농약과학회지 (Korean J. Pestic. Sci.)
Vol. 25, No. 2, pp. 157-165 (2021)
Open Access https://doi.org/10.7585/kjps.2021.25.2.157
ORIGINAL ARTICLES

Online ISSN 2287-2051
Print ISSN 1226-6183
Check for updates

소나무(*Pinus densiflora*)에서 emamectin benzoate 나무주사 시 천공 직경에 따른 소나무재선충(*Bursaphelenchus xylophilus*) 증식억제효과 및 잔류량 비교

권오경[1] · 정영학[2] · 이상명[2] · 김동수[3] · 차병진[4] · 이동운[1]*
[1]경북대학교 생태과학과, [2]㈜에스엠바이오비전, [3]국립산림과학원 산림바이오소재연구소, [4]충북대학교 식물의학과

Comparison of Proliferation Inhibition Effect of Pine Wood Nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, and Residual Amount according to the Different Injection Hole Diameter Performing Trunk Injection of Emamectin Benzoate in Pine Tree (*Pinus densiflora*)

Oh-Gyeong Kwon[1], Young Hack Jung[2], Sang Myeong Lee[2], Dong Soo Kim[3], Byeongjin Cha[4], DongWoon Lee[1]*
[1]Department of Ecological Science, Kyungpook National University, Sangju, Gyeongbuk 37224, Korea
[2]SM BioVision Co., Jinju, Gyeongnam 52849, Korea
[3]Forest Biomaterials Research Center, National Institute of Forest Science, Jinju 52817, Korea
[4]Department of Plant Medicine, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 28644, Korea,

(Received on April 25, 2021. Revised on June 17, 2021. Accepted on June 18, 2021)

Abstract We investigated the inhibition effect of proliferation of pine wood nematode (PWN) by residual amount of emamectin benzoate (EB) according to the different diameter of drill hole size (10 mm and 6 mm) performing trunk injection in pine tree (*Pinus densiflora*) for 3 years. No difference was observed in the inhibition effect of PWN and residual effect of EB for 3 years by the diameter of drill hole. The residual amount was significantly different from each tree or branch, but it tended to decrease over time. The residual amount in shoots at the end of the third year was 0.037 ppm in EB 2.15% treatment. The residual amount did not differ depending on the direction of the branches, and it was relatively small at the top of the canopy. Therefore, it is recommendable to choose the small size of drilled hole performing trunk injection. In addition, when sampling the branches for the residual analysis, it is preferred to collect evenly mixed 1- to 3-year-old branches from multiple branches at the same height of the crown.

Key words Drilling hole size, Persistence, Pine wood nematode, Residue, Trunk injection

서 론

소나무재선충(*Bursaphelenchus xylophilus*)은 *Abies*, *Cedrus*, *Larix*, *Picea*, *Pinus*, *Pseudotsuga*속의 30여종의 식물에 기생하는데 특히 *Pinus*속에 속하는 소나무류에는 시들음 증상을 유발시켜 나무를 고사시킨다(Sinclair and Lyon, 2005). 우리나라의 산림에 보편적으로 서식하고 있는 소나무(*P. densifolra*)와 곰솔(*P. thunbergii*)은 소나무재선충에 대한 감수성이 매우 높은 수종들로(Sinclair and Lyon, 2005) 소나무재선충에 감염되면 대부분이 당년에 고사된다.

소나무재선충에 의한 피해는 1905년 일본의 규슈섬에서 최초 발생하였으며(Yano, 1913), 이후에는 1982년 중국, 1988년 대한민국 그리고, 1999년 유럽의 포르투갈에서 피해가 확인되었다(Zhao et al., 2008). 국내에서는 1988년 부산 금정산에서 최초 발생이 확인되었으며(Yi et al., 1989), 이후 피해가 매년 확산되고 있는데 2005년 862,542그루의 감

*Corresponding author
E-mail: whitegrub@knu.ac.kr

염목이 제거되었고(Shin, 2008), 2015년에는 1,373,098그루가 제거되었는데 2019년에는 403,362그루로서 발생 본수가 감소하는 추세이다(Korea Forest Service, 2020a)

소나무재선충병을 관리하는 방법으로는 항공약제살포, 지상약제살포 그리고, 나무주사 등의 예방법과 고사목을 벌채 후 분쇄, 훈증소독, 소각하는 방제방법이 있다(Korea Forest Research Institute, 2004). 이들 중 나무주사는 소나무재선충을 보유한 매개충에 의한 소나무재선충 감염 전에 수간에 구멍을 뚫은 뒤 살충제나 살선충제를 주입하는 것으로 살충제는 후식하는 매개충을 방제대상으로 하고, 살선충제는 소나무재선충의 증식 억제 및 치사를 목적으로 한다(Kamata, 2008; Korea Forest Service, 2020b). 소나무재선충병 예방을 위한 나무주사는 노동력의 집약적 투입으로 인하여 고비용이 요구되어 대면적 방제에는 적합하지 않다. 하지만 환경과 인축에 대한 영향을 최소화할 수 있을 뿐만 아니라, 바람과 강우와 같은 기상요인에 대한 영향을 적게 받아 공원지역이나 생활권 주변에서도 적용이 용이한 예방 및 방제방법이다(Kamata, 2008; Cha et al., 2020).

소나무재선충 예방약제로 사용되고 있는 살선충제는 일본의 경우 morantel tartrate와 levamisole hydrochloride, mesulfenfos, nemadectin 등이 있고(Kamata, 2008), 국내에서는 avamectin과 emamectin benzoate, milbemectin등이 단제 및 혼합제로 등록 된 실정이다(Rural Development Administration, 2021).

소나무재선충 감염목이 매년 발생하고 있고, 나무주사를 이용한 방제가 매년 시행되고 있으나 우리나라에서 소나무재선충 나무주사와 관련된 연구는 제한적으로 수행되어 왔다. Lee et al. (2009a)이 abamectin과 emamectin benzoate, morantel tartrate, fosthiazate를 이용하여 곰솔에서 나무주사 후 2년 간 약효를 검증한 바 있고, 나무주사 한 abamectin의 곰솔과 잣나무(*P. koraiensis*)에서 수체 내 분포와 지속성을 조사한 바 있다(Lee et al., 2009b).

