

## *Beauveria bassiana* 배양여액 분획추출물의 진딧물 살충활성\*

정가영\*\* · 한지희\*\* · 김정준\*\*\* · 이상엽\*\*

### Aphicidal Activity of Different Fraction Extracts of Culture Filtrate of *Beauveria bassiana* Isolate against Aphids

Jeong, Ga-Young · Han, Ji-Hee · Kim, Jeong-Jun · Lee, Sang-Yeob

Cotton aphid (*Aphis gossypii*) and green peach aphid (*Myzus persicae*) are serious pests damaging various crops including vegetables such as pepper, cucumber, and Chinese cabbage. We conducted a study to control two aphids with secondary metabolite of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. A *B. bassiana* was already selected as a high virulence isolate against cotton aphid and green peach aphid. The culture filtrate of the isolate showed high pathogenicity against both aphids as 100% mortality against cotton aphid 3 days after treatment and 99% against green peach aphid 5 days after treatment. A different fraction extracts with  $\text{CHCl}_3$ :MeOH of *B. bassiana* culture filtrate (30:1, 50:1, 70:1, 90:1, 100:1; v/v) through silica gel column chromatography showed different control effect to aphids. Among them, 50:1 ( $\text{CHCl}_3$ :MeOH) fraction had highest mortality as 77.3% and 75.4% against *A. gossypii* and *M. persicae*, respectively. A mixture of each fraction (1:1) had no synergistic effects because control effect of every mixture was lower than only 50:1 extract; for example, mortality of 50:1 + 70:1 showed 2<sup>nd</sup> highest as 72% of cotton aphid and 70.2% of green peach aphid and other mixtures were lower than these values. In future we will study the identification and mass production of aphicidal compound isolated from 50:1 fraction to develop stable aphid control agent.

Key words : aphid, *Beauveria bassiana*, culture filtrate, entomopathogenic fungi

\* 본 연구는 국립농업과학원의 공동연구사업(PJ009979)의 지원에 의해 이루어진 것임

\*\* 농촌진흥청 국립농업과학원

\*\*\* Corresponding author, 농촌진흥청 국립농업과학원, +82-63-238-3051(jjkim66@korea.kr)

## I. 서 론

진딧물은 전 세계적으로 많은 농작물에 막대한 피해를 주는 해충으로(Milner, 1997), 작물 생육 초기부터 수확기까지 양분을 직접 흡즙하여 작물의 생산성을 크게 감소시킨다(Kim et al., 1986). 또 과량으로 섭취한 당분을 식물에 배출하여 그을병을 일으켜 식물의 광합성을 저해하고 상품성을 저하시킬 뿐만 아니라 식물바이러스병을 매개하여 작물에 큰 피해를 주고 있다(Kim et al., 2008). 진딧물 방제 방법에는 화학농약을 살포하는 화학적 방제법이 일반적으로 사용되고 있으나 농약의 환경 잔류 및 해충의 저항성 발현 등의 부작용으로 해충 방제에 사용이 제한적인 경우가 많다. 또한 친환경 농산물 생산 및 섭취에 대한 관심이 증가하면서 천적 곤충 및 미생물을 이용한 생물적 방제 연구도 증가하고 있다.

세균, 바이러스, 곰팡이, 선충 등을 이용한 미생물 살충제 중 진딧물과 같은 흡즙성 해충의 방제에는 곤충병원성 곰팡이를 이용한 방제제가 많이 개발 이용되고 있다(Goettel et al., 2005; Vey et al., 2001). 곰팡이를 이용한 미생물 살충제는 *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*와 *Lecanicillium* spp. 등 12종의 곰팡이를 이용하여 171 제품이 개발되어 있다(de Farina and Wright, 2007). 이 중 대표적인 흡즙성 해충인 진딧물 방제제가 28 제품(16.4%), 가루이 방제제가 42 제품(24.6%)을 차지하고 있다. 곰팡이를 이용한 미생물 살충제는 대부분 액체 또는 고체 배양한 포자가 주요 살충인자로 포함되어 있고, 이들은 층층 표면에 부착하여 적절한 온도, 습도 조건에서 발아하고 곤충의 표피 분해가 가능한 효소 등을 분비하여 곤충 체내로 침입하여 기주 곤충을 죽인다(Goettel et al., 2005). 하지만 포자에 의한 해충 방제는 속도가 느리고, 살충 효과가 온도, 습도, 햇빛(특히 자외선) 등의 영향으로 환경에 따라 살충효과의 변동이 큰 단점이 있다(Burges, 1998).

