

# 풀무치에 대하여 살충활성을 보유한 곤충병원성 진균의 생리활성 평가

이미롱<sup>1†</sup> · 김종철<sup>1†</sup> · 이세진<sup>1</sup> · 김시현<sup>1</sup> · 이석주<sup>1</sup> · 박소은<sup>1</sup> · 이왕휴<sup>1,2\*</sup> · 김재수<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>전북대학교 농업생명과학대학 농생물학과, <sup>2</sup>전북대학교 농업생명과학대학 식물의학연구센터

## Assessment of Physiological Activity of Entomopathogenic Fungi with Insecticidal Activity Against Locusts

Mi Rong Lee<sup>1†</sup>, Jong Cheol Kim<sup>1†</sup>, Se Jin Lee<sup>1</sup>, Sihyeon Kim<sup>1</sup>, Seok Ju Lee<sup>1</sup>, So Eun Park<sup>1</sup>, Wang Hyu Lee<sup>1,2\*</sup> and Jae Su Kim<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Agricultural Biology, College of Agriculture & Life Sciences, Chonbuk National University, Jeonju 54896, Korea

<sup>2</sup>Plant Medical Research Center, College of Agricultural & Life Sciences, Chonbuk National University, Jeonju 54596, Korea

**ABSTRACT:** Locusts, *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae) are periodical unpredictable agricultural pests worldwide and cause serious damage to crop production; however, little consideration has been given to the management of this pest. Herein, we constructed a locust-pathogenic fungal library and confirmed that some fungi could be used as resources for locust management. First, the entomopathogenic fungi were collected from sampled soils using a *Tenebrio molitor*-based baiting system. For the locust assay, a locust colony was obtained from the National Institute of Agricultural Science and Technology. A total of 34 entomopathogenic fungal granules, which were produced by solid cultures, were placed in the plastic insect-rearing boxes (2 g/box) and nymphs of locust were contained in the box. In 3-7 days, mycosis was observed on the membranous cuticles of the head, abdomen, and legs of locusts. In particular, *Metarhizium anisopliae*, *M. lepidiotae*, and *Clonostachys rogersoniana* exhibited high virulence against the locust. Given that the 34 isolates could be used in field applications, their conidial production and stability (thermotolerance) were further characterized. In the thermotolerance assay, *Paecilomyces* and *Purpureocillium* isolates had higher thermotolerance than the other isolates. Most of the fungal isolates produced ca.  $>1 \times 10^8$  conidia/g on millet grain medium. In a greenhouse trial, the granular application of *M. anisopliae* isolate on the soil surface resulted in 85.7% control efficacy. This work suggests that entomopathogenic fungi in a granular form can be effectively used to control the migratory locust.

**Key words:** Entomopathogenic fungi, Granular application, *Locusta migratoria*, Pathogenicity, Thermotolerance

**초록:** 풀무치 (*Locusta migratoria*) (Orthoptera: Acrididae)는 전 세계적으로 작물 생산에 심각한 문제를 야기하는 돌발 해충이다. 그러나 우리나라의 경우 풀무치를 방제하기 위한 방제제 및 적용에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 본 연구에서는 풀무치에 병원성을 갖는 풀무치병원성 진균 라이브러리를 구축하였으며, 풀무치 방제에 이용 가능한 생물학적 방제제로서의 가능성을 평가 하였다. 먼저 갈색거저리 유충-baiting 시스템을 이용하여 다양한 지역에서 채집된 토양에서 곤충병원성 진균을 발굴 하였다. 풀무치 병원성 검증을 진행하기 위하여 국립 농업 과학원에서 풀무치를 분양 받았으며, 고체 배양된 곤충병원성 진균을 곤충 사육 상자에 처리하여 (2 g/ box), 풀무치 약충 (3-4령충)에 대한 곤충병원성 진균의 병원성을 평가 하였다. 그 결과 곤충병원성 진균 처리 3-7일차에 풀무치의 머리, 복부, 다리 표면에서 진균이 증식하는 mycosis를 확인 할 수 있었다. 특히, *Metarhizium anisopliae*, *M. lepidiotae*, *Clonostachys rogersoniana*에서 높은 병원성이 나타나는 것이 확인 되었다. 확보된 34개의 풀무치병원성진균의 특성을 파악하기 위하여 열안정성 및 포자생산성을 확인 한 결과, *Paecilomyces*, *Purpureocillium* 균주가 다른 균주에 비해 열에 대한 높은 안정성안 나타나는 것을 확인 하였으며, 대부분의 균주에서  $1 \times 10^8$  conidia/gram 이상의 포자수를 생산 하는 것을 확인 하였다. 또한 온실 조건에서 비교적 병원성이 높았던 *M. anisopliae* 고체 배양된 균주를 토양에 처리하여 병원성을 확인한 결과, 85.7%의 높은 방제효과를 확인 할 수 있었다. 본 실험을 통하여 풀무치가 이동하면서 토양에 정착된 곤충병원성 진균에 접촉되어 치사 될 수 있을 것으로 판단되며, 효과적인 풀무치 방제가 가능 할 것이라고 판단된다.

**검색어:** 곤충병원성진균, 고체배양, 병원성, 열안정성, 풀무치

\*Corresponding author: [jskim10@jbnu.ac.kr](mailto:jskim10@jbnu.ac.kr)

†These two authors contributed equally to this work.