한편 나무주사를 통해 약제를 주입하는 경우, 대상 수목의 생리나 내부구조, 주입물질의 화학적 특성이나 제형, 주입시기나 날씨 및 토양환경, 수간주입 방법이나 기술 등에 따라 약효의 차이가 발생될 수 있다(Cha et al., 2020). 하지만 국내에서 나무주사 기술과 관련된 연구는 수간주입 구멍의 크기에 따른 주입구멍의 치유도 연구(Cha and Yun, 1995)와 수간주입구멍 크기와 수관 상태가 수간주입 효율에 미치는 영향(Cha et al., 2019) 등의 제한적 연구들 만 수행되었다.

현재 우리나라에서 소나무재선충 방제를 위한 나무주사는 약제주입병을 이용하는 방법과 드릴로 천공 후 약제주입기로 나무주사용 약제를 수간 내에 직접 주입하는 방법이 적용되고 있다. 주입병을 이용할 경우는 드릴로 직경 0.6 cm, 깊이 4~6 cm를 천공 한 뒤 주입병을 설치한다. 약제주입기를 사용할 경우 직경 1 cm, 깊이 7~10 cm를 천공한 뒤 약제를 수간에 직접 주입한다(Korea Forest Service, 2020b). 국내에서 소나무재선충병 방제 초기에는 주입병을 이용한 나무주사방법을 사용하였으나, 최근에는 작업시간과 공정이 간소화 된 약제주입기를 이용한 방제가 주류를 이루고 있다(Lee DW, Personal communication). 그러나 현재 우리나라에서 사용하고 있는 약제주입기를 이용하는 대공주입의 경우 목질부 변색 및 부후 피해를 유발하여 이익보다는 손실이 많다는 연구결과들로 인해 지양되고 있는 실정이다(Cha and Yun, 1995; Cha et al., 2019).

따라서 본 연구는 기존의 나무주사 방법의 개선을 위해 약제주입기를 이용하여 소나무재선충 방제 약제를 주입할 때 천공 구멍의 크기별로 소나무재선충 증식에 미치는 영향, 약제의 잔류성, 그리고 약효의 지속성에 미치는 영향을 조사하였다. 또한, 약제의 수간 내 이동에 있어 방위에 따른 차이와 수간 위치별에 따른 잔류의 차이가 있는지를 조사하였다.

재료 및 방법

시험지 및 처리약제

시험지는 경남 진주시 집현면의 소나무(*Pinus densiflora*) 자연림으로 나무주사 대상목의 흉고직경은 Table 1과 같았다. 시험지는 소나무재선충 감염목 발생지로 나무주사 약제는 emamectin benzoate 9.7% 직접살포액제와 emamectin benzoate 2.15% 유제를 ㈜신젠타로부터 제공받아 사용하였다. 우리나라에서 소나무재선충 나무주사에 등록된 약제는 abamectin, emamectin benzoate, milbemectin에 대한 단제와 혼합제들이 있는데(Rural Development Administration, 2021) 본 연구에서는 나무주사 천공 시 발생하는 구멍으로

Table 1. Trunk injection treatment details and average tree diameter at breast height (DBH)

Treatment	Injection volume (ml/DBH)	Drilled hole diameter (mm)	DBH (cm) ± SD
Emamectin benzoate 9.7% AL[a)]	0.3	6	12.1 ± 3.2
Emamectin benzoate 9.7% AL	0.3	10	10.7 ± 1.2
Emamectin benzoate 2.15% EC[b)]	1.0	10	10.8 ± 3.1
Untreated control	-	-	6.7 ± 1.1

[a)]Any other liquid. [b)]Emusifiable concentrate.

인한 나무의 상해를 최소화하는 연구를 위하여 유효성분의 함량이 높은 약제와 낮은 약제가 동시에 등록되어 있는 emamectin benzoate를 선정하여 수행하였다.

나무주사

나무주사는 휴대용 전동드릴(GSB 18V-EC, Robert Bosch GmbH, Malaysia)을 이용하여 지면에서 50 cm 이내의 수간 부분을 5~8 cm 깊이로 천공한 뒤 피펫(Pipetman, Gilson, France)을 이용하여 emamectin benzoate 2.15% 유제는 흉고직경 1 cm당 1 mL 약량을 주입하였고, emamectin benzoate 9.7% 직접살포액제는 흉고직경 1 cm당 0.3 mL씩 주입하였다. 약제주입 후 천공부위는 별도의 마감처리는 하지 않았다. 나무주사는 2017년 1월 23일 시행하였는데 처리당일 강우는 없었으며 최고기온은 1.8°C, 최저기온 -8.1°C, 평균기온 -3.5°C였다. 천공 구멍 직경별 약제 잔류량 비교를 위한 처리는 직경 6 mm와 10 mm 드릴을 이용하여 천공 한 뒤 emamectin benzoate 9.7% 직접살포액제를 처리하였는데 기존의 등록약제와 비교를 위하여 10 mm 드릴을 이용하여 천공 한 뒤 emamectin benzoate 2.15% 유제를 나무주사하였다(Table 1). 각 처리별로 1주를 한 반복으로 10주씩 완전임의배치법으로 처리하였다. 나무주사를 위한 천공은 나무의 중심부를 비켜 15° 각도로 4~5 cm 깊이로 하였다.