곤충병원성 곰팡이가 생산하는 이차대사산물을 이용한 해충 방제가 포자를 이용한 방제의 단점을 극복할 수 있는 것으로 보고되고 있다(Xia et al., 2000; Xia et al., 2001; Rohlf and Churchill, 2011). 곤충병원성곰팡이 *L. lecanii*와 *B. bassiana*의 배양여액을 처리하였을 때 진딧물의 생존율을 낮추는 효과가 있었다(Gurulingappa et al., 2011). 살충성 곰팡이의 배양액 중에는 살충효과를 나타내는 살충성 이차대사산물이나 체벽을 분해할 수 있는 효소를 포함하고 있거나(Charnley, 2003) 살충성 물질을 포함하기도 한다(Molnar et al., 2010). 살충성 곰팡이가 생산하는 이러한 살충성 대사물질로는 *Verticillium* sp.가 생산하는 bioanthracene, *Hirsutella* sp.가 생산하는 hirsutelic acid, *Isaria japonica*가 생산하는 lateritin, *B. bassiana*, *B. tenella*, 그리고 *Paecilomyces fumosoroseus* (*I. fumosorosea*)가 생산하는 beauverolides, *M. anisopliae*와 *Aschersonia insperata*가 생산하는 destruxins 등이 있다. 또 다양한 미생물 살충제 개발에 많이 사용된 *B. bassiana*는 beauvericin, destruxins, bassianin, bassianolide, beauverolides, beauveriolides, tenellin, oosporein 등의 물질을 생산하고 살충 효과뿐만 아니라 살균, 항암 효과 등 다양한 효과가 보고되어 있다(Vey et al., 2001; Zhang et al., 2007;

Wang and Xu, 2012). 이 중 beauvericin은 *B. bassiana* 뿐만 아니라 다른 *Beauveria* 속 곰팡이와 *P. fumosoroseus* (*I. fumosorosea*), *P. tenuipes* (*I. tenuipes*) 등에서도 생산된다(Molnar et al., 2010).

본 연구 이용된 *B. bassiana*는 배양액뿐만 아니라 포자를 제거한 배양여액도 복숭아혹진딧물에 살충 효과가 있는 것으로 보고되었다(Kim et al., 2013). 따라서 본 연구에서는 이 곰팡이 균주가 생산하는 살충성 물질을 확인하기 위하여 배양여액 분획들의 목화진딧물 및 복숭아혹진딧물에 대한 살충활성을 조사하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험 곤충

본 실험에 사용된 복숭아혹진딧물과 목화진딧물은 국립농업과학원 농업미생물과 해충사육실에서 온도 25°C, 광조건 16 L : 8 D, 상대습도 60±5% 조건으로 cage (90×90×90 cm<sup>3</sup>)에서 사육하였다. 기주 식물로 온실에서 45일 키운 배추와 30일 키운 오이를 사용하였다.

생물검정용 진딧물은 사육중인 진딧물 성충을 직경 5.5 cm petri dish 내에 들어 있는 직경 3.5 cm 배추 또는 오이 잎 조각에 접종하여 광주기 16:8 (L:D), 25±2°C cage에서 15시간 동안 산자를 받고 성충을 제거 후 2일을 사육한 3령 약충을 이용하였다. 각 검정용 dish에는 25마리의 3령 약충을 넣어 주고, 잎의 건조 방지를 위해 페트리디쉬의 바닥에 filter paper를 두고 200 µl의 D.W.를 넣어 습식처리를 해주었다.

### 2. 실험 균주의 배양

본 실험에서는 배양액과 배양여액 모두 복숭아혹진딧물에 살충률이 높은 것으로 알려진 *B. bassiana* Bb08 (미생물 수탁번호 : KACC93163P)를 이용하였다(Kim et al., 2013). *B. bassiana* Bb08 포자는 15% glycerol 용액에 혼합하여 -80°C에서 보관하면서 필요시 potato dextrose agar (PDA)(pH 5.8)에 올려놓고 25°C, 7~10일간 포자가 생성될 때까지 배양하였다.

액체배양을 위해 곰팡이 포자는 PDA에서 7일간 배양한 후, 멸균된 5 ml 0.05% Tween 80 용액을 PDA에 넣고 멸균된 spreader를 이용하여 포자를 회수하고, 헤모사이토미터를 이용하여 포자수를 계수한 후 1.0×10<sup>7</sup> conidia/ml의 포자현탁액을 제조하였다. 제조된 포자현탁액은 AD배지(조성 3% corn steep powder, 4% glucose (Sigma, USA), 4% yeast extract) 500 ml가 들어 있는 1 L flask에 최종농도 1.0×10<sup>5</sup> conidia/ml가 되도록 접종하였다. 균이 접종된 배지는 25°C의 rotary shaking incubator에서 200 rpm의 속도로 3일간 배양하였다.

### 3. 생물 검정용 배양여액 분획 조제

AD배지를 사용하여 3일간 shaking incubator에서 배양한 Bb08균 배양액이 들어있는 플라스크의 입구를 화염 멸균한 후 250 ml centrifugal bottle에 옮겨 담았다. 이후 9000 rpm, 4°C 조건에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 수거하여 멸균된 filter paper와 Bottle Top Vacuum Sterile Filter (CLS430769, Sigma aldrich)에 연속하여 여과시켜 균체 및 포자를 모두 제거하였다. 이 때 모든 도구는 멸균된 제품을 사용하였고 활성물질 추출 전까지 4°C 냉장고에 보관하였다.

