

최 종
연구보고서

팽이 및 느타리버섯의 갈반병 및 해충의
종합적 방제 기술 개발

Development of integrated control agent of insect pest
and brown spot against oyster and winter mushroom

연구기관
동아대학교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “팽이 및 느타리버섯의 갈반병 및 해충의 종합적 방제 기술 개발
과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007 년 5 월 24 일

주관연구기관명 : 동아대학교
총괄연구책임자 : 손 홍 대
세부연구책임자 : 진 병 래
연 구 원 : 계 중 쟁
연 구 원 : 최 용 수
연 구 원 : 위 아 동
연 구 원 : 박 남 숙
연 구 원 : 이 광 식
연 구 원 : 김 보 연
연 구 원 : 김 영 주
연 구 원 : 추 영 무
협동연구기관명 : 서울대학교
협동연구책임자 : 제 연 호
연 구 원 : 심 희 진
연 구 원 : 이 명 순
연 구 원 : 강 중 남
연 구 원 : 박 수 진

요 약 문

I. 제 목

팽이 및 느타리버섯의 갈반병 및 해충의 종합적 방제 기술 개발에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1) 기술적 측면

농가 고소득 작목으로 확고한 위치를 차지하고 있는 느타리버섯 및 팽이버섯은 매년 재배농가와 생산량 및 시장규모가 급증하고 있다. 이러한 버섯 재배에 있어서 가장 큰 문제점으로 대두되고 있는 것은 주요병해로 세균성갈반병과 주요해충으로 버섯파리류 해충의 극심한 직·간접적인 피해를 들 수 있다.

본 연구진에 의해 이미 보고된 우리나라 팽이버섯 및 특히 느타리버섯 재배지에서 대발생하는 버섯파리류 해충은 *Lycoriella mali* 및 *Coboldia fuscipes*로, 그 피해정도는 생산량의 약 30% 이상에 달하고 있는 것으로 추정되고 있다. 느타리버섯 재배 시설 특성상 동일장소에서 연작되며, 재배사의 환경조건이 버섯파리류 해충이 연중 발생할 수 있는 호조건을 제공하기 때문에 그 발생속도가 빠르고 피해가 급증하고 있는 실정이다.

또한 이들 버섯재배에 있어서 가장 문제시되고 있는 주요병해인 세균성갈반병 (*Pseudomonas tolaasii*, *agarisi*)은 지속적으로 발생하고 있는 난방제 병해로 전염원 및 전염경로를 시판종균, 재배사, 관수용 물, 균상배지 및 버섯파리로부터 조사 보고되어있다. 이중 주요 전염원은 현재까지 균상배지, 관수용 물 및 버섯파리가 작용하고 있다.

특히 중요한 것은 버섯파리류가 해충으로서 유충의 직접적인 피해뿐만 아니라 성충에 의한 느타리버섯의 주요 병해인 세균성갈반병 및 푸른곰팡이병 등을 전염시키는 중요한 매개체로 작용하고 있다는 것이다.

그러나 버섯재배시 항상 발생하는 주요병해 및 주요해충에 대한 적절한 방제가 어려운 현실이다. 약해 문제뿐만 아니라 무공해농산물로 잘 알려진 버섯에 적절한 화학적인 방제대책이 세우기 역시 힘든 형편이다. 또 국내·외에서 주요병해 및 해충에 대한 생물학적인 방제법의 개발에 대한 관심과 연구가 이루어지고 있으나 아직 그에 대한 체계적인 방제법이 확립되기 위해서는 보다 많은 그리고 지속적인 연구와 기술 개발이 요구되어진다.

실재 버섯재배농가 현장에서 주요병해 및 해충 발생에 의한 피해는 거의 무방비 상태로 즉각적인 폐기로 피해를 최소화하고 있으나, 피해 균상이나 배지를 방치함으로써 2차 감염원으로 작용하고 있는 실정이다.

따라서 우리나라의 팽이 및 느타리버섯 재배 농가, 생산량 및 시장의 규모 등에 따른 주요병해인 세균성갈반병과 주요해충인 버섯파리류에 의한 피해정도와 발생양상 및 전염경로 그리고 화학적 방제의 곤란함 등을 고려할 때, 본 과제에서 수행코자 하는 팽이 및 느타리버섯의 주요세균병 및 주요해충의 종합적 방제 기술 개발 연구에 따른 버섯재배사내에서 세균성갈반병과 버섯파리류 해충을 동시에 방제할 수 있는 환경친화적인 종합적 방제 기술 개발은 급선무이다.

2) 경제·산업적 측면

기능성 및 무공해농산물로 잘 알려진 버섯은 농산물 개방화에 따른 농가 고소득 작목으로 아울러 수출 유망작목으로 충분한 경쟁력을 갖고 있어 주목받고 있다. 우리나라 전체 생산량은 2000년 농림부 통계로 17만여 톤으로서 느타리가 50% 정도이고 다음은 표고, 팽이, 양송이, 영지 순이다. 느타리는 전국에서, 표고는 부여, 영동, 장흥, 진안 지역에서, 양송이는 부여 일대와 경주 지역에서 주로 생산되며 팽이는 전국에서 규모화 기업화되어 있다. 점차 약용버섯과 새송이버섯의 생산이 늘어나고 있다.

이러한 규모로 볼 때, 버섯 재배지에서 주요병해인 세균성갈반병과 30% 이상으로 추정되고 있는 주요해충 버섯파리류의 직·간접적인 피해는 실로 크다 하겠으며, 이는 경제·산업적 손실로 환경친화적이고 종합적인 방제 기술 개발은 당연한 시급과제라 여겨진다.

느타리버섯은 현재까지 전량 내수용으로 발전되어 왔고, 주요 농산물로 확고한 위치를 차지하고 있다. 그러나 느타리버섯은 재배 시설 상의 문제로 인해 고품질의 생산이 어렵고 병해충 발생 등 재배 환경요인에 따른 가격의 진폭이 심하고 안정된 생산의 어려움이 문제점으로 지적되고 있으나, 재배시설 및 환경관리의 개선과 환경친화적인 병해충 방제 기술 등이 이루어지면 국내 수요는 물론이고 수출품목으로 유망하다고 분석되고 있다.

3) 사회·문화적 측면

버섯은 소득 수준 및 식생활 수준 향상에 따른 소비량이 급증하고 있으며, 특히 최근에는 이들 버섯류에서 항암효과와 면역조절 활성을 증가시키는 기능이 밝혀짐에 따라 자연 건강식품으로 버섯류의 소비가 증가하고 있다. 특히 본 과제의 환경친화적 방제 기술에 의해 대량생산된 버섯은 깨끗한 먹거리로서 차별화와 고급화가 가능하다.

느타리 및 팽이버섯의 시장 규모와 고소득 추천 작목으로 매년 증가 일로로 단지화되고 있는 버섯 재배농가 현장에서 주요 병해충의 피해 호소에 대한 방제 대책의 영농지도책이 절실히 요구되고 있는 실정이다.

또한 최근 환경문제에 대한 관심 고조로 환경친화적 또는 환경농업이 범세계적 추세이기 때문에 환경친화적 지속 농업 기술 개발은 안정된 농업 기반 조성에 따른 농촌경제와 고용증대뿐만 아니라 수출농업 육성에 따른 국가경쟁력 확보에도 중요한 역할을 할 것이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 팽이 및 느타리버섯 재배지에서 가장 피해가 큰 갈반병 및 해충 (버섯파리류 해충)의 종합적 방제 기술 개발로 그 연구개발 내용 및 범위는 다음과 같다.

1. 생물검정 및 재배사 실증시험
2. 버섯파리류 해충 특이 Bt 656-3 균주의 개량
3. 항세균성 및 살충성 미생물 균주의 탐색, 대량배양 및 제제화

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 버섯파리류 해충 특이 Bt 656-3 균주의 개량

호박벌, *Bombus ignitus*로부터 4개의 항세균성 유전자 (apidaecin, abaecin, hymenoptaecin, 및 defensin)를 클로닝 하였다.

호박벌 hymenoptaecin (BiHym) 유전자는 1218 bp, 1개의 intron과 2개의 exon으로 이루어져있으며 134개의 아미노산을 코드한다. Mature BiHym는 98개의 아미노산으로 구성된다. Defensin (BiDef) 유전자의 genomic 구조는 2개의 intron과 3개의 exon으로 구성된 1958 bp의 길이를 가진며 96개의 아미노산을 code 한다. Mature BiDef 단백질은 32개의 아미노산으로 구성되며 C...CXXXC...C...CXC와 같이 cysteine이 반복되는 α/β motif를 가진다. Abaecin (BiAbae) 유전자는 174 bp의 길이로 58 개의 아미노산으로 구성되어 있다. Mature BiAbae는 39개의 아미노산으로 구성된다. Apidaecin (BiApid) 유전자는 179개의 아미노산을 코드하는 537 bp이며 mature BiApid는 17개의 아미노산으로 구성된다. Northern blot과 RT-PCR 분석에서 4 종류의 항세균성 유전자는 다양한 조직에서 발현되었으며 성-특이적으로 발현되었다.

17-residue BiApid를 베쿨로바이러스에서 발현시키고 정제하여 재조합 단백질 BiApid의 MIC 값을 측정하였다. 그 결과, $>20 \mu\text{M}$ to *E. coli*에 대하여 $>20 \mu\text{M}$ 그리고 *P. tolaasi*에 대하여 $>125 \mu\text{M}$ 의 농도로 나타났으며 그람음성균 특이적으로 항세균성 활성을 나타내었다.

방제제로써 *Bacillus thuringiensis* 생산물이 가진 주된 문제점은 버섯파리를 포함한 일부 곤충에만 한정되어있다. 이러한 이유로, *B. thuringiensis*, Bt 656-3 균주를 개량하기 위하여 Hpa II promoter에 조절되는 pLip-BiApid vector를 형질전환하고 재조합 Bt 656-3-BiApid는 PCR 및 Southern blot 분석을 통하여 선별하였다. 개량된 *B. thuringiensis* 656-3 균주는 항세균성 단백질 BiApid를 발현하는 균주를 제작하여 버섯파리를 포함한 갈반병에도 항세균성을 나타내었다.

버섯파리와 갈반병의 종합적 방제제를 위한 또 하나의 전략으로, *Pseudomonas tolaasii*에 강한 항세균성 활성을 나타내는 *Brevibacillus brevis*를 pHT1K-1Ac vector로 형질전환 하였다. 형질전환된 *B. brevis* 3101-3 균주는 *B. thuringiensis*의 곤충특이 독소 유전자인 *cryIAc* 유전자를 안정적으로 발현하였다. 이러한 결과는 항세균성 미생물에 곤충특이적인 독소 유전자를 발현할 수 있는 가능성을 제시해 준다.

2. 항세균성 및 살충성 미생물 균주의 탐색, 대량배양 및 제제화

다양하게 채집한 흙 샘플에서 모기유충과 버섯파리에 독성을 갖는 *Bacillus thuringiensis* DT-5, DT-6, DT-8 및 DT-10 균주를 선별하였다. *Bacillus thuringiensis* DT-6, DT-8 및 DT-10은 *Bt* subsp. *morrisoni* 와 *Bt* subsp. *ostriniae*의 H-antiserum과 반응하였으나, *B. thuringiensis* DT-5는 다른 어떤 H-antiserum과도 반응이 나타나지 않는 새로운 *Bt* 균주로 사료되었다. 이들 중, *B. thuringiensis* DT-10는 버섯파리에 대한 가장 높은 독성을 보였다. *B. thuringiensis* DT-10 균주의 플라스미드와 단백질 특성은 subsp. *morrisoni* PG-14와 비슷하였다.

B. thuringiensis 균주를 개량하기 위하여 pUC ori, multi cloning site 및 resistance gene를 포함한 pHT1K shuttle vector를 제작하였다. pHT1K는 pHT3101 보다 5 - 13배 높은 형질전환율을 보였다. pHT1K vector를 이용하여 *cryIAc* 유전자는 약 133 kDa으로 발현되었으며, pHT1K-1Ac의 발현정도는 pProAc와 유사하였다. 이러한 결과는 pHT1K vector는 *B. thuringiensis*에서 외래 유전자를 발현하는 vector로써 그 잇점이 있다.

*P. tolaasii*에 대하여 항세균성 활성을 보이는 2개의 균주를 분리하고 16S rRNA 염기서열을 분석하였다. 그 결과, 하나는 *Brevibacillus brevis*로, 나머지 하나는 *Brevibacillus formosus*로 나타났다. *B. brevis* 균주는 *B. formosus* 보다 갈반병에 대

한 강한 활성을 나타내었으며 본 연구에서 갈반병에 대한 미생물 방제제의 하나로 연구되었다.

3. 생물검정 및 재배사 실증시험

버섯에서 갈반병을 유발하는 병원균을 버섯재배농가에서 채집한 흙으로부터 분리하였다. 2개의 균주 P9과 P10은 배색침강선 방법과 형광 분리법에 의해 분리하였다. 2개의 균주 P9과 P10은 느타리버섯 및 팽이버섯에 갈반병을 유도하였으며, 16S rRNAs 염기서열 분석과 tolassin 유전자 분석에서 유전적으로 *Pseudomonas tolaasii* 와 매우 유사하였다.

개량 Bt 656-3 균주의 버섯파리와 갈반병에 대한 살충성 및 항세균성 검정을 실시하였다. *B. thuringiensis* 656-3-BiApid의 제제화를 위하여 독소와 포자를 포함한 침전물을 동결건조 시키고 1 m² 당 5 × 10⁷ cfu를 포함한 제제를 분무하였을 때, 버섯파리에 대한 살충성과 갈반병에 대한 항세균 활성을 갖는 것으로 나타났다.