약효 조사

나무주사 후 각 처리별로 소나무재선충에 대한 증식억제 효과와 약효 지속성을 알아보기 위하여 나무주사 당년과 1년 및 2년 후에 소나무재선충을 접종하여 증식수를 조사하였다. 증식수 조사는 처리목 가슴 높이 주간에 소나무재선충을 접종하는 방법과 처리목의 가지를 절취하여 접종하는 두 가지 방법을 병행하였다. 수간부 소나무재선충 접종은 직경 10 mm 드릴로 2 cm 깊이로 천공한 후 피펫을 이용하여 감염목으로부터 분리한 소나무재선충을 3000마리/mL씩 접종하였다. 수간부 소나무재선충 접종은 처리 당년의 경우 2017년 5월 25일 접종 후 9월 14일 증식수를 조사하였으며 2018년에는 6월 21일 처리 후 10월 23일 조사하였고, 2019년에는 6월 5일 접종 후 9월 25일 조사하였다.

절단 가지부 소나무재선충 접종 시험은 Shin et al. (2015)의 방법을 응용하여 수간 하부에 위치한 가지를 고절톱으로 절단 한 뒤 직경 2 cm 이상의 가지를 25 cm 길이로 자르고 가운데 부분을 문구용 칼로 수피를 절개한 후 탈지면을 끼우고 소나무재선충 감염 소나무로부터 분리한 소나무재선충을 1000마리/0.2 mL를 접종하였다. 2017년에는 7월 11일 접종하였고, 2018년에는 7월 26일, 2019년에는 7월 12일에 접종하였다. 접종 30일 후 소나무재선충 증식수 조사를 위하여 접종부위로부터 상하 2.5 cm 떨어진 위치에서 각각 2.5 cm 길이의 가지부분을 토막 낸 뒤 전정가위로 가늘게 잘라 깔때기법으로 선충을 분리하였다. 깔때기 설치 1일 후 분리된 선충을 현미경 하에서 수를 조사하였다. 선충의 수는 목질부 g당 선충수로 환산하여 조사하였다.

Emamectin benzoate 잔류량 분석

Emamectin benzoate 나무주사 소나무에서 잔류분석용 시료 채취

나무주사 당년과 1년 후, 2년 후에 각각의 나무주사 대상목에서 emamectin benzoate 잔류량 분석용 시료 채취를 위하여 대상목별로 수간 상, 중, 하부와 동서남북 방위별로 구분하여 고절톱과 고절가위를 이용하여 가지를 절취하였다. 대상목별에 따라 하부의 가지가 없거나 특정 방위의 가지가 없는 경우 수간 위치와 방위별로 존재하는 가지만을 절취하였다. 절취한 가지는 전정가위를 이용하여 당년생 신초와 신초 이외에 솔잎이 붙어있는 2년생 이상의 가지 부분으로 구분하여 100 g 내외의 양으로 잘라 지퍼팩에 넣어 실험실로 가져와 30일동안 음건하였다. 건조한 시료는 전정가위로 1 cm 이하 크기로 잘라 분석기관에 잔류분석을 의뢰하였다. 시료채취는 각각 2017년 11월 10일, 2018년 12월18일, 2019년 10월 16일에 하였다.

잔류 분석

검량선 작성은 emamectin benzoate 표준품(93.84%) 0.0109 g을 50 mL의 acetonitrile에 녹여 204.6 mg/L의 stock solution을 만들었다. 이 stock solution을 acetonitrile로 희석하여 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 2.5 mg/L의 working standard solution을 만들고, 1 μL를 LC/MS/MS (Agilent 6460 Triple Quad LC/MS/MS, Agilent, Santa Clara, USA)에 주입하여 나타난 chromatogram상의 peak면적의 합을 기준으로 검량선을 작성하였다.

시료분석은 시료 10 g에 증류수 20 mL를 넣어 습윤화하고, homogeniger(HG-15A, Daehan Scientific Co., Wonju, Korea)를 이용하여 acetonitrile 100 mL로 3500 rpm으로 1분간 마쇄추출하였다. 추출액을 감압여과하고, rotary vacuum evaporator (R-215, Buchi Co., Flawil, Switzerland)를 이용하여 acetonitrile을 감압 유거하였다. 수용액을 500 mL 분액여두에 옮겨서 포화 NaCl용액 50 mL, 증류수 100 mL를 가하고, dichloromethane 100 mL, 50 mL로 2회 분배한 후 무수 sodium sulfate층을 통과시켜 수분을 제거하였다. 이 액을 rotary vacuum evaporator를 이용, 감압 농축한 다음 건고물을 dichloromethane 10 mL에 용해하였다. Dichloromethane 6 mL로 활성화시킨 SPE (NH_2, 1 g)에 dichloromethane에 용해되어 있는 시료 10 mL 중 1 mL를 분취하여 loading시킨 후 dichloromethane 6 mL로 세정하고, dichloromethane:methanol (80:20, v:v) 6 mL로 용출시켰다. 용출액을 질소농축기를 이용하여 농축한 후 건고물에 acetonitrile

1 mL에 용해하여 1 μL를 LC/MS/MS에 주입, chromatogram 상에 나타난 peak면적의 합을 측정하고, 검량선에 의해 함유농도를 산출하였다.

통계분석

천공드릴의 직경별 및 처리약제별에 따른 소나무재선충 증식수는 소나무재선충 수간접종과 가지접종을 구분하여 년도별로 처리평균간 차이를 Tukey test로 분산분석하였다(SAS/STAT®9.3 user's guide, 2011). 천공드릴 직경별 잔류량은 기존에 나무주사 대조약제 처리방법으로 사용되고 있는 emamectin benzoate 2.15% 10 mm 천공 때와 비교를 위해 세 처리에 대한 처리평균간 차이를 Tukey test로 분산분석하였다. 방위별 잔류량과 수간 높이별 잔류량 비교는 각각 네 방향 또는 세 수간 높이의 시료가 모두 확보된 대상목 자료를 이용하여 전체량에 대한 각각의 비율을 계산하여 방위나 수간 높이별로 구분하여 처리평균간 차이를 Tukey test로 분산분석하였는데 수간 위치별 잔류량은 1년생 가지와 2년생과 3년생이 혼재 된 가지 시료를 구분하여 분석하였다. 1년생 가지 내 잔류량과 2~3년생 혼합 가지의 잔류량과의 상관관계를 알아보기 위하여 년도별로 구분하여 엑셀 프로그램을 이용하여 추세선과 상관계수를 산출하였다.