멸균된 분액갈때기를 준비한 후 여과된 배양여액에 ethyl acetate (EA)를 1:1로 넣고 강하게 교반하고 상층의 EA 물질 층을 회수한 후 다시 같은 부피의 EA를 다시 넣고 강하게 교반하여 EA 물질층만을 회수하였다. 회수한 물질층은 evaporator를 이용해 50°C, 70 rpm 조건에서 휘발성 용매를 모두 증발 제거한 후, 용매(CHCl<sub>3</sub>:MeOH = 100:1) 10 ml을 vacuum flask에 넣어준 후 sonicator를 이용하여 flask 내에 남아있는 물질을 녹여 회수하였다.

회수된 물질은 Silica gel column chromatography를 이용하여 CHCl<sub>3</sub>:MeOH = 100:1, 90:1, 70:1, 50:1, 30:1(v/v) 비율로 살충성 물질을 정제하여 45°C 건조 오븐에서 추출한 분획 추출물의 용매를 모두 휘발시킨 후 각 농도의 추출물에 멸균 증류수 140 ml를 넣고 3분간 vortexing 하면서 용해하여 4°C에 보관하였다. 각 농도별 분획 추출물들의 혼합액의 살충활성 검정을 위해, 멸균 증류수에 희석된 각 농도별 분획추출물을 1:1로 혼합한 혼합액(30:1 + 50:1, 30:1 + 70:1, 30:1 + 90:1, 30:1 + 100:1, 50:1 + 70:1, 50:1 + 90:1, 50:1 + 100:1, 70:1 + 90:1, 70:1 + 100:1, 90:1 + 100:1)을 준비하였다.

### 4. 분획 추출물의 진딧물에 대한 살충활성 검정

3령 진딧물 25마리가 들어있는 leaf disc에 CHCl<sub>3</sub>:MeOH = 100:1, 90:1, 70:1, 50:1, 30:1 (v/v)와 혼합용액(30:1 + 50:1, 30:1 + 70:1, 30:1 + 90:1, 30:1 + 100:1, 50:1 + 70:1, 50:1 + 90:1, 50:1 + 100:1, 70:1 + 90:1, 70:1 + 100:1, 90:1 + 100:1) 1 ml를 살포하였다. 처리는 plexiglass spray box (90×90×90 cm<sup>3</sup>)에 설치된 sprayer (cone nozzle, 직경 1.5 mm)를 이용하여 배양여액 500 µl를 각각의 leaf disc 앞, 뒷면에 분사하였다. 모든 처리는 같은 높이, 같은 위치, 같은 압력, 같은 양을 살포하였으며 타 배양여액 살포시마다 sprayer를 70% ethanol로 소독한 후 D.W.로 세척하여 사용하였다. 살포 후 잎 표면 수분제거를 위해 1시간 정도 풍건하였다. 건조 후 광주기 16:8 (L:D), 25±2°C, 습도 >90% cage에 넣고 24시간마다 진딧물의 살충률을 조사하며, 5일간 살충률을 관찰하였다. 진딧물이 붓과 공기에 대한 반응이 없고 표피 색깔의 변화가 눈에 띄게 관찰되면 죽은 것으로 판정하였다. 살충활성 검정을 위한 생물검정은 3회의 각기 다른 시기에 수행되었으며, 매 실험마다 3개의 검정용 dish를 사용하여 반복하였다.

5. 통계 분석

모든 통계분석은 SAS 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2012)으로 진행되었고, 일원 분산분석(one-way ANOVA)( $\alpha=0.05$ ) 후 유의한 차이가 나타난 데이터는 튜키의 다중비교 (Tukey's honestly significance difference [HSD]) 방법으로 사후 검정하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

*B. bassiana* Bb08을 500 ml AD 배지에서 배양하여 제조한 AD 배양여액의 목화진딧물 및 복숭아혹진딧물에 대한 살충활성을 조사한 결과, 목화진딧물에 대한 살충률은 2일차에 59%로 복숭아혹진딧물의 36%보다 유의하게 높았으며( $F=166.1$ ,  $df=3, 8$ ,  $P<0.0001$ ), 3일차에 100%에 도달하였다( $F=682.8$ ,  $df=3, 8$ ,  $P<0.0001$ ). 복숭아혹진딧물에 대해서는 5일차에 99% 살충률로 목화진딧물과 유의차를 보이지 않고 유사하였다( $F=8970.7$ ,  $df=3, 8$ ,  $P<0.0001$ ) (Fig. 1).

