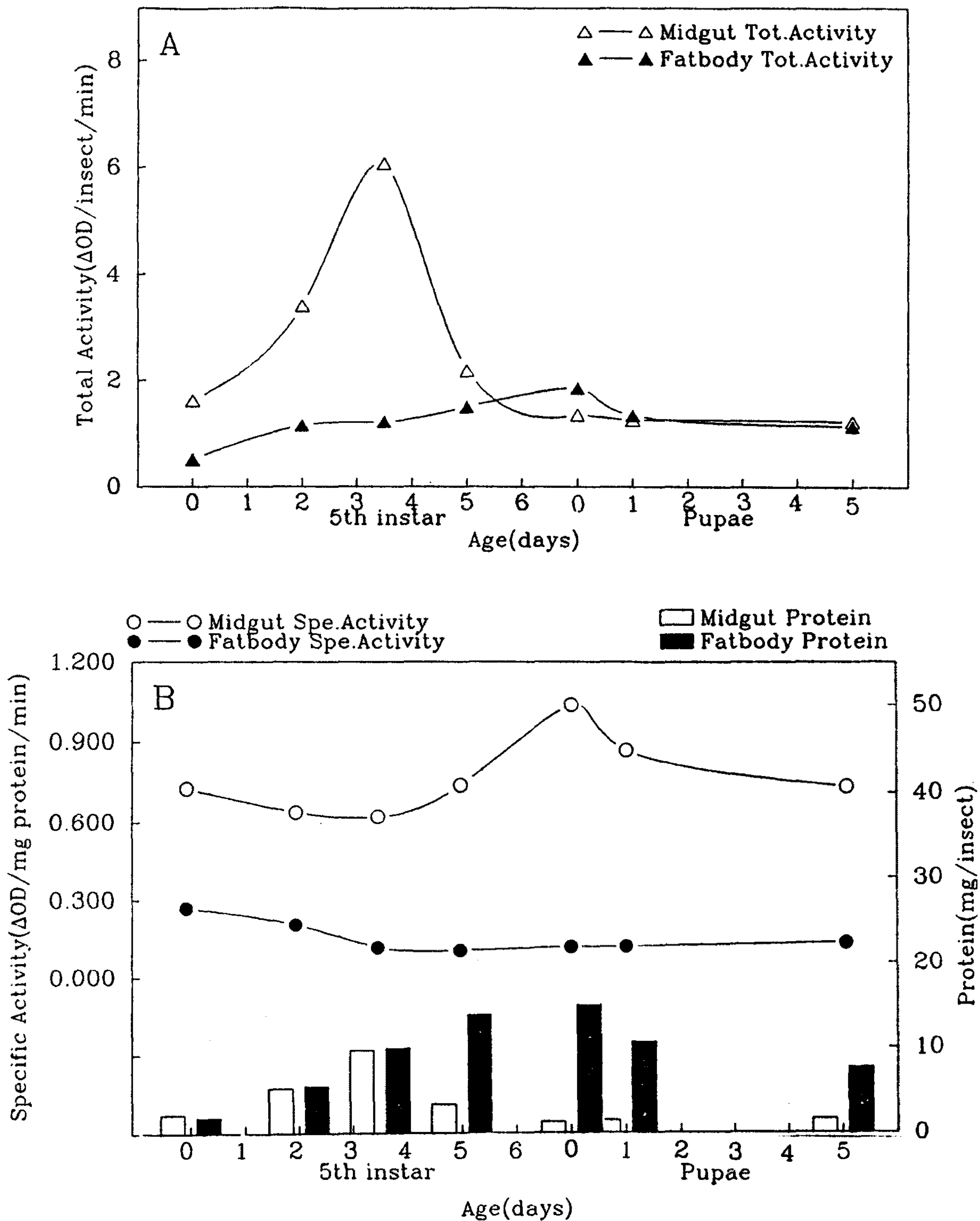


Fig. 2. Change in total (A) and specific (B) activity of cyt. P-450 reductase from the midgut and fatbody during the last larval and early pupal stage in *Helicoverpa assulta*.

서 지방체의 경우보다 2.5배 이상 높았으므로 먹이에 의해 유입된 외래물질의 산화작용은 증장에서 더 활발하게 일어남을 알 수 있었다(그림 2-B).

Cyt. P-450 reductase activity에 미치는 굶김의 영향

담배나방 말령탈피직 후의 유충을 2일부터 4일까지 굶긴 후 다시 정상적으로 사육하였는데 처음부터 정상사육한 것과는 달리 2~4일 사이에 증장의 단백질 함량과 비활성이 급격히 감소하였고 섭식을 재개하면서 비활성은 4~4.5일 사이에 매우 빠른 회복을 보였다(그림 3). 이는 cyt. P-450 reductase활성은 유충영양상태의 영향을 많이 받는다는 것을 말한다. cyt. P-450 reductase의 활성과 단백질의 함량변화양상은 굶긴 시기를 제외하고는 처음부터 정상사육한 개체의 양상과 일치하므로 cyt. P-450 reductase의 활성은 발육단계와 밀접한 관계가 있음을 알 수 있었다.

Diazinon 의 영향

AChE 와 결합하여 그 작용을 억제하는 유기인제인 diazinon을 담배나방의 인공사료에 농도별로 처리한 후 최종탈피 직후의 담배나방 말령유충에 공급하여 그 영향을 살펴보았다. 본 시험중 가장 높은농도인 0.0133% 의 diazinon 처리구에서 발육지연 효과가 뚜렷했다. 이 보다 낮은 농도에서도 발육이 조금씩 지연되었지만 큰 차이는 없었다(그림 4).

발육단계별 증장과 지방체의 단백질함량과 specific cyt. P-450 reductase 활성도는 비슷한 경향을 나타내었다(그림 5). Diazinon이 처리된 유충의 두가지 조직 모두에서 cyt. P-450 reductase의 활성은 정상적인 유충에서보다 더 높게 나타났다. 특히 낮은 농도의 diazinon 처리구에서 더 높은 활성이 나타났는데 이 조직들의 단백질 함량도(정상적인 유충의 경우를 제외하면) 비슷한 경향을 보여주었다. 그러나 말령탈피직 후부터 각 처리구별로 그들의 활성을 측정된 결과 diazinon의 영향은 지방체보다는 증장의 cyt. P-450 reductase 활성에 더 큰 영향을 미쳤다(그림 5). 즉 무 처리구에서 단백질함량이 가장 많이 증가하였고 활성도의 증가가 없는 반면, 0.0133%의 처리구에서는 단백질함량의 증가가 미약한 반면 활성의 증가는 0.0066%의 경우보다도 낮았다. 이는 정상적인 유충의 발육곡선과 크게 다르지 않은 0.0033% 처리구에서는 cyt. P-450 reductase 활성이 증가하여 체내에 들어온 diazinon을 산화시켜 독작용을 막을 수 있는데 반해서 고농도인 0.0133%처리구에선 cyt. P-450 reductase의 활성증가는 diazinon의 독작용을 막을 만큼 유기될 수 없기때문에 발육이 부진할 수 밖에 없었고, 유기된

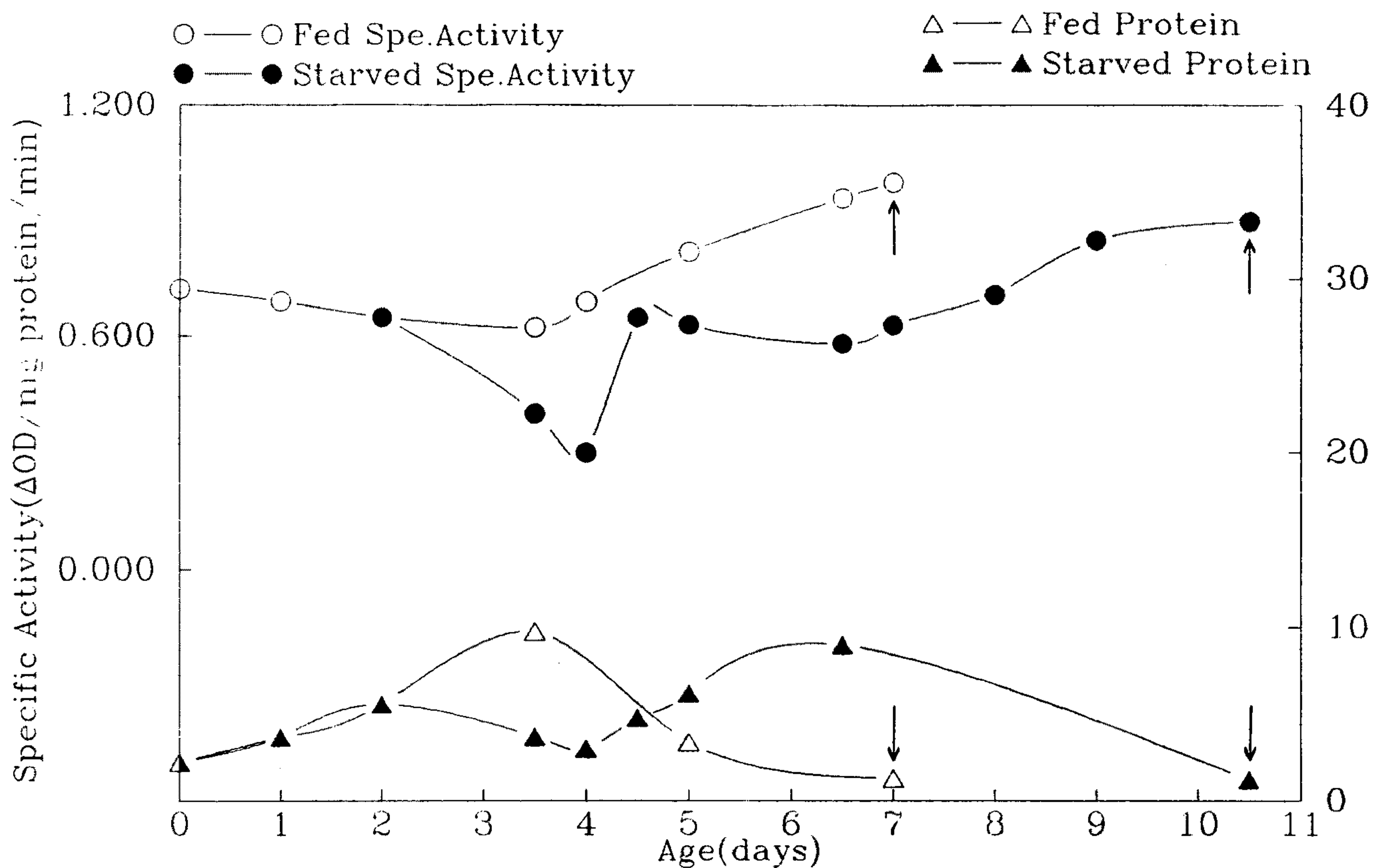


Fig. 3. Effect of starvation and feeding on midgut cyt.P-450 reductase activity in last instar larval stage of *Helicoverpa assulta*. Fed in normal food condition (○ — ○), starved 2 days from the 2nd to 4th day during the 5th instar larvae (● — ●) (Pupation time is indicated by an arrow).

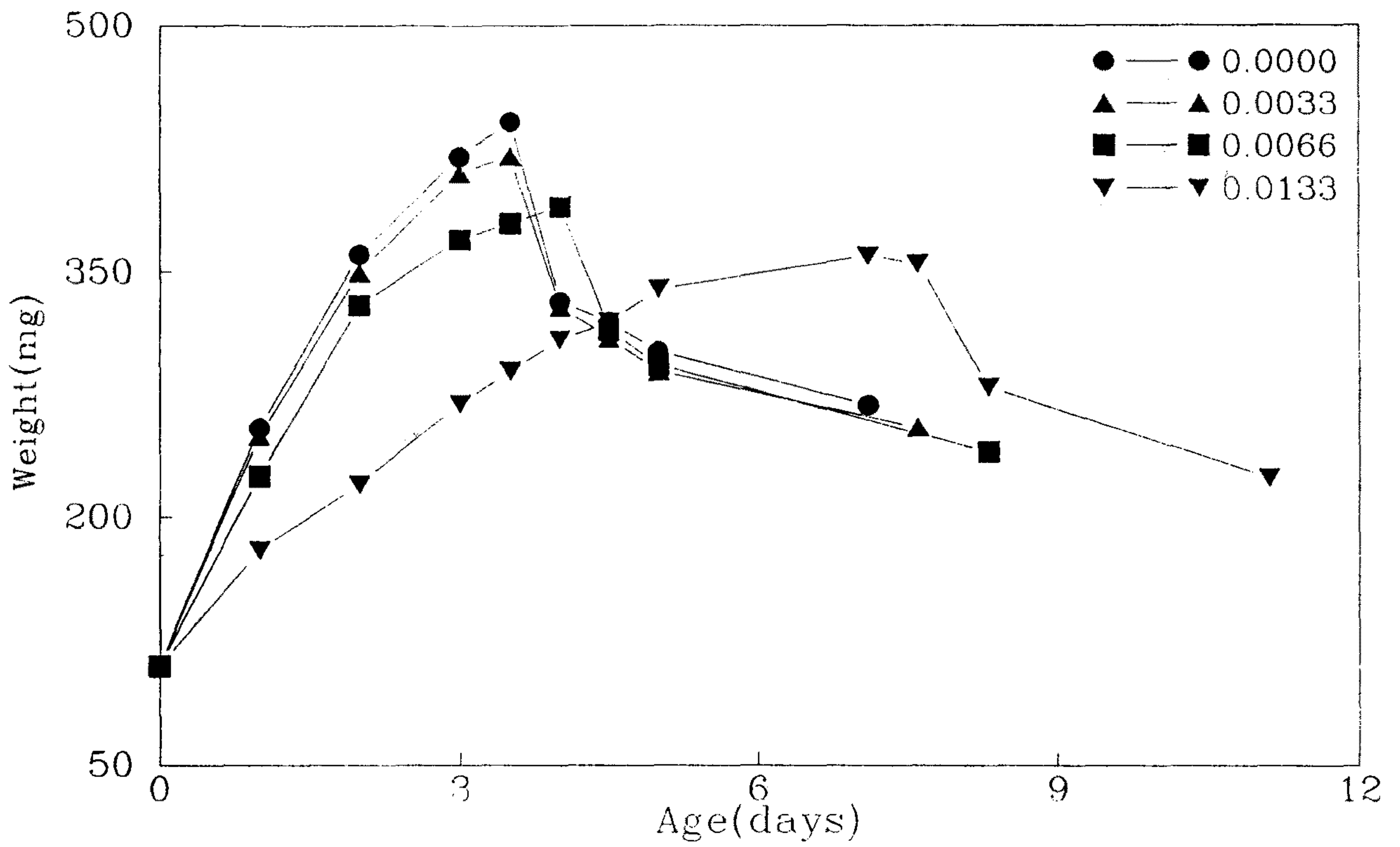


Fig. 4. Effect of diazinon on the developmental period and body weight in the last instar larvae of *Helicoverpa assulta*.

