

대벌레(*Ramulus mikado*)에 대한 유기농업자재 6종과 녹강균(*Metarhizium anisopliae*)의 살충 효과 평가

정종국¹ · 정복남^{2,3} · 이차영^{2,4} · 김진희² · 김준현² · 이영수⁵ · 박지현^{2,6*}

¹강원대학교 산림환경보호학전공, ²국립산림과학원 산림병해충연구과, ³농림축산검역본부 식물검역기술개발센터,
⁴강원대학교 산림과학연구소, ⁵경기도농업기술원 환경농업연구과, ⁶국민대학교 산림환경시스템학과

Evaluation of Insecticidal Efficacy of Six Eco-friendly Agricultural Materials and *Metarhizium anisopliae* against *Ramulus mikado*

Jong-Kook Jung¹, Bok-Nam Jung^{2,3}, Cha Young Lee^{2,4}, Keonhee E. Kim²,
Junheon Kim², Young Su Lee⁵ and Ji-Hyun Park^{2,6*}

¹Department of Forest Environment Protection, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

²Division of Forest Entomology and Pathology, National Institute of Forest Science, Seoul 02455, Korea

³Plant Quarantine Technology Center, Animal and Plant Quarantine Agency, Gimcheon 39660, Korea

⁴The Institute of Forest Science, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

⁵Division of Agricultural Biology, Gyeonggi-do Agricultural Research and Extension Services,
Hwaseong 18388, Korea

⁶Department of Forestry, Environment, and Systems, Kookmin University, Seoul 02707, Korea

요약: 2020~2021년 은평구 봉산, 의왕시 청계산 등지에서 돌발적으로 대벌레(*Ramulus mikado*)의 친환경 방제를 위해 시판 중인 유기농업자재 6종과 산림 내에서 자연폐사한 대벌레에서 분리한 녹강균(*Metarhizium anisopliae*)의 살충 효과를 검정하였다. 유기농업자재 중에서는 azadirachtin과 geraniol을 포함하는 식물성 오일 3종이 85.2~100%로 높은 치사율이 확인되었으며 이는 화학 살충제인 페니트로티온 유제와 유사한 수준이었다. 녹강균의 분생포자를 희석하여 대벌레의 몸에 직접 분주하거나 사육장 내에서 분무기로 살포한 경우 모두 수일 내 100% 사망하는 것을 확인하였다. 본 연구를 통해 확인된 유기농업자재 3종과 녹강균 등은 향후 친환경 방제제 선발 및 사용 시 우선적으로 고려할 수 있을 것이라 판단된다.

Abstract: Outbreaks of *Ramulus mikado* (Insecta: Phasmatodea: Phasmatidae) in the hilly areas of Mt. Bongsan, Mt. Cheonggye, and elsewhere in Seoul and Gyeonggi occurred from 2020 to 2021, causing serious defoliation. We evaluated the insecticidal effects of six eco-friendly organic materials and the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* against *R. mikado*. The fungus was isolated from naturally dead bodies of *R. mikado* in forest ecosystems. The results revealed that three eco-friendly organic materials containing azadirachtin or geraniol as active ingredients showed high mortality in the range of 85.2%–100%, which were rates similar to that of the chemical insecticide fenitrothion emulsifiable concentrate. All *R. mikado* adults that were sprayed with a conidial suspension of *M. anisopliae* at different concentrations were killed within a few days. In conclusion, three eco-friendly organic materials and *M. anisopliae* could be good alternatives to chemical insecticides.

Key words: forest protection, forest insect pest, insect outbreak, insect pathogenic fungus

서론

* Corresponding author

E-mail: jhpark10@kookmin.ac.kr

ORCID

Ji-Hyun Park  https://orcid.org/0000-0002-6778-4749

대벌레(*Ramulus mikado*)는 곤충강(Insecta) 대벌레목(Phasmatodea) 대벌레과(Phasmatida)에 속하고 한국과 일본에 분포하는 종으로 국내에서는 *Ramulus irregulariter-*

*dentatus*로 알려져 있기도 하나(Lee et al., 2018) 지금은 동종이명 처리되었다(GBIF Secretariat, 2021). 대벌레는 인간의 생활권 영역에서 돌발성 해충으로 간주되기도 하지만(Baker, 2015), 독특한 외모와 단위생식 등의 생태적 특성이 있는 산림곤충 중 하나로 국내에서는 체험학습용 곤충으로 대량사육기술이 개발되기도 한 종이다(Lee et al., 2013). 대벌레목에 속하는 곤충은 돌발적으로 대발생하여 산림이나 농업 생태계에 피해를 주는 해충으로 이들의 대발생 현상은 전 세계적으로 보고되고 있다(Baker, 2015). Baker (2015)는 대발생 현상에 대해 환경의 교란을 하나의 원인으로 지목하고 있는데, 교란이 발생하면 하층에 먹이 자원이 풍부해짐에 따라 밀도가 급격하게 증가할 수도 있고 교란에 의해 천적의 분포 양상이 달라질 수도 있는 등 대벌레 개체군 외적인 요소의 변화가 발생하기 때문으로 추정하고 있다.

대벌레는 1990년대 중후반부터 2000년대 초반까지 경북, 강원 등지에서 돌발적으로 대발생하여 식엽 피해를 준 것으로 알려져 있으나 정확한 통계 정보는 알려져 있지 않다. 다만, 국립산림과학원의 산림병해충 발생 예찰 조사 결과에 따르면 2001년에 지역별로 수 십~수 천ha 면적의 산림에서 피해도 ‘중’ 이상의 식엽 피해가 발생했다는 기록이 있고(KFRI, 2001), 2001년을 전후로 하여 수 십~수 백ha에서 피해가 발생한 것으로 보고되었다(KFRI, 2000, 2002, 2003). 이후에는 대발생 현상이 보고되지 않았으나 2020년 서울특별시 은평구와 고양시 덕양구 사이의 봉산 일대 19ha에서 피해가 발생하였고, 그 중 1ha는 식엽 피해가 매우 심각하였다(Jung et al., 2020b). 2021년에는 봉산을 포함하여 경기도 의왕시 청계산, 군포시 수리산 등 수도권에서만 41 ha에 달하는 산림에서 식엽 피해가 발생하였다(KFS, 2022). 대벌레는 일본의 나가노현에서도 2021년 이후 2~3년 동안 대발생한 사례가 있는데 기본적으로 이러한 대발생 현상이 잦은 종은 아닌 것으로 알려져 있다(Yano et al., 2021).