결 과

회수율, 검출한계 및 정량한계

회수율은 첨가농도 0.1 mg/kg에서 평균 9.17, 상대표준편차(Relative Standard Deviation, RSD)는 2.0%(C.V.=2.1%)였고, 첨가농도 0.5 mg/kg에서 평균 112.5, 상대표준편차는 3.9%(C.V.=3.5%)였다. Emamectin benzoate의 LC/MS/MS에서 최소 검출한계는 0.005 mg/kg이고, 정량한계는 0.01 mg/kg 이었다.

천공드릴 직경별 소나무재선충 증식

나무주사 후 주사 당년과 1년 및 2년 후에 가슴 높이의 수간에 소나무재선충을 접종 한 뒤 소나무재선충의 밀도를 조사한 결과 Table 2와 같이 2년차까지는 생존하는 소나무재선충이 없었으며 처리 3년차에는 일부 접종목에서 생존하는 선충이 있었으나 밀도는 0.6마리 이하로 매우 적어 무처리구에서 확인 된 선충수에 비해서는 통계적으로 유의하게 낮은 밀도를 보였다(1년차; df=3, 36, F=24.36, P<0.0001, 2년차; df=3, 36, F=23.22, P<0.0001, 3년차; df=3, 36, F=8.52, P<0.0002). 가지 접종 시에도 Table 2와 같이 처리 3년차까지 나무주사 처리구에서는 선충이 증식되지 않았다(1년차; df=3, 36, F=3.48, P<0.0256, 2년차; df=3, 36, F=12.27, P<0.0001, 3년차; df=3, 36, F=11.32, P<0.0001).

Emamectin benzoate 잔류량

천공 드릴 직경별에 따른 년도별 잔류량

천공 드릴의 직경에 따른 emamectin benzoate의 잔류량은 차이가 없었으나 10 mm 동일 크기천공에서 emamectin benzoate 9.7%와 2.15% 처리간에는 1년차 신초부분에서 잔류량에서만 차이가 있었고(df=2, 12, F=4.59, P=0.0331), 나머지는 차이가 없었다(Table 3).

신초부분에서는 처리 당년의 잔류량이 가장 많았고, 시간이 경과될수록 줄어드는 경향을 보였으나(EM 9.7% 6 mm; df=2, 12, F=6.48, P=0.0123, EM 9.7% 10 mm; df=2, 12, F=3.49, P=0.064, EM 2.15% 10 mm; df=2, 12, F=14.45, P=0.0006) 전체 가지부분에서는 1년차에 비하여 3년차에 잔류량이 증가되는 경향을 보였다(EM 9.7% 6 mm; df=2, 12, F=4.27, P=0.0398, EM 9.7% 10 mm; df=2, 12, F=4.46, P=0.0357, EM 2.15% 10 mm; df=2, 12, F=1.17, P=0.3433)(Table 3).

수간 위치별에 따른 잔류 비율

수간 위치별에 따른 emamectin benzoate의 검출량은 조사 대상 시료별에 따라 검출량의 절대량에 차이를 보여 동일 나무주사 대상목에서 수간 위치별 시료의 상대적 잔류량의 비율로 환산하여 조사하였다. 신초에서의 검출 비율은

Table 2. Yearly mean number of pine wood nematodes (PWNs) recovered from pine trees inoculated with PWNs after trunk-injection of emamectin benzoate (EB)[a)]

Treatment	Drilled hole diameter (mm)	Months after trunk-injection					
		Trunk-inoculation			Branch-inoculation		
		4	17	29	4	17	29
EB 9.7%	6	0 ± 0[b)]b[c)]	0 ± 0b	0.4 ± 0.7b	0 ± 0b	0 ± 0b	0 ± 0b
EB 9.7%	10	0 ± 0b	0 ± 0b	0 ± 0b	0 ± 0b	0 ± 0b	0 ± 0b
EB 2.15%	10	0 ± 0b	0 ± 0b	0.6 ± 2.0b	0 ± 0b	0 ± 0b	0 ± 0b
Untreated control[d)]	-	306.8 ± 196.6a	431.6 ± 283.2	88.1 ± 95.1a	68.9 ± 116.8b	146.7 ± 132.4a	51.0 ± 47.9a

[a)]Injection date was Jan. 23, 2017 and PWNs were recovered about 4 months after in each inoculation.
[b)]Number of PWNs ± SD.
[c)]Means followed by same lowercase letters within the column are not significantly different (Tukey's test (p<0.05)).
[d)]PWNs-inoculation without EB injection.

Table 3. Yearly amount of emamectin benzoate (EB) detected after trunk injection, depending on the size of the drilled hole

Treatment	Drilled hole diameter (mm)	Detection amount by years after trunk-injection (mg/kg) ± SD					
		Old branch[a)]			New branch		
		1	2	3	1	2	3
EB 9.7%	6	0.045 ± 0.02[b)]aB[c)]	0.118 ± 0.045aA	0.097 ± 0.052aAB	0.128 ± 0.041abA	0.076 ± 0.026aAB	0.06 ± 0.024aB
EB 9.7%	10	0.046 ± 0.022aB	0.123 ± 0.041aAB	0.18 ± 0.154aA	0.103 ± 0.042bA	0.046 ± 0.031aA	0.054 ± 0.048aA
EB 2.15%	10	0.083 ± 0.049aA	0.091 ± 0.029aA	0.176 ± 0.176aA	0.218 ± 0.086aA	0.077 ± 0.027aB	0.037 ± 0.036aB

[a)]New branch; branch formed in the same year of trunk-injection, old branch; branch formed before the year of trunk-injection.
[b)]Amount of EB (mg/kg) ± SD.
[c)]Means followed by same lowercase letters within the column in each treatment and same uppercase letters between the column in each year of old or new branch not significantly different (Tukey's test (p<0.05)).