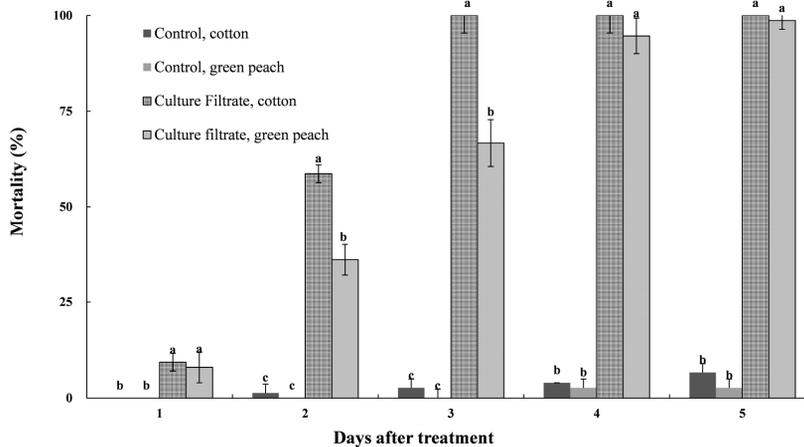


Fig. 1. Mortality of cotton aphid and green peach aphid treated with culture filtrate of *Beauveria bassiana* isolate. The bars with different letters for the same day are significantly different ( $P<0.05$ , Turkey's studentized range [honestly significant difference, HSD] test). The *B. bassiana* Bb08 was cultured in 500 ml AD medium.

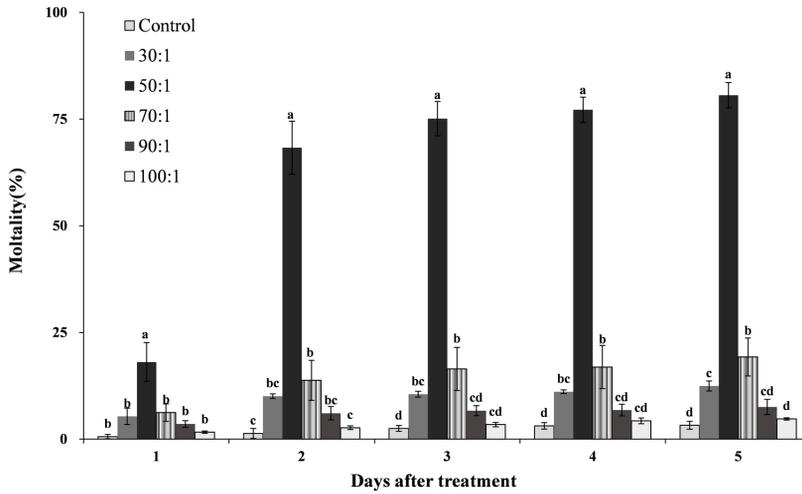


Fig. 2. Aphicidal effect of different fraction extracts with  $\text{CHCl}_3$  : MeOH of *B. bassiana* culture filtrate to cotton aphid. The bars with different letters for the same day are significantly different ( $P < 0.05$ , Turkey's studentized range [honestly significant difference, HSD] test). Chloroform : Methanol = 30:1, 50:1, 70:1, 90:1, 100:1; v/v.

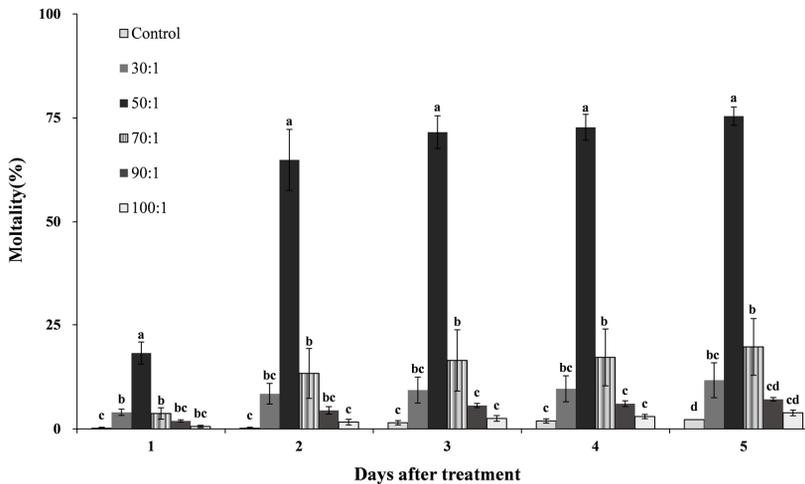


Fig. 3. Aphicidal effect of different fraction extracts with  $\text{CHCl}_3$  : MeOH of *B. bassiana* culture filtrate to green peach aphid. The bars with different letters for the same day are significantly different ( $P < 0.05$ , Turkey's studentized range [honestly significant difference, HSD] test). Chloroform : Methanol = 30:1, 50:1, 70:1, 90:1, 100:1; v/v.