4. 활용 건의

선발된 항세균성 및 개량된 살충성 Bt와 그 제제는 화학적 방제제에 비해 적은 연구 개발비와 비교적 간단한 등록 규정으로 단시간에 개발이 가능하기 때문에 관련 기업의 생물연구팀과 상호협력 하에 시작품을 제작·평가하고 균주와 제제 특허 등록과 함께 관련 기업에 이전함으로써 산업화를 추진하여 생물농약으로 등록하고 현장에 보급하며 국외에 수출을 추진하고자 한다. 현재 문제시 되고 있는 화학농약이 아닌 친환경적이며 버섯의 유전자 변형을 일으킨 GMO 작물이 아닌 방제제로 사용되고 있는 Bt의 유전자 변형이므로 상품에 대한 안정성 또한 문제시 되지 않으므로 실용화 가능함을 입증하였다.

기존에 보고한 느타리버섯 재배사내 버섯파리류 해충의 환경친화적 방제제 개발 연구에서 보고된 Bt 656-3 균주는 이미 춘천시농업기술센터에 균주를 분양하고 버섯파리 방제를 위한 제제화 기술 등을 기술 이전하여 버섯재배 농가에 Bt 656-3 균주가 사용되고 있다. 따라서 본 연구에서 개발한 개량 Bt 656-3-BiApid는 버섯파리와 갈반병에 대한 방제제로서 기술이전이 가능하리라 사료되며, 새로 발견한 *Brevibacillus brevis* 균주 또한 갈반병에 대한 강한 항세균성을 가지므로 방제제로서 실용화가 가능함을 기대한다.

SUMMARY

I. Title

Development of integrated control agent of insect pest and brown spot against oyster and winter mushroom

II. Objectives and Significance of the Research

Mushrooms have long been consumed as foods and herbs, and consumption has steadily increased. Among the marketed mushrooms in Korea, oyster and winter mushroom are the most important in respect to the number of farmhouses and the market share. But brown spot and arthropod infections are the two major problems of mushroom culture by conventional farmhouse operations.

Mushroom flies, especially *Lycoriella mali* (Diptera: Sciaridae) and *Coboldia fuscipes* (Diptera: Scatopsidae), cause severe damage to mushroom: larvae feed on the mycelium and fruitbody of mushroom and adult flies transport germs such as nematodes, mites and mold spores. *L. mali* is the most abundant mushroom pest, occurring all through the year in most mushroom houses in of Korea. And brown spot of oyster mushroom is one of the most severe and epidemic disease in oyster mushroom cultivation in Korea.

In spite of it's severe damage, the chemical control agents of mushroom flies and brown spots are limited. Therefore, biological control is showing attention as a desirable control method. In previous study, we reported an insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* 656-3 strain in oyster mushroom house.

In this study, to improve this biological control, we developed the effective control methods, integrated control agent producing anti-bacterial peptides of insect pest as well as brown spot.

III. Contents and Scope of the Research

Thus, the objective of the present work was to develop the integrated control agent of insect pest and brown spot against oyster and winter mushroom. There are three basic strategies of integrated control. These are:

- 1) Improvement of Bt 656-3 for integrated control of mushroom flies and brown spot;
- 2) Screening, mass-culture of antibacterial and insecticidal microorganisms;
- 3) Insecticidal and antibacterial effect of *B. thuringiensis* 656-3 and *Brevibacillus brevis* in mushroom house.

IV. Results of the Research and Suggestion for the Application

Part 1. Development of Bt 656-3 for integrated control of mushroom flies and brown spot

Four antibacterial peptide genes (apidaecin, abaecin, hymenoptaecin, and defensin) were cloned from the bumblebee, *Bombus ignitus*.

The *B. ignitus* hymenoptaecin (BiHym) gene spans 1218 bp and consists of one intron and two exons coding for 134 amino acid residues. The mature BiHym peptide was 98 amino acid residues long. The *B. ignitus* defensin (BiDef) gene spans 1958 bp and consists of two introns and three exons coding for 96 amino acid residues. The mature BiDef peptide was 32 amino acid residues long and had a cysteine-stabilized α/β motif of C...CXXXC...C...CXC consensus sequence, similar to insect defensins. The *B. ignitus* abaecin (BiAbae) gene spans 174 bp and consists of a single exon coding for 58 amino acid residues. The mature BiAbae peptide was 39 amino acid residues long. The *B. ignitus* apidaecin (BiApid) gene spans 537 bp and consists of a single exon encoding for 179 amino acid residues. The mature BiApid was 17 amino acid residues long. Northern blot and RT-PCR analyses showed that the four antibacterial peptide genes were expressed in various tissues and showed a sex-dependant expression manner. The

17-residue BiApid was expressed in baculovirus-infected insect cells and the purified recombinant 17-residue BiApid showed minimal inhibitory concentration values of $>20 \mu\text{M}$ to *E. coli* and $>125 \mu\text{M}$ to *P. tolaasi*, indicating that the 17-residue BiApid has anti-Gram-negative activity.

The main problems with *Bacillus thuringiensis* products for pest control are limited to mushroom flies and other insects. For this reason, we constructed a *B. thuringiensis* 656-3 strain that expressed an antibacterial BiApid gene, the product of which had activity against mushroom flies as well as brown spot. To develop *B. thuringiensis*, Bt 656-3 was transformed with pLip-BiApid under the regulation of Hpa II promoter. The transformed Bt 656-3-BiApid was screened by PCR and Southern blot analysis and showed antibacterial activity against brown spot.

As another strategies for an integrated control of mushroom flies and brown spot, *Brevibacillus brevis*, showing high antibacterial activity to *Pseudomonas tolaasii*, was transformed with pHT1K-1Ac vector. The transformed *B. brevis* 3101-3 strain expressed a cry1Ac gene, one of the insecticidal proteins from *B. thuringiensis*, as a 130 kDa protein. This result suggests that there is the possibility to produce insecticidal protein in antibacterial microbial strains.

Part 2. Screening, mass-culture of antibacterial and insecticidal microorganisms

Bacillus thuringiensis DT-5, DT-6, DT-8 and DT-10, isolated from soil samples collected at various environmental places, showed high toxicity to dipteran insects, mosquito larvae and mushroom flies. *B. thuringiensis* DT-6, DT-8 and DT-10 reacted with the H antiserums of *Bt* subsp. *morrisoni* and *Bt* subsp. *ostrinae*, but *B. thuringiensis* DT-5, did not react with any antiserums, was expected as a new strain for an important resource of microbial agents. Of these, *B. thuringiensis* DT-10 showed the highest toxicity to mosquito and mushroom flies. The plasmid and protein profiles of *B. thuringiensis* DT-10 were similar to those of its reference strain, subsp. *morrisoni* PG-14.

To develop *B. thuringiensis* strain, pHT1K shuttle vector, containing pUC *ori*, multi cloning site and resistance gene for antibiotics, was constructed. pHT1K showed 5 to 13 fold high efficiency of transformation compared to pHT3101. SDS-PAGE showed *cry1Ac* was expressed as 133 kDa by using pHT1K vector. In addition, expression levels of pHT1K-1Ac and pProAc were similar. These

results suggest that pHT1K vector would be advantageous for the expression of a foreign gene in *B. thuringiensis*.

Two strains, showed high antibacterial activity to *P. tolaasii*, was isolated from soil samples and analyzed the 16S rRNA sequences. One of them was identified as *Brevibacillus brevis* and the other was identified as *Brevibacillus formosus*. *B. brevis* showed higher activity to *P. tolaasii* than *B. formosus* did. In this study, *B. brevis* was used as a new agent for control of brown spot.

Part 3. Insecticidal and antibacterial effect of *B. thuringiensis* 656-3 and *Brevibacillus brevis* in mushroom house

Pathogenic bacteria causing brown spot of mushroom were isolated from a mushroom farm. Using the white-line-in-agar (WLA), fluorescent pseudomonas were screened. Two isolate, P9 and P10, produced a positive WLA assay and caused brown lesions of oyster and winter mushroom. Genetic analyses of 16S rRNAs and tolassin suggested that P9 and P10 were genetically same and were closely related to *Pseudomonas tolaasii*.

Insecticidal and antibacterial effect of Bt 656-3 and *B. brevis* to mushroom flies and brown spot in mushroom culture chamber and mushroom house was assayed. Formulation of Bt 656-3 and *B. brevis* was sprayed at mushroom culture chamber and mushroom house. The results show the insecticidal effect to mushroom flies and the antibacterial effect to brown spot.

V. Suggestion for the application

The results of *Bacillus thuringiensis* 656-3-BiApid and newly isolated *Brevibacillus brevis* will be submitted for patent. Accordingly, the recombinant *B. thuringiensis* 656-3-BiApid strain could be effective for control of mushroom flies and brown spot and the novel *B. brevis* strain could be used as a new agent for control of brown spot. We expect that the the recombinant *B. thuringiensis* 656-3-BiApid strain may be useful in the development of integrated control agent of insect pest and brown spot against oyster and winter mushroom.

CONTENTS

SUMMARY	7
CONTENTS	11
Chapter 1. Introduction	15
Chapter 2. Current situation and problems in domestic and foreign technology	21
Chapter 3. Research contents and results	26
Section 1. Improvement of Bt 656-3 for integrated control of mushroom flies and brown spot	26
1. Materials and methods	26
1) Screening of antibacterial genes	26
2) Characterization and assay of a recombinant antibacterial peptide	29
3) Construction of a recombinant Bt 656-3 strain	31
4) Screening of the insecticidal and antibacterial Bt 656-3-BiApid strain	31
5) Formulation of Bt 656-3-BiApid	32
6) Insecticidal and antibacterial effect of Bt 656-3-BiApid	32
7) Construction of a recombinant <i>Brevibacillus brevis</i> strain	33
2. Results and discussion	34
1) Screening of antibacterial genes	34
2) Characterization and assay of a recombinant antibacterial peptide	49
3) Construction of a recombinant Bt 656-3-BiApid strain	52
4) Screening of the insecticidal and antibacterial Bt 656-3-BiApid strain	54
5) Construction of a recombinant <i>Brevibacillus brevis</i> strain	55
Section 2. Screening, mass-culture of antibacterial and insecticidal microorganisms	58
1. Materials and methods	58
1) Screening of novel insecticidal <i>Bacillus thuringiensis</i> strains	58
2) Screening of a novel antibacterial microbial strain	59

3) Characterization of insecticidal and antibacterial microbial strains	60
4) Characterization of the insecticidal genes of <i>Bacillus thuringiensis</i> strains	62
5) Construction of Bt - <i>E.coli</i> shuttle vector, expressing a foreign gene ...	64
6) Antibacterial effect of <i>Brevibacillus brevis</i> strain	65
2. Results and discussion	68
1) Screening of novel insecticidal <i>Bacillus thuringiensis</i> strains	68
2) Characterization of the insecticidal genes of <i>Bacillus thuringiensis</i> strains	78
3) Construction of Bt - <i>E.coli</i> shuttle vector, expressing a foreign gene	81
4) Characterization of a antibacterial microbial strain	85
 Section 3. Insecticidal and antibacterial effect of <i>B. thuringiensis</i> 656-3 and <i>Brevibacillus brevis</i> in mushroom house	 90
1. Materials and methods	90
1) Culture of mushroom flies and brown spot	90
2) Insecticidal and antibacterial assay	92
2. Results and discussion	93
1) Culture and supplement of mushroom flies, <i>Lycoriella mali</i> and <i>Cobordia fuscipes</i>	93
2) Culture and supplement of brown spot, <i>Pseudomonas tolaasii</i>	94
3) Insecticidal effect	103
4) Insecticidal and antibacterial effect of <i>B. thuringiensis</i> 656-3-BiApid formulation in mushroom house	104
 Chapter 4. Accomplishment and contribution	 107
 Chapter 5. Application scheme of the research	 109
 Chapter 6. References	 110

목 차

제 1 장 연구개발 과제의 개요	15
제 2 장 국내·외 기술개발 현황	21
제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과	26
제 1 절 버섯파리류 해충 특이 Bt 656-3 균주의 개량	26
1. 재료 및 방법	26
가. 항세균 유전자의 탐색	26
나. 재조합 항균단백질의 특성 및 활성 검정	29
다. 재조합 Bt 656-3 균주의 제작	31
라. 살충성 및 살균성 Bt 656-3 균주의 선발	31
마. 개량 Bt 656-3 균주의 제제화	32
바. 개량 Bt 656-3 제제의 실증 시험	32
사. 재조합 항세균성 미생물 (<i>Brevibacillus brevis</i>) 균주 제작	33
2. 결과 및 고찰	34
가. 항세균성 유전자 탐색	34
나. 재조합 항균단백질의 특성 및 활성 검정	49
다. 재조합 Bt 656-3 균주의 제작	52
라. 살충성 및 살균성 Bt 656-3 균주의 선발	54
마. 재조합 항세균성 미생물 (<i>Brevibacillus brevis</i>) 균주 제작	55
제 2 절 항세균성 및 살충성 미생물 균주의 탐색, 대량배양 및 제제화	58
1. 재료 및 방법	58
가. 살충성 미생물 균주의 분리	58
나. 항세균성 미생물의 선발	59
다. 선발 항세균성 및 살충성 미생물의 특성 분석	60
라. 선발된 Bt 균주의 살충성 유전자 탐색	62
마. Bt - <i>E.coli</i> shuttle vector의 제작과 외래 유전자 발현	64
바. 항세균성 미생물의 활성검정	65
2. 결과 및 고찰	68
가. 살충성 미생물의 분리	68

나. 선발된 Bt 균주의 살충성 유전자 탐색	78
다. Bt- <i>E.coli</i> Shuttle vector의 제작과 외래 유전자의 발현	81
라. 분리된 항세균성 미생물의 특성 분석	85
제 3 절 생물검정 및 재배사 실증시험	90
1. 재료 및 방법	90
가. 생물검정용 시료 확보	90
나. 살충력 및 항균력 검정	92
2. 결과 및 고찰	93
가. 생물검정용 버섯파리류 해충 (<i>L.mali</i> 및 <i>C. fuscipes</i>) 실내 사육 및 제공	93
나. 생물검정용 세균성갈반병 (<i>P. tolaasii</i>) 균주의 배양 및 제공	94
다. 살충력 검정	103
라. 실증시험	104
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	107
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	109
제 6 장 참고문헌	110

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

1. 기술적 측면

농가 고소득 작목으로 확고한 위치를 차지하고 있는 느타리버섯 및 팽이버섯은 매년 재배농가와 생산량 및 시장규모가 급증하고 있다. 이러한 버섯 재배에 있어서 가장 큰 문제점으로 대두되고 있는 것은 주요병해로 세균성갈반병과 주요해충으로 버섯파리류 해충의 극심한 직·간접적인 피해를 들 수 있다.