대벌레의 경우, 높은 밀도에 의한 식엽 피해가 나무의 생육저하나 고사 등 직접적인 피해를 유발할 수 있지만 주로 등산로 주변에서 발생하기 때문에 산을 이용하는 시민에게 많은 불편함을 주고 있다. 특히 곤충 그 자체에 대한 혐오나 사체가 썩으면서 발생하는 악취 문제, 그리고 심각한 식엽 피해로 인한 수관부 열림 현상 등이 문제가 된 바 있다(J.-K. Jung's personal communication). 이러한 피해를 예방하기 위해서 여러 방법이 적용되고 있다. 그 중에서도 약충 부화기에 토양으로부터 수관부로 이동하는 약충 포획에 효과적인 끈끈이롤트랩의 사용이 권장되고 있고(KFS, 2022), 민원의 증가에 대응하여 일부 지자체

는 화학살충제에 의존하기도 한다. 그러나 대면적의 산림을 대상으로 끈끈이롤트랩을 설치하는 것은 많은 인력이 동원되며, 대벌레 이외에도 다양한 절지동물과 먼지 등이 부착됨에 따라 방제 효과 감소가 예상된다. 이외에도 다양한 거미류, 벌류, 파리류 등 산림 내에서 중요한 생태적 기능을 담당하고 있는 절지동물류의 포획으로 인해 장기적으로는 부정적인 영향을 줄 가능성도 있다. 화학살충제를 사용한 방제 역시 많은 비표적 생물과 환경에 미치는 직·간접적 영향 때문에 쉽게 선택하기 어려운 방제법으로 보다 효율적이고 친환경적인 대안 마련이 시급한 실정이다. 실제 살충제를 이용한 대면적으로 살충제 항공방제를 실시한 소나무림 내에서 서식하는 조망성 거미류인 무당거미의 발육 상태가 부진하다는 연구 보고도 있다(Jung et al., 2020a).

대벌레 방제를 위해 적용되던 끈끈이롤트랩이나 화학살충제를 대체하기 위한 방제법으로는 식물추출물을 기본 조성으로 하는 유기농업자재나 미생물 농약이 있다. 유기농업자재는 생분해성이 강하여 상대적으로 빨리 분해되므로 잔류에 의한 환경 영향이 적은 장점이 있지만, 곤충 종류에 따라 효과가 다르므로 살충 효과가 있는 물질을 찾는 것이 우선되어야 한다(Kwon et al., 2021). 미생물 농약의 경우, 곤충병원성 세균, 바이러스, 곰팡이 등이 이용되고 있는데, 특히 자연계에 널리 분포하며 높은 기주 특이성으로 인해 곤충의 밀도를 조절할 수 있는 것으로 알려진 백강균이나 녹강균과 같은 곤충병원성 곰팡이의 중요성이 부각되고 있다(Yun et al., 2018).

따라서 본 연구는 여러 해충을 대상으로 사용 가능한 유기농업자재 6종과 곤충병원성 곰팡이를 이용하여 대벌레 살충 효과를 검증하고 이를 비교함으로써 대벌레 대상 친환경 방제제의 적용 가능성을 제시하기 위해 수행하였다. 일반적으로 식물추출물을 이용한 살충력 실험은 후보 물질에 대한 생물검정 후 방제 효과 검정을 수행하지만, 본 연구에서는 대벌레의 대발생 기간 동안 긴급하게 방제에 사용될 물질을 선발하여야 했기 때문에 시판 중인 유기농업자재 중 유효성분이 상이한 제품을 선정하였다. 또한 본 연구에서는 2020년과 2021년 봉산 및 청계산에서 자연 폐사한 대벌레 사체로부터 분리한 곰팡이 중 곤충병원성을 보유하여 살충제로 개발 가능한 곰팡이를 실내에서 배양하여 종 동정한 후 살충 효과를 검증하였다.

재료 및 방법

1. 실험 곤충

유기농업자재의 살충력을 평가하기 위해서 2021년 6월

중순 청계산 매봉 방향 등산로 일대에서 대벌레의 4령 약충 또는 성충을 500개체 이상 채집하여 망사형 사육장(60×40×40 cm)에 나누어 넣은 후 국립산림과학원 산림해충연구실로 운반하였다. 이를 다시 20~30개체씩 나누어 망사형 사육장(60×40×40 cm)에 넣은 후 사육실 조건(평균 온도 25±2°C, 상대습도 70±10%, 광주기 16L:8D)에서 7일 동안 떡갈나무의 잎을 먹이로 제공하였고(Figure 1), 수분 부족에 의한 폐사를 막기 위해 매일 오전 9~10시 사이에 분무기를 이용하여 증류수를 분무하였다. 7일이 지난 시점에서 활동성이 양호한 개체를 선발하여 살충 실험에 이용하였다.

녹강균의 살충 효과 평가를 위해 알부터 사육한 개체(120개체)와 야외에서 채집한 개체(120개체)를 함께 사용하였다. 대벌레의 알은 2021년 3월 중순 은평구 봉산에서 토양과 낙엽층을 채취하여 산림해충연구실로 운반한 후 토양체를 이용하여 분리한 후 부화를 유도하였다. 알에서 부화한 1령 약충은 20~30개체씩 나누어 망사형 사육장에 넣은 후 사육실 조건(25±2°C, 70±10% RH, 16L:8D)에서 사육하였다. 부화 약충으로 실험에 필요한 충분한 개체수 확보가 어려웠기 때문에 6월 말 은평구 봉산에서 500여 개체의 대벌레 성충을 추가로 채집하여 산림해충연구실로 운반한 후, 유기농업자재의 살충률 조사용 대벌레와 동일한 조건에서 사육하였다. 1령 약충부터 사육한 대벌레 및 채집한 대벌레 성충은 15개체씩 망사형 사육장에 넣은 후 녹강균의 살충 효과를 평가하는데 이용하였다.