Received June 23 2017; Revised August 9 2017

Accepted August 23 2017

풀무치(*Locusta migratoria*)는 메뚜기목(Orthoptera) 메뚜기과의 곤충이며, 우리나라를 포함하여, 아시아, 아프리카, 오스트레일리아, 유럽 등 전세계적으로 발생하여 작물에 피해를 주는 위협적인 농업 해충이다(Chen, 1999; Farrow and Colless, 1980; Uvarov, 1966; Uvarov, 1977). 가해 식물로는 밀(*Triticum aestivum*), 벼(*Oryza sativa*), 옥수수(*Zea mays*) 등 주요 식량 작물이 있으며, 참억새(*Miscanthus sinensis*), 락(*Imperata cylindrica*), 갈대(*Phragmites communis*) 등에도 큰 피해를 주는 것으로 알려져 있다(Lee et al., 2016).

풀무치는 크기가 4-6 cm 정도이며, 하루에 100 km를 이동할 수 있을 정도로 이동성이 강하다(Meizingen, 1993). 한 해에 4-6번의 세대를 거치는데, 알 기간은 10-65일, 약충 기간은 24-95일, 성충 기간은 75-150일 가량으로 한 세대가 진행된다. 성충은 토양의 표면에서 5-10 cm 아래에 알을 낳고, 강수와 온도 조건에 따라 부화하게 된다(Symmons and Cressman, 2001).

밀도 요인에 따라 풀무치는 단독형(solitaria phase)과 집단형(gregaria phase)으로 구분된다. 단독형은 연갈색 또는 녹색이며, 단독적인 생활을 하기 때문에 농작물에 큰 피해를 주지 않는다. 그러나 밀도가 높아지면서 검은색을 띠게 되며 집단형으로 변하게 된다(Uvarov, 1966; Uvarov, 1977). 집단형은 1 km<sup>2</sup>의 면적에 5천 마리까지 군집을 형성하여 발생되기 때문에(Steedman, 1988), 단독형 풀무치라 할지라도 대집단으로 증식할 경우 식량작물에 큰 피해를 일으킬 수 있다(Luo et al., 2013).

대발생된 풀무치 떼는 10만 톤의 무게에 이르며, 1 톤의 풀무치는 2,500명의 사람이 하루에 소비하는 쌀의 양을 섭취할 수 있다(Prior and Greathead, 1989). 1998년 중국 북부와(Luo et al., 2013), 2004년 호주에서 대발생 되었으며(Zhang and Li, 1999), 아프리카, 중동, 아시아, 인도 등 온대와 열대 지역에서 광범위하게 발생되었다. 전세계 국가 중 12개 국가에서 풀무치로 인한 식량 작물의 피해액은 9년 동안 1,500만 달러로 추정된다(FAO, 1958). 우리나라에서도 2014년 전라남도 해남군 산이면의 약 20 ha 면적의 간척지일대에서 대발생하여 벼, 기장(*Panicum miliaceum*), 수단그라스(*Sorghum sudanense*)와 화본과 작물에 큰 피해를 주었으며, 작물 주변의 식물에도 피해를 주었다(Lee et al., 2016).

현재까지 풀무치 방제를 위해서 carbamates계, pyrethroid계 등의 화학 약제가 대량으로 사용되어 왔다. 이로 인해 환경 오염, 천적 파괴 등의 문제가 제기 되었고, 화학약제의 연속 사용으로 인해 저항성 및 내성을 갖는 개체 또한 발생 되었다(Zhang and Li, 1999). 이러한 이유로, 화학약제의 단점으로 보완하고 풀무치 방제를 위한 전략적인 개체군 관리가 필요하다. 더불어

장기적인 관점에서 친환경적이면서 생태학적인 접근방법으로 생물적 방제제의 연구개발이 필요한 실정이다.

생물적 방제제는 천연 식물의 추출물이나 미생물을 주요 성분으로 이용하며, 미생물 제제 중 곤충병원성 진균은 다양한 해충을 방제하는데 이용하고 있다. 곤충병원성 진균의 대표적인 균주로 *Beauveria bassiana*와 *Metarhizium anisopliae*가 있으며, 이들은 나비목과 딱정벌레목을 포함한 다양한 해충균에 병원성을 가지고 있다. 현재, *B. bassiana*를 이용한 상용화된 제품군으로는 BotaniGard, Naturalis-L, Mycotal, Beauverin, Boverol 등이 있으며, *M. anisopliae*를 이용한 제품군으로는 Bio-Catch-M, Green Muscle, BioGreen 등이 있다(Copping, 2004). 풀무치에 병원성을 나타내는 곤충병원성 진균으로 *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces* 속 균주들이 있으며(Shah and Pell, 2003), 유럽에서는 대발생된 풀무치 방제를 위해 *M. anisopliae* var. *acridum*을 주원료로 하는 Green Muscle이라는 제품을 개발하여 상용화하였다(Douthwaite, 2001).

하지만, 아직까지 국내에서는 풀무치 방제를 위한 우수 활성 균주 선발 및 라이브러리 구축, 균주의 대량 생산 및 시스템 확보, 그리고 환경 적용성 및 정착성 평가와 같은 핵심적인 연구 개발은 아직 미흡한 실정이다. 따라서, 국내의 토양에서 수집한 진균을 이용해 풀무치 방제를 위한 진균 라이브러리를 구축하여 이를 활용할 필요가 있다.

본 연구에서는 잠재적 해충인 풀무치의 발생을 억제하기 위해 곤충병원성 진균을 검토하였다. 국내의 토양에 서식하는 곤충병원성 진균을 수집하고, 이를 이용해 풀무치에 대한 병원성 검정, 제형화된 진균 입제의 포자 생산성과 열에 대한 포자의 안정성을 평가하였다. 이를 통해 풀무치 방제에 이용하기 위한 우수한 자원을 발굴하고 이들의 특성을 구명하였으며, semi-field 조건에서 진균 입제를 토양에 처리하여 풀무치를 방제할 수 있는 가능성을 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 곤충

풀무치는 농촌진흥청 농업과학원 작물보호과에서 분양을 받았으며, 목재 프레임과 망사를 이용하여 제작된 사육케이지(70 × 50 × 60 cm)에서 사육하였다. 사육케이지 안에 논흙을 담은 트레이(48 × 38 × 10 cm)를 넣어 산란을 유도하였으며, 화본과 식물인 밀과 옥수수를 먹이로 공급하였다. 사육 조건은 온실에서 27 ± 1°C, 상대습도 30 ± 2%, 광 주기 L:D = 16:8이며, 3-4령의 약충을 이용하여 병원성 검정을 진행하였다.