본 연구진에 의해 이미 보고된 우리나라 팽이버섯 및 특히 느타리버섯 재배지에서 대발생하는 버섯파리류 해충은 *Lycoriella mali* 및 *Coboldia fuscipes*로, 그 피해정도는 생산량의 약 30% 이상에 달하고 있는 것으로 추정되고 있다. 느타리버섯 재배 시설 특성상 동일장소에서 연작되며, 재배사의 환경조건이 버섯파리류 해충이 연중 발생할 수 있는 호조건을 제공하기 때문에 그 발생속도가 빠르고 피해가 급증하고 있는 실정이다.

또한 이들 버섯재배에 있어서 가장 문제시되고 있는 주요병해인 세균성갈반병 (*Pseudomonas tolaasii*, *agarisi*)은 지속적으로 발생하고 있는 난방제 병해로 전염원 및 전염경로를 시판종균, 재배사, 관수용 물, 균상배지 및 버섯파리로부터 조사 보고되어 있다. 이중 주요 전염원은 현재까지 균상배지, 관수용 물 및 버섯파리가 작용하고 있다.

특히 중요한 것은 버섯파리류가 해충으로서 유충의 직접적인 피해뿐만 아니라 성충에 의한 느타리버섯의 주요 병해인 세균성갈반병 및 푸른곰팡이병 등을 전염시키는 중요한 매개체로 작용하고 있다는 것이다.

그러나 버섯재배시 항상 발생하는 주요병해 및 주요해충에 대한 적절한 방제가 어려운 현실이다. 약해 문제뿐만 아니라 무공해농산물로 잘 알려진 버섯에 적절한 화학적인 방제대책이 세우기 역시 힘든 형편이다. 또 국내·외에서 주요병해 및 해충에 대한 생물학적인 방제법의 개발에 대한 관심과 연구가 이루어지고 있으나 아직 그에 대한 체계적인 방제법이 확립되기 위해서는 보다 많은 그리고 지속적인 연구와 기술 개발이 요구되어 진다.

실제 버섯재배농가 현장에서 주요병해 및 해충 발생에 의한 피해는 거의 무방비 상태로 즉각적인 폐기로 피해를 최소화하고 있으나, 피해 균상이나 배지를 방치함으로써 2차 감염원으로 작용하고 있는 실정이다.

따라서 우리나라의 팽이 및 느타리버섯 재배 농가, 생산량 및 시장의 규모 등에 따른 주요병해인 세균성갈반병과 주요해충인 버섯파리류에 의한 피해정도와 발생양상 및 전

염경로 그리고 화학적 방제의 곤란함 등을 고려할 때, 본 과제에서 수행코자 하는 팽이 및 느타리버섯의 주요세균병 및 주요해충의 종합적 방제 기술 개발 연구에 따른 버섯재배사내에서 세균성갈반병과 버섯파리류 해충을 동시에 방제할 수 있는 환경친화적인 종합적 방제 기술 개발은 급선무이다.

2. 경제·산업적 측면

가능성 및 무공해농산물로 잘 알려진 버섯은 농산물 개방화에 따른 농가 고소득 작목으로 아울러 수출 유망작목으로 충분한 경쟁력을 갖고 있어 주목받고 있다. 우리나라 전체 생산량은 2000년 농림부 통계로 17만여 톤으로서 느타리가 50% 정도이고 다음은 표고, 팽이, 양송이, 영지 순이다. 느타리는 전국에서, 표고는 부여, 영동, 장흥, 진안 지역에서, 양송이는 부여 일대와 경주 지역에서 주로 생산되며 팽이는 전국에서 규모화 기업화되어 있다. 점차 약용버섯과 새송이버섯의 생산이 늘어나고 있다

이러한 규모로 볼 때, 버섯 재배지에서 주요병해인 세균성갈반병과 30% 이상으로 추정되고 있는 주요해충 버섯파리류의 직·간접적인 피해는 실로 크다 하겠으며, 이는 경제·산업적 손실로 환경친화적이고 종합적인 방제 기술 개발은 당연한 시급과제라 여겨진다.

느타리버섯은 현재까지 전량 내수용으로 발전되어 왔고, 주요 농산물로 확고한 위치를 차지하고 있다. 그러나 느타리버섯은 재배 시설 상의 문제로 인해 고품질의 생산이 어렵고 병해충 발생 등 재배 환경요인에 따른 가격의 진폭이 심하고 안정된 생산의 어려움이 문제점으로 지적되고 있으나, 재배시설 및 환경관리의 개선과 환경친화적인 병해충 방제 기술 등이 이루어지면 국내 수요는 물론이고 수출품목으로 유망하다고 분석되고 있다.

3. 사회·문화적 측면

버섯은 소득 수준 및 식생활 수준 향상에 따른 소비량이 급증하고 있으며, 특히 최근에는 이들 버섯류에서 항암효과와 면역조절 활성을 증가시키는 기능이 밝혀짐에 따라 자연 건강식품으로 버섯류의 소비가 증가하고 있다. 특히 본 과제의 환경친화적 방제 기술에 의해 대량생산된 버섯은 깨끗한 먹거리로서 차별화와 고급화가 가능하다.

느타리 및 팽이버섯의 시장 규모와 고소득 추천 작목으로 매년 증가 일로로 단지화되고 있는 버섯 재배농가 현장에서 주요 병해충의 피해 호소에 대한 방제 대책의 영농지도책이 절실히 요구되고 있는 실정이다.

또한 최근 환경문제에 대한 관심 고조로 환경친화적 또는 환경농업이 범세계적 추세이기 때문에 환경친화적 지속 농업 기술 개발은 안정된 농업 기반 조성에 따른 농촌경제

와 고용증대뿐만 아니라 수출농업 육성에 따른 국가경쟁력 확보에도 중요한 역할을 할 것이다.

제 2 절 연구개발의 내용 및 범위

1. 최종 연구 목표 및 연구 내용

- 팽이 및 느타리버섯의 갈반병 및 해충의 환경친화적, 종합적 방제 기술 개발
- 항세균성 및 살충성 미생물 균주의 탐색, 대량배양 및 제제화
 - 버섯파리류 해충 특이 *Bacillus thuringiensis* 656-3 (Bt 656-3) 균주의 개량
 - 생물검정 및 제제의 재배사 실증시험을 통한 균주 등록 및 특허 출원

2. 연차별 연구개발 내용 및 범위

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위	연구 개발 결과
1차 년도 (2004)	- 항세균성 및 살충성 미생물 균주의 탐색	- 국내 버섯재배지 토양 채집 - 채집 토양 시료로부터 해충 병원성 미생물 분리 - 분리 균주의 해충 독성 검정 - 항세균성 미생물 균주 분리 - 항세균성 미생물 균주의 항균력 검정 - 항세균성 및 살충성 미생물 균주의 선발	- 해충 독성 균주 분리 - 항세균성 균주 분리 - 항세균성 및 살충성 균주 분리
	- Bt 656-3 균주 개량을 위한 항세균 단백질 유전자 확보	- 항세균성 유전자 탐색 - 구조 분석 - 발현 및 재조합 항세균단백질 분리 - 재조합 항균단백질의 특성 및 활성 검정 - 세균성갈반병 방제 효과 검정	- 항세균성 유전자 확보 - 항세균성갈반병 재조합 단백질 분리
	- 생물검정용 시료 확보	- 생물검정용 버섯파리류 해충 (<i>L. mali</i> 및 <i>C. fuscipes</i>) 실내 사육 및 제공 - 생물검정용 세균성갈반병 (<i>P. tolaasii</i>) 균주의 배양 및 제공 - 느타리 및 팽이버섯의 실험실 배양 - 생물검정	- 버섯파리류 해충의 실내 사육 - 세균성갈반병 균주의 배양 - 느타리 및 팽이버섯의 실험실 배양

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위	연구 개발 결과
2차 년도 (2005)	<ul style="list-style-type: none"> - 항세균성 및 살충성 미생물 균주의 특성 및 대량배양 	<ul style="list-style-type: none"> - 분리된 해충 독성 미생물의 특성 분석 - 분리된 항세균성 미생물의 특성 분석 - 항세균성 및 살충성 유전자 탐색 - 항세균성 및 살충성 유전자의 대량 발현 - 항세균성 및 살충성 단백질의 특성 분석 - 선발 균주의 대량배양 	<ul style="list-style-type: none"> - 분리 균주의 특성 분석 - 선발 균주의 특성 분석
	<ul style="list-style-type: none"> - Bt 656-3 균주의 개량 	<ul style="list-style-type: none"> - Bt 656-3 균주에 항세균성 단백질 유전자 도입 - 재조합 Bt 656-3 균주의 선발 - 재조합 Bt 656-3 균주의 특성 분석 - 재조합 Bt 656-3 균주의 살충성 검정 - 재조합 Bt 656-3 균주의 항균력 검정 - 재조합 Bt 656-3 균주의 효율성 분석 	<ul style="list-style-type: none"> - 재조합 Bt 656-3 균주의 제작 - 살충성 및 살균성 재조합 Bt 656-3 균주의 선발
	<ul style="list-style-type: none"> - 생물검정 	<ul style="list-style-type: none"> - 생물검정용 시료 유지 - 살충력 조사 - 항균력 조사 	<ul style="list-style-type: none"> - 버섯파리류 해충, 세균성갈반병 균주, 느타리 및 팽이버섯의 실험실 계대 - 생물검정 및 균주 선발

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위	연구 개발 결과
3차 년도 (2006)	<ul style="list-style-type: none"> - 항세균성 및 살충성 미생물 균주의 제제화 및 재배사 시험 	<ul style="list-style-type: none"> - 항세균성 및 살충성 미생물 균주의 제제화 - 항세균성 및 살충성 미생물 균주 제제의 시작품 제작 - 항세균성 및 살충성 미생물 균주 제제의 재배사 시험 	<ul style="list-style-type: none"> - 항세균성 및 살충성 미생물 균주 제제의 시작품 제작 - 항세균성 및 살충성 미생물 균주 등록 - 항세균성 및 살충성 미생물 균주 제제의 특허 출원
	<ul style="list-style-type: none"> - 개량 Bt 656-3 균주의 제제화 및 재배사 시험 	<ul style="list-style-type: none"> - 개량 Bt 656-3 균주의 제제화 - 개량 Bt 656-3 균주 제제의 시작품 제작 - 개량 Bt 656-3 균주 제제의 재배사 시험 	<ul style="list-style-type: none"> - 개량 Bt 656-3 균주 제제의 시작품 제작 - 개량 Bt 656-3 균주 등록 - 개량 Bt 656-3 균주 제제의 특허 출원
	<ul style="list-style-type: none"> - 재배사 실증 시험 	<ul style="list-style-type: none"> - 재배사 실증 시험 - 살충력 조사 - 항균력 조사 - 효율성 분석 	<ul style="list-style-type: none"> - 재배사 실증 시험 - 효율성 분석

제 2 장 국내·외 기술개발 현황

제 1 절 국내·외 관련 기술의 현황과 문제점

국내 버섯 관련 연구는 농촌진흥청 관련 연구소를 중심으로 버섯 관련 형질전환 및 우량품종 육종, 배양 생리, 재배 생력화 및 연중생산 기술, 바이러스 무병균주, 병해 진단 및 방제 등 주로 재배 기술에 관한 연구가 계속 진행되고 있어 버섯의 농업에 있어서의 중요성 및 경제적 가치와 규모를 보여주고 있다. 또한 농업과학기술원의 일부 버섯파리류 피해 및 화학적 방제 시험에 이어 각도 농업기술원을 중심으로 경기지역 주요버섯의 해충 정밀 조사, 느타리버섯 병원균의 발생 생태 및 방제시험, 경북지역 버섯 주요 병해충 발생생태 및 방제 시험, 버섯파리 생태 및 방제법 연구 등이 주로 '99 신규 경상공제로 조사되고 있는 점으로 미루어 그 피해의 중요성을 시사하고 있다고 여겨진다.

농림기술 개발 사업으로는 느타리버섯 액체종균을 이용한 느타리버섯 생산, 느타리버섯 세균성 갈반병의 종합방제법, 무농약 신재배 기술, 느타리버섯 바이러스병 퇴치를 위한 진단시약 개발 및 바이러스 무병주 선발, 느타리버섯 균상에 발생하는 푸른곰팡이병의 종합방제법 개발, 느타리버섯 배지제조 기계화 및 터널이용법 개발, PCR을 이용한 느타리버섯 주요병의 조기진단 및 병원균 검출 기술 개발 및 느타리, 팽이버섯 액체배양 종균의 작업능율을 위한 접종장치 개발 등이 수행 또는 수행 중에 있어, 역시 느타리버섯의 규모와 중요성을 잘 보여 주고 있다. 이런 점으로 미루어 볼 때, 버섯의 생산량에 직접적인 영향을 미치는 주요병해와 병해의 매개체로서 뿐만 아니라 역시 직접적인 피해를 미치는 주요해충의 환경친화적 종합적 방제 기술 개발은 시급히 해결해야 할 분야라고 여겨진다.