2. 유기농업자재의 살충력 평가

화학 살충제인 페니트로티온 유제를 대조약제로 시판 중인 해충 방제용 유기농업자재 6종(EFAM A~F)의 대벌레에 대한 살충활성을 검정하였다(Table 1). 약제별로 3개의 망사형 사육장에 16~20개체씩 접종하였다. 약제는 휴대용 소형분무기를 이용해 약제별 추천농도로 희석하여

먹이로 제공한 떡갈나무의 잎과 대벌레 몸이 충분히 젖을 정도로 1회 분무하였다(Table 1). 또한 수분 부족에 의한 폐사를 막기 위해 매일 오전 9~10시 사이에 분무기를 이용하여 증류수를 분무하였다. 약제처리 1, 3, 7일 경과 후 사충수를 조사하였으며, 증류수를 분무한 무처리구 및 페니트로티온 처리구와 비교하여 살충률을 분석하였다.

3. 녹강균의 살충력 검정

대벌레 곤충병원성 곰팡이는 은평구 봉산(2020, 2021년)과 의왕시 청계산(2021년)에서 채집한 죽은 대벌레 성충으로부터 분리하였다. 곰팡이는 성충의 내부에서 자라기 시작하며, 외부로는 마디와 마디 사이에서 자라 나오기 시작하여 성충의 표면 전체를 덮었으며 특히 마디에는 다량의 분생포자가 덮여 있었다. 이를 potato dextrose agar (PDA) 배지를 이용하여 분리 배양하였고, 곰팡이의 형태와 internal transcribed spacer (ITS), large subunit (LSU) 염기서열(White et al., 1990)을 기반으로 동정한 결과 녹강균(*Metarhizium anisopliae*)으로 확인되었다(Figure 2).

대벌레에 대한 녹강균의 병원성 여부를 조사하기 위하여 실내에서 알부터 부화시켜 사육한 120개체와 봉산에서 채집한 120개체를 대상으로 실험하였다. 대벌레의 몸 표면에 피펫을 이용하여 개체당 녹강균 포자 현탁액(10⁸ spores/ml, 0.1% tween 80 첨가)을 1ml 분주하였다. 대조구의 대벌레에게는 1ml의 증류수를 분주하였다. 현탁액 또는 증류수를 분주한 개체는 접종구와 대조구로 나누어 망사형 사육장(60×40×40 cm)에 각각 30개체씩 넣은 후 실온에서 떡갈나무의 잎을 제공하면서 사육하였고, 현탁액 분주 후 2주 동안 매일 사망한 개체의 유무를 조사하였다. 본 실험은 2021년 6월 23일에 2반복(알을 부화시켜 얻은 개체), 7월 7일에 2반복(야외 채집 개체)을 실시하여 총 4반복으로 수행했다. 총 240개체(처리구와 무처리구 각 30개체×4반복)의 대벌레를 대상으로 살충률을 조사하였다.



Figure 1. (a) Defoliated trees by *Ramulus mikado* populations, (b) *R. mikado* population collected in Mt. Cheonggye, and (c) dead body of *R. mikado* in pesticide bioassay.

Table 1. List of organic materials (EFAM, eco-friendly organic materials) and a chemical insecticide to test the insecticidal efficacy on *Ramulus mikado*.

Products	Plant extracts (%)	Active ingredient (%)	Recommended concentration (Dillution)	No. of <i>R. mikado</i> in each cage (3 replicates)
EFAM A	Neem (60)	Azadirachtina	1,500×	16 / 16 / 20
EFAM B	Oak smoke flavoring (40) + Chinese scholar tree, goosefoot and subtripinnata (50)	Matrinea, Eugenola, Geraniola	1,000×	18 / 18 / 18
EFAM C	Citronella oil (30) + Deris (20) + Cinnamon (10)	Geraniol (1.3), Cinnamaldehyde (2), Rotenone (0.2)	2,000×	18 / 18 / 18
EFAM D	Gosam extract (90)	Matrine (0.45)	1,000×	18 / 18 / 18
EFAM E	Custard apple oil (50) + Cinnamon (10)	Oleic acid (4.794), Cinnamaldehyde (2.198)	1,000×	18 / 18 / 18
EFAM F	Deris (30) + Cinnamon (5) + Lemongrass oil (5) + Jicama (2) + Pyrethrum (2)	Rotenone (1.4), Cinnamaldehyde (3.3), Citral (2.5), Ethyl alcohol (40), Pyrethrins (0.7)	1,000×	18 / 18 / 18
Insecticide	-	Fenitrothion Emulsifiable concentrate (50)	1,000×	18 / 18 / 18
Controlb	-	-	-	18 / 18 / 18