Table 4. Yearly detection rate of trunk-injected emamectin benzoate in branch formed in the same year of trunk-injection

Location of branch on canopy	Detection rate (%) by year ± SD		
	1	2	3
Low	36.4 ± 9.4ab[a)]	44.2 ± 13.8a	52.4 ± 26.1a
Middle	43.2 ± 12.6a	31.0 ± 5.8ab	32.2 ± 17.9ab
Upper	20.4 ± 14.5b	24.8 ± 12.6b	15.4 ± 9.5b

[a)]Means followed by same lowercase letters within the column are not significantly different (Tukey's test (p<0.05)).

Table 5. Yearly detected amount of trunk-injected emamectin benzoate in branch formed in the same year of trunk-injection

Location of branch on canopy	Detection amount by year (mg/kg) ± SD		
	1	2	3
Low	0.11 ± 0.039a[a)]	0.09 ± 0.073a	0.109 ± 0.086a
Middle	0.13 ± 0.048a	0.058 ± 0.038a	0.057 ± 0.036ab
Upper	0.06 ± 0.037a	0.037 ± 0.023a	0.027 ± 0.02b

[a)]Means followed by same lowercase letters within the column are not significantly different (Tukey's test (p<0.05)).

Table 6. Yearly detection rate of trunk-injected emamectin benzoate in branch formed before the year of trunk-injection

Location of branch on canopy	Detection rate (%) by year ± SD		
	1	2	3
Low	41.3 ± 14.0a[a)]	48.1 ± 12.7a	51.6 ± 15.8a
Middle	29.3 ± 4.2a	32.7 ± 3.7b	32.2 ± 13.0ab
Upper	29.4 ± 16.5a	19.2 ± 9.8b	16.2 ± 6.9b

[a)]Means followed by same lowercase letters within the column are not significantly different (Tukey's test (p<0.05)).

Table 7. Yearly detected amount of trunk-injected emamectin benzoate in branch formed before the year of trunk-injection

Location of branch on canopy	Detection amount by year (mg/kg) ± SD		
	1	2	3
Low	0.053 ± 0.03a[a)]	0.177 ± 0.095a	0.154 ± 0.1a
Middle	0.037 ± 0.015a	0.115 ± 0.04b	0.079 ± 0.035ab
Upper	0.032 ± 0.011a	0.06 ± 0.028b	0.044 ± 0.039b

[a)]Means followed by same lowercase letters within the column are not significantly different (Tukey's test (p<0.05)).

Table 4와 같이 처리 당년의 경우 중간부분 가지에서의 검출 비율이 가장 높았으나 2년차와 3년차에서는 수간 하부의 검출 비율이 높았다(1년차; df=2, 12, F=4.47, P=0.0355, 2년차; df=2, 15, F=4.63, P=0.0271, 3년차; df=2, 18, F=

Table 8. Detection rate of trunk-injected emamectin benzoate according to branch orientation

Direction on tree branch	Detection[a)] rate (%) by year ± SD	
	1	2
East	26.7 ± 14.0a[b)]	27.7 ± 8.6a
West	18.8 ± 9.3a	26.9 ± 14.1a
South	24.8 ± 10.7a	23.5 ± 4.8a
North	29.7 ± 13.7a	22.0 ± 7.2a

[a)]One year tree branches were used as samples for residual analysis.
[b)]Means followed by same lowercase letters within the column are not significantly different (Tukey's test (p<0.05)).

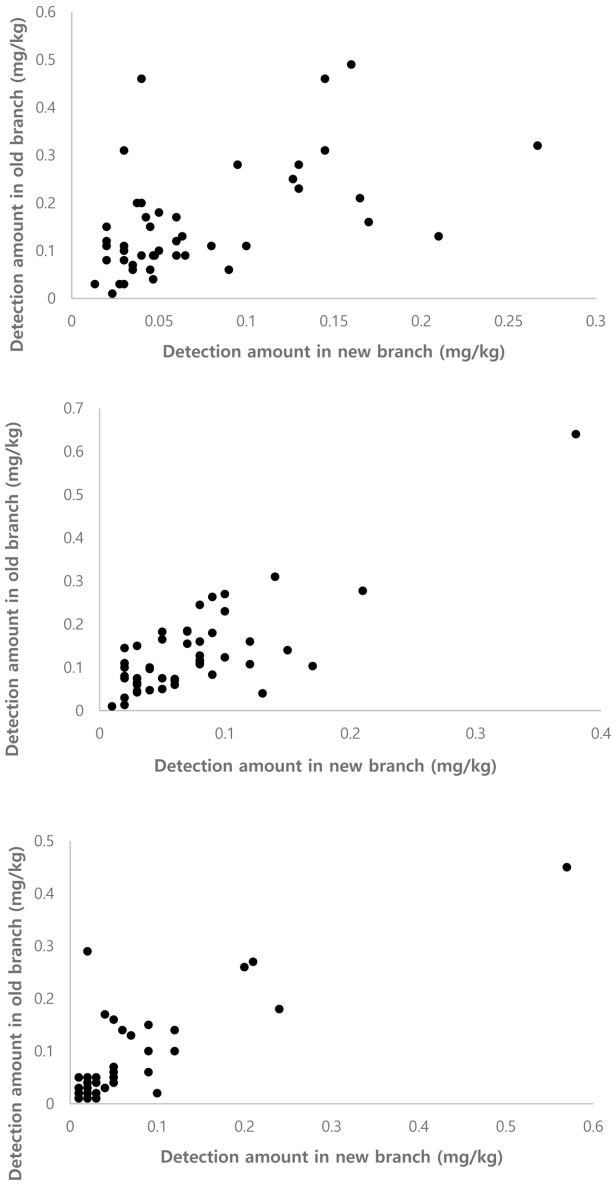

Fig. 1. Comparison of emamectin benzoate residues in new branch (branch formed in the same year of trunk-injection) with old branch (branch formed in before the year of trunk-injection) of emamectin benzoate in *Pinus densiflora*. (A); Injection year, (B); one year after injection, (C); two years after injection.