“느타리버섯 세균성 갈반병의 종합방제법 개발에 관한 연구”는 이미 농림기술 개발 사업으로 1994-1997년에 연구되었다. 그 결과로 병원세균이 *Pseudomonas tolaasii*임을 동정하고, 효소면역측정법 (ELISA)에 의한 진단법을 개발하였다. 아울러 병원세균의 전염원 및 전염경로로 균상배지, 저장수조의 물 및 버섯파리를 통하여 전염되고 있음을 구명하였다. 또 시판되는 항생제를 이용한 방제약제 선발에서 tetracycline, kanamycin 및 kasugamycin이 세균성갈반병에 대한 방제효과가 높은 것으로 조사하였으며, kasugamycin은 어독성이 매우 낮으며 쉽게 생분해되는 항생제로서 식용버섯의 세균성갈반병 방제약제로 실용화가 가능하다고 생각된다고 보고하였다. 식초, 목초액, 클로르칼크, 차아염소산나트륨, 오존과 같은 환경오염이 크게 문제되지 않는 저독성소독제의 세균성갈반병 방제효과를 조사하여 이들 중 식초, 목초액 및 차아염소산

나트륨에서 발병초기의 병방제 효과가 인정되었으나 재배사 실증시험에서는 방제가가 낮아 실용성이 없음을 제시하였다. 한편, *P. tolaasii*에 길항작용이 있는 길항세균과 느타리버섯에 병원성이 없는 비병원성 세균균주들을 선발하고 이들의 세균성 갈반병 방제효과를 실내시험 및 병재배실험으로 실시하여 T-11균주를 우수균주로 선발하였으며, 농가 활용가능성에 대하여는 병방제 기작의 구명 등의 추가연구가 필요하다고 하였다.

현재 알려진 대사물질을 이용한 항생제이외에 항세균제로서 세균이 직접 생산하는 peptides인 bacteriocins에 대한 연구가 활발하다. bacteriocin은 근연종의 활성 또는 생장을 저해하는 역할을 하며 현재는 주로 천연 방부제 및 병원성 세균을 제어하는데 사용되고 있다. 최근 들어 *Bacillus*속 균주의 bacteriocin에 대한 연구가 활발하며 미생물살충제로 널리 알려져 있는 *Bacillus thuringiensis*에서도 여러 종류의 bacteriocin이 분리되고 있다. *B. thuringiensis*가 항세균성을 갖는 세균으로는 주로 다른 아종의 *B. thuringiensis* 균주와 근연종인 *Bacillus*속 균주들, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycooides* 등이나, 최근에 *B. thuringiensis* 아종 entomocidus HD9 균주로부터 분리된 bacteriocin인 entomocin 9의 경우에는 *Bacillus*속 균주와 더불어 다른 속의 세균인 *Lactobacillus*속, *Pseudomonas*속, 곰팡이인 *Aspergillus nidulans*, *Fusarium graminis*등에 대해서도 광범위하게 항세균성을 나타내는 것으로 보고되고 있다.

본 연구진은 이미 2000년-2003년 동안 농림기술 개발 사업으로 “느타리버섯 재배사 내 버섯파리류 해충의 환경친화적 방제제 개발”에 관한 연구를 수행하여 다음과 같은 결과를 확보하고 있다. 국내 느타리버섯 재배지에서 대발생하는 버섯파리류 해충은 *Lycoriella mali*와 *Coboldia fuscipes*로, 연중발생하며 가장 문제시되는 *L. mali*와 여름에 대발생하여 심각한 피해를 끼치는 *C. fuscipes*의 생태적 특성을 밝혔다. 아울러 유인살충 끈끈이 트랩에 의한 재배사 실증시험에서 성충 밀도감소효과를 얻었다. 특히 *L. mali*와 *C. fuscipes*에 동시에 강독성을 보이는 새로운 *Bacillus thuringiensis* 656-3 균주를 선발하여 대량배양 및 기초 제제화에 의한 재배사 실증시험을 통해 그 살충효과를 입증하였다. 이 균주는 실용화가 가능한 균주로 판단되어 특히 출원하였으며, 국내 모 농약 관련회사와 생물농약 개발에 관한 추가 시험을 협의 추진 중에 있다.

상기 두 연구과제를 종합할 때, 아직까지 버섯의 주요병해인 세균성갈반병과 주요해충인 버섯파리류의 방제를 위한 환경친화적 방제제가 실용화를 위해서는 지속적인 추가 연구가 요구되어진다는 것이다.

“느타리버섯 세균성 갈반병의 종합방제법 개발에 관한 연구”에서 세균성 갈반병원균의 동정과 감염경로 등의 중요한 기본 연구결과가 밝혀졌고, kasugamycin 같은 어독성이 매우 낮으며 쉽게 생분해되는 항생제가 식용버섯의 세균성갈반병 방제약제로의 가능성을 보고하였다. 아울러 길항세균에 의한 세균균주 (T-11)의 병방제 기작의 구

명 등의 추가연구에 의한 가능성을 제시하였다.

특히 본 연구팀의 “느타리버섯 재배사내 버섯파리류 해충의 환경친화적 방제제 개발”의 결과인 *L. mali*와 *C. fuscipes*에 동시에 강독성을 보이는 새로운 *Bacillus thuringiensis* 656-3 균주를 선발과 재배사 실증시험을 통한 살충효과 입증과 특허 출원, 관련 기업체 연구팀과 생물농약개발 적합성시험을 협의 중에 있으며, 조속한 실용화를 위해서는 계속적인 추가 연구가 요구되어진다.

상기 두 연구과제의 결과로 볼 때 요구되어지는 해결책은 우선 세균성갈반병 방제를 위해서는 전염경로로 볼 때 균상 배지, 관수용 저장 수조의 물 및 버섯파리를 통하여 주로 전염되므로 버섯 재배시 주기적으로 또는 필요시 수시로 공급되는 관수용 물에 무독성 천연 항생제 등의 약제를 포함시킴으로서 균상 배지나 외부 전염되는 갈반병 원균을 방제하는 방법이 효과적이라 생각된다. 아울러 세균성갈반병 매개체인 버섯파리 역시 별도로 방제해야 한다.

다음으로 주요버섯해충인 버섯파리 방제를 위해 역시 관수용 물에 무공해 살충제로 각광받고 있는 *Bacillus thuringiensis* 독소 단백질을 이용한 제제를 포함시킴으로서 버섯파리를 방제하고 아울러 세균성갈반병 등의 병해 매개를 차단해야 한다.

그러나 아직까지 상기 두 주요병해 및 주요해충 방제를 위한 효율적인 약제가 실용화되어 있지 않으므로 현재 개발에 대한 연구와 실용화가 절실히 요구되어진다. 현재 개발되어 있는 버섯파리류 방제 약제로서는 국내 2개 농약회사의 총체 표피조직의 키틴질 형성을 저해하여 탈피억제로 살충효과를 나타내는 곤충생장조절물질 (Insect growth regulators: IGRs)이 판매되고 있으나, 이들은 버섯에 대한 약해로 인해 복토 시까지 또는 발이유기시 1회 이내로 그 사용이 한정되어 있다. 이 시기는 재배농가에서 버섯파리류 해충의 피해가 극히 미약한 시기로 실제 버섯파리류 해충의 극심한 피해시기에는 사용 제한을 받는다는 문제점과 아울러 버섯파리류 해충 중에서도 종의 제한을 받는다는 문제점이 있다. 또 현재까지 본 연구진에 의해 연구 및 현장 조사된 결과를 종합할 때, 버섯파리류 해충 중 *L. mali*는 연중발생하며 유충의 직접적인 피해뿐만 아니라 성충의 경우 비행력이 좋아 병해매개의 확산력이 강하며, 실제 현장에서 *L. mali*가 발생한 부위는 세균성 갈반병 및 푸른곰팡이병 등이 동시에 만연하고 있다. *C. fuscipes*는 특히 많은 산란수로 인해 피해가 크며, 성충의 경우 비행도 하지만 주로 버섯이나 균상 위로 걸어다니기 때문에 병해매개가 심각하고 역시 *C. fuscipes* 발생부위에는 버섯병해가 만연하고 있다.

실재재배사에서 주요병해인 세균성갈반병과 버섯파리류 해충은 대부분 동시에 발생한다. 특히 느타리버섯의 재배사 뿐만 아니라 팽이버섯 재배사 역시 세균성갈반병은 가장 문제시되고 있는 주요 병해이다. 버섯파리 역시 느타리버섯 재배사는 물론 다소 시설이 미진한 팽이버섯 재배사에서 발생하고 있어 문제시되고 있다.

그러나 가장 큰 문제점으로 버섯은 작목 특성 상 화학적 방제가 어려운 실정이다.

게다가 아직 국내·외적으로 주요병해 세균성갈반병 및 주요해충 버섯파리류의 친환경적 방제 기술 확립이 연구에도 불구하고 계속적으로 요구되어지고 있다. 현재, 국내 버섯 농가의 경우 버섯 성장과 수확기에 주요병해 및 주요해충의 피해에도 불구하고 무방비 상태로 수확을 하며 그 손실을 감수할 수밖에 없는 실정을 고려할 때 더욱 절실하다고 여겨진다..

따라서 주요병해인 세균성갈반병과 주요해충인 버섯파리류를 동시에 타겟 (target)으로 하는 환경친화적인 종합방제 기술 및 방제제 개발이 가장 효과적이라고 판단된다.

따라서 본 연구에서 개발하고자 하는 느타리, 팽이버섯의 주요병해 세균성갈반병 및 주요해충 버섯파리류 방제를 위한 효과적인 환경친화적 방제기술은,

첫째, 세균성갈반병에 효과적인 항균단백질을 생산하며 아울러 버섯파리류 해충에 독성을 가진 독소단백질을 생산하는 곤충병원 미생물인 토양세균 *Bacillus thuringiensis*의 탐색 및 이용 기술을 들 수 있다. 이러한 *B. thuringiensis* 균주의 확보는 주요병해충을 동시에 방제할 수 있는 획기적인 방법이 될 수 있다. 그 이유로는 탐색 *B. thuringiensis* 균주를 저비용 배지 (이미 본 연구진에 의해 전 농림특정연구에서 보고되었음)에서 대량배양하면, 배양배지 전체 (배양 상층액에는 항균단백질이 포함되고, 침전물에는 *B. thuringiensis* 독소단백질이 포함됨)를 적절한 방법에 의해 제제화 (버섯 병해충 방제로는 Bt의 제제화가 상대적으로 간단하다고 여겨짐)하여 관수용 물에 포함시켜 살포하면 주요병해충을 동시에 간편하고 저비용으로 방제할 수 있어 매우 효과적이라 여겨짐.

둘째, 또 다른 선행연구 과제의 진척연구 전략으로 이미 농림특정연구를 통해 본 연구진에 의해 분리 및 재배사에서 살충효과가 입증된 *B. thuringiensis* 656-3 균주의 개량을 들 수 있다. 항세균단백질 유전자 확보와 이를 *B. thuringiensis* 656-3에 도입함으로써 이미 본 연구진에 의해 균주 등록 및 특허 출원된 균주의 효율성을 제고 시키는 것이다. 역시 이 접근방법에서 효율성이 제고된 *B. thuringiensis* 656-3 균주의 대량배양은 배양액 전체를 주요병해충 방제의 두 목적으로 동시에 이용할 수 있다. 이는 또한 첫 번째 접근 방법의 보완 또는 선택 기능을 할 수 있다.

제 2 절 앞으로 전망

버섯재배의 경우 소비량의 급증과 함께 대규모화 및 기업농화 추세로 발전되고 있는 실정이다. 이러한 결과로 대두되는 문제점으로는 연작화와 단지화에 따른 병해충 발생의 심각한 피해를 들 수 있다.

특히 우리나라 버섯생산량의 대부분을 차지하고 있는 느타리버섯과 팽이버섯의 경

우 재배 시설 특성 상 주요 병해충의 직·간접적인 극심한 피해에도 불구하고 작목 특성 상 화학적 방제가 어려운 실정이다. 따라서 본 과제의 느타리, 팽이버섯의 주요 세균병 및 주요해충의 환경친화적 종합적 방제기술 개발은 안정적인 그리고 고품질의 버섯생산에 따른 국제경쟁력 확보는 물론 농가 소득 증대에 크게 기여할 것으로 전망된다.

제 3 절 기술도입의 타당성

범세계적인 환경농업 또는 환경친화적 지속농업의 추세와 버섯의 작목 특성 상, 화학적 방제가 어려운 실정에도 불구하고 아직까지 국내·외적으로 갈반병 및 해충의 종합적 방제 기술 체계가 수립되어 있지 않다.

따라서 갈반병 및 해충의 종합적 방제 기술 개발은 국내뿐만 아니라 버섯재배 국가에 기술 수출이 충분히 가능할 것으로 기대된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 버섯파리류 해충 특이 Bt 656-3 균주의 개량

1. 재료 및 방법

가. 항세균성 유전자 탐색

1) cDNA 유전자은행 제작 및 유전자 발현 꼬리표 (ESTs) 작성

호박벌 (*Bombus ignitus*)로부터 새로운 항세균성 단백질 유전자를 탐색하기 위하여, 유발에 마쇄하여 SV total RNA Isolation System (Promega Co.)을 이용하여 total RNA를 분리하였다. total RNA의 농도를 측정하여 500 μ g 정도를 모으고 poly(A) Quick mRNA Isolation Kit (Stratagene Co.)를 이용하여 oligo(dT)-셀룰로오스 크로마토그래피에 의해 mRNA를 분리한 후 역시 농도를 측정하여 5 μ g의 mRNA를 cDNA 유전자은행 제작에 사용하였다. cDNA 유전자은행 제작을 위해 Stratagene사 (CA, U.S.A)의 Uni-ZAP XR Vector Kit와 Packaging Extract를 사용하였는데, 먼저 poly A+ RNA로부터 *Xho*I linker primer와 역전사 효소를 이용하여 cDNA를 평탄말단으로 만들었다. 그리고 제한효소 *Eco*RI adaptor를 부착시킨 후 제한효소 *Xho*I으로 절단하고 size fractionation을 거쳐 적당한 크기의 단편만을 취하였다. 이러한 cDNA를 Uni-ZAP XR vector에 삽입시켜 bacteriophage 상태가 되도록 coat protein으로 packaging하여 cDNA 유전자은행을 제작하고 기주세포(XL1-blue MFR' strain)내에 감염시킨 후 cDNA 농도를 적정하고 이를 적당한 농도로 증폭하여 본 실험에 사용하였다. 이렇게 제작한 cDNA phage 유전자은행을 *in vivo* excision 방법을 이용하여 플라스미드화 한 후, 임의의 클론을 선발하여 5말단 또는 3말단 중 한쪽 방향으로 부분 염기서열을 분석하고 기존 데이터베이스를 통한 상동성 분석에 의한 유전자들의 잠정적인 기능을 추정하는 방법인 발현 유전자 꼬리표 (expressed sequence tags: ESTs) 분석 방법을 수행하였다. 먼저 임의로 선발한 클론으로부터 Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System을 이용하여 분리한 DNA(0.2 μ g)를 T3 혹은 T7 primer와 혼합한 후 BigDye Cycle Sequencing kit와 혼합한 후 PCR (polymerase chain reaction) 반응을 수행하였다. PCR 산물은 1 capillary 방식인 310 Genetic Analyzer (ABI PRISM)에 의해 분석하여 염기서열을 결정하고 얻어진 염기서열은

GenBank database(www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)를 통하여 상동성을 분석하여 유전자 발현 꼬리표를 작성하였다.