^a Percent of active ingredient is not provided

^b Distilled water was used

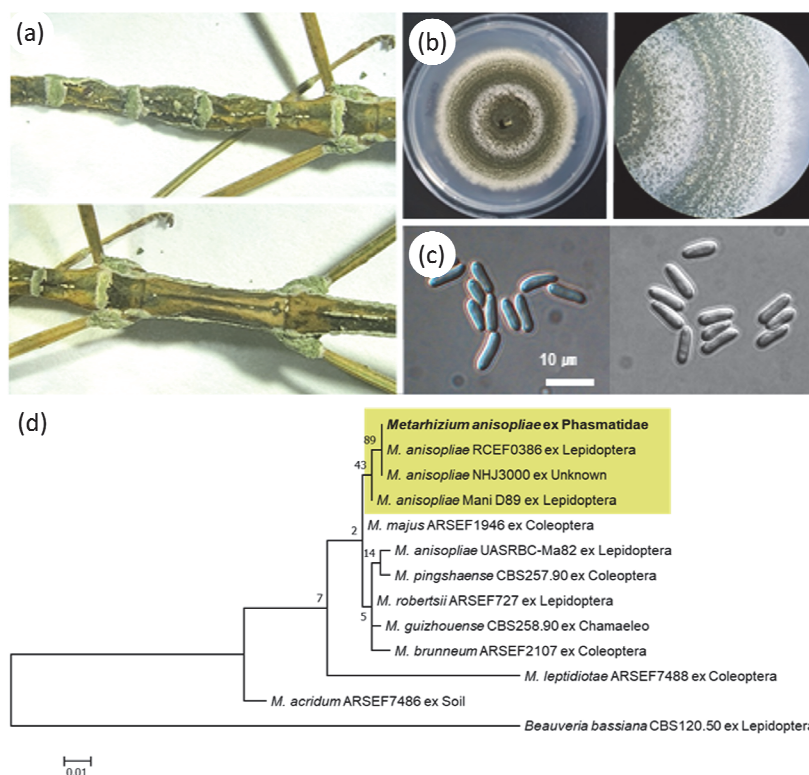


Figure 2. (a) A dead body of *Ramulus mikado* infected by *Metarhizium anisopliae*, (b) A 7-day culture of *M. anisopliae* on PDA medium, (c) conidia of *M. anisopliae*, (d) Phylogenetic relationship of *M. anisopliae* and reference sequences retrieved from GenBank, inferred from Maximum likelihood analysis using the ITS sequences. Bootstrap values (1,000 replicates) are shown for each node and our sample is shown in bold. The scale bar represents 0.01 nucleotide substitutions per site.

앞선 녹강균 포자 현탁액 분주 실험을 통해 녹강균이 대벌레에 대해 병원성을 보인다는 것을 확인한 후 녹강균 포자 현탁액의 희석배율에 따른 살충효과 검정을 위해, 녹강균 포자를 10^2 spores/ml, 10^4 spores/ml, 10^6 spores/ml로 희석한 현탁액을 대벌레 성충이 들어있는 망사형 사육장에 분무하였다. 망사형 사육장 1개당 15개체의 대벌레 성충을 넣었고, 대조구 포함 총 4처리구를 3반복 실험하여 총 180개체의 대벌레에 대해 살충률을 조사하였다. 녹강균 포자 현탁액 분무 후 2주 동안 매일 폐사한 개체의 유무를 조사하였다.

실험 중 폐사한 개체는 발견 즉시 한 개체씩 페트리디쉬 (10×4 cm)로 옮겨 배양기(25°C , 상대습도 100%)에 두고 곰팡이의 발생 여부를 확인한 후 녹강균 특이 프라이머 (F3: gggtatgatgaggggagggc, B3: gggtcctggtcgggact)를 이용한 PCR 분석을 통해 재확인하였다(Hung et al., 2017).

4. 통계분석

유기농업자재 6종, 페니트로티온 처리구, 무처리구 간의 살충률 비교를 위해서 일원분산분석을 수행하였다. 또한 녹강균 포자 현탁액 분주 여부(처리구, 대조구) 및 희석배수(대조구, 10^2 spores/ml, 10^4 spores/ml, 그리고 10^6 spores/ml)에 따른 살충률 비교를 위해서 t검정 및 일원분산분석을 수행하였다. 일원분산분석 결과에서 통계적 유의성이 확인될 경우 Tukey 검정을 이용하여 다중 비교를 수행하였다. 모든 통계 분석은 R 프로그램 버전 4.1.3 (R Core Team, 2020)을 이용하였다. 일원분산분석을 위해서 ‘aov’ function을 이용하였고, 다중 비교를 위해 ‘multcompView’ 패키지 내 ‘multcompLetters4’ function을 이용하였다.

결 과

1. 유기농업자재 6종의 살충 효과

대벌레에 대한 살충률은 약제의 종류와 시간 경과에 따라 차이를 보였다(Table 2). 처리 후 1일차에는 페니트로티온 유제에서만 98.1%가 폐사하였고 EFAM A, B, C는 31.5%~56.7%의 폐사율을 보였던 것에 비해, EFAM D, E, F 및 무처리구는 0%~11.1%만이 폐사하여 통계적으로 유의미한 차이를 보였다. 처리 후 3일차에는 페니트로티온 유제 처리구에서는 100% 폐사하였고 EFAM A는 85.0%가 폐사하여 다른 처리구와 차이를 보였다. 처리 후 7일차에는 EFAM B와 C의 폐사율도 3일차에 비해 크게 증가하여 각각 88.9%와 85.2%의 폐사율을 보이면서 페니트로티온 유제와 EFAM A와 유사한 살충률을 나타냈고 다른 처리구와는 큰 차이를 보였다. EFAM D, E, F는 처리 직후부터 실험 종료시까지 무처리구의 폐사율과 통계적으로 유의한 차이가 발생하지 않았다.

EFAM의 종류별 살포 후 대벌레의 특이적인 반응이 관찰되었는데, 모든 제품에서 살포 직후 배마디가 늘어지며 활동성이 저하되는 모습을 보였다. A제품의 경우 약제 살포 후 1일 이내에 대부분 개체는 살아 있었지만, 다리 전체가 떨어지는 현상이 관찰되었다. B제품은 개체별로 일부 다리가 떨어지는 현상이 관찰되었지만 약제 살포 직후의 활동성 저하로부터 회복하는 듯한 모습이 관찰되었다. C제품은 다리가 떨어지는 현상은 없었으나 활동성 저하로부터 회복하지 못하고 서서히 폐사하는 개체가 증가하는 경향이었다. D제품의 경우 약제 살포 이후 대부분 개체의

Table 2. Insecticidal activity of six eco-friendly organic materials (EFAM) and one chemical insecticide (fenitrothion EC) against *R. mikado* at 1, 3, 7 days after treatment (DAT) in laboratory conditions ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ RH, 16L:8D) with statistics for one-way ANOVA. Control was a group of water-sprayed instead of insecticidal materials. Different letters indicate significant difference of *R. mikado* mortality based on Tukey’s HSD test.