## 곤충병원성 진균 분리

곤충병원성 진균은 다양한 지역에서 채집한 토양을 이용하여 분리하였다. 토양으로부터의 균주 분리는 갈색거저리 유충-baiting 시스템(*Tenebrio molitor* baiting system)을 사용하였다. 분리 후 갈색거저리 유충에 대한 병원성을 재확인하였다. 분리된 곤충병원성 진균을 1/4 Sabouraud Dextrose Agar (SDA) 배지(60 × 15 mm)에  $1.0 \times 10^7$  conidia/ml의 농도로 200  $\mu$ l를 도말하고,  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  조건의 항온기에서 7일간 배양하였다. 곤충병원성 진균이 배양된 plate에 갈색거저리 유충 5마리를 처리하고,  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 의 실험실 조건에서 10일간 병원성 유무를 확인하였다. 갈색거저리 유충 5마리를 10일 이내로 모두 치사시킨 균주는 ITS (Internal Transcribed Spacer) primer를 이용하여 PCR을 통해 동정하였다. 이 중 갈색거저리 유충을 이용한 병원성 검정에서 높은 병원성을 보인 34개 균주를 선발하여 풀무치 실험에 사용하였다.

## 곤충병원성 진균 입제 생산

고온고압멸균기를 이용해  $121^\circ\text{C}$ 에서 15분간 멸균한 기장(*Panicum miliaceum* L.)을 Petri dish (90 × 15 mm)에 10 g씩 옮겨 담았다. 멸균된 기장에 선발한 34 균주(*Beauveria bassiana* 2 균주, *B. brongniartii* 2 균주, *Clonostachys rogersoniana* 1 균주, *Cordyceps militaris* 1 균주, *Isaria fumosorosea* 2 균주, *Lecanicillium attenuatum* 1 균주, *Metarhizium anisopliae* 3 균주, *M. brunneum* 1 균주, *M. lepidiotae* 1 균주, *M. flavoviride* 1 균주, *Metacordyceps brittlebankisoides* 1 균주, *Metacordyceps taii* 1 균주, *Paecilomyces javanicus* 2 균주, *Paecilomyces* sp. 1 균주, *P. lilacinus* 1 균주, *Penicillium guanacastense* 1 균주, *Pochonia bulbilosa* 5 균주, *Pochonia suchlasporia* 4 균주, *Pupureocillium lilacinum* 3 균주)를  $1.0 \times 10^7$  conidia/ml의 농도로 10 ml씩 포자현탁액을 제조하고 100  $\mu$ l씩 접종하였다. 접종한 후,  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 의 실험실 조건에서 14일간 배양하였다.

## 풀무치 병원성 예비 검정

Sterilized filter paper를 깔아준 breeding box (6 × 6 × 20 cm)에 곤충병원성 진균이 배양된 입제를 2 g 넣어 주고 풀무치 3-4명 약충을 1마리 처리하였다. 습도 유지를 위해 매일 1차 증류수(1 ml)를 공급해주고, 10일 동안 풀무치 약충의 치사율을 관찰하였다. 대조구는 곤충병원성 진균을 처리하지 않은 멸균된 기장을 처리하였으며, 모든 처리는  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , 습도  $40 \pm 5\%$ 의

실험실 조건에서 단반복으로 진행되었다. 국내에서 아직 풀무치 사육 시스템이 확립되지 않아 다량의 풀무치 실험충 확보가 어려워 많은 수의 균주 스크리닝 측면에서 단반복으로 실험이 진행하였다.

## 곤충병원성 진균 입제의 포자 생산성

선발된 34개 균주의 포자 생산성을 확인하기 위해 0.03% silwet (FarmHannong, Korea)을 1 ml 넣은 1.5 ml 용량의 microtube (Eppendorf, USA)에 곤충병원성 진균이 배양된 입제를 0.1 g 넣고, 1분 동안 vortexer (VWR Scientific, NY)을 이용해 vortexing 하여 포자현탁액을 제조하였다. 포자현탁액을 Hemocytometer에 10  $\mu$ l을 처리하여 포자의 수를 측정하였다. 본 실험은 3반복으로 진행하였다.

## 곤충병원성 진균 입제의 열에 대한 포자 안정성

선발된 34개의 곤충병원성 진균 입제를 1.5 ml의 용량의 microtube에 0.1 g을 넣고,  $45 \pm 2^\circ\text{C}$  항온기에 넣어 30, 60, 90 그리고 120분 동안 열처리를 하였다. 열처리 후, 열처리된 microtube에 200  $\mu$ l의 0.03% silwet을 넣어주고, 1분 동안 vortexer를 이용하여 vortexing하여 포자 현탁액을 제조하였다. 각 시간 별로 열처리된 포자현탁액 2  $\mu$ l을 1/4 SDA 배지(90 × 15 mm)에 dropping하였으며 3반복으로 진행하였다.  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  배양기에 20시간 배양 후, 광학현미경을 이용해 100개의 포자 중에 발아한 포자를 관찰하여 진균의 포자 발아율을 조사하였다. 대조구는 진균 입제에 열처리하지 않는 조건으로 비교하였으며, 모든 처리는 3반복으로 진행하였다.