2) 항세균성 유전자의 클로닝 및 구조 분석

호박벌 cDNA 유전자은행으로부터 유전자 발현 꼬리표(ESTs)를 생산하여 GenBank database에 상동성 검색을 통하여 항세균성 유전자와 상동성을 보이는 클론을 선별하고, 전체 염기서열 결정을 위하여 Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System에 의해 분리된 플라스미드 DNA(0.2 μ g)를 각각 T3 혹은 T7 primer로 BigDye Terminator cycle sequencing kit을 이용하여 96°C에서 10초, 50°C에서 10초 그리고 60°C에서 4분씩 25회 반복조건을 설정하여 수행하였다. PCR 산물은 알코올 침전시켜 10,000×g로 15분간 원심분리를 실시하고 70% 에탄올로 세척하였다. 이렇게 준비된 PCR 산물을 1 capillary 방식인 310 Genetic Analyzer (ABI PRISM)에 의해 분석하여 염기서열을 결정하고 분석하였다. 결정된 염기서열은 NCBI, GenBank, EMBL과 SwissProt에서 제공되는 BLAST algorithm program (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)을 이용하여 유사 유전자들을 검색하고 비교하였다. 본 연구에서 항세균성 유전자들과 상동성을 보이는 유전자의 아미노산서열 비교를 위해 MacVector (ver. 6.5, Oxford Molecular)를 사용하였다.

3) Northern blot 분석

Stereomicroscope (Zeiss, Jena, Germany)를 사용하여 호박벌을 해부하고 각 조직을 PBS (140 mM NaCl, 27 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.4)에 2회 washing 하였다. Total RNA Extraction Kit (Promega)을 사용하여 total RNA를 분리하고 nylon membrane (Schleicher & Schuell, Germany)에 blotting한 후, 2 × PIPES, 50% formamide, 1% SDS 및 blocking agent (Boehringer Mannheim, Germany)의 용액으로 hybridization을 실시하였다. [³²P] dCTP (Amersham)과 Prime-It II Random Primer Labelling Kit (Stratagene)을 사용하여 probe를 제작하였다. Hybridization 후, membrane을 0.1% SDS와 0.2 × SSC buffer로 65°C에서 30분간 3회 washing하고 X-ray film에 노출시켰다.

4) Genomic DNA 분리 및 항세균성 단백질 유전자의 genomic structure 분석

Genomic DNA의 구조분석을 위하여 *B. ignitus*의 지방체조직으로부터 Wizard™ Genomic DNA Purification Kit (Promega)를 사용하여 genomic DNA를 분리하였다.

BiApid cDNA 상의 개시코돈을 포함한 5'-CAGAGATCTGACCACTAGTCAATTAGAAA-3' 및 3' 말단 영역의 5'-GCCTGGCGGATATGATGTTTGGGTG-3', abaecin cDNA 상의 개시코돈을 포함한 5'-GAGGGAGAGAAAAACATATACAAATG-3' 및 3' 말단 영역의 5'-CTGTTTGAACGTTTCTTGATTTTTTGTG-3', hymenoptaecin cDNA 상의 개시코돈을 포함한 5'-GGGCAGGTCCAGATGAAATTCAT-3' 및 3' 말단 영역의 5'-CCACTGACATCACGTCATCGATGTCGCG-3'와 defensin cDNA 상의 개시코돈을 포함한 5'-CACAAAACCTTTAGCCAAAATGGTGA-3' 및 3' 말단 영역의 5'-GCTTGGTGTAGGATTGGTAGAATTGGA-3' 유전자 특이적인 primer를 제작하고 Pre-Mix (Bioneer사)를 사용하여 genomic DNA와 각각의 primer 0.1-0.5 μ M을 넣은 다음, DNA Thermal Cycler (Bioneer사)로 94°C에서 30초, 48°C에서 40초 그리고 72°C에서 2분씩 35회 반복조건을 설정하여 수행하였다. PCR 산물은 알코올 침전시켜 10,000×g로 15분간 원심분리를 실시하고 70% 에탄올로 세척하였다. 이렇게 준비된 PCR 산물은 1% agarose gel에 전기영동하여 분석하고 염기서열 분석을 위하여 pGemT vector (Promega)에 클로닝하고 BigDye Terminator cycle sequencing kit을 이용하여 염기서열을 분석하였다.

5) RT-PCR 분석

4가지 항세균성 유전자가 발현되는 조직을 연구하기 위하여 일벌로부터 지방체, 중장, 근육, 표피, 머리, 하인두샘, 독샘, 침샘 및 가슴샘으로부터 total RNA를 분리하고 0.27 μ g RNAs와 유전자 특이 primer를 사용하여 역전사는 48 °C에서 한 시간, PCR은 94 °C에서 2분, 53 °C에서 1분 그리고 72 °C에서 1분 30초를 30회 반복하여 RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR 결과는 1.5% agarose gel에 전기영동하여 확인하였다.

6) Apidaecin 17잔기의 PCR

4가지 항세균성 유전자 중, 본 과제에서 방제 대상인 갈반병이 그람음성균이며 형질 전환하려는 Bt가 그람양성균이므로 그람음성균에만 효과를 보이는 apidaecin을 선별하여 연구를 수행하였다. 기존에 곤충에서 알려진 apidaecin에서 활성을 보이는 mature 단백질은 17개의 잔기로 이루어져 있는데, 이를 클로닝하기 위하여 개시코돈과 제한효소의 염기서열을 포함한 primer와 종결코돈을 제거하고 제한효소 염기서열을 넣어 primer를 제작하였다 (Ap-EcoRI (ATG) (5-GATCCAGAAGAATTTCATGGCCAACCGA-3) 및 Ap-XhoI

(5-CAGCTTCGCCTCGAGAAGACGCGG-3). 밑줄 친 부분은 *EcoRI*과 *XhoI* 제한효소 서열을 나타낸다. Mature apidaecin을 증폭시키기 위하여 제작한 primer와 pfu taq DNA polymerase (Invitrogen)를 사용하여 PCR을 수행하고 PCR product은 pGem-T (Promega)에 클로닝하여 pGemT-BiApid를 제작하고 베쿨로바이러스 발현용 벡터에 클로닝하기 위하여 사용하였다.

나. 재조합 항균단백질의 특성 및 활성 검정

1) 전이벡터 및 재조합 바이러스 제작

베쿨로바이러스에 항균단백질을 발현시키고자, *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcNPV)와 insect cell line Sf9을 사용하였다. Apidaecin의 mature 단백질 부분만 클로닝한 pGemT-BiApid 벡터와 전이벡터인 pBAC1 벡터를 제한효소 *EcoRI*과 *XhoI*를 처리하고 ligation시켜, 전이벡터 pBAC1-BiApid를 제작하였다. Mature apidaecin은 베쿨로바이러스의 polyhedrin 프로모터하에 두어 발현되도록 하였다. 전이벡터 pBAC1-BiApid 500 ng과 AcNPV viral DNA 100 ng을 $1.0-1.5 \times 10^6$ Sf9 곤충세포주에 Lipofectin reagent (Gibco BRL, Gaithersburg, MD)을 사용하여 co-transfection 시켜 재조합 베쿨로바이러스 AcNPV-BiApid를 제작하였다. Transfection 된 곤충세포는 TC100 medium (Gibco BRL)을 사용하여 27°C에서 5일간 배양하였다. 재조합 AcNPV는 Sf9 곤충세포주에 감염시켜 증식시키고 바이러스 농도는 O'Reilly et al., 1992의 방법에 의해 pfu/ml로 나타내었다.

2) SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

Sf9 곤충세포주 또는 wild-type AcNPV를 감염시킨 Sf9 그리고 재조합 베쿨로바이러스 AcNPV-BiApid를 35-mm diameter dish (1×10^6 cells)에 5 PFU로 감염시키고 27°C에서 3일후, 곤충세포를 수거하였다. Sf9 곤충세포와 바이러스를 감염시킨 Sf9 곤충세포를 PBS (140 mM NaCl, 27 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.4)로 2회 씻어준 후, protein sample buffer와 혼합하고 5분간 끓였다. Total 단백질은 15% SDS-PAGE에 전기영동하고 0.1% Coomassie brilliant blue R-250에 염색하였다.

3) Western blot 분석

Western blot을 위하여 단백질을 15% SDS-PAGE에 전기영동하고 단백질을 nitrocellulose membrane (0.45 μm pore size)에 blotting하였다. Blotting한 후, membrane은 1% (v/v) BSA에 실온에서 2시간 동안 침지시키고 His-tag 항체 (1:1000 v/v)에 실온에서 1시간 동안 침지시켰다. 그리고 membrane을 TBST (10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 0.05% Tween 20)에 washing하고 anti-mouse IgG horseradish peroxidase (HRP) conjugate와 HRP-streptavidin 혼합물에 침지시켰다. Membrane을 반복하여 TBST buffer에 washing한 후, ECL detection reagents (Amersham Pharmacia Biotech)와 반응 시키고 X-ray film에 노출시켰다.

4) 항균단백질의 분리

항균단백질을 발현하는 재조합 바이러스 AcNPV-BiApid를 5 PFU/cell의 농도로 곤충세포주 Sf9에 감염시켜 배양하였다. 3일 후, 감염시킨 Sf9 곤충세포를 수거하여 1,000 \times g에서 10 분간 원심분리를 실시하고 PBS buffer로 3회 씻었다. 세포를 sonication하여 발현된 재조합 단백질 BiApid는 MagneHisTM Protein Purification System을 사용하여 분리하였다.

5) Inhibition zone assay

정제한 재조합 단백질 BiApid를 갈반병 (*Pseudomonas tolaasii*)와 Bt 656-3을 대상으로 항균성을 실험하였다. 먼저, *Pseudomonas tolaasii*와 Bt 656-3을 LB plate에 도말하고 white disk를 얹고 40 μg 의 정제한 재조합 단백질 BiApid 100 μl 를 white disk에 첨가하여 30 $^{\circ}\text{C}$ 에 48시간 배양하여 항균력을 실험하였다.

6) Minimal inhibitory concentration (MIC) assay

MIC 값은 96-well microtiter plates에 bacteria 균에 대하여 결정하였다. 정제한 재조합 단백질 BiApid를 serial dilutions한 10 μl 와 70 μl 멸균수를 혼합하고 20 μl 의 1.5×10^5 colony forming units/ml의 bacteria를 혼합하여 배양하였다. 그람음성균의 경우, NB (nutrient broth)에 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 18시간동안 배양하고, 그람양성균의 경우, 같은 방법으로 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 18시간동안 배양하고 bacteria의 성장을 억제하는 재조합 단백질 BiApid의 최소 농도를 구하였다.

다. 재조합 Bt 656-3 균주의 제작

1) Bt 656-3 균주 발현용 벡터 제작

Bacillus 발현용 벡터인 pLip 벡터 (Bioleaders™)를 구입하여 재조합 Bt 656-3 균주를 제작하기 위하여 사용하였다. pLip 벡터는 *Bacillus*에서 외래 유전자를 발현시켜 외부로 secretion할 수 있는 signal peptide를 가지고 있으므로 본 연구에 적합한 형질전환용 벡터로 사료되었다. 먼저, pLip 벡터의 multi-cloning site의 제한효소 *EcoRI*과 *PstI*를 처리하고 BiApid 17개 아미노산 잔기를 PCR하여 같은 제한효소로 처리하여 삽입하여 pLip-BiApid를 제작하고 Bt 656-3에 형질전환 시키기 위하여 사용하였다.

본 연구에 사용한 pLip vector는 *bacillus subtilis* 균주에서 외래물질을 발현하는데 많이 이용되는 것으로 알려져 있으며, vector에 존재하는 HpaII promoter는 강력하고, 항생균 유전자를 발현시키는데 적절한 것으로 판단되었다. pLip vector의 promoter-signal-MCS-transcriptional terminator 구조에 Apid gene을 클로닝하여, Bt에 transformation시켜, erythromycin으로 선별하였다.

2) Competent cell의 제작과 electroporation

외래 유전자 도입을 위한 electroporation은 Lereclus *et al.* (1998)의 방법을 최적화하여 수행하였다. host 균주는 100 ml Brain Heart Infusion (BHI)에서 OD₆₀₀ 값 0.7이 될 때까지 30°C에서 배양한 후 배지량 1/10만큼의 멸균증류수로 2회 세척하고, pellet에 polyethyleneglycol (PEG) 600 (40%, w/v)에 resuspension 한 후 4°C의 electroporation cuvettes에 넣어 electroporation을 수행하였다. Electroporation은 Bio-Rad Gene Pulser apparatus를 사용하여 25 μF와 2.5 kV/cm, pulse controller 400 Ω의 조건에서 수행하였다.

라. 살충성 및 살균성 Bt 656-3 균주의 선발

1) PCR

형질전환용 벡터 pLip-BiApid가 삽입된 Bt 656-3-BiApid를 선별하기 위하여 PCR, Southern blot 분석과 Northern blot 분석을 실시하였다. PCR은 BiApid 17개 아미노산 잔기 특이적인 primer를 사용하였고, Southern blot 및 Northern blot

분석은 BiApid 17개 아미노산 잔기를 포함하는 54 bp DNA 단편을 probe로 사용하였다.