Treatment	Mortality (% , mean \pm S.D.)			
	1 DAT	3 DAT	7 DAT	
Fenitrothion EC	98.1 \pm 3.21 a	100.0 \pm 0.00 a	100.0 \pm 0.00 a	
EFAM A	56.7 \pm 11.55 b	85.0 \pm 4.33 a	100.0 \pm 0.00 a	
EFAM B	25.9 \pm 12.83 bcd	33.3 \pm 16.67 bc	88.9 \pm 11.11 a	
EFAM C	31.5 \pm 22.45 bc	48.1 \pm 11.56 b	85.2 \pm 13.98 a	
EFAM D	11.1 \pm 5.56 cd	22.2 \pm 11.11 bc	37.0 \pm 12.83 b	
EFAM E	7.4 \pm 3.21 cd	18.5 \pm 8.49 c	33.3 \pm 14.70 b	
EFAM F	5.6 \pm 9.62 cd	11.1 \pm 5.56 c	20.4 \pm 8.49 b	
Control	0.0 \pm 0.00 d	7.4 \pm 6.42 c	16.7 \pm 9.62 b	
Statistics				
	<i>F</i>	28.04	41.30	37.12
	<i>d.f.</i>	7, 16	7, 16	7, 16
	<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

다리가 1~3개 정도 떨어지는 모습이 관찰되었지만 폐사율은 낮았다. E와 F제품은 무처리구와 유사하게 활동성이 유지되었다.

2. *Metarhizium anisopliae*의 살충 효과

대벌레 성충의 몸에 녹강균 포자 현탁액(10^8 spores/ml)을 직접 분주하여 살충률을 조사한 결과, 폐사 개체는 4일 차부터 발생하였으나 두 집단간 폐사율의 통계적으로 유의미한 차이는 5일차부터 나타났다($t=-5.00$, $p=0.015$) [Figure 3(a)]. 녹강균 현탁액을 분주한 처리구에서는 6~7일 차에는 100% 폐사하였고 대조구에서는 9일차와 12일차에 각각 2개체씩 폐사하였다. 녹강균 현탁액을 분주한 처리구에서 대벌레가 폐사하는데 걸린 기간은 평균 5.3 ± 0.66 일이었다.

녹강균 포자 현탁액 희석배수에 따른 살충률은 포자 현탁액 살포 후 1~4일차까지는 일부 집단의 폐사율이 6.7~20.0% 수준으로 약간 증가하였으나 집단간 통계적 차이는 없었다(4일차, $F=0.89$, $p=0.487$) [Figure 3(b)]. 그러나 5일차($F=32.32$, $p<0.001$), 6일차($F=218.80$, $p<0.001$), 7일차($F=359.10$, $p<0.001$)의 폐사율은 대조구와 큰 차이를 보였으며, 8일차 이후의 폐사율은 녹강균 포자 현탁액의 희석배수에 관계없이 100% 폐사하였다($F=462.20$, $p<0.001$). 10^2 /ml 현탁액의 경우 5, 6, 7일차 폐사율이 각각 64.4%, 91.1%, 95.6%로 다른 처리구에 비해 약간 낮았지만 통계적 유의성은 없었다. 포자 현탁액의 농도에 따른 대벌레의 폐사기간은 10^2 /ml, 10^4 /ml, 10^6 /ml에서 각각 평균 5.4 일 ± 1.03 일, 5.1 ± 0.53 일, 4.8 ± 0.88 로 포자의 농도가 높아질수록 빨리 폐사하는 경향이 있었다($F=4.19$, $df=2$, 132 , $p=0.017$; Tukey 검정 결과, 10^2 /ml $\geq 10^4$ /ml $\geq 10^6$ /ml).

폐사한 대벌레로부터 유전자 마커를 이용하여 녹강균 존재 여부를 재확인한 결과, 전체 120개체 중 114개체(95.0%)에서 녹강균(*M. anisopliae*)이 확인되었고, 전체 120개체 중 6개체(5.0%)에서는 부생균이 확인되었다. 대조구에서도 일부 폐사한 개체가 있었으나 이들로부터 분리한 곰팡이는 *Fusarium solani*, *Aspergillus westerdijkiae*, 그리고 *Penicillium* sp. 등으로 폐사하여 부패 중인 곤충에서 발생하는 부생균만 확인되었다(Figure 4).

고 찰

본 연구 결과, 사용한 유기농업자재 6종 중 3종이 대벌레에 높은 살충 활성을 보이는 것을 확인하였으며, 최종 살충률은 유기인계 농약인 페니트로티온 유제와 유사한 수준이었다. 특히 대벌레가 님과 고삼추출물의 유효성분인