배양여액의 용매 비율별 분획 추출물에 의한 목화진딧물 살충률 조사 결과, 처리 1일 후 50:1 (CHCl<sub>3</sub>: MeOH)에서 18%로 다른 농도(30:1, 70:1, 90:1, 100:1)의 0.6~6.2%보다 유의하게 높았으며(F=24.5, df=5, 12, P<0.0001), 처리 2일 후 68.3%, 3일 후 75.1%, 5일 후 80%로 다른 4개 농도의 2~5일 후 1.3~19.3%보다 유의하게 높았다(2일 후, F=180.0, df=5, 12, P<0.0001; 3일 후, F=318.2, df=5, 12, P<0.0001; 4일 후, F=391.9, df=5, 12, P<0.0001; 5일 후, F=463.9, df=5, 12, P<0.0001) (Fig. 2). 복숭아혹진딧물에 대한 분획별 살충률도 목화진딧물과 유사하게 50:1의 살충률이 가장 높았다(처리 1일 후 18.2%, 2일 후 65%, 5일 후 75.4%; 다른 4개 농도의 1일 후부터 5일 살충률 0.1~19.7%) (1일 후, F=84.8, df=5, 12, P<0.0001; 2일 후, F=112.8, df=5, 12, P<0.0001; 3일 후, F=162.1, df=5, 12, P<0.0001; 4일 후, F=198.0, df=5, 12, P<0.0001; 5일 후, F=201.4, df=5, 12, P<0.0001)(Fig. 3.).

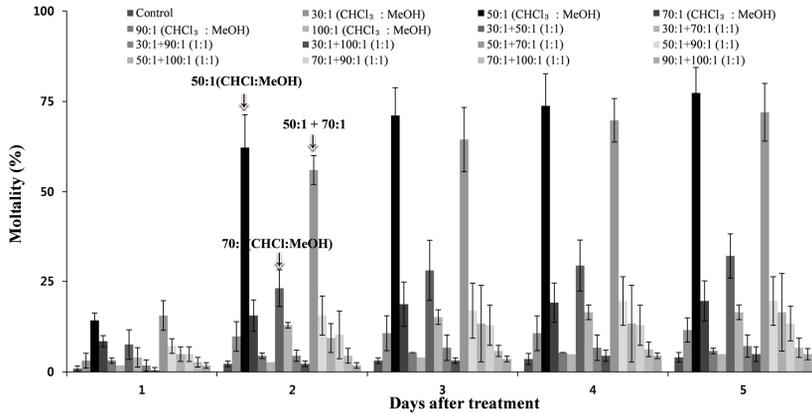


Fig. 4. Mortality of cotton aphid treated with a mixture of different fraction extract of culture filtrate of *B. bassiana* cultivated in AD medium.

각 용매 비율별 분획 추출물 혼합액의 시너지 효과를 확인하기 위해 실시한 생물검정 결과, 목화진딧물(Fig. 4) 및 복숭아혹진딧물(Fig. 5)은 50:1(CHCl<sub>3</sub>: MeOH) 단독 처리에서 가장 높은 살충률(5일차, 목화진딧물 77.3%; 복숭아혹진딧물 76.4%)을 보였다. 두 번째로 높은 살충률은 50:1+70:1(1:1) 혼합액 처리에서 목화진딧물과 복숭아혹진딧물에 각각 72%와 70.2%로 70:1 추출물의 19.6%와 24.9%보다 높은 상승효과를 보였다(목화진딧물 처리 1일 후, F=13.7, df=15, 32, P<0.0001; 2일 후, F=63.0, df=15, 32, P<0.0001; 3일 후, F=42.2, df=15, 32, P<0.0001; 4일 후, F=53.4, df=15, 32, P<0.0001; 5일 후, F=61.2, df=15, 32, P<0.0001; 복숭아혹진딧물 처리 1일 후, F=19.6, df=15, 32, P<0.0001; 2일 후, F=102.5, df=15, 32, P<0.0001; 3일 후, F=69.0, df=15, 32, P<0.0001; 4일 후, F=72.3, df=15, 32, P<0.0001; 5일 후, F=104.3, df=15, 32, P<0.0001). 그러나 50:1 혼합액은 다른 비율의 추출물과 혼합하여 처리 시 모두

살충률이 감소하였다. 다른 추출물(30:1, 90:1, 100:1)들은 50:1 추출물과 혼합 시 살충률 상승은 보였으나 30% 이하로 낮았다(Table 1).

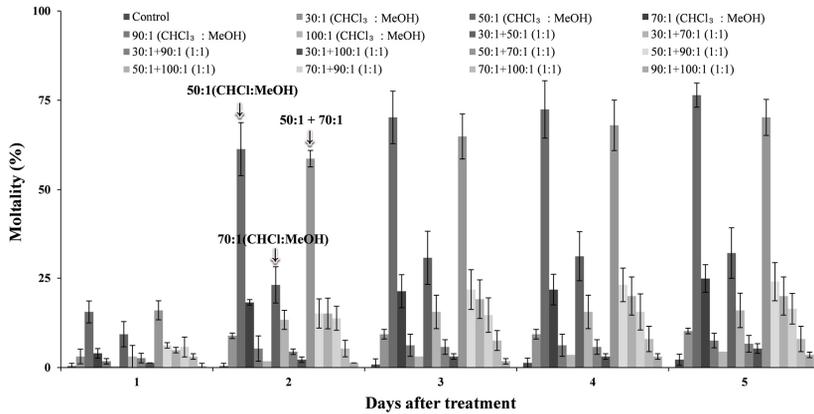


Fig. 5. Mortality of green peach aphid treated with a mixture of different fraction extract of culture filtrate of *B. bassiana* cultivated in AD medium.