6.61, P=0.0071). 실제 잔류량은 Table 5와 같이 3년차에서만 수간 상부의 잔류량이 0.027ppm으로 수간 하부와 통계적인 차이를 보였다(df=2, 18, F=3.9, P=0.0391).

수간 위치별에 따라 검출된 emamectin benzoate의 신초를 제외한 가지에서의 검출 비율은 Table 6과 같이 3년 동안 수간 하부에서의 검출 비율이 높았다(1년차; df=2, 12, F=1.46, P=0.2709, 2년차; df=2, 15, F=13.87, P=0.0004, 3년차; df=2, 18, F=14.08, P=0.0002). 신초를 제외한 가지부분에서 잔류량은 2차년도(df=2, 15, F=5.35, P=0.0177)와 3차년도(df=2, 18, F=5.24, P=0.0161)에 수간 상부 가지가 통계적으로 유의하게 낮은 잔류량을 보였다(Table 7).

가지 방위별 잔류량

가지 방위별에 따른 emamectin benzoate의 검출량도 조사 대상 시료별에 따라 검출량의 절대량에 차이를 보여 동일 나무주사 대상목에서 가지 방위별 시료의 상대적 잔류량의 비율로 환산하여 조사하였다. 가지의 방위별에 따른 나무주사 한 emamectin benzoate의 신초부분에서 검출비율은 Table 8과 같이 차이가 없었다(1년차; df=3, 40, F=1.59, P=0.2061, 2년차; df=3, 60, F=1.34, P=0.2687).

신초와 신초 이외 가지부분에서의 잔류량 비교

가지에서 신초와 신초 이외 가지 부분의 약제잔류량을 비교하기 위하여 년차별 결정 계수를 구한 결과 1년차에는 0.285이었으나 2년차와 3년차에는 0.624과 0.663으로 높게 나타났다(Fig. 1).

고 찰

Emamectin benzoate 나무주사 시 2년차까지는 생존하는 소나무재선충이 없었으나 3년차에는 emamectin benzoate 9.7% 직경 6 mm 천공 주사 처리에서 3그루와 emamectin benzoate 2.15% 직경 10 mm 천공 주사 처리에서 1그루에서 생존하는 선충이 발견되었지만 평균 1.4마리와 6.3마리의 선충이 확인되어 무처리의 88.1마리에 비해서는 현저히 낮았고, 절단 가지 접종에서는 전체적으로 생존하는 선충이 없었다(Table 2). 또한 3년동안 emamectin benzoate의 잔류량 조사 시 신초에서는 잔류량이 해마다 감소하는 경향을 보였으나 전체 가지부의 잔류량은 2년차와 3년차에 차이가 없었다(Table 3). 따라서 전체적으로 나무주사 한 emamectin benzoate의 잔류는 3년간 수체 내에서 소나무재선충의 증식을 억제 시킬 수 있는 수준으로 유지된다고 판단되는데 개별 처리나무별에 따라 잔류량의 편차가 심한 단점이 있었다. Emamectin benzoate의 약효 및 잔류와 관련된 연구로 일본에서는 m^3당 10 g 나무주사 시 곰솔과 소나무에서 3년간 소나무재선충 예방효과가 있음을 입증하였고(Takai et al.,

2003), 실제 2~3년생 가지에서 나무주사 27개월 후에 95% 소나무재선충 증식억제 농도(IC_{95})인 0.031 ppm 이상의 emamectin benzoate가 검출되었다(Takai et al., 2004). 반면 우리나라에서는 Lee et al. (2009b)이 나무주사 후 당년과 다음 년도에 소나무재선충을 접종하여 증식억제 효과가 있음만 규명하였고, abamectin에 대해 곰솔에서 나무주사 180일 후 하부 가지에서 0.18 ppm, 주간 하부에서 0.05 ppm이 검출되었다는 보고만 있어 나무주사한 emamectin benzoate의 지속기간에 대한 명확한 근거가 없었다. 그러나 본 연구에서의 결과와 같이 나무주사 3년차에 당년생 신초가지를 비롯한 모든 가지부분에서 emamectin benzoate의 잔류량이 Takai et al. (2004)이 제시한 95% 소나무재선충 증식억제 농도 0.031 ppm보다 높게 검출되어 소나무재선충 억제 효과를 보이는 약량이 3년간 지속됨을 확인하였다. 또한 나무주사를 위한 천공 작업 시 대공주입에 사용되는 10 mm 천공과 소공주입에 사용되는 5 mm 천공 크기에 근접한 6 mm 천공 크기와 관계없이 잔류량과 소나무재선충 증식억제 효과가 확인되어 향후 약제주입기를 사용하는 방제에도 처리약량이 적은 약제를 천공부 직경을 작게하여 나무주사하는 것이 바람직할 것으로 판단된다. Cha et al. (2019)은 느티나무(*Zelkova serrata*)에서 수간주입 구멍의 크기가 수간주입 효율과는 상관이 없다고 하였고, 수간주입 구멍 주변의 변색부는 천공 구멍의 크기가 클수록 더 크다고 하여(Cha and Yun, 1995) 천공구멍의 크기가 약제의 이행에는 영향이 없지만 나무의 건강에는 부정적인 영향을 미치는 것으로 나타나 가능한한 천공 크기를 줄여 약제를 주입하는 것이 바람직하다고 하였다.