## 온실 조건(Semi-filled)에서의 병원성 검정

목재 프레임과 망사를 이용해 제작한 사육공간(120 × 60 × 140 cm)에 논흙을 담은 트레이(48 × 38 × 10 cm)를 넣어주었다. 트레이에 담긴 흙 표면에 풀무치에 대한 높은 병원성을 보인 *M. anisopliae* 균주가 배양된 입제를 10 g/tray 처리하였다. 충분한 수분 공급하고, 7일 동안 곤충병원성 진균의 토양 정착을 유도하였다. 7일간 토양에 진균을 정착시킨 후, 3-4명의 풀무치 약충 14 마리/tray를 처리한 후, 10일 동안 풀무치 약충의 치사율을 관찰하였다. 대조구는 곤충병원성 진균을 처리하지 않은 멸균된 기장을 처리하였다. 치사된 개체에서 발생한 진균은 ITS sequencing을 통해 동정을 진행하였으며, 주사 전자현미경을 이용하여 충체의 표면의 진균의 침입을 관찰하였다.

## 통계분석

폴무치병원성 진균의 포자생산성, 열에 대한 포자의 안정성에 대하여 요인분석(ANOVA)과 Tukey's HSD test로 처리 평균 간 유의성 차이를 다중 비교하였다. 유의성은  $\alpha = 0.05$  조건으로 검정하였으며 분석 결과는 평균±표준편차로 표기하였다 (SPSS, 2009).

## 결과

### 폴무치에 대한 곤충병원성진균 병원성

갈색거저리 유충을 이용하여 1차 선발된 34개의 곤충병원성 진균의 폴무치에 대한 병원성을 확인한 결과(Table 1), 19개의 곤충병원성 진균 처리구에서 처리 후 3일차 이내에 폴무치가 치사되었다. 이 중, *B. brongniartii*, *C. rogersoniana*, *M. anisopliae*, *M. brunneum*, *M. lepidiotae*, *M. flavoviride*, *M. taii*, *P. javanicus* 속 균주와 *P. bulbillosa* E, *P. suchlasporia* A와 D, *P. lilacinum* A와 C 균주의 처리구에서 처리 후 3일차에 폴무치 약충들이 치사되었다. *C. militaris*, *Pochonia suchlasporia* C 균주의 처리구에서는 처리 후 10일차까지 병원성이 확인되지 않았다.

## 곤충병원성 진균의 포자 생산성

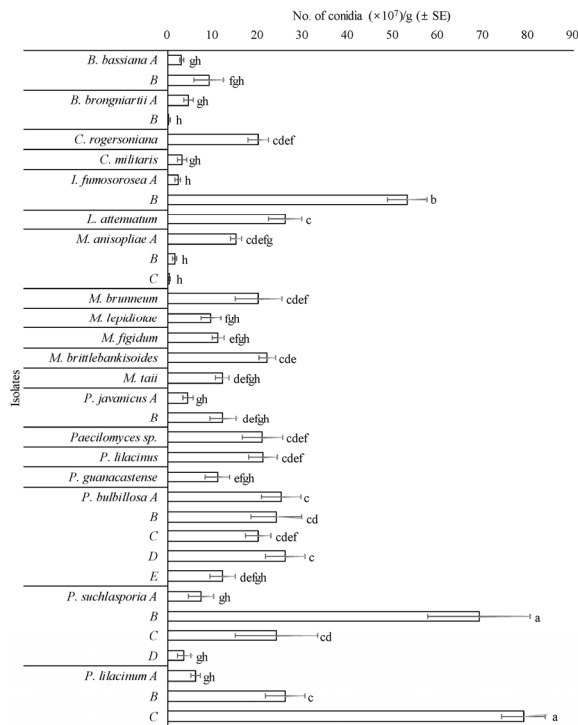
기장에 배양된 곤충병원성 진균 균주의 포자 생산성을 확인한 결과(Fig. 1), 배양 10일차에 *Beauveria* 속의 4 균주는  $4.2 \times 10^7$  conidia/g, *Metarhizium* 속의 6 균주는  $9.6 \times 10^7$  conidia/g, *Paecilomyces* 속의 4 균주는  $14.6 \times 10^7$  conidia/g, *Pochonia* 속의 9 균주는  $23.4 \times 10^7$  conidia/g, *Pupureocillium* 속의 3 균주는  $37.0 \times 10^7$  conidia/g의 평균 포자 생산성을 보였다. *B. brongniartii* B, *M. anisopliae* B와 C, *I. fumosorosea* A 균주의 포자 생산성은 각각  $0.1 \times 10^7$ ,  $1.5 \times 10^7$ ,  $0.27 \times 10^7$ ,  $2.1 \times 10^7$  conidia/g로 상대적으로 낮은 포자 생산성을 보였다. *I. fumosorosea* B 균주의 포자 생산성은  $50.3 \times 10^7$  conidia/g로 상대적으로 높은 포자 생산성을 보였으며, *P. suchlasporia* B와 *P. lilacinum* C 균주의 포자 생산성은 각각  $60.9$ ,  $70.9 \times 10^7$  conidia/g로 가장 높은 포자 생산성을 보였다( $F_{33,102} = 67.072$ ,  $p < 0.001$ ). 전체적으로 대부분의 곤충병원성 진균은  $1.0 \times 10^8$  conidia/g의 생산성을 보인 것으로 판단된다.