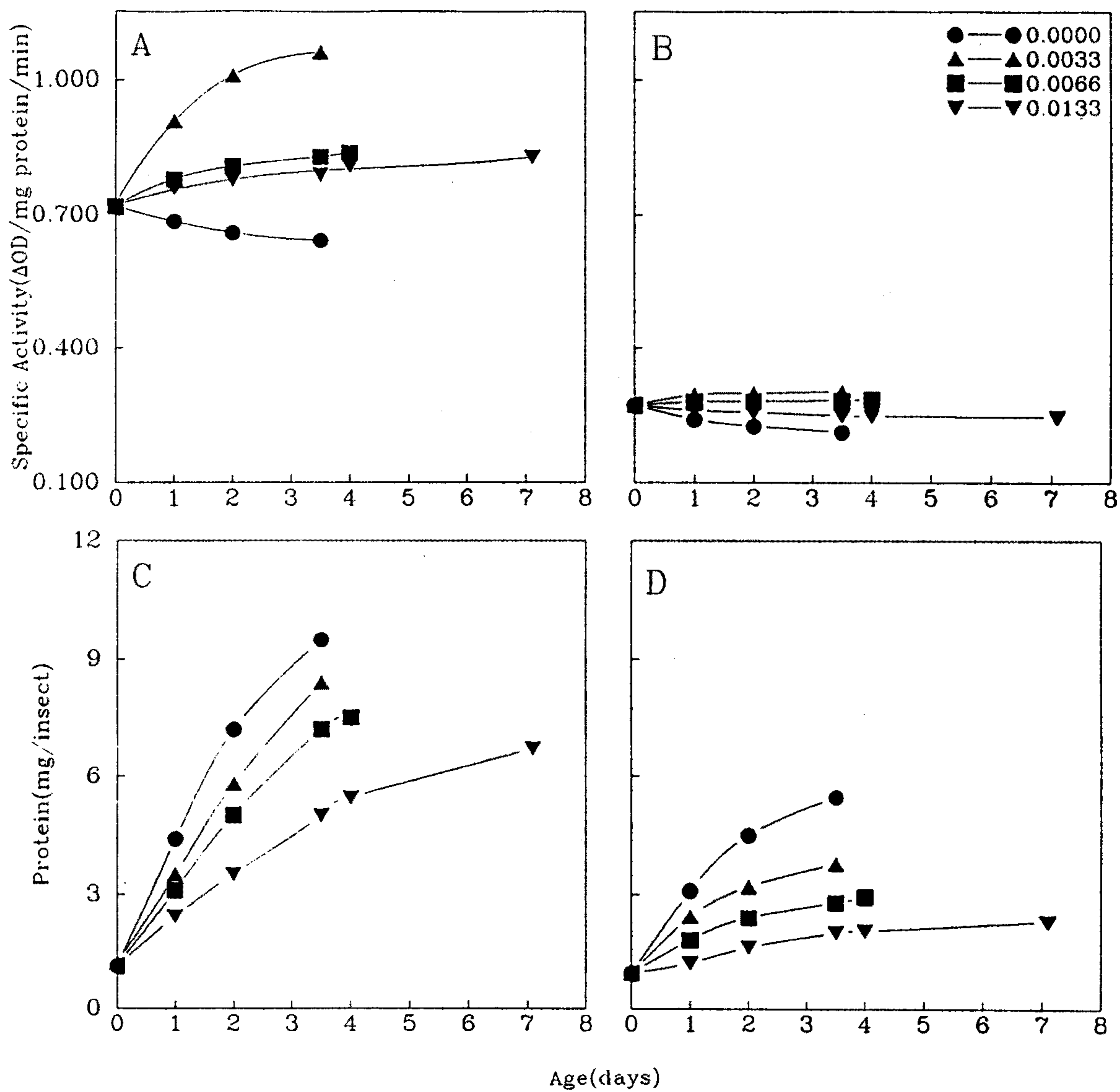


Fig. 5. Effect of diazinon on the specific activity of cyt. P-450 reductase (A, B) and protein content(C,D) in midgut (A,C) and fatbody (B,D) from the last instar larval of *Helicoverpa assulta*.

활성도 역시 0.0033%처리구보다 훨씬 낮은 것으로 여겨졌다.

위 와 같은 농도의 diazinon을 서로 다른 영기의 유충에 공급하면 고농도의 처리구 일 수록 유충의 발육 지연현상이 뚜렷하였고 같은 농도의 처리구에서는 어린 령기의 유충발육이 부진하였다(표 5). 이와같이 발육이 부진한경우 용화율이 낮았고, 번데기도 부실하여 우화율이 훨씬 낮았다.

파밤나방과 담배나방 각 영기의 유충에 여러농도의 diazinon이 처리된 인공사료를 공급한 후 3일뒤에 사망률을 조사하였는데, 전반적으로 유기인제에 저항성을 나타내는 파밤나방의 사망률은 담배나방의 경우보다 매우낮았다(그림 6). 한편 diazinon의 농도 증가율에 따른 같은 영기의 유충사망률의 증가율은 더욱 높다. 이와 같이 담배나방과 파밤나방의 어린유충의 사망률이 높은 것은 어린유충이 단위체중당 먹이섭취량이 많아(그림 7-A) 고령의 유충보다 diazinon의 체내흡수량이 상대적으로 더 많고, 대사활동이 높기 때문에(그림 7-B) diazinon의 독작용을 더 많이 받으며 cyt. P-450 reductase를 포함한 제독효소들의 활성이 어린 유충기에 상대적으로 낮기 때문일 것이다(그림 10-C).

말령탈피 직후 diazinon을 처리했을 때 파밤나방에서 유기되는 specific cyt. P-450 reductase activity가 담배나방의 경우보다 컸고 가장 높은 활성유기를 나타내는 약량은 각기 다른데 파밤나방은 0.0133%, 담배나방은 0.0033%이었다(그림 8). Total cyt. P-450 reductase activity는 파밤나방이 약간 낮기 때문에, 유기되는 specific cyt. P-450 reductase activity가 큰 이유는 단위 cyt. P-450 reductase의 활성이 담배나방의 경우보다 크기 때문이라고 여겨진다. 파밤나방의 사망률이 담배나방의 경우보다 현저히 낮은데반해(그림 6) cyt. P-450 reductase의 활성은 약 2배 정도만 더 높게 나타났다(그림 8). 따라서 diazinon에 대한 두 곤충 종 간의 독성차이는 cyt. P-450 reductase의 활성차이만으로는 설명할 수 없으며 아울러 AChE의 활성(그림 10)과 다른 제독효소들의 활성 검정이 필요하다.

숙주식물의 영향

흰불나방을 각각 뽕나무, 수양버들 및 염주나무 등 세가지 다른 숙주식물로 사육하였을 때 머리부위의 AChE의 활성도 변화양상은 발육단계별로 비슷하였고 각기 성숙한 단계에서 최대정점을 이루고, 이후에는 급격히 감소하여 용화직 후에는 매우 낮은 활성을 나타냈다(그림 9-A). 염주나무의 AChE활성도가 전반적으로 가장 높았고 증장의 cyt. P-450 reductase활성도(그림 9-B)역시 염주나무에서 전반적으로 가장높게 나타났으며 용화직 후 최대정점을 보였다. 이로 미루어보아 염주나무에는 흰불나방이 꺼리는

Table 5. Effect of diazinon^a, on 2nd, 3rd and 4th instar larval period, 5th instar larval weight and adult emergence rate in *Helicoverpa assulta*

Dosage (instar)	Larval period(days)			5th instar larval weight (mg)	Eclosion rate (%)
	2nd	3rd	4th		
0.0000(%)	2.0±0.1 ^b	2.0±0.2	3.0±0.2	110±15	96
0.0033(%)					
2nd	2.0±0.4	4.2±2.1	7.4±3.1	53±18	52
3rd		3.3±0.9	4.6±1.3	63±18	64
4th			3.1±0.4	102±17	76
0.0066(%)					
2nd	3.2±2.4	6.2±3.1	10.1±4.3	41±18	40
3rd		4.5±2.1	7.6±3.2	45±16	56
4th			5.3±2.2	51±15	65

^a Diazinon was mixed in the artificial diet, at the dosage indicated, and the artificial diet was given to the larvae beginning at 2nd, 3rd, or 4th instar to the end of larval development.

^b Mean±standard error.

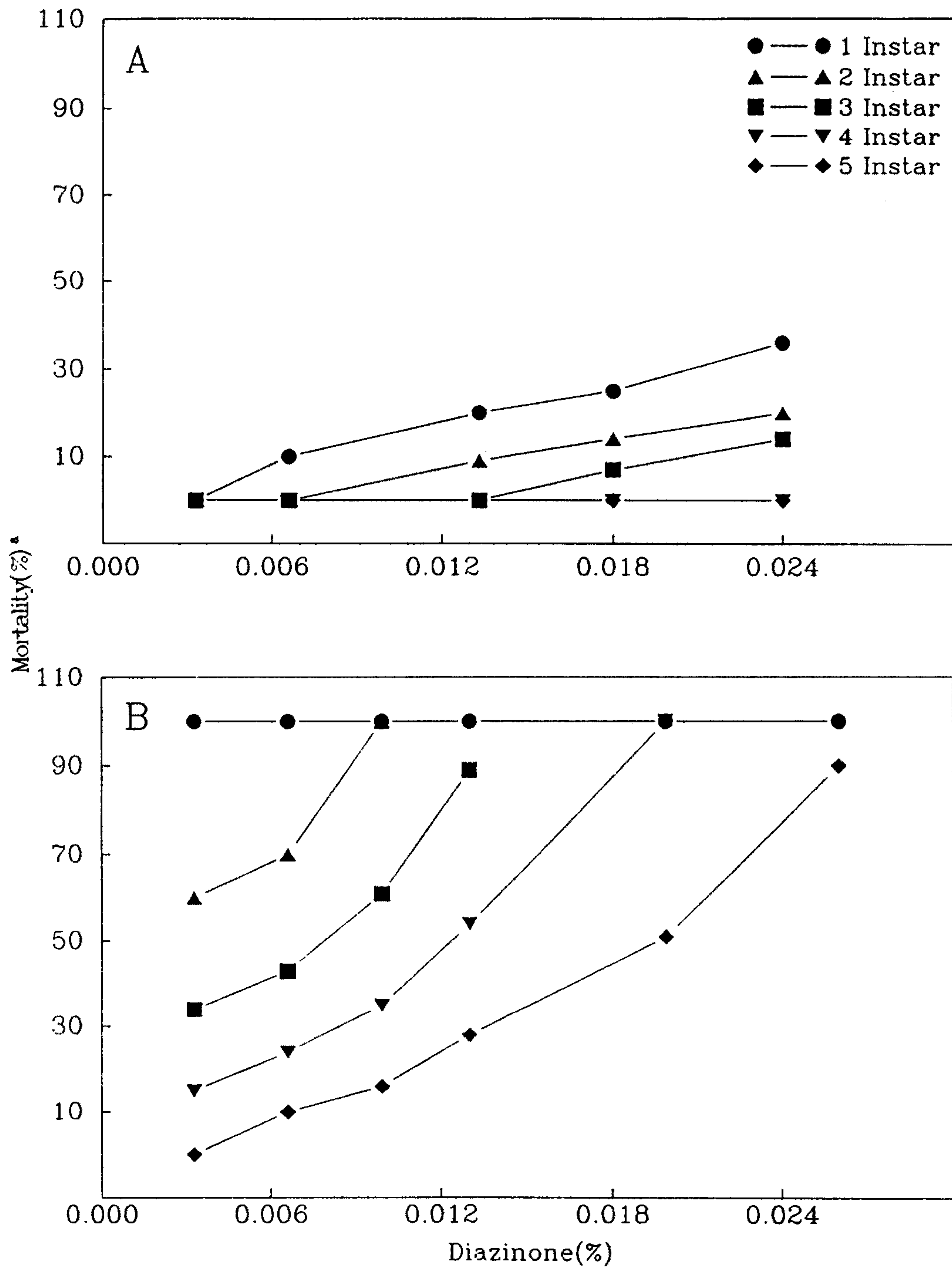


Fig. 6. Effect of diazinon on mortality of *Spodoptera exigua* (A) and *Helicoverpa assulta* (B).

* Mortality was calculated 3 days after treatment.