나무주사한 emamectin benzoate의 수간 내 분포는 전체적으로 나무주사 위치로부터 가까운 부분의 잔류비율이 높게 나타났는데 Takai et al. (2004)의 연구에서도 수고 20 m의 곰솔에서 접종부위에서 4 m와 2 m 부분의 잔류량이 6 m와 8 m 주간에 비하여 많아 본 연구의 결과와 동일한 경향을 보였고, abamectin의 경우도 곰솔에서 동일한 경향을 보였다(Lee et al., 2009a). 수관 상층부에 위치한 가지에서 나무주사 3년차의 잔류량은 평균 0.027 ppm으로 Takai et al. (2004)이 제시한 95% 소나무재선충 증식억제농도인 0.031 ppm에 미달되었는데 신초를 제외한 가지부분의 잔류량 분석에서는 평균 0.044 ppm으로 IC_{95} 농도를 상회하였다. 또한 가지별 잔류량도 년차와 관계없이 IC_{95} 농도 이하의 잔류량을 보이는 가지들은 존재하였다(Fig. 1). 따라서 잔류량이 소나무재선충에 대한 증식억제 농도 이하의 약제가 잔류하는 가지에 소나무재선충이 감염될 경우 충분한 증식억제가 이루어지지 않을 수 있지만 수간이나 주변의 가지에는 증식을 억제할 수 있는 수준의 약량이 잔류되기 때문에 수간 전체로 소나무재선충이 확산되지는 않을 것으로 판단된다. 실제 소나무재선충 접종 시 소수의 소나무재선충이 확인된 개체목들에서도 고사는 일어나지 않았다.

가지의 방위에 따른 잔류비율은 차이를 보이지 않았는데 Takai et al. (2004)이 나무주사 대상목의 수관을 높이별로 원판을 잘라 네 부분으로 잔류량을 비교한 결과에서도 원판의 위치에 따라 잔류량의 편차를 보여 특정 부분에 일관되게 잔류가 많이 되는 경향은 보이지 않았으며 일부 낮은 위치의 가지에서는 잔류가 되지 않는 경우도 있어 높이나 위치에 따라 불균일한 잔류를 개선하기 위해서는 대경목의 경우 주입구멍의 수를 늘릴 필요성을 제기하였다. 전술한바와 같이 수간주입에 영향을 미치는 요인들은 다양한데 동일한 방법으로 동일한 약제를 동일약량으로 처리하여도 잔류량의 편차를 보이는 것은 소나무와 전나무와 같은 겉씨식물 목질부가 가지고 있는 내부구조적 특성에 기인할 것으로 생각된다. 소나무와 같은 겉씨식물 목질부는 상대적으로 크기가 작은 헛물관으로 이루어진 무공재로 물이 헛물관에 있는 벽공을 통해 옆 세포로 이동하며 사선방향으로 상승하기 때문에(Claney, 1986) 대경목의 경우 주입약제 이동의 사각지대가 생겨 잔류량이 적거나 없을 수 있다. Takai et al. (2004)도 곰솔에서 나무주사한 emamectin benzoate의 수체 내 불균일성을 개선하기 위해 주입공의 수를 늘리는 것을 제안하였다.

나무주사 약제의 수체 내 잔류량은 나무주사 약제가 수체 내에서 통도조직을 따라 이동하는 특성에 의해 차이가 날수 있어 잔류량 조사를 위한 시료 채취 위치에 따라 영향을 받을 수 있다. 소나무재선충의 매개충인 솔수염하늘소나 북방수염하늘소는 우화 탈출 뒤 신초부분의 수피를 주로 갉아먹는데 2년생지나 3년생지를 갉아먹기도 한다. 따라서 매개충으로부터 전파가 처음 이루어지는 가지는 당년생 신초부분이 주가 되기 때문에 이 부분에 잔류 약량이 많을 경우 초기에 소나무재선충의 증식을 효과적으로 억제할 수 있을 것이다. 나무주사 당년에는 신초의 잔류량이 다른 2~3년생 가지에 비하여 높았으나 2년차와 3년차에는 신초보다 2~3년생 가지의 잔류량이 많았는데 신초에서 증식된 선충이 2년생지와 3년생지로 확산되어 수간전체로 확산되어야 고사가 일어나는 점을 감안할 때 나무주사 2년차와 3년차에 2~3년생 가지보다 신초에 잔류량이 많은 부분이 선충 증식 억제 효과에 크게 작용할 것으로는 판단되지 않는다. 다만 매개충 방제를 대상으로 하는 나무주사 약제의 경우 이러한 부분이 중요할 것으로 생각된다. 당년생 신초와 2~3년생 가지부분을 구분하여 약제 잔류량을 조사하여 가지 수령별 상관관계를 조사한 결과 1차년도에는 결정계수가 낮았으나 2차년도와 3차년도에는 0.6이상의 비교적 높은 상관관계를 보였다. 따라서 나무주사 후 잔류량 분석을 위한 시료 채취 시 수간 상, 중, 하부의 가지를 하나씩 절취하여 동일 년령대의 소가지를 채취하는 것이 필요할 것으로 판단되며 만일 잔류분석을 위해 하나의 가지만을 선택하여 시료를 조제할 경우

동일 년생의 소가지를 최대한 많이 채취하는 것이 필요할 것으로 생각된다.

나무주사 한 emamectin benzoate는 2.15%나 9.7% 모두 3년간 소나무재선충 증식 억제 효과를 보였으며 나무주사 천공구멍의 크기와 상관없이 선충증식 억제효과와 0.034 ppm 이상의 잔류량을 보였다. 따라서 약제 주입기를 사용한 나무주사에도 천공 드릴의 직경이 작은 것을 이용할 것을 제안하며 잔류분석용 시료채취는 수관 위치와 잔가지의 년생을 고려하여 동일 한 조건의 가지를 선택할 것을 추천한다.

감사의 글

본 연구는 2019년 신젠타의 연구비 지원에 의하여 수행되었다. 야외 조사와 실내실험에 도움을 준 정문기, 김현국, 나희빈, 안현정과 Mwamula Abraham Okki 박사에 감사를 표합니다.

Author Information and Contributions

Oh-Gyeong Kwon, Kyungpook National University, Doctor student.

Young Hack Jung, SM Biovision Co., PhD.

Sang Myeong Lee, SM Biovision Co., PhD.

Dong Soo Kim, National Institute of Forest Science, PhD.

Byeongjin Cha, Chungbuk National University, Professor.

DongWoon Lee, Kyungpook National University, Professor, ORCID http://orcid.org/0000-0001-9751-5390.