Table 1. Mortality of cotton and green peach aphid after 5 days treated with a mixture of different fraction extract of culture filtrate of *B. bassiana* cultivated in AD medium

Mortality (%) of aphids 5 days after treatment					
Cotton aphid			Green peach aphid		
Pr<F	<0.0001		Pr<F	<0.0001	
Group	Mean	Fraction No.	Group	Mean	Fraction No.
A	77.3	<b>50:1</b>	A	76.4	<b>50:1</b>
A	72.0	<b>50:1+70:1</b>	A	70.2	<b>50:1+70:1</b>
B	32.0	<b>30:1+50:1</b>	B	32.0	<b>30:1+50:1</b>
CB	19.6	<b>50:1+90:1</b>	CB	24.9	<b>70:1</b>
CB	19.6	<b>70:1</b>	CB	24.0	<b>50:1+90:1</b>
CD	16.4	<b>30:1+70:1</b>	CD	20.0	<b>50:1+100:1</b>
CD	16.4	<b>50:1+100:1</b>	CDE	16.4	<b>70:1+90:1</b>
CD	13.3	<b>70:1+90:1</b>	CDE	16.0	<b>30:1+70:1</b>
CD	11.6	<b>30:1</b>	FDE	10.2	<b>30:1</b>
CD	7.1	<b>30:1+90:1</b>	FE	8.0	<b>70:1+100:1</b>
CD	6.7	<b>70:1+100:1</b>	FE	7.6	<b>90:1</b>
CD	5.8	<b>30:1+100:1</b>	FE	6.7	<b>30:1+90:1</b>

Mortality (%) of aphids 5 days after treatment					
Cotton aphid			Green peach aphid		
Pr<F	<0.0001		Pr<F	<0.0001	
Group	Mean	Fraction No.	Group	Mean	Fraction No.
CD	4.9	<b>90:1</b>	FE	5.3	<b>30:1+100:1</b>
CD	4.9	<b>90:1+100:1</b>	F	4.4	<b>100:1</b>
CD	4.9	<b>100:1</b>	F	3.6	<b>90:1+100:1</b>
D	4.0	<b>Control</b>	F	2.2	<b>Control</b>

곤충병원성 곰팡이 *B. bassiana* Bb08 배양여액의 용매 비율별 분획의 살충률은 용매 비율에 따라 달랐으며 50:1 (CHCl<sub>3</sub> : MeOH) 분획에서 가장 높았다. 곤충병원성 곰팡이 배양여액 중에는 살충효과뿐만 아니라 섭식 저해 효과를 보이는 물질을 포함하는 경우도 있는 것으로 알려져 있으며, 그 물질의 종류나 성분은 곰팡이의 종류나 배지 성분, 배양 조건에 따라 다르다. 그 예로, *Lecanicillium lecanii*로부터 추출된 물질은 담배가루이의 알, 약충, 성충에 대한 살충효과 뿐만 아니라 섭식 저해 효과도 보고되었다(Wang et al., 2007). 본 연구에 사용된 곰팡이 균주(*B. bassiana* Bb08)도 배양 배지의 종류에 따라 살충률이 달랐으며 옥수수 침지액(corn steep liquor)이 포함된 배지의 배양여액에서 살충률이 가장 우수하였다(Kim et al., 2013). Khan 등(2012)에 따르면 *B. bassiana*와 *V. lecanii* 균주의 포자와 배양여액을 이용하여 진딧물 방제 시 배양여액은 진딧물의 표피 구조를 변화시키는 물질을 생산하여 진딧물을 죽이기 때문에 포자를 이용한 방제보다 물리적 환경의 영향을 덜 받는 장점이 있다고 하였다. Bb08 균주의 배양여액 분획도 복숭아혹진딧물과 목화진딧물에 접촉하여 살충시키는 접촉독의 경향을 보이고 있으나 구체적인 기작에 대한 구명이 필요하다. 곤충병원성 곰팡이가 생산하는 이차대사산물의 효과에 관한 다양한 결과가 보고되고 있다. 나방 유충을 감염하는 *M. anisopliae*는 destruxin을 분비하여 곤충혈구의 형태와 세포골격 변형을 일으켜 해충을 죽이는 것으로 조사되었다(Vilcinskis et al., 1997). 지중해과실파리 방제용 미생물 추출물 선발 연구에서는 *M. anisopliae* 추출물이 *Paecilomyces fumosoroseus*와 *Aspergillus ochraceus*의 추출물보다 살충률이 높으면서 산란 억제 효과도 있었다(Castillo et al., 2000). 또 다른 곤충병원성 곰팡이인 *Hypocrella raciborskii*의 배양여액 추출물은 ergosterol, dustanin (15 $\alpha$ , 22-dihydroxyhopane), 3 $\beta$ -acetoxy-15 $\alpha$ , 22-dihydroxyhopane이 주성분이었으며 점박이응애에 대해 독성, 기피 그리고 산란 저해 효과를 보였다(Buttachon et al., 2013). 이들 세 성분이 포함된 배양여액 처리의 효과가 각 성분을 단독 처리한 경우보다 독성 등의 효과가 높은 것은 이들 성분의 상승효과에 의한 것으로 추정된다. 배양여액 추출물 내 각 성분이 해충에 미치는 연구도 많이 진행되었다. 아프리카의 모기 방제를 위해 *V. lecanii* 액체배양여액 추출물을 에탄올과 비율을 달리한 혼합물을 처리한 결과, 열대집모기에 대한 살충률