2) Southern blot 분석 및 Northern blot 분석

재조합 Bt 656-3-BiApid로부터 플라스미드 DNA를 1.0% agarose gel에 전기영동하고 nylon membrane (Schleicher & Schuell)에 blotting 시켰다. blotting 후, BiApid probe를 사용하여, membrane을 42°C에서 hybridization buffer [5 × SSC, 50% formamide, 0.1% (w/v) N-lauroylsarcosine, 0.02% SDS and 2% blocking agent (Boehringer Mannheim)] 에서 반응 시켰다. BiApid 유전자는 [³²P] dCTP (Amersham)과 Prime-It II Random Primer Labelling Kit (Stratagene)을 사용하여 probe를 제작하였다. Hybridization 후, membrane을 0.1% SDS와 0.2 × SSC buffer로 65°C에서 30분간 3회 washing하고 X-ray film에 노출시켰다. Total RNA Extraction Kit을 사용하여, 재조합 Bt 656-3-BiApid로부터 total RNA를 분리하고 nylon membrane (Schleicher & Schuell, Germany)에 blotting 하고 2 × PIPES, 50% formamide, 1% SDS 및 blocking agent (Boehringer Mannheim, Germany)의 용액으로 hybridization을 실시하였다. Probe 제작 및 washing 과정은 Southern blot 분석 방법과 동일하게 실시하였다..

마. 개량 Bt 656-3 균주의 제제화

대량배양된 개량 Bt 656-3은 원심분리를 통하여 Bt 656-3의 독소 및 포자가 포함되어있는 배양침전물을 수거하였다. 독소를 포함하고 있는 배양침전물은 외부의 물리적 작용을 최소화하기 위하여 진공건조 방식으로 건조하였으며, 공기압축기를 사용하여 배양침전물을 분말화 하였다. 분말화 된 개량 Bt 656-3의 독소를 포함하고 있는 배양침전물 40 g과 metamorphic starch 전분 60 g을 혼합하여 제제화 하였다.

바. 개량 Bt 656-3 제제의 실증 시험

항세균성 단백질을 발현하는 개량 Bt 656-3 제제의 갈반병 (*P. tolaasii*)에 대한 항세균성 활성을 알아보기 위하여 단층 검정 plate를 사용하였다. 먼저, 단층 검정 plate는 갈반병인, *P. tolaasii*를 접종한 배지 약 5ml을 단층으로 하여 plate를 조제

하여 사용하였다.

항균활성의 측정은 Koneman 등 (1979)의 방법에 따라 cylinder plate 법으로 행하였으며 30℃에서 48시간 동안 배양하여 평판에 나타난 저지원을 측정하여 그 항균활성을 나타내었다.

사. 재조합 항세균성 미생물 (*Brevibacillus brevis*) 균주 제작

(1) Bt 독소 유전자 *cry1Ac* 유전자를 발현하는 재조합 항세균성 미생물 균주 제작

B. thuringiensis 독소 유전자 중, 하나인 *cry1Ac* 유전자를 유전자의 발현에 필요한 promoter와 transcriptional terminator의 도입 및 유전자 발현을 검증하기 위하여 *cry1Ac* gene, native promoter 및 transcriptional terminator를 갖는 pHT1K-1Ac를 제작하였다. 제작한 pHT1K-1Ac vector를 *B. brevis* 균주에 transformation 시키고 *cry1Ac* 유전자 특이적인 primer를 제작하고 PCR을 통하여 재조합된 균주 *B. brevis* 3101-3을 선별하였다. 이렇게 선별된 재조합 *B. brevis* 균주의 Bt 독소 유전자 *cry1Ac* 유전자 발현유무를 SDS-PAGE 및 Western blot 분석을 실시하여 발현 양상을 확인하였다.

(2) 파리목 살충성 유전자 *cry4D* 유전자를 발현하는 재조합 항세균성 미생물 균주 제작

협동과제에서 분양받은 *B. brevis*를 개량하기 위하여 파리목에 독성을 나타내는 *cry4D* 유전자 특이적인 primer를 제작하고 PCR을 수행하였다. PCR product은 pGemT vector에 클로닝하여 염기서열을 밝히고 제한효소 *EcoRI*과 *XhoI*을 처리하여 같은 제한효소를 처리한 pLip vector에 ligation하여 pLip-*cry4D*를 제작하고 *B. brevis* 균주의 competent cell 및 electroporation 방법은 개량형 Bt 제작과 동일한 방법으로 수행하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 항세균성 유전자 탐색

1) cDNA 유전자은행 제작 및 유전자 발현 꼬리표 (ESTs) 작성

제작한 cDNA library의 titer를 측정한 결과, 약 1.3×10^6 개 이상의 plaque이 존재하였으며, cDNA의 재조합 비율을 알아보기 위하여 이 phage를 *E. coli*에 감염시킨 후 X-Gal과 IPTG가 첨가된 NZY 배지에서 배양한 결과 98% 이상의 plaque이 cDNA가 도입된 재조합 phage plaque으로 확인되었다. 고등생물의 경우 약 10만여 개의 유전자가 있고 이중 약 15%만이 세포 개체들에서 공통적으로 발현되고, 한 세포내에서도 abundant 그룹과 rare 그룹이 존재한다. 초파리의 유전자는 사람의 1/5에 해당하며, 이 비율을 본 실험 각각의 개체에 적용할 때 제작된 cDNA library는 세포내에 적은 양으로 존재하는 poly A+ RNA종을 모두 포함하는 것으로 생각되었다. 제작된 cDNA library에서 벡터내에 삽입된 cDNA 크기를 확인하기 위하여 무작위로 선발한 phage를 *in vivo excision*하여 pBluescript SK 전환하였다.

*B. ignitus*의 cDNA 유전자은행에서 무작위로 *in vivo excision*을 이용하여 얻은 박테리아 콜로니로부터 DNA 염기서열 결정을 위해 플라스미드 DNA를 분리하였다. 염기서열 분석을 위한 primer는 삽입 cDNA에 근접해 있는 T3 primer를 사용하였고 one capillary 방식의 310 Genetic Analyzer를 사용하여 cDNA 염기서열을 결정하였다. cDNA 유전자은행으로부터 57개의 발현 유전자 꼬리표 (ESTs)를 생산할 수 있었다. 클론마다 평균 350 bp 이상의 염기서열을 판독할 수 있었는데 판독한 염기서열은 GenBank database에서 기존에 알려진 유전자와의 상동성 검색을 통하여 4개의 항세균성 유전자를 선발하였다 (Table 1). 기존에 곤충에서 알려진 Hymenoptacin, abaecin, defensin 및 apidaecin과 상동성을 나타내는 4종류의 항세균성 유전자를 확보하였다.

Table 1. Summary of the expressed sequence tags isolated from the cDNA library of the bumblebee, *Bombus ignitus*

Clone	Putative identification	Species	Overlength (length)	Homology (%)
B-5	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	<i>Homalodisca coagulata</i>	332	91
B-6	protease P27	<i>Hypocrea lixii</i>	311	84
B-7	pyrroline-5-carboxylase synthase	<i>Tigriopus californicus</i>	857	87
B-8	elastin like protein	<i>Drosophila melanogaster</i>	110	58
B-13	unnamed protein product	<i>Debaryomyces hansenii</i>	242	61
B-15	ornithine-5-phosphate decarboxylase	<i>Pichia anomala</i>	267	60
B-37	hymenoptaecin precursor	<i>Apis mellifera</i>	129	75
B-38	5-enol-pyruvylshikimate-phosphate synthase	<i>Helianthus salicifolius</i>	264	50
B-39	similar to phosphodiesterase 2A, cGMP-stimulated; cyclic GMP stimulated phosphodiesterase	<i>Apis mellifera</i>	348	39
B-41	brain-specific GTP-binding protein	<i>Homo sapiens</i>	558	62
B-42	chitinase	<i>Chironomus tentans</i>	475	62
B-43	small heat shock protein	<i>Anopheles gambiae</i>	133	73
B-44	mutant N-acetylglucosaminyltransferase I	<i>Cricetulus griseus</i>	447	80
B-45	similar to ribosomal protein L10A	<i>Apis mellifera</i>	214	69
B-46	hypothetical protein	<i>Apis mellifera</i>	329	73
B-50	S3Ae ribosomal protein	<i>Biphyllus lunatus</i>	267	67
B-51	CG10527-like methyltransferase	<i>Mesobiusus euseus</i>	119	53
B-56	similar to major allergen Bla g 1.02	<i>Apis mellifera</i>	221	82
B-57	Peritrophin 1	<i>Mamestra configurata</i>	1917	63
B-59	variable surface lipoprotein	<i>Mycoplasma bovis</i>	176	47
B-62	similar to Apidaecin precursor	<i>Apis mellifera</i>	172	63
B-63	hypothetical Fe-S oxidoreductase	<i>Photobacterium profundum</i>	476	54
B-66	defensin	<i>Apis mellifera</i>	1169	79
B-72	Hemolysin (flyC) homolog	<i>Escherichia coli K12</i>	231	98
B-78	oxidoreductase	<i>Brachyrrhizobium japonicum</i>	321	60
B-80	Myo le protein	<i>Mus musculus</i>	1107	51
B-81	abaecin	<i>Bombus ignitus</i>	58	100
B-85	Apoptosis-inducing protein D	<i>Homo sapiens</i>	279	82
B-86	hymenoptaecin precursor	honeybee	129	52
B-88	ornithine decarboxylase antizyme	<i>Bombus mori</i>	261	65
B-89	CuZn superoxide dismutase	<i>Apis mellifera ligustica</i>	152	70
B-90	similar to chymotrypsin-like protease precursor	<i>Apis mellifera</i>	710	68
B-91	similar to major allergen Bla g 1.02	<i>Apis mellifera</i>	221	63
B-92	similar to calcyphosine-like protein	<i>Apis mellifera</i>	222	74
B-94	alpha-glucosidase	<i>Apis mellifera</i>	567	45
B-95	polyubiquitin	<i>Tribolium castaneum</i>	112	100
B-98	thioredoxin-like protein TXL	<i>Drosophila melanogaster</i>	287	70
B-103	calponin-like protein	<i>Drosophila melanogaster</i>	188	92
B-114	ubiquitin-conjugating enzyme	<i>Danio rerio</i>	170	82
B-118	late trypsin 1	<i>Culex pipiens quinquefasciatus</i>	50	79
B-119	ras homolog gene family, member B	<i>Homo sapiens</i>	197	73
B-128	Levansucrase	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	428	62
B-134	phosphoserine phosphatase	<i>Homo sapiens</i>	225	69
B-144	extracellular chitinase ChiA	<i>Aeromonas hydrophila</i>	866	60
B-145	similar to calpain-C-	<i>Apis mellifera</i>	666	61
B-146	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2-carboxylate N-succinyltransferase	<i>Cromobacterium violaceum</i>	148	61

B-147	serine protease		148	61
B-154	similar to PAX neighbour protein	<i>Apis mellifera</i>	614	87
B-162	similar to putative FGF-signaling promoter	<i>Apis mellifera</i>	1168	62
B-171	xenotropic and polytropic retrovirus receptor	<i>Homo sapiens</i>	631	71
B-183	similar to maltase 1	<i>Apis mellifera</i>	574	57
B-185	elongation factor-1alpha	<i>Manataria maculata</i>	347	96
B-189	maltase	<i>Aspergillus oryzae</i>	574	66
B-190	chitinase	<i>Tenebrio molitor</i>	2838	60
B-193	natural resistance associated macrophage protein-beta	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	558	83
B-194	glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase	<i>Aedes aegypti</i>	675	72
B-196	ribosomal protein L6	<i>Culicoides sonorensis</i>	209	70

2) 항균성 유전자의 클로닝 및 구조 분석

가) 호박벌 유래 abaecin

호박벌 cDNA 유전자은행으로부터 clone 81은 기존에 보고된 abaecin 유전자와 높은 상동성을 보였다. 호박벌 abaecin cDNA (BiAbae)는 전체 open reading frame (ORF)를 포함하고 있었으며, 총 345 bp의 염기서열에 예상되는 ORF는 177 bp의 염기서열과 59개의 아미노산으로 구성되어 있었다 (Fig. 1A). 예상되는 분자량은 6438 Da으로 pI는 10.34로 나타났다. 이 cDNA는 개시코돈(ATG)과 종결코돈(TAA)를 가지며, polyadenylation signal인 AATAAA는 염기서열 317-322 bp 위치에 존재하고 있었다.

BiAbae의 아미노산서열과 기존에 보고된 abaecin을 비교하였다. Fig. 1B에서 나타난 바와 같이 mature protein 영역이 잘 보존되어 있으며 기존에 알려진 abaecin 유전자들 중, *Apis mellifera* abaecin과 58%로 가장 높은 상동성을 보였다 (Fig. 2B).

BiAbae 유전자가 발현되는 조직을 알아보기 위하여 호박벌을 해부하여 조직별로 total RNA를 분리하고 Northern blot 분석을 실시하였다. 여왕벌, 일벌 그리고 수벌로부터 독샘, 지방체, 중장, 근육, 표피, 머리, 하인두샘, 침샘, 가슴 및 가슴샘을 채취하여 total RNA를 분리하고 RT-PCR 및 Northern blot 분석을 실시하였다. 그 결과, 여왕벌과 일벌의 경우, 독샘과 지방체에서만 발현이 되었으며, 독샘이 없는 수벌의 경우에는 지방체 조직에서만 발현이 되는 것을 알 수 있었다 (Fig. 2). 이것은 기존에 보고된 곤충유래 항세균성 단백질이 지방체에서 특이적으로 발현되는 특성과 일치된다.