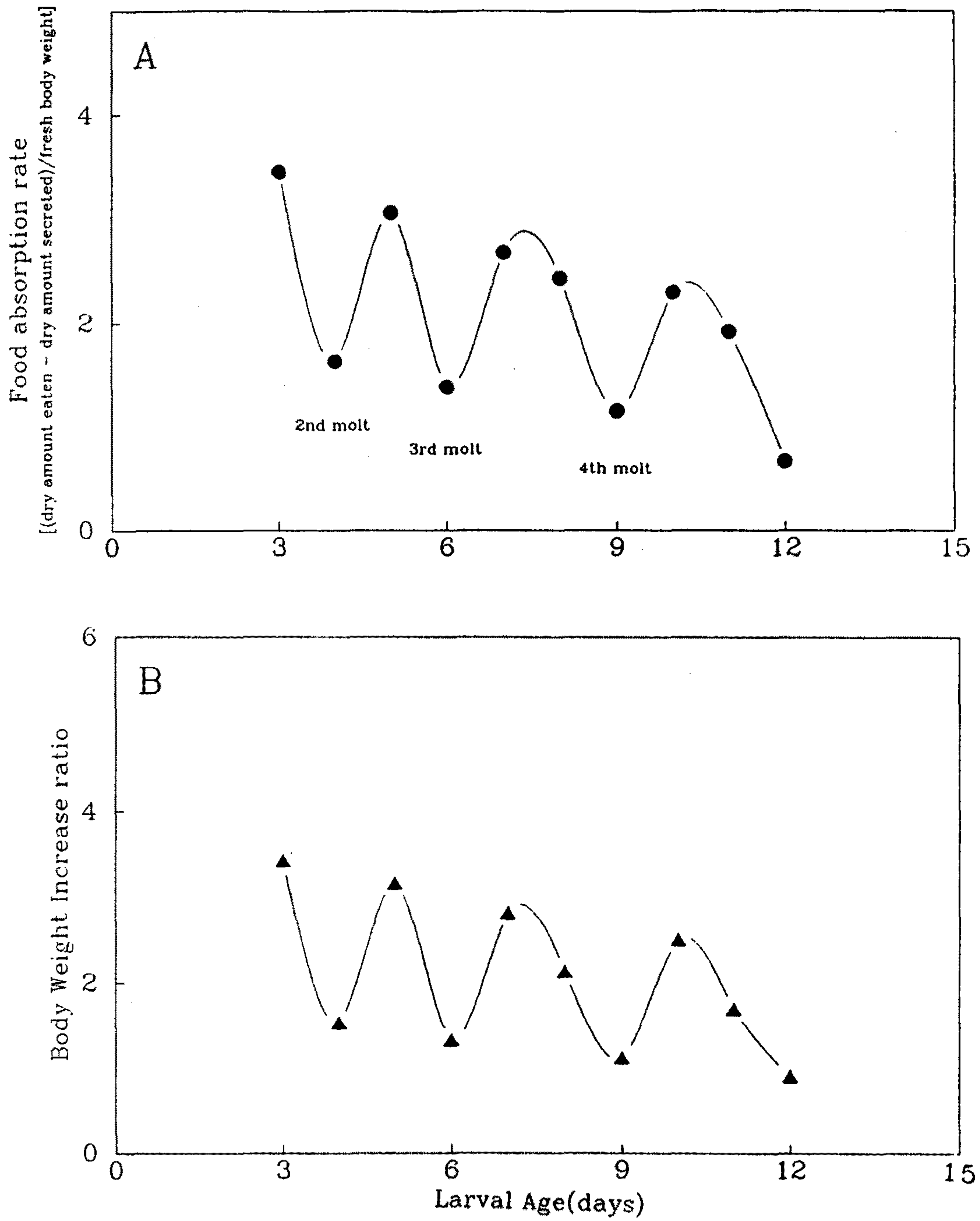


Fig. 7. Food absorption rate (A) and body weight increase ratio (B) from 2nd to 5th instar larval stage in *Helicoverpa assulta*.

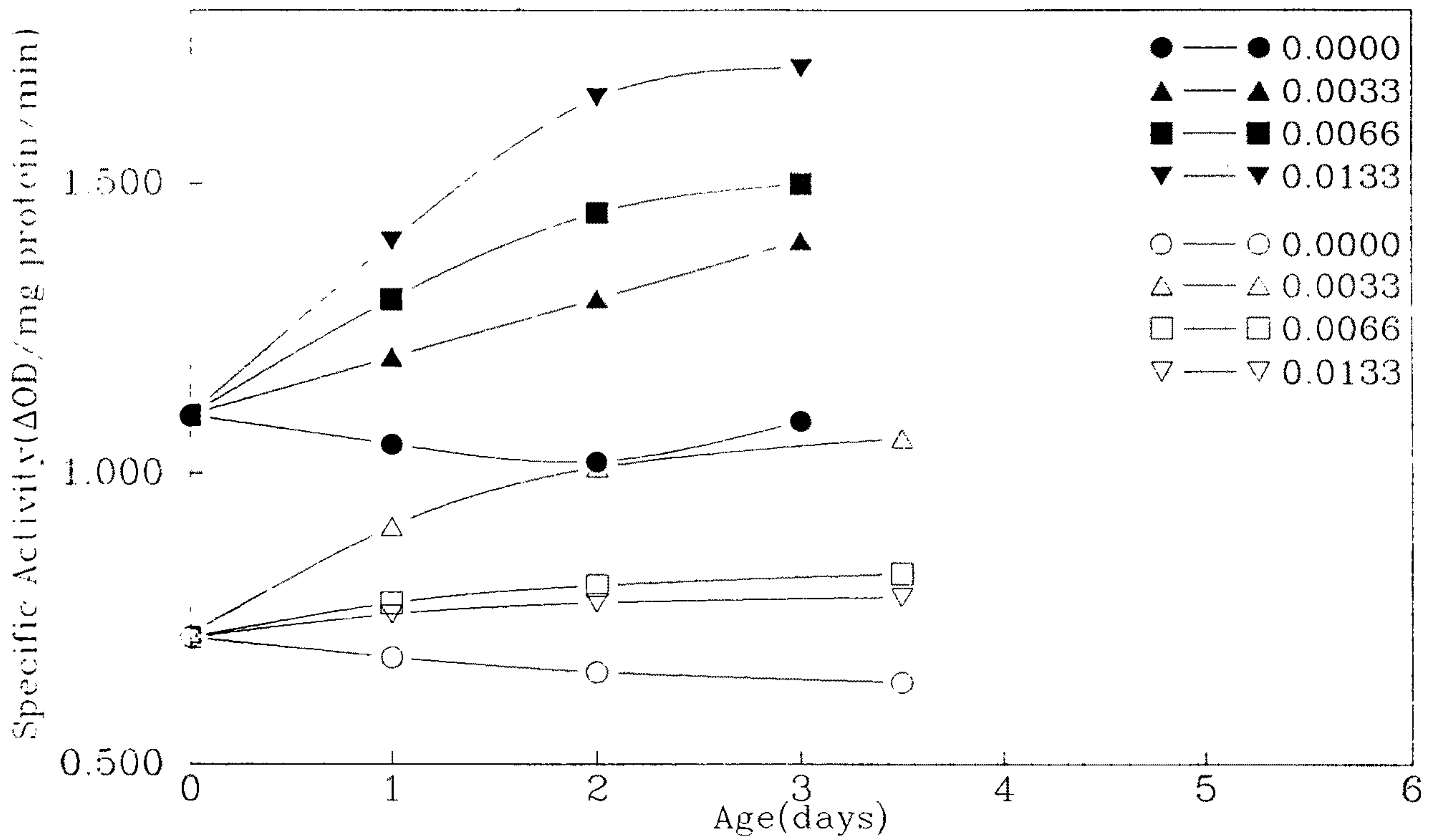


Fig. 8. Effect of diazinon on the specific activity of cyt. P-450 reductase from the last instar larval midgut of *Spodoptera exigua* (filled) and *Helicoverpa assulta* (open).

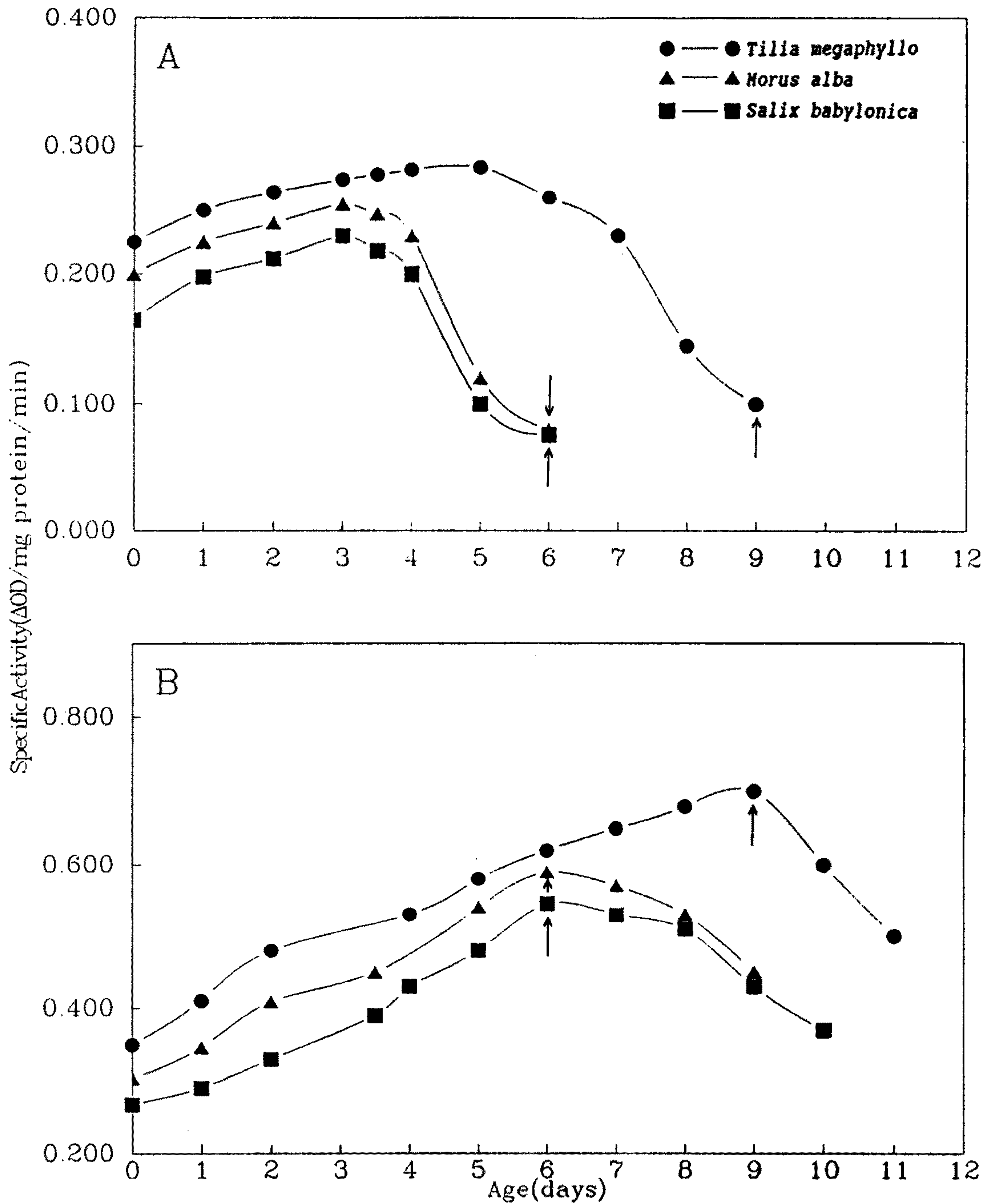


Fig. 9. Difference in specific activity of head acetylcholinesterase (A) and midgut cyt. P-450 reductase (B) from the last instar larvae and early pupae of *Hyphantria cunea* reared with different host plants (Pupation time is indicated by an arrow).

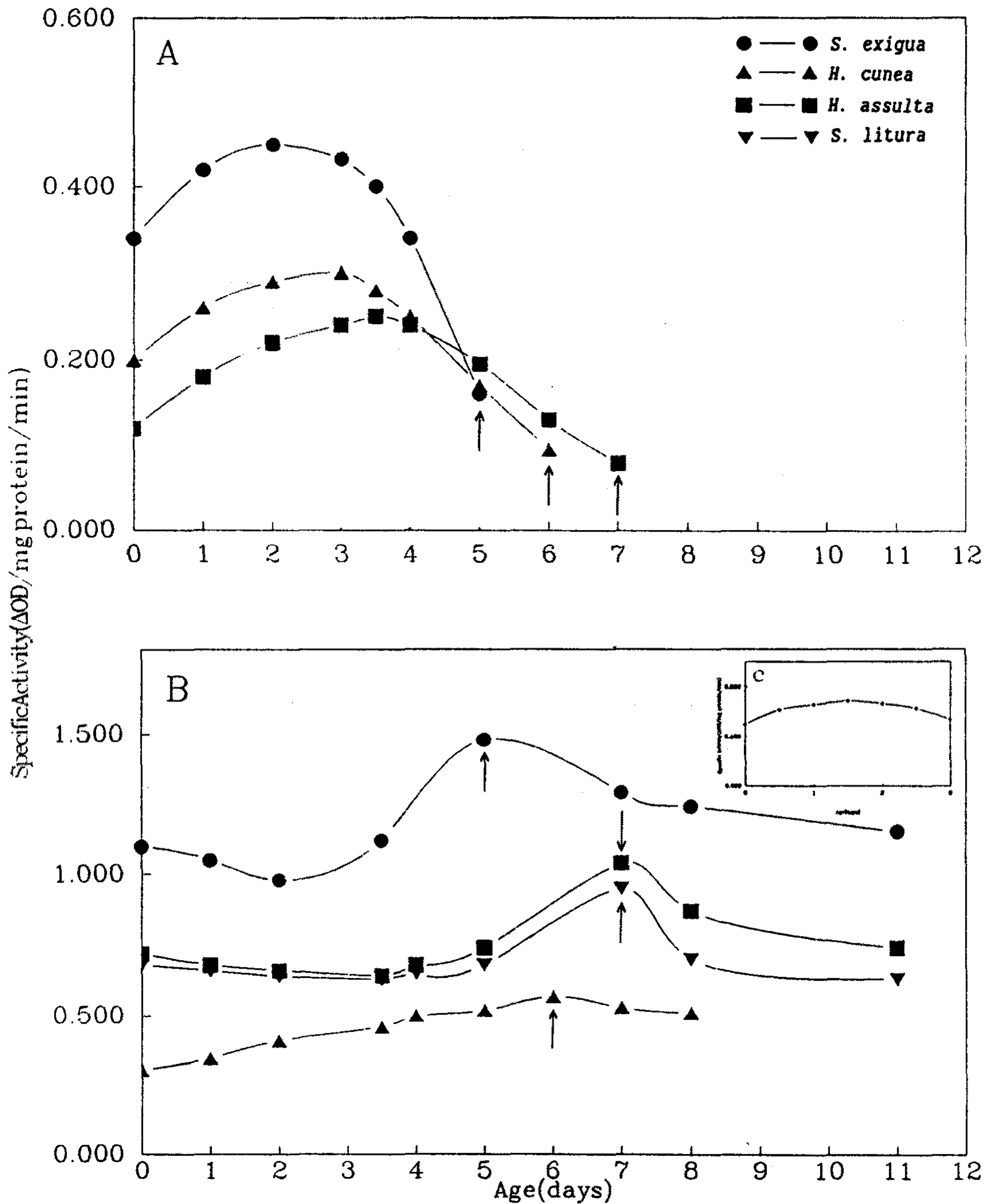


Fig. 10. Change in specific activity of head ACh esterase (A) and midgut cytochrome P-450 reductase (B) from the last instar larvae and early pupae of *Spodoptera exigua*, *Spodoptera litura*, *Hyphantria cunea* and *Helicoverpa assulta* (The inset shows a profile of specific activity of cytochrome P-450 reductase during the 4th instar larvae of *Helicoverpa assulta*). (Pupation time is indicated by an arrow).