은 4:6, 이집트숲모기에 대해서는 1:9에서 가장 높은 살충률을 보여 혼합 비율에 따라 다른 활성을 보였다(Soni and Prakash, 2012). 목화진딧물에 병원성이 있는 포자를 생산하는 *L. lecanii*와 *B. bassiana*의 대사산물 역시 진딧물 방제효과를 보였는데, 특히 *V. lecanii* 배양액의 ethyl acetate와 메탄올성 분획에서는 목화진딧물에 대한 살충효과 뿐만 아니라 산란감소 효과를 보였고, *B. bassiana* 균사의 메탄올 추출물도 높은 독성을 보였다(Gurulingappa et al., 2011). 곰팡이 *Trichoderma citrinoviride* 배양 메탄올 추출 대사산물 중 bislongiquinolide와 dihydrotrichodimerol은 처리 외에 보리두갈래진딧물(*Schizaphis graminum*)의 정착과 섭식을 억제하여 작물의 피해를 감소하는 것으로 보고되었다(Evidente et al., 2009). Bb08 균주의 경우 배양여액의 50:1 (CHCl<sub>3</sub>:MeOH) 추출분획이 목화진딧물과 복숭아혹진딧물 모두에 높은 살충률을 보이는 것으로 보아 50:1 (CHCl<sub>3</sub>:MeOH) 추출분획에 진딧물 살충성 물질이 포함된 것으로 추측된다. 본 연구 결과에서 Bb08 균주의 배양여액 분획은 복숭아혹진딧물과 목화진딧물에 접촉하여 살충시키는 접촉독의 경향을 나타내고 있었으며 위의 다른 연구결과에서와 같이 Bb08 균주의 진딧물에 대한 기피 효과, 산란에 미치는 영향에 대한 구체적인 추가 실험과 기작에 대한 구명이 필요하다. 앞으로 효율적이고 안정적인 진딧물 방제제 개발을 위해 진딧물 살충성 곰팡이의 대량생산, 진딧물 살충성 물질의 분리 동정 및 이 물질의 대량 배양 기술 개발을 수행할 예정이다. 진딧물 살충성 곰팡이 및 대사물질의 대량 생산 기술 개발을 통한 저렴하고 안전한 친환경 미생물제의 안정적 공급은 국내 친환경 농자재 시장 활성화 및 1,000억 원에 이르는 진딧물 방제용 농약 수입 비용 절감 효과가 있을 것으로 기대된다.

#### IV. 적 요

목화진딧물과 복숭아혹진딧물은 채소를 포함한 다양한 작물에 큰 피해를 주는 해충이다. 이들 해충의 친환경 방제를 위해 진딧물에 병원성이 높은 곰팡이(*B. bassiana*) 유래 대사물질을 이용한 방제 연구를 수행하였다. 이 균주의 배양여액의 살충율은 목화진딧물에 처리 3일 후 100%, 복숭아혹진딧물에 처리 5일 후 99%였다. 이 추출물을 CHCl<sub>3</sub>:MeOH 비율을 달리하여 silica gel column chromatography 한 결과, 50:1 (CHCl<sub>3</sub>:MeOH)의 추출물 분획의 살충률이 목화진딧물과 복숭아혹진딧물에 각 80%와 75.4%로 다른 분획에 비해 현저하게 높았다. 또 각 용매비율별 추출물을 1:1로 혼합하여 처리한 결과, 분획 추출물 혼합에 의한 상승효과는 보이지 않았으며 두 진딧물에 모두 50:1 (CHCl<sub>3</sub>:MeOH) 단독처리에서 살충률(목화진딧물 77.3%, 복숭아혹진딧물 76.4%)이 가장 높았으며 50:1 + 70:1이 두 번째로 높았다(목화진딧물 72%, 복숭아혹진딧물 70.2%). 앞으로 안정적인 진딧물 방제를 위해 50:1 분획 추출물 내 진딧물 살충성 물질을 분리 동정 및 대량생산 연구를 진행할 예정이다.