(A)

```

-56      agtggatccccgggctgcaggaattcggcagagggagagaaaaacatatataca
      ATGAAGGCAGTAATGTTTATTTTCGTAATGCTTGCCACAATATGTGGAATCCTTGCATTT
1  M K A V M F I F V M L A T I C G I L A F

61  GTACCATATAATCCGCCACGACCGGGACAATCTAAACCGTTTCCAACCTTCCAGGTCAT
21  V P Y N P P R P G Q S K P F P T F P G H

121 GGACCATTC AATCCAAAATTCAATGGCCATACCCATTACCAAACCCTGGTCATTAAtca
41  G P F N P K I Q W P Y P L P N P G H *
181 caaaaatcaagaaacggttcaaacagttaaactcgacagatcatcagagattatatctaca
241 atgtaccgaccgaattattataattataaattgttattaagttatacactgatcaaaatg
301 atcctgatttattttcaataaatagaaactatcctgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

(B)

<i>Bombus ignitus</i> (this study)	1	M	K	A	V	M	F	I	F	V	M	L	A	T	I	C	G	I	L	A	F	V	P	Y	-	N	P	P	R	P	G	29
<i>Apis mellifera</i> (P15450)	1	M	K	V	V	L	L	L	L	A	L	L	A	T	I	C	A	A	F	A	Y	V	P	L	P	N	V	P	O	P	G	30

<i>Bombus ignitus</i> (this study)	30	Q	S	K	P	F	P	F	F	P	G	H	G	P	F	N	P	K	I	Q	W	P	Y	P	L	P	N	P	G	H	58	-
<i>Apis mellifera</i> (P15450)	31	R	-	R	P	F	P	F	F	P	G	Q	G	P	F	N	P	K	I	K	W	P	Q	G	Y						53	58/71

Fig. 1. cDNA sequence and structure of the abaecin. (A) Nucleotide sequence and predicated amino acid sequences of abaecin cDNA clones numbers at the left indicate positions of the nucleotide and amino acid. The ATG start codon is boxed. The star symbol above the nucleotide sequence indicated sequences indicates the translational stop signal (TAA). Poly(A) adenylation signals (AATAAA) are indicated by line. (B) Comparison of the deduced amino acid sequence of BiAbae with that of other abaecin. Conserved region is PRP and PFNPK for antibacterial activity (small solid box is specific site in *B. ignitus* and big solid box was conserved). The predicted leader sequences are indicated by dotted box, respectively. GenBank accession numbers are: *Apis mellifera* (P15450). BiAbae sequence was used as a reference for the identity / similarity (Id/Si) values.

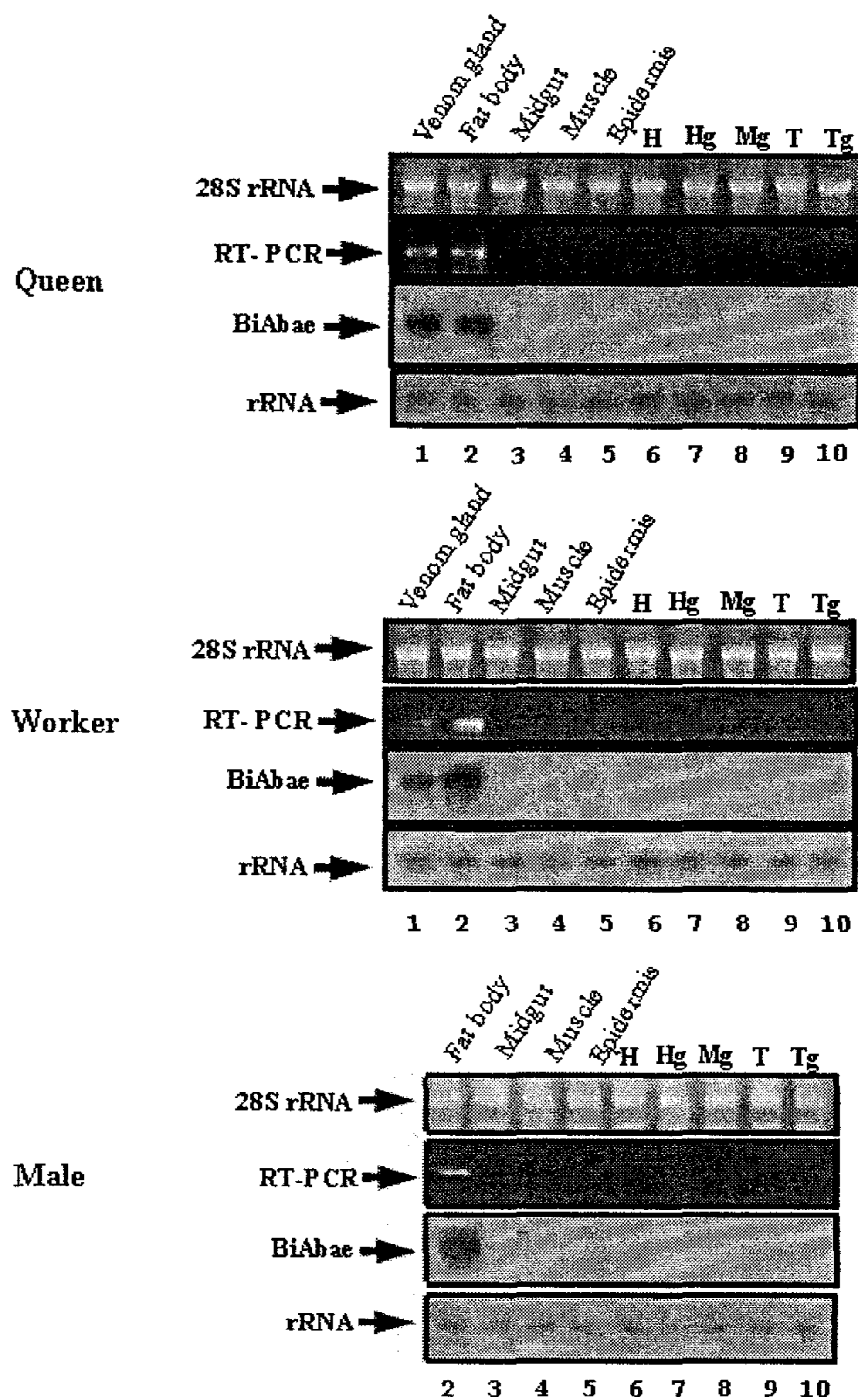


Fig. 2. Tissue distribution of the BiAbae mRNA by RT-PCR and Northern blot hybridization. Total RNA was isolated from the venom gland (lane 1), fat body (lane 1), midgut (lane 3), muscle (lane 4), epidermis (lane 5), head (lane 6), hypopharyngeal gland (lane 7), mandibular gland (lane 8), thoraces (lane 9), and thoracic salivary gland (lane 10) of queen, worker and male, respectively. RT-PCR was performed under the conditions described in Materials and methods. The RNA was separated by 1.0% formaldehyde agarose gel electrophoresis, transferred onto a nylon membrane, and hybridized with radiolabelled BiAbae cDNA. Transcripts are indicated on the right side of the panel by an arrow (BiAbae). Ethidium bromide stain and Northern blot of rRNA are shown as a loading control.

나) 호박벌 유래 hymenoptaecin

기존에 보고된 항균단백질의 하나인 hymenoptaecin과 높은 상동성을 나타내는 clone 86을 찾고 전체 염기서열을 밝혔다. 그 결과, 호박벌 유래 hymenoptaecin (BiHym)은 전체 ORF를 포함한 총 길이가 757 bp의 염기서열로 이루어져 있다. BiHym의 cDNA 염기서열과 아미노산서열을 Fig. 3A에 나타내었다. BiHym cDNA는 405 bp 뉴클레오티드와 134개의 아미노산으로 이루어진 ORF를 가지며 예상분자량은 14826 Da, pI는 8.95로 예상되었다. Polyadenylation signal은 cDNA 서열의 692-697에 위치하였다.

BiHym의 genomic 구조를 밝히기 위하여 호박벌로부터 genomic DNA를 분리하고 cDNA 염기서열로부터 hymenoptaecin specific primer를 제작하여 PCR을 수행하였다. PCR product의 염기서열을 분석한 결과, BiHym의 cDNA 염기서열과 100% 일치하였으며, 그 구조는 Fig. 3B에 나타내었다. BiHym의 genomic DNA 염기서열과 cDNA 염기서열을 비교한 결과, genomic DNA는 2개의 exon과 1개의 intron으로 구성되어 있으며, 진핵생물에서 잘 보존되어 있는 intron 5' 개시 영역의 GT와 intron 3' 말단 영역의 AG 서열을 확인할 수 있었다. BiHym의 genomic DNA 염기서열의 전체 길이는 1201 bp로 이루어져 있다.

BiHym 아미노산 서열을 기존에 보고된 hymenoptaecin과 비교할 때, prepeptide 영역과 propeptide 영역으로 이루어져 있었고 mature 단백질의 활성 영역은 잘 보존되어 있었다 (Fig. 3C). 그리고 *Apis mellifera* hymenoptaecin과 61%의 가장 높은 상동성을 보였다.

여왕벌, 일벌 그리고 수벌로부터 독샘, 지방체, 중장, 근육, 표피, 머리, 하인두샘, 턱샘, 침샘, 가슴 및 가슴샘을 채취하여 total RNA를 분리하고 RT-PCR 및 Northern blot 분석을 실시하여 호박벌 BiHym이 발현되는 조직을 알아보았다. 그 결과, 여왕벌, 일벌 그리고 수벌 모두 지방체 특이적으로 발현된다는 것을 밝혔다 (Fig. 4).

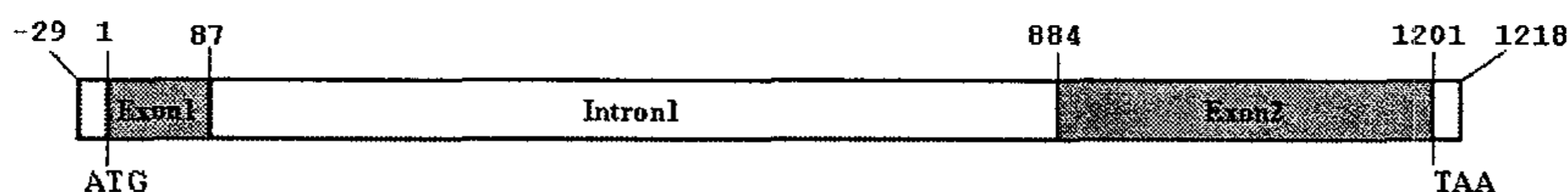
(A)