Research design; Kwon O, Lee SM, Kim DS, Lee DW, Investigation; Kwon O, Jung YH, Data analysis; Kwon O, Lee SM, Kim DS, Cha B, Lee DW, Writing – original draft preparation; Lee DW, Writing – review and editing; Kwon O, Jung YH, Lee SM, Kim DS, Cha B.

이해상충관계

저자는 이해상충관계가 없음을 선언합니다.

Literature Cited

Cha B, Han S, Kim KW, Kim DS, Lee D, 2020. Improving strategies for trunk injection considering tree anatomy and physiology. Korean J. Pestic. Sci. 24(2):218-230. (In Korean)

Cha B, Kim M, Kim J, Kim C, Lee KJ., 2019. Influence of the injection wound size and the crown condition on the trunk-injection efficiency in Zelkova trees. J. Agricul. Life Sci. 53(1):73-84. (In Korean)

Cha BJ, Yun JK., 1995. The size of injection wound, tree diameter, and injection wound healing of a tree. Jor. Korean For. Soc. 84(1):22-30. (In Korean)

Chaney WR, 1986. Anatomy and physiology related to chemical movement in trees. J. Arboric. 12(4):85-91.

Kamata N, 2008. Integrated pest management of pine wilt disease in Japan: tactics and strategies. pp.304-322. In pine wilt disease. (eds. Zhao BG., Futai F., Sutherland JR., Takeuchi Y.), Spring. Tokyo, Japan.

Korea Forest Research Institute, 2004. Easy-to-understand pine wood nematode. Korea Forest Research Institute, Seoul. Korea. (In Korean)

Korea Forest Service, 2020a. 2020 statistical yearbook of forestry. Korea Forest Service, Daejeon, Korea (In Korean)

Korea Forest Service, 2020b. Prevention guidelines for pine wood nematode. Korea Forest Service, Daejeon, Korea. (https://www.forest.go.kr/kfsweb/cop/bbs/selectBoardArticle.do?bbsId=BBSMSTR_1069&mn=NKFS_06_09_01&nttId=3149198) (Accessed Mar. 1, 2021)(In Korean)

Lee SM, Kim DS, Kim CS, Cho KS, Choo HY, et al., 2009a. Persistence and distribution of trunk-injected abamectin in *Pinus thunbergia* and *Pinus koraiensis* tissues. Korean J. Pestic. Sci. 13(3):190-196. (In Korean)

Lee SM, Kim DS, Lee SG, Park NC, Lee DW, 2009b. Selection of trunk injection pesticides for preventive of pine wilt disease by *Bursaphelenchus xylophilus* on Japanese black pine (*Pinus thunbergii*). Korean J. Pestic. Sci. 13(4):267-274. (In Korean)

SAS/STAT® 9.3 user's guide, 2011. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA

Sinclair WA, Lyon HH, 2005. Diseases of trees and shrubs-2nd ed. Cornell University Press, Ithaca, USA.

Shin WS, Jung YH, Lee SM, Lee CM, Lee CJ, et al., 2015. Development of effective screening method for efficacy test of trunk injection agents against pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* in Japanese black pine, *Pinus thunbergii*. Korean J. Pestic. Sci. 19(4):440-449. (In Korean)

Takai K, Suzuki T, Kawazu K., 2003. Development and preventative effect against pine wilt disease of a novel liquid formulation of emamectin benzoate. Pest Manag. Sci. 59:365-370.

Takai K, Suzuki T, Kawazu K., 2004. Distribution and persistence of emamectin benzoate at efficacious concentrations in pine tissues after injection of a liquid formulation. Pest Manag. Sci. 60:42-48.

Yano S., 1913. Investigation on pine death in Nagasaki prefecture. Sanrin-Kouhou. 4:1-14. (In Japanese)

Zhao BG, Futai K, Sutherland JR, Takeuchi Y., 2008. Pine wilt disease. Springer, Tokyo, Japan. Pp.2-4.
Rural Development Administration, 2021. Pesticide safety information system. Rural Development Administration. Jeonju, Korea. http://psis.rda.go.kr/psis/agc/res/agchmRegistStusLst.ps. (Accessed Mar. 1, 2021)(In Korean)

소나무(*Pinus densiflora*)에서 emamectin benzoate 나무주사 시 천공 직경에 따른 소나무재선충(*Bursaphelenchus xylophilus*) 증식억제효과 및 잔류량 비교

권오경[1] · 정영학[2] · 이상명[2] · 김동수[3] · 차병진[4] · 이동운[1]*

[1]경북대학교 생태과학과, [2]㈜에스엠바이오비전, [3]국립산림과학원 산림바이오소재연구소, [4]충북대학교 식물의학과

요 약 소나무재선충(*Bursaphelenchus xylophilus*) 예방 나무주사제로 사용되는 emamectin benzoate의 나무주사 시, 천공구멍의 크기(10 mm와 6 mm)가 소나무재선충 증식억제에 미치는 영향과 잔류량에 미치는 영향을 3년간 조사하였다. 천공구멍의 크기에 따른 emamectin benzoate의 약효와 잔류량은 차이를 보이지 않았으며 3년간 소나무재선충 증식 억제 효과가 있었다. 잔류량은 조사하는 개체별로 차이가 있었으나 나무주사 기간이 오래 될수록 줄어드는 경향을 보여 3년차에 신초 내 잔류량은 emamectin benzoate 2.15% 처리에서 0.037 ppm이 검출되었다. 잔류량은 가지의 방향에 따라서는 차이가 없었고, 수관 상부에서 상대적으로 잔류량이 적었다. Emamectin benzoate 나무 주사 시 천공구멍의 크기에 따라 약효와 잔류량에 차이가 없어 향후 나무주사 시 천공구멍의 크기를 작게 할 것을 권장한다. 또한 잔류분석을 위한 시료 채취 시 동일 수관 높이부분에서 복수의 가지를 대상으로 1~3년생 가지를 고루 섞어 채취할 것을 권고한다.

색인어 나무주사, 소나무재선충, 잔류, 지속성, 천공구멍