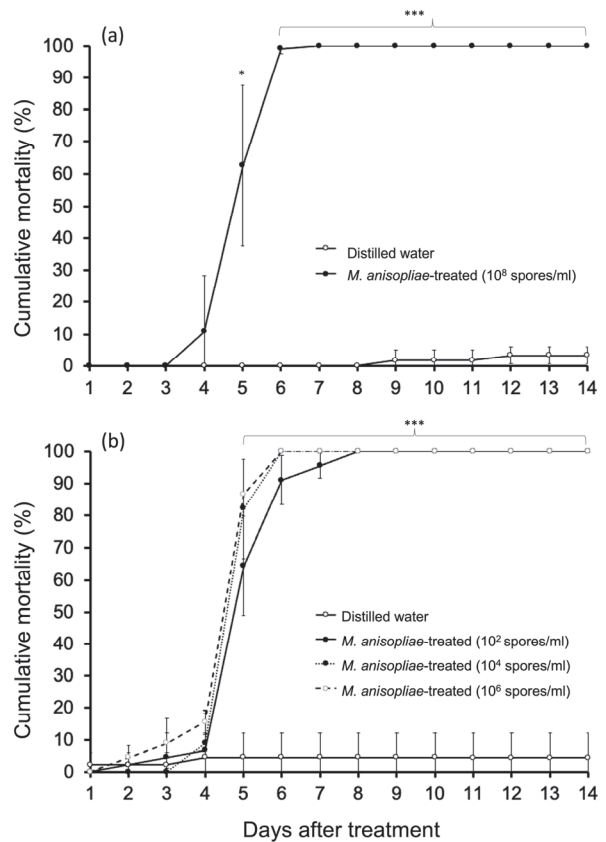


Figure 3. Cumulative mortality (mean \pm S.D.) of *Ramulus mikado* since days after treatments. (a) Comparison between two groups (*Metarhizium anisopliae* treated vs. sterile distilled water sprayed), and (b) among four groups (three concentrations of *M. anisopliae* treated vs. sterile distilled water sprayed). Asterisks indicate significant difference level at * <math>p < 0.05</math>, *** <math>p < 0.001</math>.

azadirachtin을 포함하는 식물성 오일에 대하여 감수성이 높은 것으로 추정되었다. Azadirachtin의 작용 기작은 일반적으로 곤충 신경전달물질의 전달 억제, 칼슘 이온 통로의 부분적 차단에 의한 신경 전달을 저해, 전홍샘자극호르몬의 억제 또는 유약호르몬의 감소를 통한 발육에 문제 유발, 섭식 또는 산란 저해 등의 효과가 있는 것으로 보고된 바 있다(Kilani-Morakchi et al., 2021). 그러나 대벌레류에 대한 Azadirachtin의 살충 효과는 알려진 바 없고, 본 연구에서는 성충만을 대상으로 하였기 때문에 어린 약충이나 알을 대상으로 보완 실험을 수행을 한다면 대벌레 관리 방안을 마련하는데 도움이 될 것이다. 또한, geraniol을 단일 또는 다른 유효성분과 혼합하여 판매 중인 유기농업자재도 높은 살충율을 보였는데, 이 물질 역시 대벌레에 대한 사례는 없고 바퀴벌레류에 대한 신경 독성 및 모기류에 대한 기피 효과가 알려져 있었다(Chen and Viljoen, 2010). 실제로 대벌레에 대한 유기농업자재 분무 시 신경독성에 의한 마비 증세를 보이는 경우가 많았는데, azadirachtin이나

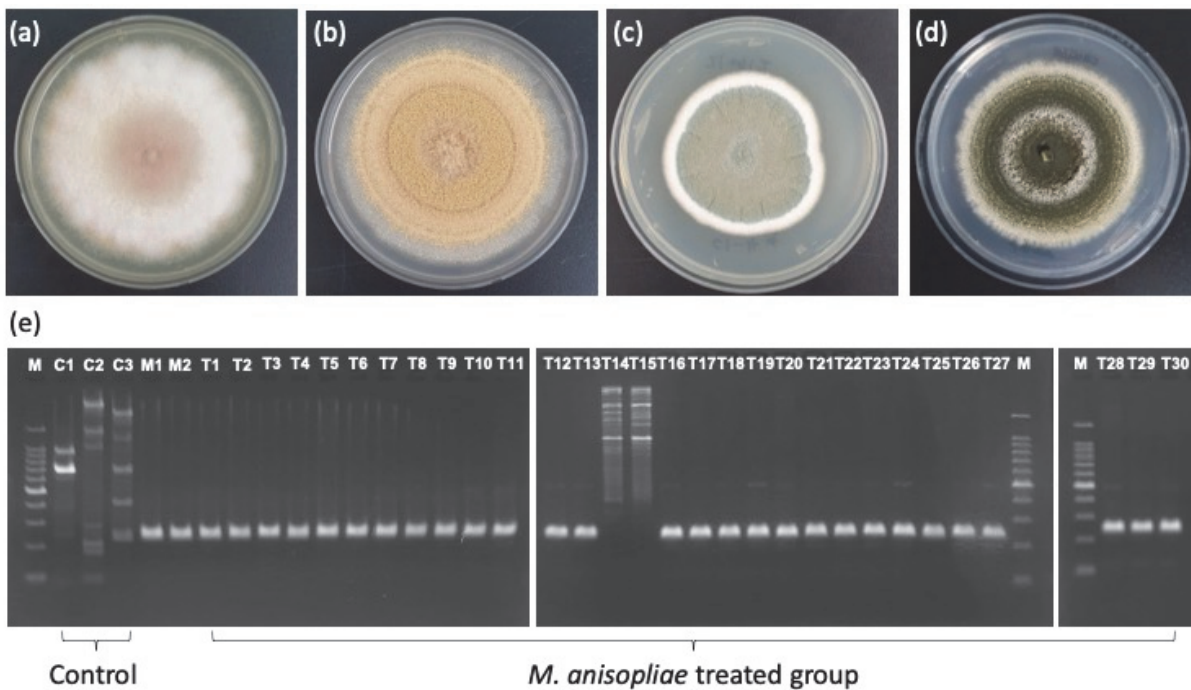


Figure 4. Fungi derived from dead bodies of *Ramulus mikado* in control groups (a~c): (a) *Fusarium solani*, (b) *Aspergillus westerdijkiae*, and (c) *Penicillium* sp. (d) *Metarhizium anisopliae* re-isolated from dead bodies of the fungus-treated groups. (e) Results of *M. anisopliae* specific primers screening on dead bodies of *R. mikado* 7 days after sterilized distilled water (SDW) or *M. anisopliae*-treated groups as follows: C1~C3, Negative control (SDW treatment); M1 and M2, Positive control (*Metarhizium anisopliae* cultures); T1~T30, *M. anisopliae*-treated.