Table 6. Change in mortality, specific MFO and specific AChE Activity from the 5th instar larvae of *Helicoverpa assulta* and *Spodoptera exigua* reared with 0.01663% diazinon-mixed artificial diet for 0, 6, 18 or 24-hours, after the last molting

Time(hour)	Mortality(%) ^a		Specific MFO Activity ^b (Δ OD/mg protein/min)		Specific AChE Activity ^b (Δ OD/mg protein/min)	
	<i>H. Assulta</i>	<i>S. exigua</i>	<i>H. assulta</i>	<i>S. exigua</i>	<i>H. assulta</i>	<i>S. exigua</i>
0 h	72	0 (78)	0.723	1.184	0.083	0.302
6 h	56	0 (51)	0.693	1.146	0.127	0.347
18 h	44	0 (42)	0.662	1.106	0.164	0.365
24 h	39	0 (42)	0.651	1.057	0.198	0.413

^a Mortality was checked 3days after the end of the treatment. Since *Spodoptera exigua* showed no mortality at 0.01633% of diazinon, another test was conducted with 0.053% of diazinon to get mortality figures given in parenthesis.

^c Specific activities were measured at the beginning of the treatment.

물질이 있음을 나타내고 이 때문에 발육기간이 길어졌고 AChE 와 cyt. P-450 reductase의 활성이 다른 기주식물에서와는 달리 높게 나타난 것 같다. 이는 야외실험에서, 뽕나무와 수양버들과는 달리 옻나무의 난괴와 산란수가 적은 것으로도 입증된다. cyt. P-450 reductase의 활성은 AChE의 활성도에서 처럼 발육단계에 따라 비슷한 변화양상을 나타냈는데 이들의 활성은 유충의 발육과 매우 밀접한 관계를 갖는 것으로 생각되었다.

파밤나방, 흰불나방, 담배나방 및 담배거세미나방의 AChE, MFO 활성비교

파밤나방, 흰불나방, 담배나방 및 담배거세미나방을 각각의 인공사료로 사육하여 말령기의 specific cyt. P-450 reductase 및 specific AChE activity를 측정하였는데, AChE(그림 10-A)의 경우 변화양상은 앞에서 자세히 보고된 흰불나방의 경우(그림 9-A)와 비슷하여 역시 성숙단계에서 최대정점을 이루고 급격히 감소하여 용화직후 매우 낮은 활성을 나타냈다. 파밤나방, 담배나방 및 담배거세미나방의 specific cyt. P-450 reductase activity(그림 10-B)는 말령탈피직 후 점진적으로 감소하여 성숙단계에 가장 낮은 값을 나타내고 이후에 방황기를 거치면서 급격히 증가하여 용화직 후 최대정점을 이루는데, 이는 말령초기부터 발육이 진전됨에 따른 cyt. P-450 reductase의 합성보다 일반 중장조직단백질의 합성이 빠르기 때문이고(그림 2-B: 0~3 day; 표 6: 시간경과에 따라 사망률이 감소하지만 specific cyt. P-450 reductase activity도 역시 감소함; 그림 10-A: 시간경과에 따른 머리부위의 단백질 합성은 매우 느리게 진행됨 (data not shown)), specific cyt. P-450 reductase activity 가 다시 증가하여 용화직 후 최대가 되는 것은 합성된 cyt. P-450 reductase의 분해가 일반 중장조직의 분해보다도 훨씬 늦기 때문인 것 같다(그림 10-C: 4령의 후반기에는 specific cyt. P-450 reductase activity가 점차 감소하여 탈피직전 최소). 파밤나방은 AChE 와 cyt. P-450 reductase에서 다른 실험곤충보다 훨씬 높은 활성을 나타냈는데, 이로 인해 파밤나방이 담배나방보다 더 높은 살충제저항성을 갖는 것을 간접적으로 나타낸다고 보여진다.

8. 기대성과

- 가. 밤나방등의 해충에서 MFO, AChE를 추출하여 그들의 활성을 측정하는 최적의 방법을 확립.
- 나. 새로 개발되는 살충제들의 살충메카니즘과 분해대사 등을 규명하기위한 방법을 확립.

9. 참고문헌

1. Belzunces, L. P., J. J. L. Rousseaux and M. Bounias. 1988. Properties of acetylcholinesterase from *Apis mellifera* head. *Insect Biochem.* 18: 811-819.
2. Brattsten, L. B., C. W. Hlyoke, J. R. Leeper and D. F. Raffa. 1986. Insecticide resistance: Challenge to pest management and basic research. *Science.* 231: 1255-1260.
3. Brestkin, A. P., A. E. Khovanskikh, E. B. Maizel, S. N. Moralev, K. V. Godovikov, M. I. Kabachnik, B. A. Khaskin, T. A. Mastryukova and A. E. Shipov. 1986. Cholinesterase of aphids-II Anticholinesterase potency and toxicity of different organophosphorous inhibitor for spring grain aphid *Schizaphis gramina*. *Insect Biochem.* 16: 701-707.
4. Detra, R. L. and W. J. Collins. 1986. Characterization of cholinesterase activity in larval *Chironomus riparius*. *Insect Biochem.* 16: 733-739.
5. Edwards, A. 1980. Cholinesterase activity in the cockroach central nervous system. *Insect Biochem.* 10: 387-392.
6. Feyereisen, R. 1983. Polysubstrate monooxygenase in larvae of susceptible and resistant strains of house flies. *Pestic. Biochem. Physiol.* 19: 262-269.
7. Feyereisen, R. and D. R. Vincent. 1984. Characterization of antibodies to house fly NADPH-cytochrome P-450 reductase. *Insect Biochem.* 14: 163-168.
8. Feyereisen, R. and D. E. Farnsworth. 1985. Developmental changes of microsomal cytochrome P-450 monooxygenases in larval and adult *Diptera punctata* *Insect Biochem.* 15: 755-761.
9. Hodgson, E., L. C. Tate, A. P. Kulkarni and F. W. Plapp. 1974. Microsomal cytochrome P-450: Characterization and possible role in insecticide resistance in *Musca domestica*. *J. Agric. Food Chem.* 22: 360-366.
10. Jefcoate, C. R. E., J. L. Gaylor and R. L. Valabrese. 1969. Ligand interactions with cytochrome P-450. I. Binding of primary amines. *Biochem.* 8: 3455-3463.

11. Kulkarni, A. P. and E. Hodgson. 1975. Microsomal cytochrome P-450 from the house fly, *Musca domestica*: Assay and spectral characterization. *Insect Biochem.* 5: 679-696.
12. Kulkarni, A. P. and E. Hodgson. 1976. Spectral characterization of microsomal cytochrome P-450 from the midgut of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem.* 6: 385-390.
13. Lee, S. S. T. and J. S. Scott. 1989a. An improved method for preparation, stabilization and storage of house fly (Diptera: Muscidae) microsomes. *J. Econ. Ent.* 82: 1559-1563.
14. Lester, D. S. and L. I. Gilbert. 1987. Characterization of acetylcholinesterase activity in the larval brain of *Manduca sexta*. *Insect Biochem.* 17: 99-109.
15. Omura, T. and R. Sato. 1964. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 239: 2370-2378.
16. Riskallah, M. R., W. C. Dauterman and E. Hodgson. 1986. Nutritional effects on the induction of cytochrome P-450 and glutathione transferase in larvae of the tobacco budworm, *Heliothis virescens*. *Insect Biochem.* 16: 491-499.
17. Rousseaux, J. J. L. and J. Gautron. 1987. Activity, Localization and molecular form of acetylcholinesterase in the male accessory glands of metamorphosing *Tenebrio molitor*. *Insect Biochem.* 17: 739-750.
18. Tate, L. G., S. S. Nakat and E. Hodgson. 1982. Comparison of detoxication activity in midgut and fatbody during fifth instar development of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Comp. Biochem. Physiol.* 72C: 75-81.
19. Williams, C. H. and H. Kamin. 1962. Microsomal triphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase of liver. *J. Biol. Chem.* 237: 587-595.
20. Wheelock, G. and J. G. Scott. 1989. Simultaneous purification of a cytochrome P-450 and cytochrome *b₅* from the house fly, *Musca domestica*. *Insect Biochem.* 19:481-488.
21. Yu, S. J. 1984. Interaction of allelochemicals with detoxification enzymes of insecticide-susceptible and resistant fall armyworm. *Pestic. Biochem. Physiol.* 22: 60-68.

여 백

1991년 (1 차년도) 위탁연구보고서 - II

본 과 제 명 : 신규 살충성 천연 물질 개발

위탁연구과제명 : 생물살충제 개발을 위한 토양 세균의 분리
및 동정

주 관 연 구 기 관 : 한국과학기술연구원 부설 유전공학연구소

본 연구과제책임자 : 김 정 일

위탁연구과제책임자 : 강 석 권

연 구 기 간 : 1990년 7월 - 1991년 6월

I. 서 론

해충방제를 위한 유기합성농약의 개발은 한정된 토양자원에서 인류의 식량을 안정적으로 생산·공급할 수 있게 한 측면에서 획기적인 공헌을 하였다는 사실은 의심할 여지가 없을 것이다.

1940년대 DDT, BHC를 비롯하여 현재에 이르기까지 많은 유기합성 물질들이 개발되었으나, 대량살포로 인한 독성, 식이연쇄작용에 의한 위험성, 생태계 파괴등의 부작용이 야기됨에 따라서 심각한 사회문제화 되고 있다.

현재에는 생분해되기 쉽고 환경잔류성이 적은 약제를 사용하여 그 부작용을 많이 감소시켰으나 짧은 반감기때문에 효과적인 병충해 방제를 위해서는 여러차례 반복사용을 해야 하므로 추가되는 약제비용과 노동력이 문제가 되고 있다.

따라서 위와 같은 공해유발형 합성농약과 대체할 수 있는 새로운 농약에 대한 기술개발이 강력히 요구되는 바, 살충력이 강한 해충의 병원 미생물의 탐색과 제제화는 최근 구미각국 및 일본등 선진국에서 크게 각광을 받고 있고, 날로 미생물농약의 수요가 증대되고 있다.

한편, 1943년 Waksman이 토양방선균인 *Streptomyces* 속에서 Streptomycin을 분리한 이래, 현재까지 방선균에서 분리된 항생물질은 약 5,000여종으로서 항생물질의 과반수 이상을 차지하고 있어 그 중요성이 높이 평가되고 있다.

이와 같이 미생물을 이용한 생리활성물질의 분리동정은 주로 의학용 항생물질 개발분야에 집중되어 왔으나, 최근에는 그 영역을 확장하여 병해충방제와 제초제등 농약으로서 사용하려는 연구가 시도되고 있다. 그중 Avermectin 과 tetranactin은 이미 살충제로서 개발에 성공, 상품화되었으며 많은 종류의

항생물질이 살충효과가 있다고 보고되고 있다.

우리나라와 같은 미작농업국가에서 막대한 양의 경비로 집중적인 방제에도 불구하고 점차 유기합성농약에 내성을 갖는 저항성해충이 430 여종에 이르고 있다. 이와같이 화학적 방제의 한계성이 현실화되므로서 대체약제 개발이 시급히 요청되고 있다.

본 실험에서는 한국과학기술연구소 유전공학센터 국책연구개발사업의 일환인 무공해 생물농약 개발에 관한 연구를 착수하게 됨에 있어서 토양방선균을 분리, 동정 제공함으로써 새로운 유용살충제 개발에 관한 공동연구를 수행하고 있다. 본 연구의 1차년도에서 그 기초연구로서 연구방법의 확립과 개발가능성을 확인하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시충의 확보

미생물 신규 살충성물질 개발을 위한 연구에서 검정용 곤충으로 사용되는 누에 (*Bombyx mori*), 흰불나방 (*Hyphantria cunea*), 담배거세미나방 (*Spodoptera litura*), 파밤나방 (*Spodoptera exigua*) 등은 서울대학교 농과대학 곤충병리학 실험실에서 계대사육중인 것으로 25 ℃의 조건으로 사육하면서 먹이로는 본 실험실에서 제조한 인공사료를 공급하였다(표. 1, 표. 2).

Table 1. Composition of artificial diet for continuous-rearing of *S. litura*, *S. exigua*, *H. cunea*.

Ingredients	Amount (g)
Soy bean powder	150
Wheat germ	150
Salt mixture	10
Yeast powder	80
Agar	28
MPH	6
Ascorbic acid	18
Sorbic acid	3
Formalin	45 (ml)
D.W	1400 (ml)

Table 2. Composition of artificial diet for continuous-rearing of *B. mori*

Ingredients	Amount (g)
artificial diet	300
acetic acid	3.6 (ml)
Vitamine mixture	1.2 g

2. 공시충의 처리 및 화학약제에 대한 감수성

곤충에 대한 시료처리는 petri-dish에 3령~4령에 해당하는 누에 10마리와 일정량의 인공사료를 넣고, 시료액 $20\mu\text{l}$, $200\mu\text{l}$, $500\mu\text{l}$ 를 인공사료에 처리한 다음, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간후의 사충율을 조사하였다.