### 곤충병원성 진균 포자의 열에 대한 안정성

고온 조건( $45^\circ\text{C}$ )에서 시간에 따른 곤충병원성 진균 포자의 안정성을 확인한 결과, 대조구로서 열을 처리하지 않은 처리구에서는 *C. rogersoniana*, *M. lepidiotae*, *M. taii*, *P. lilacinum* A

**Table 1.** Required date to kill *Locusta migratoria* nymphs after exposure to 34 entomopathogenic fungal isolates as granular forms

Genus	Species	Isolate code	Required date to kill locust	Genus	Species	Isolate code	Required date to kill locust
Control			>10				
<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>	A	4	<i>Paecilomyces</i>	<i>javanicus</i>	A	3
		B	6			B	3
<i>Beauveria</i>	<i>brongniartii</i>	A	3	<i>Paecilomyces</i>	sp.		7
		B	3			<i>Paecilomyces</i>	<i>lilacinus</i>
<i>Clonostachys</i>	<i>rogersoniana</i>		2	<i>Penicillium</i>	<i>guanacastense</i>		5
<i>Cordyceps</i>	<i>militaris</i>		>10	<i>Pochonia</i>	<i>bulbillosa</i>	A	6
<i>Isaria</i>	<i>fumosorosea</i>	A	3			B	9
		B	5	C	5		
<i>Lecanicillium</i>	<i>attenuatum</i>		3	D		9	
<i>Metarhizium</i>	<i>anisopliae</i>	A	2	E		3	
		B	2	<i>Pochonia</i>	<i>suchlasporia</i>	A	3
		C	3			B	4
<i>Metarhizium</i>	<i>brunneum</i>		3	C		>10	
<i>Metarhizium</i>	<i>lepidiotae</i>		2	D		3	
<i>Metarhizium</i>	<i>flavoviride</i>		2	<i>Pupureocillium</i>	<i>lilacinum</i>	A	3
<i>Metacordyceps</i>	<i>brittlebankisoides</i>		4			B	9
<i>Metacordyceps</i>	<i>taii</i>		3			C	3

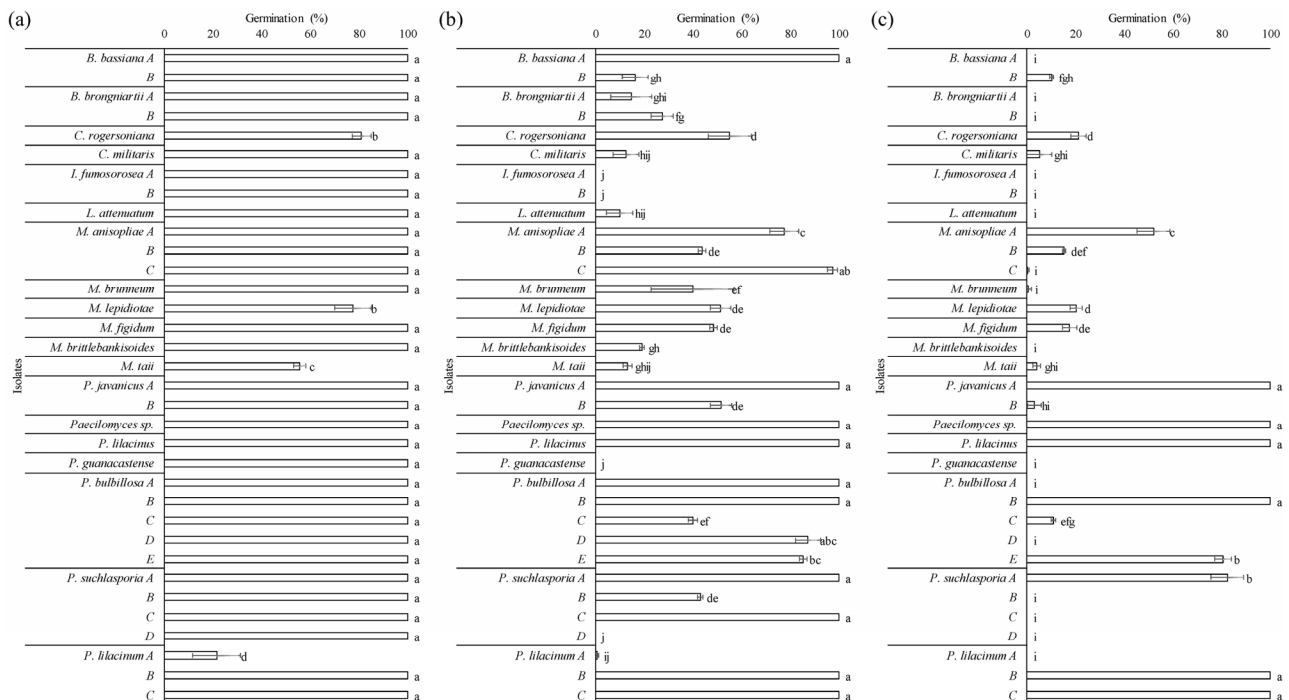


**Fig. 1.** Conidia productivity of 34 entomopathogenic fungi on Italian millet. Means with the same lowercase letters are not significantly different according to Tukey's HSD ( $p > 0.05$ ). Within the same species, isolates were coded as A, B, C, and so on.

균주를 제외한 모든 균주에서 포자 발아율이 100%임을 확인하였다(Fig. 2A).

열에 30분간 노출된 처리구(자료미제시)에서는 *I. fumosorosea* A와 B, *M. taii*, *P. guanacastense*, *P. suchlasporia* D, *P. lilacinum* A 균주가 27% 미만의 포자의 발아율을 보여 대체로 낮은 열안정성을 보였다. 이 중, *I. fumosorosea* A 균주는 30분간 열에 노출되었을 때, 포자의 발아율이 0%로 나타나 포자의 열안정성이 가장 낮은 것을 확인하였다( $F_{33,102} = 146.973$ ,  $p < 0.001$ ).