geraniol에 의한 영향으로 추정된다. 한편, EFAM D, E, 그리고 F의 살충활성은 50% 미만으로 낮아 대벌레 방제용으로 활용하기 어려울 것으로 판단된다. 살충 효과가 낮았던 이들 제품의 주성분인 matrine이나 cinnamaldehyde 등도 여러 절지동물에게 살충 효과를 보이는 성분으로 알려져 있는데(Huang and Ho, 1998; Zanardi et al., 2015), 본 연구에서 사용된 제품에 포함된 다른 식물성 오일 성분이나 보조제와의 반응에 의해 살충 효과가 낮게 나왔을 수도 있으므로 별도의 추가 검증이 필요할 것이라 생각된다. 결론적으로 대벌레 방제를 위한 친환경방제제 선발 시 azadirachtin이나 geraniol 성분이 우선적으로 검토될 필요가 있다. 다만, azadirachtin은 살포 후 섭식 독성으로 인해 다른 식엽성 곤충도 영향을 받을 수 있으므로(Mordue et al., 2005), 대벌레에 대한 살충력이 높았던 유기농업자재가 다른 곤충에 미치는 영향도 검토가 필요하다.

유기농업자재와 달리 자연생태계에 분포하고 있는 녹강균류의 경우, 대벌레에 대한 살충 활성은 최근 일본에서도 보고된 바 있지만(Yano et al., 2021), 일본에서의 발견은 산림 내에서 폐사한 개체에서 녹강균의 분생포자를 확인한 것으로 본 연구와 차이가 있다. 대벌레의 몸에 직접 녹강균의 포자 현탁액을 처리한 본 연구에서 대벌레의 살

충 활성은 녹강균 포자의 농도와 관계없이 약 5일차부터 집중적으로 나타났는데, 1~3일차에 살충 활성이 나타나는 유기농업자재나 화학 살충제에 비해 상대적으로 늦는 것으로 확인되었다. 본 연구에서는 살충 활성이 나타나기 전까지 식엽활동을 하는지에 대해서는 조사를 수행하지 않았기 때문에 늦은 살충활성으로 인해 식엽 피해가 더 증가할 것인지는 불명확하다. 따라서 녹강균의 살충 효과를 유기농업자재나 화학 살충제와 직접적으로 비교하는 것은 적절하지 않다. 그러나 유기농업자재나 화학 살충제가 다소 넓은 범위의 곤충류에 대해 영향을 주는 점을 감안한다면 녹강균을 이용한 대벌레 방제는 보다 효과적일 수 있다. 실제로 녹강균류는 국제적으로는 농림업과 질병 매개 곤충의 관리를 위해 개발되어 이용 중인 생물 농약 중 하나이다(Faria and Wraight, 2007; Ansari et al., 2011). 미국 환경청에서는 *M. anisopliae* strain F52의 환경 위해성이 매우 낮은 것으로 판단하고 있는데(US EPA, 2011), 녹강균은 무당벌레류, 귀뚜라미류, 노린재류(Ginsberg et al., 2002), 모기류(Vivekanandhan et al., 2020) 등 곤충에 대한 병원성이 대상 곤충 종에 따라 다르게 나타나는, 즉 기주 특이성이 있는 것으로 보고되고 있다. 국내의 경우, 녹강균이 자연생태계에서 쉽게 확인되는 곤충병원성 곰팡이

중 하나이고(Kim et al., 2010), 비표적 생물에 대한 영향 평가는 수행된 바 없는데 대벌레 병원성 녹강균이 다른 곤충류에 미치는 영향에 대해서는 추가 검증이 필요하다.

대벌레의 알 부화에 필요한 온열량은 1542.7온일도(degree-day)로 1령부터 성충까지의 1097.4온일도와 비교하여 매우 높은 편으로(Lee et al., 2018) 생활사를 완성하는데 필요한 기간이 상당히 길며, 1개체의 산란량이 평균 100여개에 불과하여 생물검정과 같은 연구수행에 필요한 개체수 확보가 어려운 종이다. 이러한 이유로 본 연구는 돌발적으로 대발생하는 자연발생 개체를 대상으로 유기농업자재 및 곤충병원성 미생물에 대한 감수성을 검정했다는 측면에서 의미가 있다. 다만, 본 연구에서 확인된 녹강균의 살충 효과는 기상 조건에 따라 달라질 가능성이 있어 추가 연구가 요구되는데, 실제 흰점박이꽃무지 유충을 대상으로 한 실험에서 흰점박이꽃무지 유충에 대한 녹강균의 병원성은 온도나 상대습도 등 사육 조건에 따라 달라진다고 보고된 바 있다(Kim et al., 2020). 향후 대벌레의 녹강균 감염과 기상 조건과의 관계에 대한 정밀한 조사와 분석이 수행된다면, 대벌레의 대발생 현상에 대한 이해도 증가와 함께 산림 내 돌발 해충의 관리 전략 수립에 활용될 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 2022년도 강원대학교 대학회계 학술연구조성비(과제번호 202202970001) 및 환경부의 재원으로 국립생물자원관(NIBR202211101)의 지원을 받아 수행하였음.