유기합성 살충제에 대한 감수성 조사는 유기 염소계, 유기인계, 카바메이트계의 대표적 살충제인 DDT, Parathion, Carbofuran을 각각 200 ppm, 60ppm, 20ppm으로 희석된 것을 분양받아 인공사료에 처리한 다음, 24시간 후의 사충율을 측정하였다.

항생제에 대한 감수성조사는 진핵생물에 살균효과가 있는 Kanamycin(Sigma Co), Gentamycin, Streptomycin 등을 선택하여 농도별로 희석하여 인공사료에 처리한 다음, 24시간후의 사충율을 측정하였다.

3. 토양시료의 채취

서울과 경기 및 영호남(제주포함) 일원의 농가 부식토를 대상으로 하여 시료는 지표면으로부터 5-10 cm 깊이의 토양을 10g 정도 취하여 채취하였다.

4. 방선균의 분리

토양시료 1g을 멸균된 생리식염수 10ml에 넣고 충분히 교반시킨 후에 상온에서 1시간 방치한 다음, 방선균의 포자를 활성화시키고 토양내의 비포자형성세균을 억제하기 위하여 시료 1ml를 6% Yeast extract와 0.05% SDS가 포함된 멸균식염수 9ml에 첨가하여 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 20분간 방치하였다.

방치 후 멸균식염수로 $10^{-4} \sim 10^{-5}$ 으로 희석하여 방선균 분리용 배지에 희석액 $100\mu\text{l}$ 를 도말하였다. 분리용 배지에는 사상균과 다른 세균의 성장을 방지하기 위해 Nystatine ($10\text{ mg}/\ell$)를 첨가하여 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 항온기에서 5~7

일간 배양한 후, 방선균을 순수분리하여 사면배지에 보존하였다.

5. 검정용 시료의 조제

고체배지 (11.0 cm, petri-dish)에서 순수하게 자란 방선균은 멸균된 knife를 이용하여 잘게 잘라 acetone 20 ml 를 넣고 24 시간동안 침지한 후, 유용성물질을 추출하였다. 위 용액을 vaccum evaporator에서 3~4 ml 정도로 농축하여 검정용 시료로 사용하였다(그림. 1.).

6. 선발균주의 보존

분리된 방선균 중 활성을 나타낸 균주는 Bennet's medium에서 균사체가 충분히 발달하도록 배양하여 포자나 균사체를 긁어내어 Salser's medium에 넣어 -20 °C에 보존하였다. 각각의 배지조성은 표 3 과 같다.

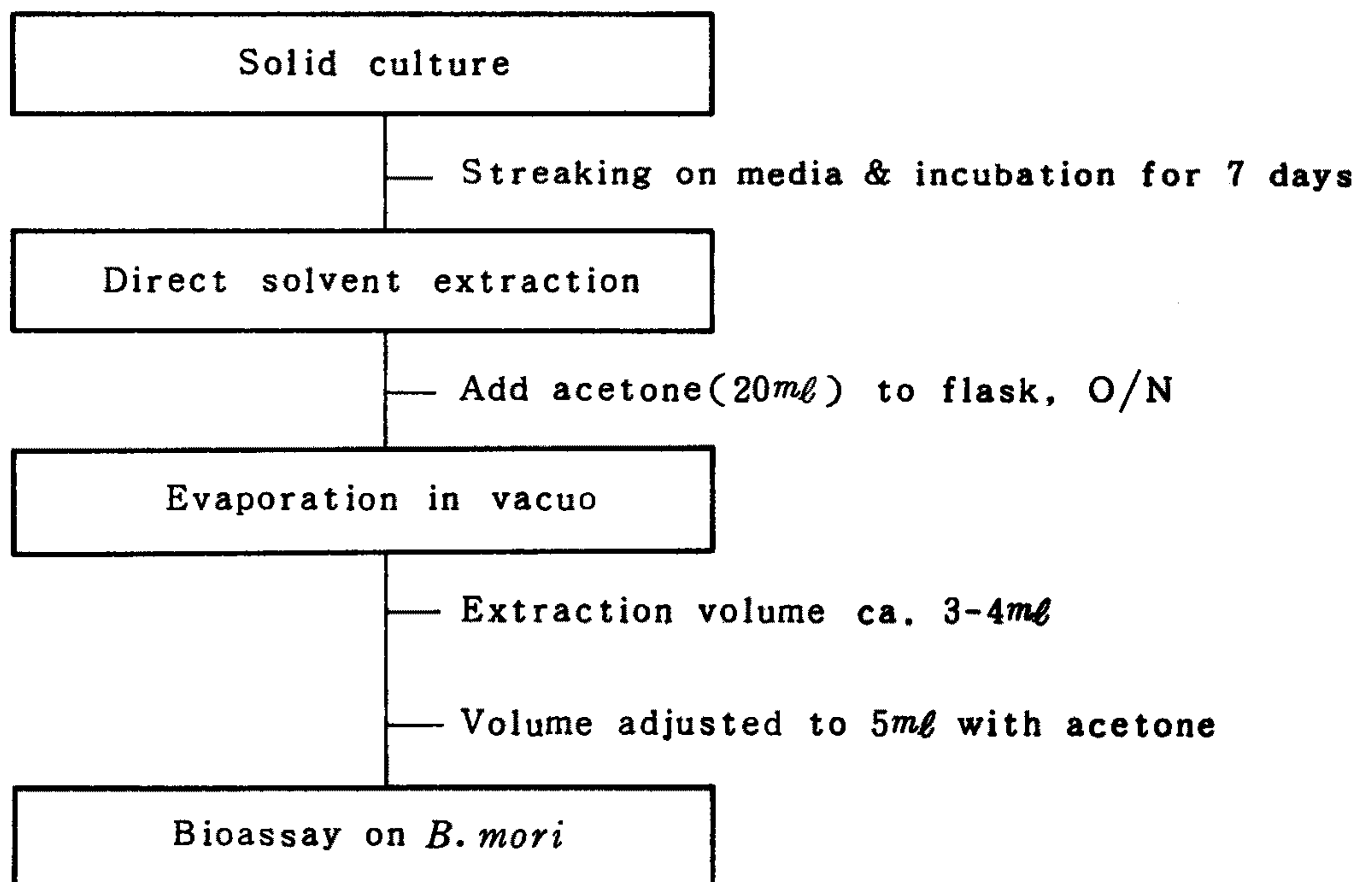


Fig. 1. Schematic diagram of first bioassay procedure.

Table 3. Media used for the isolation, cultivation and preservation of *Actinomyces*

<p>i) Waksman medium (pH 7.4-7.6)</p> <p>Starch (soluble) 10.0 (g/l)</p> <p>K₂HPO₄ 1.0</p> <p>MgSO₄ 1.0</p> <p>MgSO₄ · 7H₂O 1.0</p> <p>(NH₄)₂SO₄ 1.0</p> <p>NaCl 1.0</p> <p>CaCO₃ 3.0</p> <p>Agar 15.0</p>	<p>ii) Bennet's agar medium (pH 7.3)</p> <p>Glucose 10.0 (g/l)</p> <p>Peptone 2.0</p> <p>Beef extract 1.0</p> <p>Yeast extract 1.0</p> <p>Agar 15.0</p>
<p>iii) GAPY-medium (pH 7.3)</p> <p>Glucose 10.0 (g/l)</p> <p>Starch (soluble) 20.0</p> <p>Yeast extract 5.0</p> <p>Bacto soytone 5.0</p> <p>CaCO₃ 1.0</p> <p>Agar 15.0</p>	<p>iv) Salser's medium (pH 7.3)</p> <p>Glycerol 44.0 (g/l)</p> <p>K₂HPO₄ 6.3</p> <p>KH₂PO₄ 1.8</p> <p>(NH₄)₂SO₄ 0.9</p> <p>Na-citrate 0.45</p> <p>MgSO₄ · 6H₂O 0.09</p>

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 공시충의 처리 및 화학약제에 대한 감수성

살충성 있는 신규 미생물을 찾아내기 위한 탐색에 있어 검정대상으로서 적합성을 고려할 때 흰불나방, 담배거세미나방, 파밤나방등은 대량 계대사육이 어렵고 섬식량이 적어 적합치 못한 것으로 나타났다. 그러나 누에는 안정된 인공사료육이 확립되어 있기 때문에, 검정대상으로서 비교적 균일한 공급을 할 수 있다는 점에서 본 실험실에서는 공시충으로 누에가 적합하였다.

1차 탐색과정의 효과적인 검정을 위해서 누에는 항생물질이나 합성농약에 대해 적절한 감수성을 보여야 하기 때문에, 다음과 같은 몇종의 항생물질과 유기합성 살충제에 대한 살충반응에 관한 시험을 행하였다.

우선 항생제에 대해 gentamycin, streptomycin 등은 1mg이하의 농도에서 24시간 후의 생존율이 100%이고, kanamycin은 500 μ g이하의 농도에서 100%의 생존율을 보임으로 살충성 물질 탐색에 있어 기존의 항생제에 저항성이 커 효과적인 검정대상임이 입증되었다.

또한 유기합성 살충제에 대해 Parathion과 Carbofuran의 경우 1 μ g-10 μ g/ml의 농도에서 100%의 치사율을 보이고, DDT의 경우 1.0 μ g-1 μ g/ml의 농도에서 100%의 치사율을 나타내어 기존 살충제에 대해 감수성이 높음을 입증하였다.

2. 토양시료의 채취

서울과 경기 및 영·호남(제주포함) 일원의 12개 지역에서 총 60점의 토양을 채취하여, 총 324 균주를 분리하였다(표 4).

Table 4. Soil sampling regions and isolated colony number of *Actinomyces*.

Region	Sampling site	Isolated colonies
Seoul	Kwanak Mt.	28
Kyung-Gi	Suwon	49
	Pocheon	12
	Pyeongtaik	32
	Yongin	53
	Kimpo	22
Jun-Buk	Jeonju	13
Jun-Nam	Gwangju	15
Keyong-Nam	Jinju	26
	Chungmu	17
	Hamyang	38
Che-Ju	Hanra Mt.	19

3. 방선균 분리 및 균주독성 검정

채취한 각 토양시료에서 효율적인 방선균 분리를 위해 SDS와 열처리등을 수행하였다. 분리된 방선균을 동정하기 위해 aerial mycelium의 현미경 관찰과 포자표면의 SEM관찰을 하였다(Fig.2, Fig.3).

또한, 토양시료로부터 분리한 방선균 중 1차 살충효과를 나타낸 균주는 6개 균주이다. 앞으로 1차 선발된 균주들 중에서 누에에 대한 살충력 확인실험을 행하고, 살충력 검정실험을 하지 못한 나머지 균주들도 계속 검정하여 1차 선발하고 그 후 TLC상에서 단일 spot 확인을 통해 물질분리하

고 HPLC를 이용하여 순수성 확인 및 분리작업을 수행하고자 한다.

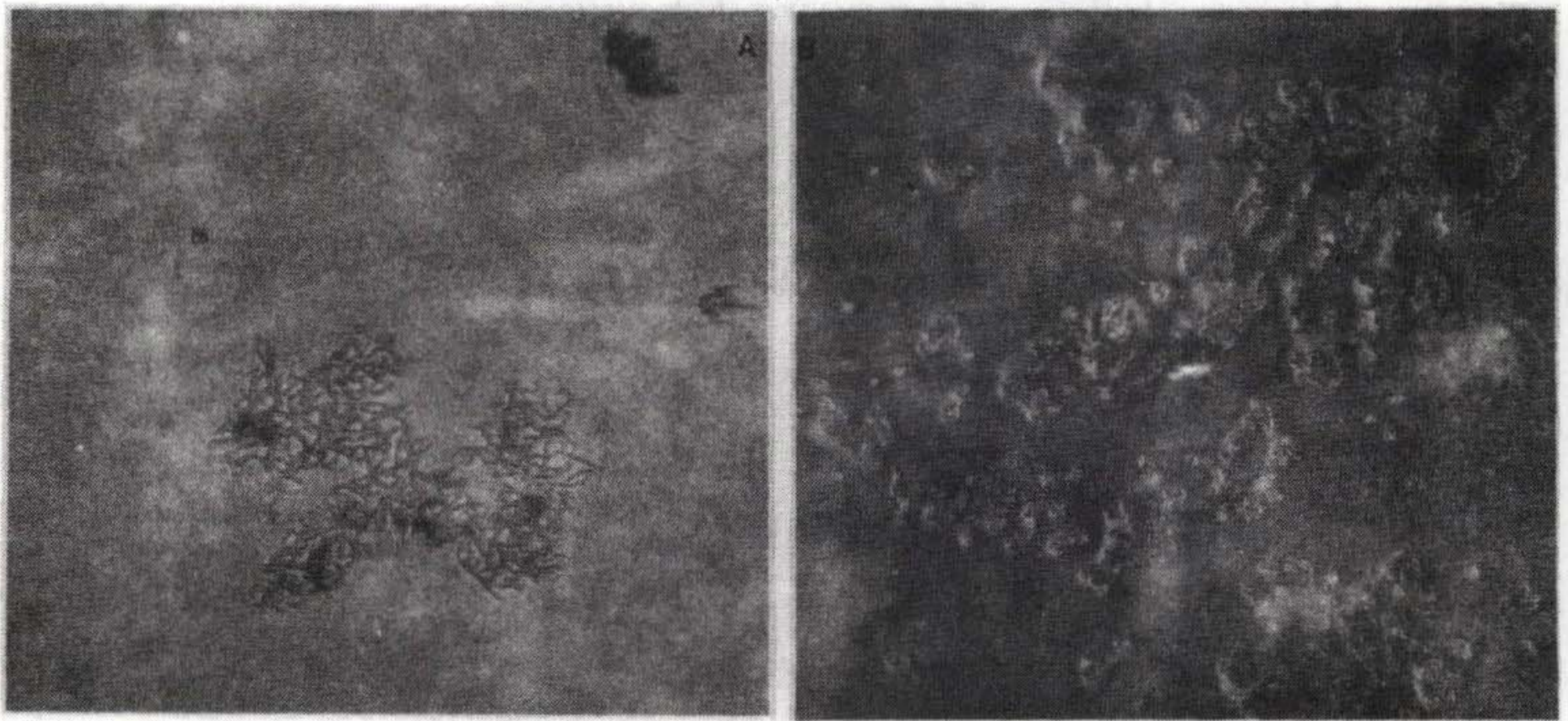


Fig.2. Light micrographs of aerial mycelium and spore chain.