열에 60분간 노출된 처리구(Fig. 2B)에서는, 30분 열처리에서 낮은 포자 발아율을 보인 6개 균주를 포함하여, *B. bassiana* B, *B. brongniartii* A와 B, *C. militaris*, *L. attenuatum*, *M. brittlebankisoides* 균주가 28% 미만의 포자의 발아율을 보여 낮은 열안정성을 보였다. 이 중, *I. fumosorosea* A와 B, *P. guanacastense*, *P. suchlasporia* D 균주는 0%의 포자 발아율을 보여 포자의 열안정성이 가장 낮게 나타났다( $F_{33,102} = 236.258$ ,  $p < 0.001$ ). 열에 90분간 노출된 처리구(자료미제시)에서는, 30분과 60분 열처리에서 낮은 포자 생산성을 보인 12균주를 포함하여, *B. bassiana* A, *C. rogersoniana*, *M. anisopliae* B와 C, *M. brunneum*, *M. lepidotae*, *M. flavoviride*, *P. javanicus* B, *P. bulbillosa* A, C, 그리고 D, *P. suchlasporia* B와 C 균주의 포자



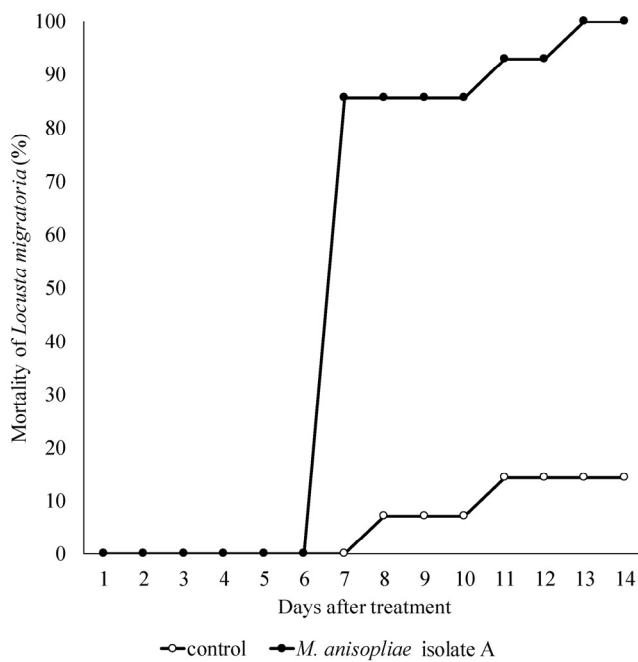
**Fig. 2.** Germination of 34 entomopathogenic fungal conidia when exposed to 45°C for 0 min (a), 60 min (b), and 120 min (c). For each exposure time, means with the same lowercase letters are not significantly different according to Tukey's HSD ( $p > 0.05$ ). Within the same species, isolates were coded as A, B, C, and so on.

의 발아율이 26% 미만으로 낮게 나타났다( $F_{33,102} = 467.02, p < 0.001$ ).

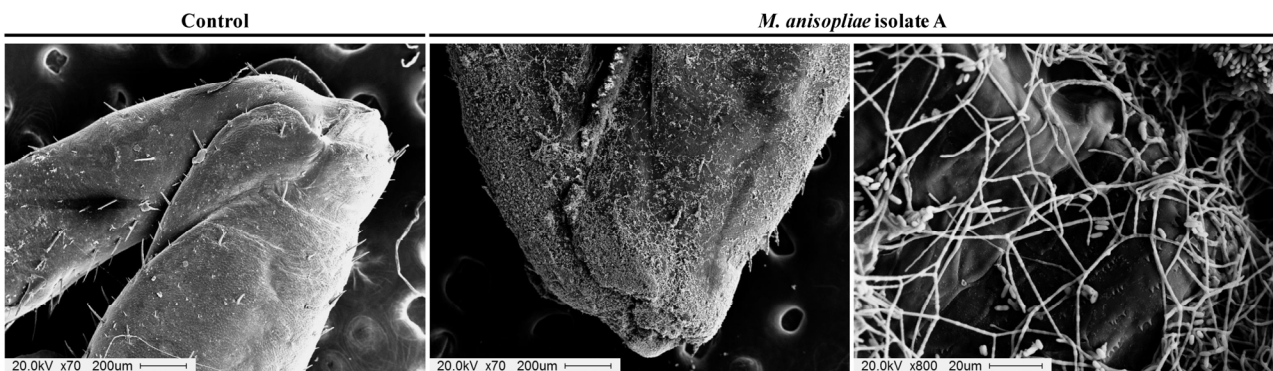
열에 120분간 노출된 처리구(Fig. 2C)에서는 *P. javanicus* A, *Paecilomyces* sp., *P. lilacinus*, *P. bulbillosa* B, *P. lilacinum* B와 C 균주는 100%의 발아율로 열에 대한 가장 높은 안정성을 보였다. 또한, *M. anisopliae* A (52.1%), *P. bulbillosa* E (80.7%), *P. suchlasporia* A (82.3%) 균주도 포자는 비교적 높은 안정성을 유지하였다. 이외의 균주는 0-20%의 포자의 발아율을 보여 열에 대한 포자의 안정성이 낮았다( $F_{33,102} = 976.169, p < 0.001$ ).

### 온실 조건(Semi-filled)에서의 풀무치 살충효과

풀무치를 이용한 병원성 검정에서 선발된 *M. anisopliae* A 균주의 입제를 이용한 온실 조건에서의 실험 결과(Fig. 3), 무처리구에서는 처리 후 14일차에 14.3%의 치사율이 확인된 반면, 곤충병원성 진균 입제 처리구에서는 처리 후 7일차에 풀무치가 85.7%의 치사율을 보였으며, 13일차에 모두 치사되었다. 또한 치사된 풀무치의 다리 관절 부위에서 녹색의 포자와 균사 생장이 확인하였다(mycois). 풀무치 총체에서 확인된 균주를 확보



**Fig. 3.** Mortality and infection symptoms of *L. migratoria* against *M. anisopliae* isolate-A in semi-field conditions. *M. anisopliae* isolate-A granules were applied to the soil at 10 g/tray (48 × 38 × 10 cm) and in 7 days, adult locusts were released to the soil and mortality was measured daily.