References

- Ansari, M.A., Pope, E.C., Carpenter, S., Scholte, E.-J. and Butt, T.M. 2011. Entomopathogenic fungus as a biological control for an important vector of livestock disease: the *Culicoides* biting midge. *PLOS ONE* 6(1): e16108.
- Baker, E. 2015. The worldwide status of phasmids (Insecta: Phasmida) as pests of agriculture and forestry, with a generalised theory of phasmid outbreaks. *Agriculture & Food Security* 4: 22.
- Chen, W. and Viljoen, A.M. 2010. Geraniol – A review of a commercially important fragrance materials. *South African Journal of Botany* 76(4): 643-651.
- Faria, M. and Wraight, S. 2007. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *BioControl* 43(3): 237-256.
- GBIF Secretariat (Global Biodiversity Information Facility Secretariat). 2021. GBIF Backbone Taxonomy. <https://doi.org/10.15468/39omei>. (2022.02.11).
- Ginsberg, H.S., Lebrun, R.A., Heyer, K. and Zhioua, E. 2002. Potential nontarget effects of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) used for biological control of ticks (Acari: Ixodidae). *Environmental Entomology* 31(6): 1191-1196.
- Huang, Y. and Ho, S.H. 1998. Toxicity and antifeedant activities of cinnamaldehyde against the grain storage insects, *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motsch. *Journal of Stored Products Research* 34(1): 11-17.
- Hung, D.V., Posta, K. and György, T. 2017. PCR based detection of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* in host organisms. *ARPN Journal of Agricultural and Biological Science* 12(2): 38-42.
- Jung, J.K., Kim, J., Kim, D. and Jung, C. 2020a. Effect of pesticide on biological traits of an orb-web spider, *Trichonephila clavata* Koch (Araneae: Araneidae) in *Pinus densiflora* forests in Mt. Geumjeong, Korea. *Korean Journal of Applied Entomology* 59(3): 209-215.
- Jung, J.K., Nam, Y., Kim, D., Lee, S.H., Lim, J.H., Choi, W.I. and Kim, E.S. 2020b. Tree-crown defoliation caused by outbreak of forest insect pests in Korea during 2020. *Korean Journal of Applied Entomology* 59(4): 409-410.
- KFRI (Korea Forest Research Institute). 2000. Annual report of forest pests monitoring. Korea Forest Research Institute. ISBN 89-8176-076-4.
- KFRI (Korea Forest Research Institute). 2001. Annual report of forest pests monitoring. Korea Forest Research Institute. ISBN 89-8176-094-2.
- KFRI (Korea Forest Research Institute). 2002. Annual report of forest pests monitoring. Korea Forest Research Institute. ISBN 89-8176-115-9.
- KFRI (Korea Forest Research Institute). 2003. Annual report of forest pests monitoring. Korea Forest Research Institute. ISBN 89-8176-153-1.
- KFS (Korea Forest Service). 2022. Forecasting and control plans for forest insect pests and diseases in 2022. <https://www.forest.go.kr>. (2022.06.30).
- Kilani-Morakchi, S., Morakchi-Goudjil, H. and Sifi, K. 2021. Azadirachtin-based insecticide: overview, risk assessment, and future directions. *Frontiers in Agronomy* 3: 676208.
- Kim, N.H., Kim, E., Song, M.H., Kawk, K.W., Park, K.H. and Kim, Y. 2020. Pathogenicity of entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* in *Protactia brevitarsis seoulensis* under different rearing conditions. *Korean Journal of Ecology and Environment* 53(1): 73-79.

- Kim, W.G., Seok, S.J., Weon, H.Y., Lee, K.H., Lee, C.J. and Kim, Y.S. 2010. Isolation and identification of entomopathogenic fungi collected from mountains and islands in Korea. *The Korean Journal of Mycology* 38(2): 99-104.
- Kwon, D.H., Kwack, G.Y., Won, S.M., Kim, M.H., Choi, H.J., Ahn, Y.K., Hong, K.H., Kwon, H.Y. and Park, Y. 2021. Establishment of classification system of major ingredients in organic agricultural materials associated with insect pest control. *Korean Journal of Pesticide Science* 25(4): 287-304.
- Lee, J.G., Kim, H.D., Kang, C.S., Seo, A.G., Lee, S.H., Park, Y.K. and Lee, Y.B. 2013. Study on the hatching characteristics and diet of the stick insect, *Baculum elongatum* (Phasmida:Phasmatidae) for artificial mass rearing. *International Journal of Industrial Entomology* 26(1): 61-66.
- Lee, J.G., Baek, S., Kang, C., Lee, Y.S., Lee, Y. and Lee, J-H. 2018. Temperature-dependent development and oviposition models of *Ramulus irregulariterdentatus* (Phasmida: Phasmatidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology* 21(3): 903-913.
- Mordue, A.J., Morgan, E.D. and Nisbet, A.J. 2005. 6.4 - Azadirachtin, a natural product in insect control. In: Gilbert, L.I. (Eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier. pp. 117-135.
- US EPA (United States Environmental Protection Agency). 2011. *Metarhizium anisopliae* strain F52 (029056) Biopesticide Fact Sheet. <https://www.epa.gov>. (2022.07. 20).
- Vivekanandhan, P., Swathy, K., Kalaimurugan, D., Ramachandran, M., Yuvaraj, A., Kumar, A.N., Manikandan, A.T., Poovarasam, N., Shivakumar, M.S. and Kweka, E.J. 2020. Larvicidal toxicity of *Metarhizium anisopliae* metabolites against three mosquito species and non-targeting organisms. *PLOS ONE* 15(5): e0232172.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rna genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. New York: Academic Press, Inc; 1990. pp. 315-22.
- Yano, K., Ozaki, T., Suzuki, T., Yamazaki, H., Nasuno, M., Degawa, Y. and Tojo, K. 2021. Outbreak of the stick insect, *Ramulus mikado* (Phasmatodea, Phasmatidae), in the Akashina area of Japan (Azumino City, Nagano Prefecture). *Entomological Science* 24(2): 196-200.
- Yun, H.G., Gwak, W.S., Woo, S.D. 2018. Selection of optimal culture medium for four entomopathogenic fungal isolates with dual activity and evaluation of their antimicrobial activity against several phytopathogens. *The Korean Journal of Mycology* 46(3): 333-344.
- Zanardi, O.Z., do Prado Ribeiro, L., Ansante, T.F., Santos, M.S., Bordini, G.P., Yamamoto, P.T. and Vendramim, J.D. 2015. Bioactivity of a matrine-based biopesticide against four pest species of agricultural importance. *Crop Protection* 67: 160-167.

Manuscript Received : July 28, 2022

First Revision : October 31, 2022

Second Revision : December 16, 2022

Accepted : December 19, 2022