A) & B) show flexuous spore bearing structure.

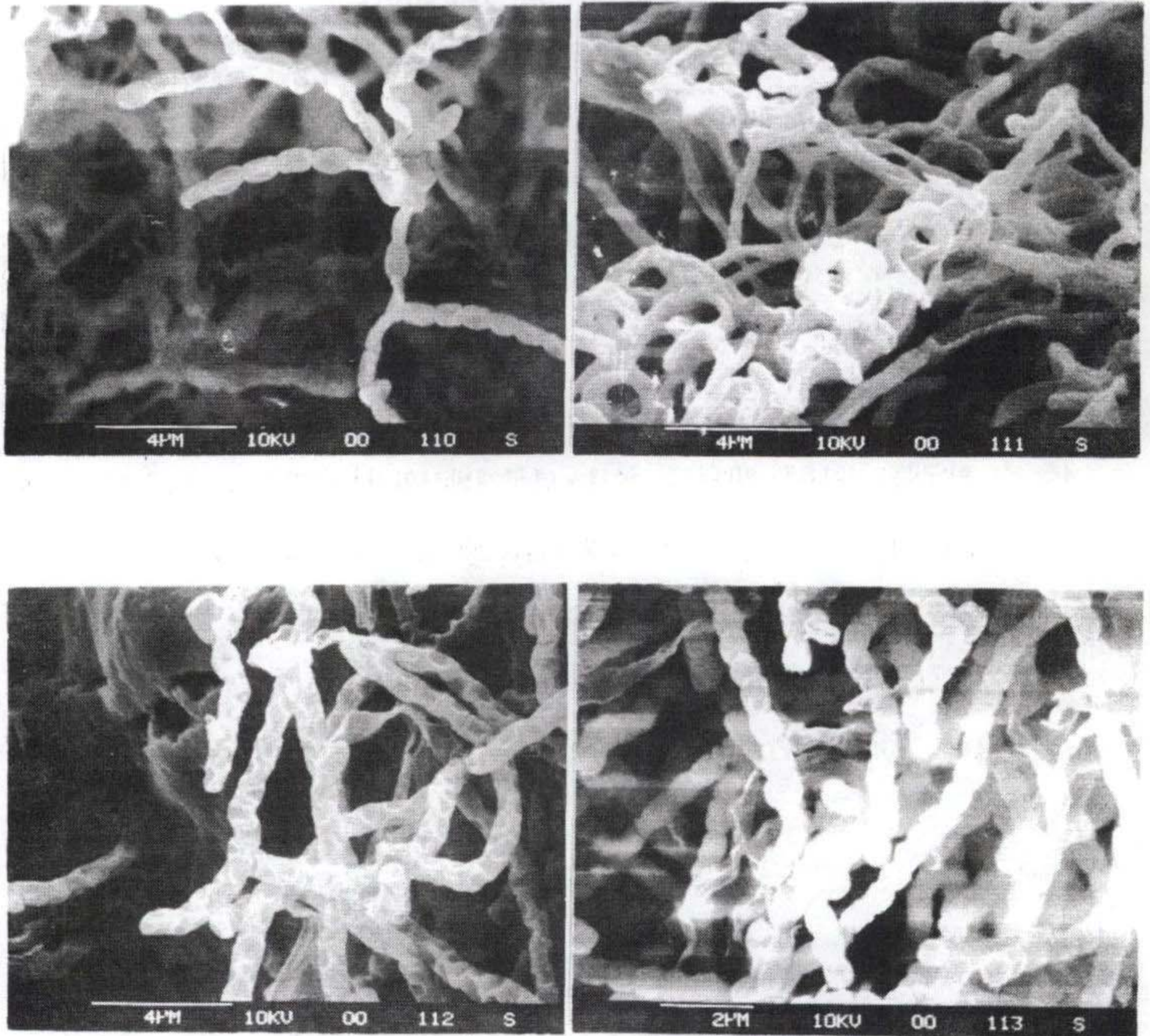


Fig.3. Scanning electron micrographs of the Various spore surfaces of isolated *Streptomyces* spp.

IV. 결 론

방선균이 분비하는 살충성 물질을 탐색하기 위하여, 우선 1차년도에서는 방선균의 분리를 효율적으로 유도하고, 이들 중에서 누에에 대한 살충성 검정 실험을 실시하여 유의성이 인정된 균주를 선별하였다.

1. 토양시료로부터 SDS첨가와 열처리등의 전처리과정을 통하여 효율적인 분리를 할 수 있는 실험적 기초를 확립하였다.
2. 누에에 대한 살충력 검정실험은 사충율 50%이상인 균주를 선별하고 1차선발 기준으로 하였다.
3. 현재 분리중인 324 균주중 우선 6개균주를 1차탐색의 유의성이 있다고 판정하였다.
4. 본 연구는 KIST 90년도 국책 연구개발사업의 일환으로 무공해 개발을 착수하게 됨에 있어서 토양방선균을 분리동정 제공함을 1차목표로 하고 있으며, 2차년도에도 계속해서 방선균을 분리하여 살충력 검정을 수행하고 각종 column work 과 spectrophotometry에 의한 살충성 물질의 분리를 KIST 유전공학 연구소와 공동으로 수행한다.

참 고 문 헌

- Ando, K.,(1982). Pesticide Chemistry, Vol.2, pp.253-260.
- Baute, R., G.Deffieux, D.Merlet, M.A. Baute and A. Neveu,(1981).
J.Antibiotics, Vol.34, pp.1261-1265.
- Berg, D.H. and R.L. Hamill,(1978). J.Antibiotics, Vol.31, pp.1-6.
- Box, S.J.,(1985). Discovery and Isolation of Microbial products,
pp.32-51.
- Claydon, N. and J.F. Grove,(1982). J. Inverteb. Pathol., Vol.40,
pp.413-418.
- Dulmage, H.T. and K. Aizawa, (1982). Microbial and Viral Pesticid-
es, pp.209-237.
- Dybas, R.A.,(1982). Pesticide Chemistry, Vol.1,pp.83-90.
- Eder, U. and H.C. Vol Keyserlingk.,(1985). Approaches to New
Lead for Insecticides, pp.1-8.
- Fabre, B., E.Armau, G.Etienne, F.Legendre and G. Tiraby,(1988).
J.Antibiotics, Vol.61, pp.212-219.
- Forgash, A.J.,(1984). Pestic. Biochem. Physiol., Vol.22, pp.178-
186.
- Goldberg, L.G. and J.Margalit,(1977). Mosq. News 37, pp.355-
358.
- Hans, J.K.,(1981). " The Family Streptomycetaceae " The Prok-
aryotes, Vol.2, pp.2028-2090.

- Hummel, H.E., (1983). *J.Nematol.*, Vol.15, pp.615-630.
- Isogai, A., S. Sakuda, S.Matsumoto. W.Ogura, K.Furihafa, H. Seto and A.Suzuki, (1984). *Agric, Biol.Chem.*, Vol.48, pp.827-828.
- Kenneth, A.H., (1982). *The Chemistry of Pesticides "their metabolism, mode of action and use in crop protection"*, pp.146-160.
- Mendrano, F.G. and E.A. Heinrich, (1985). *Handbook of insect Rearing*, Vol.1, pp.361-372.
- Menn, J.J., (1985). *ibid.*, pp.37-46.
- Miller, T.W., L. Chaiet, D.J. Cole, L.J. Cole, J.E.Flor, R.T. Geogrlman, V.P.Gullo, H. Joshua, A.J. KeapF, W.R. Krellwitz, R.L.Monaghan, R.E. Ormond, K.E.Wilson, G.Albersschonberg and I. Patter, (1979). *Antimicrob. Agents Chemother.*, Vol.15, pp.368-371.
- Mishima, H., (1982). *Pesticide Chemistry*, Vol.2, pp.129-134.
- Mishima, H., J.Ide, S.Muramatsu and M.Ono, (1983). *J. Antibiotics*, Vol.36, pp.980-990.
- Misato, T., (1982). *Pesticide Chemistry*, Vol.2, pp.241-246.
- Nonomura, H. and M.Hayakawa, (1988). *Biology of Actinomycetes '88*, pp.288-293.
- *Pesticides and Plant Protection*, (1987). Vol.8, pp.23-30.
- Pridham, T.G., C.W.Hesseltme, and R.G.Benedict, (1958). *Apply. Microbiol*, 6:52-70.

- Sakuda, S., A. Isogai, S. Matsumoto and A. Suzuki, (1978). J. Antibiotics, Vol. 60, pp.296-300.
- Suzuki, A., N. Hiromichi, S. Matsumoto, H. Kataoka, I. Akira S. Tamuta, H. Ishizaki, S. Sakurai, H. Fugo, H. Sonobe and N. Ogura, (1982). Pesticide Chemistry, Vol.2, pp.97-110.
- Usherwood, P.N.R., (1985). *ibid.*, pp.71-80.
- Verral, M.S., (1985). Discovery and Isolation of Microbial Products, pp.9-31.
- Yoshida, S., K. Yoneyama, S. Shiraishi, A. Watanabe and N. Takahashi, (1977). Agric, Biol. Chem, Vol.41, pp.849-853
- Zippel, M. and M. Neigenfind, (1988). J. Gen. Microbiol., Vol.34, pp.7-14.

여 백

1991년 (1 차년도) 위탁연구보고서 - Ⅲ

본 과 제 명 : 신규 살충성 천연물질 개발

위탁연구과제명 : 실험곤충을 이용한 생물검정 체계 확립

주 관 연 구 기 관 : 한국과학기술연구원 부설 유전공학연구소

본 과제 연구책임자 : 김 정 일

위탁연구과제책임자 : 장 영 덕

연 구 기 간 : 1991년 11월 ~ 1991년 6월

여 백

I. 서 론

최근들어 우리나라는 국제물질특허 협약에 가입이후 국내의 각종 새로운 물질생산개발을 서두르고 있는 이때에 신개발물질들의 각종 생물체 및 환경에 대한 효과 및 적합성과 부작용을 포함한 각종 평가방법은 물론 이를 검정할 수 있는 생물의 종류, 품종, 순수계통의 유지보존과 표준화된 사육기술의 확립이 절실히 요구되고 있는 실정이라 하겠다. 그러나 현재 우리나라에 있어서 전국 89개 각 대학 및 연구소에서 사육되고 있는 생물의 종수는 총 131종으로서 매뚜기목(23종), 나비목(20), 파리목(15), 거미, 선충, 응애류 등인데 각 기관당 평균사육종수는 1.5종으로 나타났다. 특히 실험곤충으로서의 가치기준을 든다면 순수한 표준종의 유지와 보존은 물론 아종, 변종, 지역종과 이들의 저항성 및 감수성계통 등의 다양한 유전자원의 확보와 아울러 필요시에 단기간내에 대량생산가능한 기술체계가 이루어져야 함은 물론 수많은 종류에 다른 사육용기, 사육기주(대체기주), 인공먹이, 간편한 취급기기 및 접종장비 및 기술, 생물검정용 처리시설 및 기기, 방법의 개발을 비롯한 각종 시설의 개발 및 확립은 많은 인력과 장기간을 요하므로 신물질생산과 더불어 매우 시급한 과제라 아니할 수 없다. 외국의 국공립 연구소는 물론 민간기업들까지도 첨단기술을 동원하여 사육시설과 기술을 투여하여 수많은 종들을 유지 보존하고 있는데 예를들면, 독일의 몬하임에 있는 Bayer 회사의 사육시설, 일본의 다카다약품의 시설들은 세계적인 기술을 축적하여 계획적 생산과 검정법 확립의 대표적인 것이라 할 수 있으며 국내에서는 현재 한국화학연구소가 기초적인 출발을 서두르고 있는 단계라 할 수 있다.

현재 우리나라에서 생산되고 있는 각종의 새로운 물질들을 가장 경제성이 높은 농작물해충 중 벼멸구를 비롯한 멸구매미충류 5종, 이화명나방을 비롯한

나방류, 토양해충류, 파리, 모기, 바퀴벌레 비롯한 위생해충류, 선충 및 응애류 등의 순수계통유지 및 보존, 대량생산 기술 및 체계의 표준화 등의 확립을 수립하고자 할 뿐만 아니라 사육기주식물 및 대체 기주의 선발을 시도할 것이다. 따라서 보다 신속하고 간편한 사육기술을 통하여 보다 합리적이고 체계적인 생물검정 시스템을 확립함으로써 보다 많은 인력과 시간을 단축할 수 있는 각종 사육시스템의 운영방법이 수립될 것이다.

본 실험에서는 한국과학기술연구원 유전공학 연구소 국책 연구개발 사업의 일환인 무공해 생물농약 개발에 관한 연구를 착수하게 됨에 있어서 실험 곤충을 수집 분리하고 대량사육하여 새로운 생물검정체계 확립에 필요한 자원을 제공함으로써 유용살충제 개발에 관한 공동연구를 수행하고 있다. 본 연구의 1차년도에서 그 기초 연구로서 연구방법의 확립과 개발 가능성을 확인하였다.

II. 재료 및 방법

1. 각 지역별, 작물별 순수계통의 수집 및 분리

전국 주요지역의 작물 및 저장물에 발생하는 각종 해충류를 1990년 11월부터 1991년 5월까지 채집하여 분리 사육하고 있다.