[Submitted, October. 21, 2016 ; Revised, January. 4 2017 ; Accepted, January. 6, 2017]

## References

1. Burges, H. D. 1998. Formulation of mycopesticides. In Burges, H. D. (ed.), Formulation of microbial biopesticides: Beneficial microorganisms, nematodes and seed treatment. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherland. pp. 131-186.
2. Buttachon, S., A. Chandrapatya<sup>1</sup>, W. Himaman, and A. Kijjoa. 2013. Acaricidal activity of *Hypocrella raciborskii* Zimm. (Hypocreales: Clavicipitaceae) crude extract and some pure compounds on *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). African J. Microbiol Research. 7: 577-585.
3. Castillo, M-A., P. Moya, E. Hernazbqdez, and E. Primo-Yu'fera. 2000. Susceptibility of *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) to entomopathogenic Fungi and their extracts. Biol. Control. 19: 274-282.
4. Charnley, A. K. 2003. Fungal pathogens of insects: cuticle-degrading enzymes and toxins. Adv. Bot. Res. 40: 241-321.
5. Evidente, A., A. Andolfi, A. Cimmino, S. Ganassi, C. Altomare, M. Favilla, A. De Cristofaro, S. Vitagliano, and M. A. Sabatini. 2009. Bisorbicillinoids produced by the fungus *Trichoderma citrinoviride* affect feeding preference of the aphid *Schizaphis graminum*. J Chem Ecol. 35: 533-541.
6. de Faria, M. R. and S. P. Wraight. 2007. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. Biol. Control. 43: 237-256.
7. Goettel, M. S., J. Eilenberg, and T. Glare. 2005. Entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect populations. Mol. Insect. Sci. 6: 361-405.
8. Gurulingappa, P., P. A. McGee, and G. Sword. 2011. Endophytic *Lecanicillium lecanii* and *Beauveria bassiana* reduce the survival and fecundity of *Aphis gossypii* following contact with conidia and secondary metabolites. Crop Prot. 30: 349-353.
9. Khan, S., L. Guo, H-X, Shi, M. Mijit, and D. Qiu. 2012. Bioassay and enzymatic comparison of six entomopathogenic fungal isolates for virulence or toxicity against green peach aphids *Myzus persicae*. African J. Biotechnol. 11: 14193-14203.
10. Kim, H. Y., H. B. Lee, Y. C. Kim, and I. S. Kim. 2008. Laboratory and field evaluations of entomopathogenic *Lecanicillium attenuatum* CNU-23 for control of green peach aphid

- (*Myzus persicae*). J. Microbiol. Biotechnol. 18: 1915-1918.
11. Kim, J. J., G. Jeong, J. H. Han, and S. Lee. 2013. Biological control of aphid using fungal culture and culture filtrates of *Beauveria bassiana*. Mycobiol. 41: 221-224.
  12. Kim, S. H., I. S. Kim, and M. H. Lee. 1986. Aphid species and their seasonal fluctuations in vegetable crops. Korean J. Plant Prot. 25: 129-131.
  13. Milner, R. J. 1997. Prospects for biopesticides for aphid control. Entomophaga. 42: 227-239.
  14. Molnar, I., D. M. Gibson, and S. B. Krasnoff. 2010. Secondary metabolites from entomopathogenic Hypocrealean fungi. Nat. Prod. Rep. 27, 1241-1275.
  15. Rohlfs, M. and A. C. L. Churchill. 2011. Fungal secondary metabolites as modulators of interactions with insects and other arthropods. Fungal Gen. Biol. 48: 23-34.
  16. SAS Institute Inc. 2012. SAS OnlineDoc® 9.3. Cary: SAS Institute Inc.
  17. Soni, N. and S. Prakash. 2012. Larvicidal effect of *Verticillium lecanii* metabolites on *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* larvae. Asian Pacific J. Tropical Dis. 2: 220-224.
  18. Vey, A., R. Hoagland, and T. M. Butt. 2001. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In Butt. T. M., C. W. Jackson, N. Magan (eds.), Fungi as biocontrol agents progress: Problems and potential, CABI publishing, Wallingford, CT, U.S.A. pp. 311-346.
  19. Vilcinskasa, A., V. Mathab, and P. Götz. 1997. Effects of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its secondary metabolites on morphology and cytoskeleton of Plasmatocytes isolated from the greater wax moth, *Galleria mellonella*. J. Insect Physiol. 43: 1149-1159.
  20. Wang, Q. and L. Xu. 2012. Beauvericin, a bioactive compound produced by fungi: a short review. Mol. 17: 2367-2377.
  21. Wang, L., J. Huang, M. You, X. Guan, and B. Liu. 2007. Toxicity and feeding deterrence of crude toxin extracts of *Lecanicillium (Verticillium) lecanii* (Hyphomycetes) against sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). Pest Manag Sci. 63: 381-387
  22. Xia, Y., P. Dean, A. J. Judge, J. P. Gillespie, J. M. Clarkson, and A. K. Charnley. 2000. Acid phosphatases in the haemolymph of the desert locust, *Schistocerca gregaria*, infected with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. J. Insect Physiol. 46: 1249-1257.
  23. Xia, Y., J. M. Clarkson, and A. K. Charnley. 2001. Acid phosphatases of *Metarhizium anisopliae* during infection of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. Arch. Microbiol. 176: 427-434.
  24. Zhang, L., K. Yan, Y. Zhang, R. Huang, J. Bian, C. Zheng, H. Sun, Z. Chen, N. Sun, and R. An. 2007. High-throughput synergy screening identifies microbial metabolites as combination agents for the treatment of fungal infections. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 104: 460-4611.