**Fig. 4.** Symptoms of locust legs infected by *M. anisopliae* isolate-A. Conidial germination and hyphal growth of *M. anisopliae* isolate-A were observed on the leg surface.

하여 ITS primer를 이용하여 PCR 후 sequencing한 결과 *M. anisopliae*로 확인되었다. 또한 *M. anisopliae*으로 인해 치사된 사충을 주사 전자현미경으로 관찰한 결과, *M. anisopliae*의 균사와 포자가 총체 표면을 덮고 있는 것이 확인되었다(Fig. 4).

## 고찰

채집한 토양에서 갈색거저리 유충-baiting 시스템을 통하여 곤충병원성 진균을 분리하였으며, 1차 갈색거저리 유충을 이용한 병원성 검정을 통하여 총 34개의 곤충병원성 진균을 선발하여 풀무치 방제효능 평가를 위하여 사용하였다. 이는 풀무치에 비해 갈색거저리 유충이 토양으로부터 살충성 균주 분리에 보다 적합한 곤충으로 판단되었기 때문이었다. 갈색거저리 유충은 먹이의 공급 없이도 1개월 이상 생존할 수 있으며, 다량의 개체수 확보가 용이한 장점을 가지고 있다. 갈색거저리 유충을 이용한 곤충병원성 진균의 분리 후, 풀무치에 대한 병원성 검정을 통해 우수한 균주를 선발하고자 하였다.

선발된 곤충병원성 진균은 기장(Italian millet)을 이용하여 입제 형태로 배양하여 토양에 처리하는 방법으로 풀무치 방제에 이용하고자 하였다. 이는 풀무치가 이동성이 높은 해충이지만, 섭식 및 산란을 위해서는 토양의 표면으로 이동하게 되고, 토양 표면에서 곤충병원성 진균 입제 또는 정착되어 안정화된 균사에 접촉하여 풀무치가 치사 되는 방제 원리의 적용성을 검토하고자 하였기 때문이다. 특히 풀무치는 토양 표면을 뚫고 산란하기 때문에 토양에 처리된 진균의 포자 또는 균사에 부착될 수 있다. 또한 진균 입제가 높은 습도 환경에서 생장을 진행하고 균사가 토양의 안쪽으로 성장하게 되어, 산란된 알에 도달하여 이를 치사시킬 수 있는 가능성도 높을 것이다. 최근 꽃노랑총채벌레(*Frankliniella occidentalis*)가 번데기 시기에 식물체에서 토양으로 이동하는 생활 습성을 이용하여 토양에 *B. bassiana* ERL-836 균주 입제를 처리하여 방제할 수 있다는 것이 보고되었다(Lee et al., 2017). 따라서 이와 같은 풀무치의 산란 습성을 고려하여 살충성 진균을 효과적으로 적용하여 높은 방제효과를 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

선발된 균주를 이용한 풀무치에 대한 병원성 검정에서 *Metarhizium* 균주는 모두 4일 이내에 풀무치 약충을 치사 시켜 높은 병원성을 보였다. *Metarhizium*은 풀무치와 같은 메뚜기목 이외에도 깍지벌레류, 나비목, 딱정벌레목, 진딧물류 등의 해충에 병원성을 가지고 있다고 보고되어 있다(Shah and Pell, 2003). *Metarhizium* 속의 균주를 이용한 진균 입제는 다양한 토양 해충 방제에 적용될 가능성이 높을 것이다.

곤충병원성 진균을 실제 포장에서 이용하기 위해서는 몇가

지 중요한 부분들이 있다. 먼저, 진균의 포자 생산성은 경제성 측면에서 대량으로 진균을 적용할 때 포장의 면적에 따른 실제 사용량을 결정하는 중요한 역할을 하며, 포자 생산성이 높은 균주일수록 포자를 짚은 시간에 저비용으로 대량으로 생산할 수 있어 유리한 장점을 가지게 된다. 본 실험에서 기장에 진균을 배양하였을 때, *Isaria*, *Pochonia*, *Purpureocillium*, *Metarhizium* 속의 균주들이 높은 포자 생산성을 가진 것을 확인하였다.

미생물을 이용한 생물적 방제제들은 보관 조건과 처리 환경에서 온도에 직접적인 영향을 받게 된다. 높은 온도에 적응하지 못한 살충활성 진균은 점차 활성이 떨어지게 되고 포자가 발아하지 못해 결국 모두 사멸에 이르게 되고, 이로 인해 유효 사용기간도 짧아지게 된다(Skinner et al., 2012). 또한 고온 조건의 환경에 처리되었을 때, 활성을 유지하지 못하고, 정상적인 생장을 하지 못해 방제제로서의 역할을 기대하기 어렵다. 이러한 측면에서 생물 방제제의 개발에 있어, 열에 대한 안정성을 검토하는 것은 매우 필수적이다. 본 실험 결과에서는 *Purpureocillium*, *Paecilomyces*, *Metarhizium* 속의 균주가 열에 대한 높은 포자 발아율을 보였다. *Purpureocillium lilacinum* C의 균주는 포자의 생산성도 가장 높게 나타났다. 따라서, 생물 방제제로 이용하는 측면에서, 위 균주들은 기본적인 가능성이 높다고 볼 수 있다. 하지만, *Purpureocillium* 속의 균주는 복숭아혹진딧물(*Myzus persicae*)에 병원성이 있다고 보고 되었지만(Lee et al., 2015), 다른 곤충에 대해서는 높은 병원성을 보인 사례가 적다.