① 수도해충

벼멸구 (*Nilaparvata lugens*)을 비롯한 수도 해충류는 대전, 진주, 수원 등 발생이 심한 예찰탑에서 흡충관을 이용하여 채집하고 곧바로 미리 준비한 5일된 수도유묘가 있는 시험관 (20 × 20 cm)에 옮긴 후 사육실 (LD 18:6)로 이동하였다. 수도해충류 누대사육을 위하여 Plastic batt (30 × 40 × 40 cm)위에 5일된 수도유묘를 넣고 사육 Cage (25 × 30 × 20 cm)를 씌운 후 채집한 멸구류를 접종하였다.

② 난 기생봉

난 기생봉은 애멸구, 벼멸구, 흰등멸구 등 3개의 멸구류를 실내에서 어린 유묘에 산란시킨 2일 후 야외포장에 멸구류별 유묘 15본씩 batt에 심은 다음 대전, 진주, 수원지역 등 3개소에 두었으며 방치 2~3일후 실내에서 시험관에 각각 옮겨 우화된 기생봉을 조사하였다. 수도 해충별로 유충 또는 번데기를 채집하여 실내사육하면서 우화되는 기생성 천적을 분리하여 사육하였다

③ 저장해충

저장해충인 팟바구미 (*Callosobruchus*)는 청양, 대전 등에서 월동유충을 분리하여 Compact 샤아레를 이용 사육실로 옮긴 후 팟을 넣은 Yolk 샤아레에 방사하였다. 쌀바구미 (*Sitophilus oryzae*)도 같은 방법으로 유충과 성

충을 채집하여 누대 사육하였다. 꿀벌 부채명나방은 남원, 대전 등 발생이 심한 양봉장에서 감염이 심한 소비면을 실내로 옮긴 후 3~4령 유충을 분리하여 3년 이상된 묵은 소비를 15 cm² 크기로 잘라 1.5 liter glass jar에 넣은 후 접종하여 누대 사육하였다.

④ 채소류 해충

채소류에 발생하는 진딧물류는 대전 근교포장에서 채집하여 온실로 옮긴 후 1 cm² 당 40 mesh의 망사로 씌운 기주체인 고추, 수박, 토마토 등에 접종하였다. 콩을 가해하는 간자와 응애 (*Tetranychus kanzawai*)는 대전 근교의 강남콩 포장에서 성충을 채집하여 위와 같은 방법으로 사육하였으며, 강남콩엽 뒷면에 접종시킨 후 응애가 가지를 타고 내려가는 것을 막기 위하여 가지마다 바세린을 발라주었다.

2. 기주식물 및 실험곤충 사육용기의 보완

멸구류 누대사육시 오염방지 및 이동의 편리성을 위해 커피통(7×20 cm; 5×17 cm)을 뚜껑에 3×4 cm 크기의 홈을 내어 1 cm² 당 200 mesh의 망사를 부착시켜 만들었다. 꿀벌부채명 나방의 사육을 위해 아이스크림통(10×15 cm)의 뚜껑을 제거한 후 비닐랩을 씌워 0.5mm의 철사로 5개의 구멍을 내어 사용하였다.

3. 실험 곤충의 사육 특성 조사

① 난 기생봉

*Anagrus incarnatus*는 기주별 기생율을 조사하기 위해 벼멸구(*N. lugens*), 애멸구(*Laodelphax striatellus*), 흰등멸구(*Sogatella furcifera*)별로 암

컷 2마리씩 1일간 산란시킨 후 기생봉 2마리씩 넣어서 기주에 따른 기생율을 조사한다.

② 간자와 응애

간자와 응애 (*Tetranychus kanzawai*)의 사육특성은 기주체인 강낭콩을 Pot에 심었을 경우 온도와 습도, 천적의 포식 등 외부조건이 잘 맞지않는 경우를 대비하여 Incubator (LD 16:8, RH60-80%)를 이용하였으며, 이때 직경 18 cm Petridish에 응애의 이동과 강낭콩엽의 건조고사를 막기 위하여 수분을 충분히 적신 탈지면을 깔고 그 위에 절단한 강낭콩엽의 뒷면이 위로 향하도록 놓은 다음 가는 붓을 사용하여 그 엽 위에 응애를 접종하여 공시하였으며 4~5일에 1회 새로운 강낭콩엽으로 교체한다.

III. 결과 및 고찰

1. 각 지역별, 작물별 순수계통의 수집 및 분리

곤충방제 기술의 실행을 위하여 Table 1에서 보는바와 같이 벼멸구 (*N. lugens*)을 비롯한 수도해충류 5종, 난 기생봉인 *A. incarnatus* 등 2종, 쌀바구미 (*S. oryzae*)을 포함한 저장해충류 4종, 진딧물류 3종, 응애류 2종을 야외포장에서 채집하여 성공적으로 사육하고 있다. 일반적으로 야외곤충의 실내사육시 발생하는 질적, 행동적, 유전적인 변화를 극복하기 위해 우선 기주체를 이용 사육을 하였으며 향후 실험곤충의 생물학적 역할을 상세히 조사하여 대량사육을 시도하고자 한다.

Table 1. The present state of laboratory rearing of each insect pest collected in the field.

Rearing insect		Host	Collected site
Rice	<i>Nilaparvata lugens</i> Stal	<i>Oryza sativa</i>	Taejon, Suwon, Jinju
pests	(brown planthopper)	(rice)	
	<i>Laodelphax striatellus</i> Fallen	<i>Oryza sativa</i>	Taejon, Suwon, Jinju
	(small brown planthopper)	(rice)	
	<i>Sogatella furcifera</i> Horvath	<i>Oryza sativa</i>	Taejon, Suwon, Jinju
	(white-backed rice planthopper)	(rice)	
	<i>Nephotettix cincticeps</i> Vhler	<i>Oryza sativa</i>	Taejon, Suwon, Jinju
	(green rice leafhopper)	(rice)	
	<i>Lissorhoptrus oryophilus</i> kuschel	<i>Oryza sativa</i>	Suwon
	(rice water weevil)	(rice)	

Rearing insect	Host	Collected site
(continued)		
Para- <i>Anagrus incarnatus</i> Haliday	<i>Nilaparvata lugens</i>	Tae jon,
sitoids <i>A. flaveolus</i>	(brown planthopper)	Suwoo
	<i>Laodelphax striatellus</i>	Jinju
	(small brown planthopper)	
	<i>Sogatella furcifera</i>	
	(white-backed rice planthopper)	
Stored <i>Sitophilus oryzae</i> Linnaeus	<i>Oryza sativa</i>	Tae jon, Chongyang
products (rice weevil)	(rice)	
pests <i>Callosobruchus chinensis</i> Linne	<i>Phaseolus angularis</i>	Tae jon, Chongyang
(azuki bean weevil)	Wight	
<i>Plodia interpunctella</i> Hübner	<i>Oryza sativa</i> (rice)	Tae jon, Chongyang
(indian meal moth)	<i>Glycine max</i>	
<i>Galleria mellonella</i>	<i>Apis mellifera</i>	Tae jon, Namwon
(greater wax moth)	(honey bee)	
Aphide <i>Myzus persicae</i> Salzer	<i>Citrullus vulgaris</i>	Tae jon
(green peach aphid)	<i>Capsium annuum</i>	
<i>Aphis craccivora</i> Koch	<i>Lycopersicon esculentum</i>	
(cow pea aphid)		
<i>Aphis gossypii</i>		
(melon aphid, cotton aphid)		
Acarids <i>Tetranychus kanzawai</i> Kishida	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Tae jon
<i>Varroa jacobsoni</i> Oudemans	<i>Apis mellifera</i>	Tae jon, Namwon
	(honey bee)	

각종 해충류의 수집 분리중 저장해충인 *Anagasta kuchniella*는 수도해충 천적류인 *Trichogramma* sp.의 대량사육시의 대체기주로서 매우 중요하다는 것과 쌀바구미 (*S.oryzae*)는 *S.maize*가 상당수 혼재해 있다는 보고가 있어 앞으로 유전적인 연구가 필요한 것으로 실내사육을 수행하고자 한다.

2. 실험곤충 사육용기의 보완

실험곤충 사육에 있어 용기의 보완은 순수계통의 유지 및 대량사육 기술 개발에 절실히 필요하며 특히 목적 종의 특이성과 각 기주체의 발육특성을 고려하여야만 성공적인 개발이 될 수 있다. 본 실험실에 사용된 커피통 및 아이스크림 통은 재활용품으로서 어디서나 값싸고 쉽게 구할 수 있기 때문에 사육용기로서 더욱 알맞다 하겠다. (그림 1)에서 보는 바와 같이 커피통의 멸구류 사육은 누대사육시 오염방지 및 이동의 편리성 까지 갖추어 필요로 하는 공시충을 손쉽게 확보할 수 있다. 현재 사육되고 있는 사육상자(cage)는 고가의 제품이며 누대사육시에만 필요하며 실험에 응용하는데는 많은 어려움이 있다. 꿀벌부채명 나방의 사육에 이용한 아이스크림통 역시 사육의 경제적 가치를 인식할 때 효과적인 용기라 할 수 있다. 관찰을 용이하도록 하기 위해 비닐랩을 씌우고 공기 순환의 문제는 5개의 홈을 내므로써 해결할 수 있었다.

사육용기의 개발은 목적해충의 실험을 정밀하고 능률적으로 할 수 있게 하는 중요한 관건이므로 지속적인 개발 및 보완이 있어야 할 것이다.

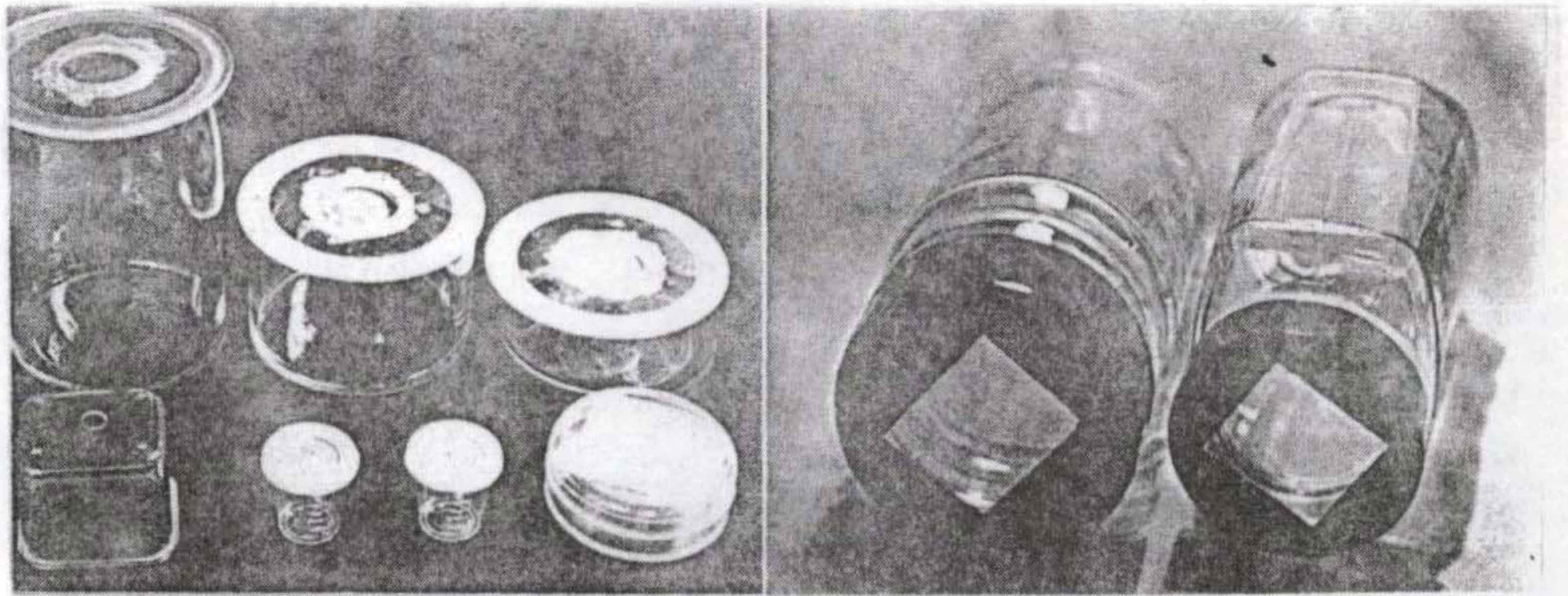


Fig.1. Containers used for laboratory rearing.

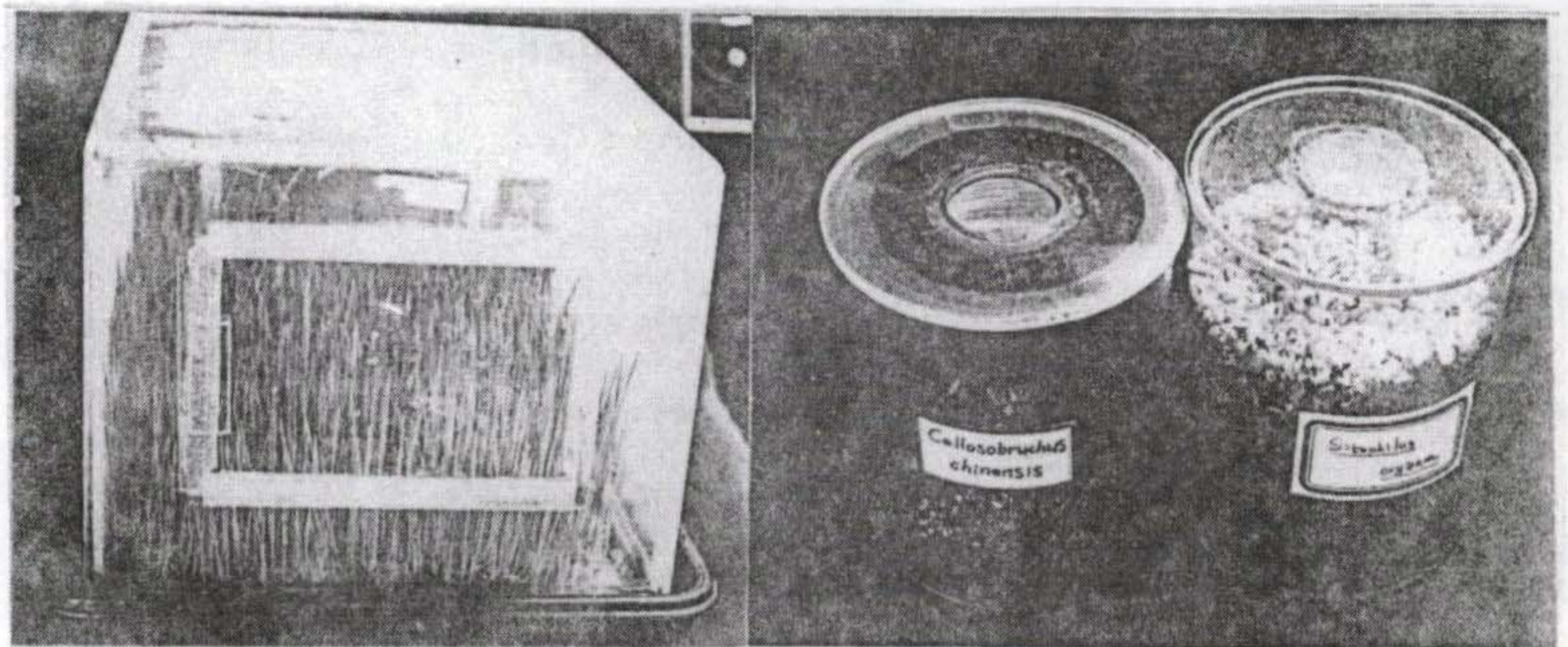


Fig.2. Laboratory rearing of rice pests and stored products pests.