풀무치 방제에 있어 곤충병원성 진균의 적용 가능성을 평가하기 위해 온실 조건에서 semi-field 실험을 진행하였다. 온실 조건 실험에서는 병원성 실내 검정 결과에서 2일 이내로 풀무치 약충을 치사시키고, 포자의 생산성과 열에 대한 포자의 안정성이 비교적 높았던 *M. anisopliae* A 균주를 사용하였다. 균주 처리구에서는 7일차에 풀무치의 85.7%가 치사되었는데, 치사된 풀무치의 다리에서 분리한 진균이 *M. anisopliae* 균주로 확인되었으며, 전자현미경으로도 다리 부분에 *M. anisopliae*의 균사가 다리 표피를 뚫고 들어가는 형태와 표면에 포자가 부착되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 이는 풀무치가 이동하면서 토양에 정착된 곤충병원성 진균에 접촉되어 다리에 부착되었고, 이로 인해 진균이 풀무치 총체내로 침입하여 치사시켰을 가능성이 높다. 이 결과를 통해 곤충병원성 진균 입제를 토양에 처리하는 형태로 토양 표면에서 산란을 하는 풀무치를 효과적으로 방제할 수 있는 가능성이 확인되었다. 하지만, 잠재적인 해충인 풀무치의 밀도를 지속적으로 감소시키기 위해, 선발된 균주를 처리하여 풀무치의 산란에 영향을 주는지 추가적으로 검토되어야 한다. 또한 실내 실험을 통한 결과만으로는 방제효과를 판단하기 어려워 실외에서의 추가적인 연구가 필요하다.

결론적으로, 풀무치를 방제하기 위한 전략으로 생물학적 방제제 중에 하나인 곤충병원성 진균의 적용 가능성을 확인하였으며, 추가적으로 곤충병원성 진균 입제를 이용한 토양 처리는 토양 해충 및 토양의 표면을 경유하는 해충을 방제하는데 효과적인 생물 방제제로서의 역할을 기대할 수 있을 것이다.

## 사 사

본 연구에 풀무치 사육용 개체군을 제공해 주신 국립농업과학원 이관석 박사님과, 국립식량과학원 정진교 박사님께 감사드립니다. 본 연구는 농촌진흥청 농업과학기술개발사업(과제번호: PJ011630, 세부과제명: 돌발해충 풀무치의 발생특성 및 방제기술 연구)의 지원으로 수행한 결과입니다.

## Literature Cited

- Chen, Y., 1999. The locust and grasshopper pests of China. Beijing, China: China Forestry Publishing House.
- Copping, L.G., 2004. A world compendium: the manual of biocontrol agents, BCPC, Hampshire.
- Douthwaite, M.B., 2001. Development and commercialization of the Green Muscle biopesticide. IITA.
- FAO, 1958. Report of the fifth session of the FAO Desert Locust Control Committee, Rome June, 1958. FAO DLCC Rep., 11:44.
- Farrow, R.A., Colless, D.H., 1980. Analysis of the interrelationships of geographical races of *Locusta migratoria* (Linnaeus) (Orthoptera: Acrididae), by numerical taxonomy, with special reference to sub-speciation, in the tropics and affinities of the Australian race. *Acrida*, 9(2), 77-99.
- Lee, G.S., Kim, K.H., Kim, C.S., Lee, W., 2016. An outbreak of gregarious nymphs of *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae) in Korea and their genetic lineage based on mtDNA COI sequences. *Korean J. Appl. Entomol.* 55(4), 523-528.
- Lee, W.W., Shin, T.Y., Bae, S.M., Woo, S.D., 2015. Screening and evaluation of entomopathogenic fungi against the green peach aphid, *Myzus persicae*, using multiple tools. *J. Asia-Pac. Entomol.* 18(3), 607-615.
- Lee, S.J., Kim, S., Kim, J.C., Lee, M.R., Hossain, M.S., Shin, T.S., Kim, T.H., Kim, J.S., 2017. Entomopathogenic *Beauveria bassiana* granules to control soil-dwelling stage of western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). *BioControl*. In Press (DOI: 10.1007/s10526-017-9818-8).
- Luo, Y., Wang, X., Wang, X., Yu, D., Chen, B., Kang, L., 2013. Differential responses of migratory locusts to systemic RNA interference via double-stranded RNA injection and feeding. *Insect Mol. Biol.* 22(5), 574-583.
- Meizinger, W.F., 1993. Guide to migrant pest management in Africa. Rome: FAO. 184 pp.
- Prior, C., Greathead, D.J., 1989. Biological control of locust: the potential for the exploitation of pathogens. *FAO Plant Prot. Bull.* 37(1), 37-48.
- Shah, P.A., Pell, J.K. 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61(5), 413-423
- Skinner, M., Gouli, S., Frank, C.E., Parker, B.L., Kim, J.S., 2012. Management of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) with granular formulations of entomopathogenic fungi. *Biol. Control* 63(3), 246-252.
- SPSS Institute, 2003. SPSS version 12.0. SPSS Inc. Chicago, IL., U.S.A.
- Steedman, A., 1988. Locust handbook 2nd ed. London. Overseas/Development National Resources VII+180 pp.
- Symmons, P.M., Cressman, K., 2001. Desert locust guidelines: biology and behaviour. FAO, Rome.
- Uvarov, B.P., 1966. Grasshoppers and Locusts. Cambridge. 1, 481.
- Uvarov, B. P., 1977. Grasshoppers and Locusts. Vol. 2. Centre for Overseas Pest Research, London. 475 pp.
- Zhang, Z., Li, D., 1999. A possible relationship between outbreaks of the oriental migratory locust (*Locusta migratoria manilensis* Meyen) in China and the El Niño episodes. *Ecol. Res.* 14(3), 267-270.