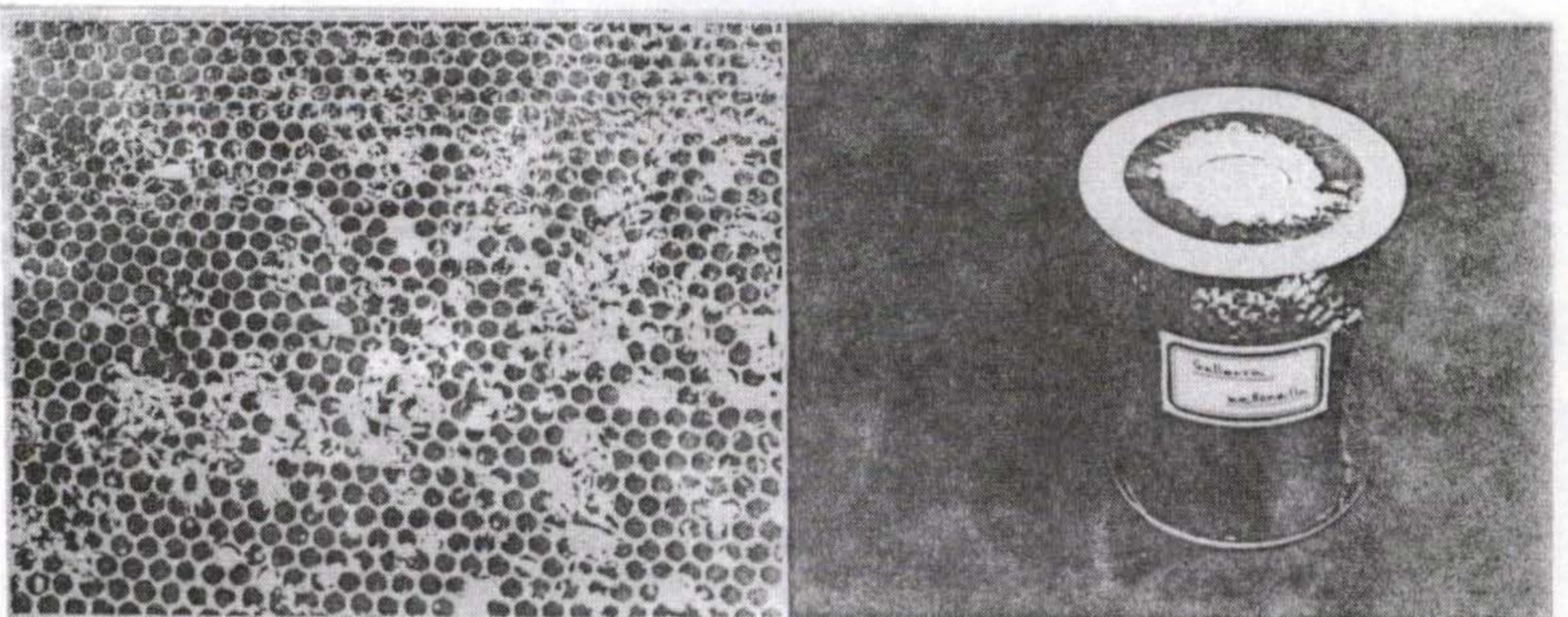


Fig.3. Comb of honey bee attacked *Galleria mellonella* and laboratory rearing of greater wax moth.

3. 실험곤충의 사육특성 조사

① 난 기생충

수도 해충별로 유충 또는 번데기를 채집하여 실내사육하면서 우화되는 기생충 천적을 분류동정한 결과는 다음과 같다.

Table 2. Parasitoids of rice pest

Host	Parasitoids	Stage attacked
<i>Chilo suppressalis</i> W.	<i>Microgaster russata</i> H.	larva
<i>Mythimna weparata</i> W.	<i>Aphanteles kariyae</i> W.	larva
	<i>Ichneumonid</i> sp.	larva
<i>Cnaphalo crosis medinalis</i> G.	<i>Itoplectis narangae</i> ASH	larva
<i>Chlorops oryzae</i> M.	<i>Neochrysocharis okazakii</i> K.	pupa
<i>Hydrellia griseola</i> F.	<i>Neochrysocharis okazakii</i> K.	pupa
	<i>Trichomalopsis</i> sp.	pupa
	<i>Dacnusa</i> sp.	pupa
<i>Nilaparvata lugens</i> S.	<i>Opius</i> sp.	pupa
<i>Sogatella furcifera</i> H.	<i>Anagrus incarnatus</i>	
<i>Laodelphax striatellus</i> F.	<i>A. flaveolus</i>	
	<i>A. optabilus</i>	egg
	<i>Mymar taprobaricum</i>	

Table 2에서 보는바와 같이 이화명 나방 유충에서는 명충 큰 고치벌, 멸강나방은 멸강나방 고치벌 등이 나왔고 멸구류에서는 난 기생충으로써 A.

incarnatus 등 3종이 나왔으며 *A. flavelolus*가 우점종으로 나왔다. 굴파리에서는 좀벌류들이 나왔다.

벼멸구 (*N. lugens*), 애멸구 (*L. striatellus*), 흰등멸구 (*S. furcifera*) 등 3종이 멸구난에 대한 *A. incarnatus*의 기생을 결과는 Table 3에서 보는바와 같이 애멸구의 기생율이 가장 높았다.

Table 3. Parasitism of *A. incarnatus* on different host eggs in test tube *

Replicates	% Parasitism on each host eggs*		
	BPH	SBPH	WBPH
1	52	33	15
2	19	81	0
3	13	67	0
4	36	64	0
5	35	65	0
Mean ± S.E	32.0 ± 5.2	62.0 ± 7.9	3.0 ± 2.9

* *A. incarnatus* were introduced into the test tube with 3 rice seedlings involving respective host eggs and the parasitized host eggs were counted before emergence.

* BPH : *Nilaparvata lugens* SBPH : *Laodelphax striatellus*

* WBPH : *Sogatella furcifera*

② 간자와 응애

간자와 응애 사육결과 Table 4에서 보는바와 같이 번식률에 큰 차이를 보였다. 30℃ 정도의 고온의 경우 번식률이 너무 빠르기 때문에 기주식물이 짧은 시간내에 고사하게 되고, 응애도 계대를 하지 못하게 되었다. 또 응애가 불량한 환경조건에서는 휴면에 들어가게 되므로 Growth chamber를 이용하여 최선의 조건을 만들어 주었을 때 대량사육이 가능하였다.

Table 4. Developmental times(days) of immature stage of tea red spidermite at different temperatures.

Temperature (°C)	Mean \pm SD	No. individuals
16	24.8 \pm 1.1	35
20	17.0 \pm 1.0	24
24	11.0 \pm 0.7	28
28	8.2 \pm 1.2	31
32	6.7 \pm 1.5	30

IV. 결 론

실험곤충을 이용한 새로운 생물검정 체계확립을 위하여, 우선 1차 년도에는 표준종을 수집분리하여 실내사육 하였으며, 효율성을 높이는 방안으로 사육특성을 조사하여 대량사육을 유도하였다.

1. 각 지역별, 작물별 순수계통의 수집 및 분리는 수도해충류 5종, 수도해충 기생봉 1종, 저장해충류 4종, 진딧물류 3종, 응애류 2종 등 총 15종이며, 실내사육에 모두 성공적이었다.

2. 대량사육기술의 일환인 사육용기의 개발은 멸구류에 커피용 통을 저장류에 가벼운 플라스틱 제품과 아이스크림 통이 효과적이었다.

3. 난 기생봉 *Anagrus incarnatus*는 수도멸구류 중 애멸구를 가장 많이 선호하는 특성을 보였다.

4. 간자와 응애는 온도에 따라 번식률에 큰 차이를 보여 누대 사육시 온도의 고려가 필요하였다.

5. 본 연구는 KIST 90년도 국책 연구개발 사업의 일환으로 새로운 생물검정체계 확립개발을 착수하게 됨에 있어서 실험곤충을 기주체로 부터 수집 분리하고 사육특성을 밝혀 누대사육하여 공시충을 확보하는 것을 1차 목표로 하고 있으며, 2차 년도에는 대량사육을 인공배지 또는 실험실내 기주체를 이용하여 실시하며 새로운 생물검정 체계확립을 KIST 유전공학 연구소와 공동으로 수행한다.

여 백

인 용 문 헌

- Berk, S.D. 1971, Growth and retrogression in larvae of *Trogoderma glabrum*(Coleoptera : Dermestidae). I. Characteristics under feeding and starvation conditions. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 64 :149-155.
- Chantarasa-ard, S., Y. Hirashima and T. Miura. 1984. Effect of temperature and food on the development and reproduction of *Anagrus incarnatus* Haliday (Hymenoptera : Mymaridae), an egg parasitoid of the rice planthoppers. *Esakia*. 22:159-162.
- Chantarasa-ard, S. 1984. Preliminary study on the overwintering of *Anagrus incarnatus* Haliday (Hymenoptera : Mymaridae), an egg parasitoid of the rice planthoppers. *Esakia*. 22:159-162.
- Endris, R.E. ; Perkins, P.V. ; Young, D.G. ; Johnson, R.N. 1982. Techniques for laboratory rearing of sand flies (Diptera : Psychodidae). *Mosq. News* 42:400-407.
- Grisdale, D.G. 1963. Rearing insects on artificial diet. Interim Res. Rep. Insect Pathology Res. Inst. Sault Ste Marie, Ontario, Canada.
- Huettel, M.D., 1976. Monitoring the quality of laboratory-reared insects : a biological and behavioral perspective. *Environ. Entomol.* 5:807-814.
- IRRI (International Rice Research Institute). 1976. Annual report for 1975. Los Banos, Philippines. 479 p.

- Joslyn, D.J., 1984. maintenance of genetic variability in reared insects. In: E.G. King and N.C. Leppla (Editors), *Advances and Challenges in Insect Rearing*. U.S. Department of Agriculture Handbook, pp.20-29.
- 菊本敏雄：植物防疫 24, 328(1970).
- 駒田 旦：植物防疫 24, 325(1970).
- 木村貞夫：植物防疫 35, 115(1981).
- Lyon, R. L., Richmond, C.E., Robertson, J.L. and Lucas, B.A., 1972. Rearing diapause and diapause-free western spruce budworm (*Choristoneura occidentalis*) (Lepidoptera: Tortricidea) on artificial diet. *Can. Entomol.* 104:417-427.
- Mittler, T.E. and Tsitsipis, J.A., 1973. Economical rearing of larvae of the olive fly, *Dacus oleae*, on a liquid diet offered on cotton towelling. *Entomol. Exp. Appl.* 16:292-293.
- Mulken, G.B.; Toczec, D.R. 1970. Bioassays of plant extracts for growth-promoting substances for *Melanoplus femurrubrum* (Orthoptera: Acrididae). *Ann. Ent. Soc. Amer.* 63 (1):272-284.
- Navon, A. and Keren, S., 1980. Rearing the Egyptian cotton leaf-worm, *Spodoptera littoralis*, on a practical calcium-alginate diet. *Phytoparasitica* 8:205-207.
- Pathak, M.D. 1968. Ecology of common insect pests of rice. *Ann. Rev. Ent.* 13:257-294.

- Pathak, P.K.; Heinrichs, E.A. 1982. Selection of biotype population 2 and 3 of *Nilaparvata lugens* by exposure of resistant rice varieties. *Environ. Entomol.* 11:85-90.
- Pickett, C.H. and F.E. Gilstrap. 1986. Inoculative releases of phytoseiids for the biological control of spider mites (Acari: Tetranychidae) in corn. *Environ. Ent.* 15:790-794.
- 細豊二. 1985. 最新農薬生物検定法. 全国農村教育協会. pp.179-271.
- 佐久間昭. 1977. 生物検定法, 東大出版會, 東京, 309 pp.
- 生越一明: 植物防疫 24, 313(1970).
- 小倉寛典: 植物防疫 24, 319(1970).
- 津山博之: 植物防疫 35, 104(1981).
- 松田 明: 植物防疫 24, 322(1970).
- Southwood, I.R.E., 1978. *Ecological method*, John Wiley and Sons, New York, 524 pp.
- Stock, M.W. and Robertson, J.L., 1980. Inter-and intraspecific variation in selected *Choristoneura* species (Lepidoptera: Tortricidae): a toxicological and genetic survey. *Can. Entomol.* 112: 1019-1027.
- Veerman, A. 1977. Aspects of the induction of diapause in a laboratory strain of the mite *Tetranychus urticae* *J. Insect Physiol.* 23:703-711.