```

-28 Exon1                               tttcagagccgcccggcaggtccag
1 ATGAAATTCATCGTACTGGCTCTCTTCTGCATGGCCGCATACGCCGCTGCCCAAGAAATT
1 M K F I V L A L F C M A A Y A A A Q E I
61 GAACCTGAAGCTGTGGAAGAATACTACGGCTCTCCTCGTTTTTCGACGACACGCTGACCCG
21 E P E A V E E Y Y G S P R F R R H A D P
121 CAAGGGTCCCTTGTATCGAGGGAACGAAACCATTGAGCGGACCGGATCGTCCGCCATCC
41 Q G S L V I D G T K P L S G P D R R P S
181 TTGGACGTGACTATCATCAACCGCTCTACGACAGAAACGGAATGAACGCGGACGCGTAC
61 L D V D Y H Q R V Y D R N G M N A D A Y
241 GGTGGACTGAATATTCGCCAGGACAGCTGCTCAACCACATTTGGGTGTCCAATCCAG
81 G G L N I R P G Q P A Q P H L G V Q I Q
301 CGTGAAACAAGAAATGGCTTCATCAGAGGATACAGCCAGGCTGAACGCGGTCTGGCCGG
101 R E Y K N G F I R G Y S Q A E R G P G G
361 AGGATCTGCCCCAGCTTCGGCGTGGTGGGTGATTTCAGATTCTAAcgcgacatcgatgac
121 R I S P S F G V G G G F R F *
421 gtgatgtcagtggaactaggatattaaatctatctatgcgtacagttacgattatatta
481 cggatTTTTctgcaattcataattTTTTtgacacaatttagagaaatttagacagagatc
541 agTTTTaagtaatatcaattactattgtattagtcttgtattaattgcatttatttaat
601 atttaatgattatttatttgaaatatgcattactttgtttcatttcgtatactttatgt
661 aattggtaaagtattgacgattaaaatgataataaatgtaatgtataccataaaaaaaaa
721 aaaaaaaaa

```

(B)



Exon	Length of exon (bp)	Position in gene	Sequence at exon-intron junction
1	87	1-87	gcaggtccag ATGAAATTC GAATACTAC gtaagaact M K F E Y Y
2	318	884-1201	ttcttctcag GGCTCTCCT AGATTCTAA cgcgacatc G S P R F Stop

(C)

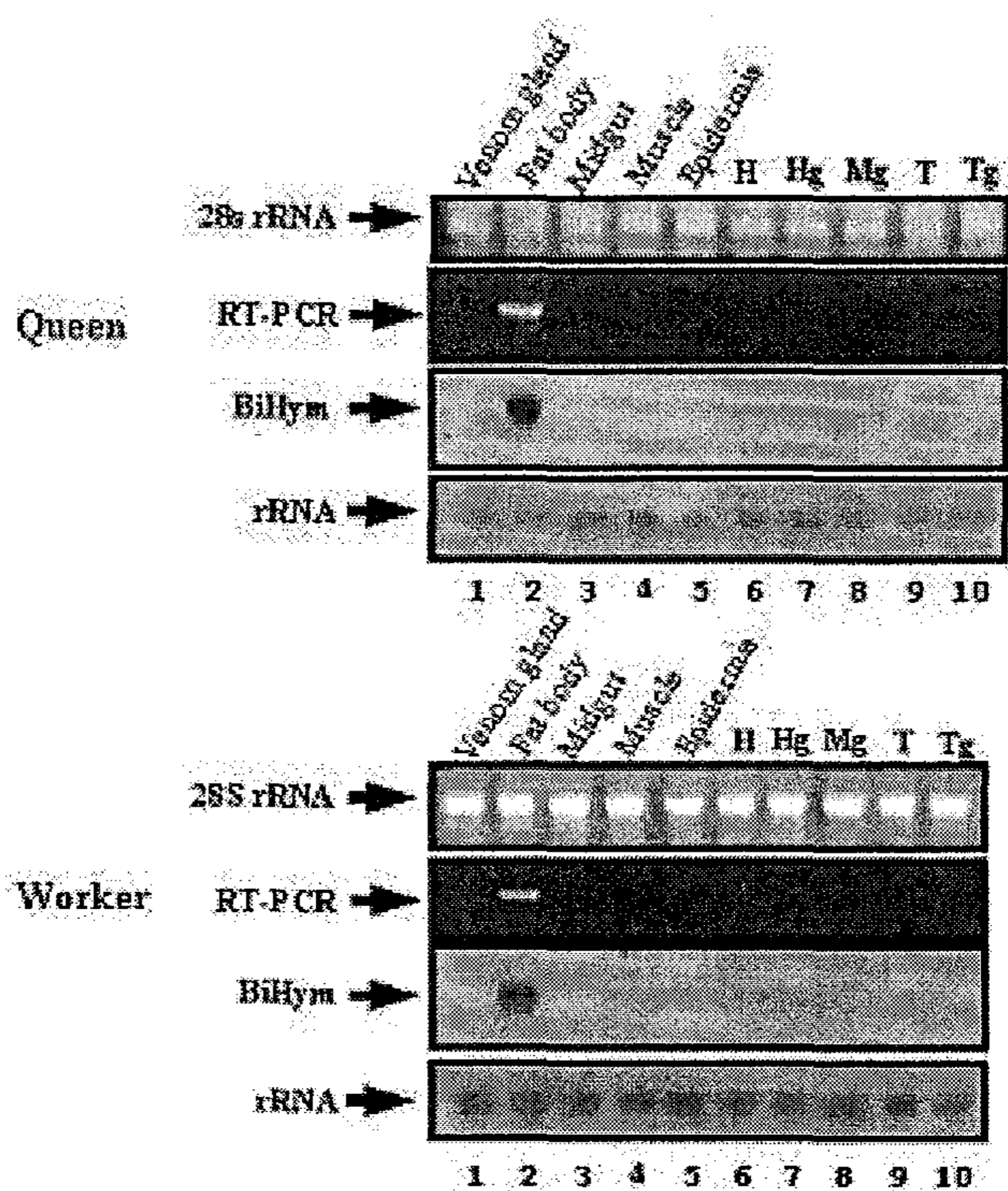
Prepeptide **Propeptide**

<i>Bombus ignitus</i> (This study)	1	M Q I I V L A L F C M A A Y A A A Q	-	E I E P E A V E E Y Y G S P	33
<i>Apis mellifera</i> (U15956)	1	M K F I V L V L F C A V A Y S A A Q	A	E I E P E D T M D P I P T	33
<i>Bombus ignitus</i> (This study)	34	F R R H A D P Q G S L V I D G K K P L S G P D R R	P S I D V D Y H Q	67	
<i>Apis mellifera</i> (U15956)	34	F R R Q E - - R G E I V I Q G T K - - E G K S K	- P E I D I D Y K Q	62	
<i>Bombus ignitus</i> (This study)	68	E V Y D R H G V N A D A Y C G L N I R P G Q P A Q P	H L G V Q I Q R	101	
<i>Apis mellifera</i> (U15956)	63	E V Y D K H G M T G D A Y C G L N I R P G Q P S R Q	H A G F E F G K	96	
<i>Bombus ignitus</i> (This study)	102	E Y K N G F I R G Y S Q A E N G P C G R I S P S	F G V G G C F R F	134	
<i>Apis mellifera</i> (U15956)	97	E Y K N G F I R G Q S F V O R G P C G R I S P Y	F G I N G G F R F	129	

IdSi(%)
+ 61/75

Fig. 3. cDNA sequence and structure of the hymenoptaecins. (A) Nucleotide sequence and predicated amino acid sequences of prepro-hymenoptaecin cDNA

clones numbers at the left indicate positions of the nucleotide and amino acid. The ATG start codon is boxed. The star symbol above the nucleotide sequence indicated sequences indicates the translational stop signal (TAA). Poly(A) adenylation signals (AATAAA) are indicated by line. (B) Genomic structure of the BiHym gene revealed by PCR amplification from BiHym cDNA.. Numbers indicate the position in the genomic sequences. (C) Comparison of the deduced amino acid sequence of BiHym with that of other hymenoptaecin. The pro-sequences are indicated by dotted box, the basic (RR) dipeptides by a star, respectively. Putative processing sites for prepro-hymenoptaecin by an endopeptidase (↓) and a carboxypeptidase (★) GenBank accession numbers are: *Apis mellifera* (U15956). BiHym sequence was used as a reference for the identity / similarity (Id/Si) values.



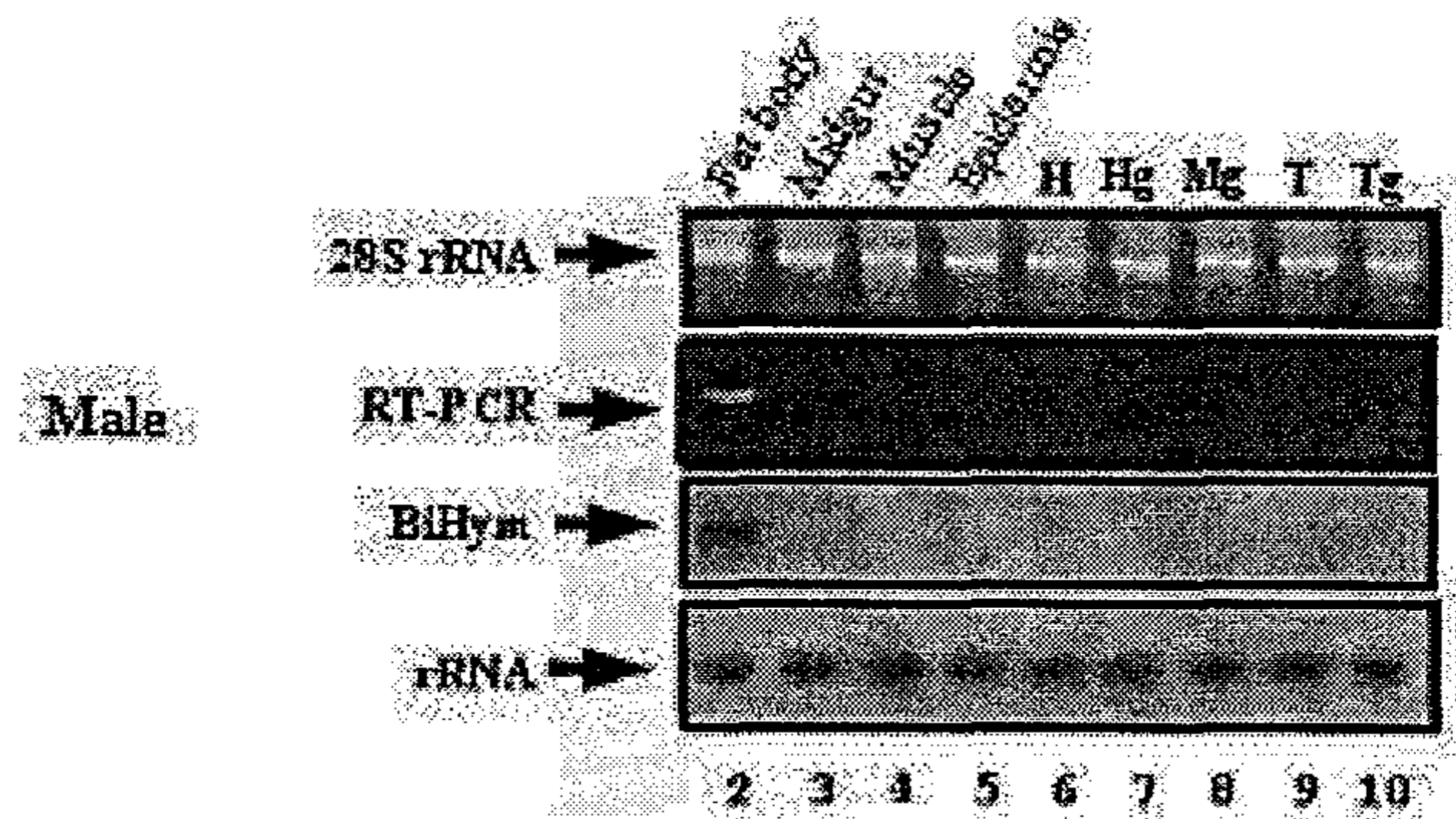


Fig. 4. Tissue distribution of the BiHym mRNA by RT-PCR and Northern blot hybridization. Total RNA was isolated from the venom gland (lane 1), fat body (lane 1), midgut (lane 3), muscle (lane 4), epidermis (lane 5), head (lane 6), hypopharyngeal gland (lane 7), mandibular gland (lane 8), thoraces (lane 9), and thoracic salivary gland (lane 10) of queen, worker and male, respectively. RT-PCR was performed under the conditions described in Materials and methods. The RNA was separated by 1.0% formaldehyde agarose gel electrophoresis, transferred onto a nylon membrane, and hybridized with radiolabelled BiHym cDNA. Transcripts are indicated on the right side of the panel by an arrow (BiHym). Ethidium bromide stain and Northern blot of rRNA are shown as a loading control.

다) 호박벌 유래 defensin

곤충에서 가장 많이 보고된 항균단백질 중의 하나인 defensin과 상동성을 나타내는 clone 66을 확보하고 전체 염기서열을 밝혔다. 그 결과 defensin으로 사료되었으며, BiDef라 명명하였다. BiDef cDNA 전체 염기서열은 574 bp으로 이루어져 있으며, 291 bp의 염기서열과 96개의 아미노산 서열의 ORF를 가지는 것으로 나타났다 (Fig. 5A). BiDef의 분자량은 10569 Da, pI는 7.05로 예상되었다. Polyadenylational signal, AATAAA는 692-697 bp에 위치해 있다.

BiDef의 genomic 구조를 밝히기 위하여 호박벌로부터 genomic DNA를 분리하고 cDNA 염기서열로부터 defensin specific primer를 제작하여 PCR을 수행하였다. PCR product의 염기서열을 분석한 결과, BiDef의 cDNA 염기서열과 100% 일치하였으며, 그 구조는 Fig. 5B에 나타내었다. BiDef의 genomic DNA 염기서열과 cDNA 염기서열을 비교한 결과, genomic DNA는 3개의 exon과 2개의 intron으로 구성되어 있으며,

진핵생물에서 잘 보존되어 있는 intron 5' 개시 영역의 GT와 intron 3' 말단 영역의 AG 서열을 확인할 수 있었다. BiDef의 개시코돈부터 종결코돈까지 genomic DNA 염기서열의 전체 길이는 1958 bp로 이루어져 있다.

BiDef의 아미노산 서열을 기존에 보고된 곤충유래 defensin과 비교하였다 (Fig. 5C). 이 유전자 역시 BiHym과 마찬가지로 prepeptide 영역과 propeptide 영역을 가지고 있으며, mature protein 영역에 defensin 아미노산 서열에서 보이는 6개의 cysteine이 잘 보존되어 있었으며 BiDef는 *Apis mellifera* defensin과 70%의 높은 상동성을 나타냈으며 다른 곤충유래 defensin과는 비교적 낮은 24%-34%의 상동성을 나타내었다.

BiDef 유전자가 발현되는 조직을 알아보기 위하여 호박벌을 해부하여 조직별로 total RNA를 분리하고 Northern blot 분석을 실시하였다. 여왕벌, 일벌 그리고 수벌로부터 독샘, 지방체, 중장, 근육, 표피, 머리, 하인두샘, 턱샘, 침샘, 가슴 및 가슴샘을 채취하여 total RNA를 분리하고 RT-PCR 및 Northern blot 분석을 실시하였다. 그 결과, 여왕벌의 경우, 독샘, 지방체, 머리, 하인두샘, 침샘, 가슴 및 가슴샘 조직에서 발현되는 것으로 나타났으며, 일벌의 경우, 독샘, 지방체, 머리, 하인두샘 그리고 침샘에서 발현이 되었으며, 수벌의 경우에는 지방체 조직에서만 발현이 되는 것을 알 수 있었다 (Fig. 6).

(A)

```

-63          cgaggcttcagtaacttgaacacagtttaccgtcgaattttcacaaaaactttagccaaa          gga
          Exon1
1  ATGTTGAAGGTCTATTTTCTTGTGGCTCTCCTCTTTGTGGCTGTAGCGGCCATCATGGCA
1  M V K V Y F L V A L L F V A V A A I M A
          Exon2
61  GCACCCGTGGAGGAGGAGTACGAGCTCCTCGAACAGCTGGTATCGAGGAACGTGCCGAT
21  A P V E E E Y E L L E Q A G I E E R A D
          Exon3
121  AGACAAAGAAGAGTGACCTGCGATCTTCTCTCCATCAAAGGAGTCGCTGAACATAGTGCT
41  R Q R R V T C D L L S I K G V A E H S A
          Exon4
181  TGGCTGCCAATTGTCTCAGCATGGGCAAAGCTGGAGGTCGCTGCGAGAACGGAGTCTGC
61  C A A N C L S M G K A G G R C E N G V C
          Exon5
241  CTTTGGCGCAGACCAACTTCAAGGATCTCTGGGACAAACGTTTCGGTTAAatccaattot
81  L C R K T N F K D L W D K R F G *
301  accaatcctacaccaagctccgacgaatttccatgacgagagatccgcaagaagag
361  cegactaatgtcaagaaattaccaaatttaaaaaaagtacgcttattttattatagt
421  tatagtgaatcttctactaaaaattccgtggagcttatgttgttaaaatccatccat
481  tatctgataatacagccgagctcttttgacaagctattatacagaataaataaagtttca
541  aaagaagaaaagacataaacaacaaaaaaaaaaaaa

```


(P17722), *stomoxys calcitrans* (O16137), *Drosophila melanogaster* (P36192), *stomoxys calcitrans* (O16136), *Aedes aegypti* (P81603), and *Anopheles gambiae* (Q17027). BiDef sequence was used as a reference for the identity / similarity (Id/Si) values.

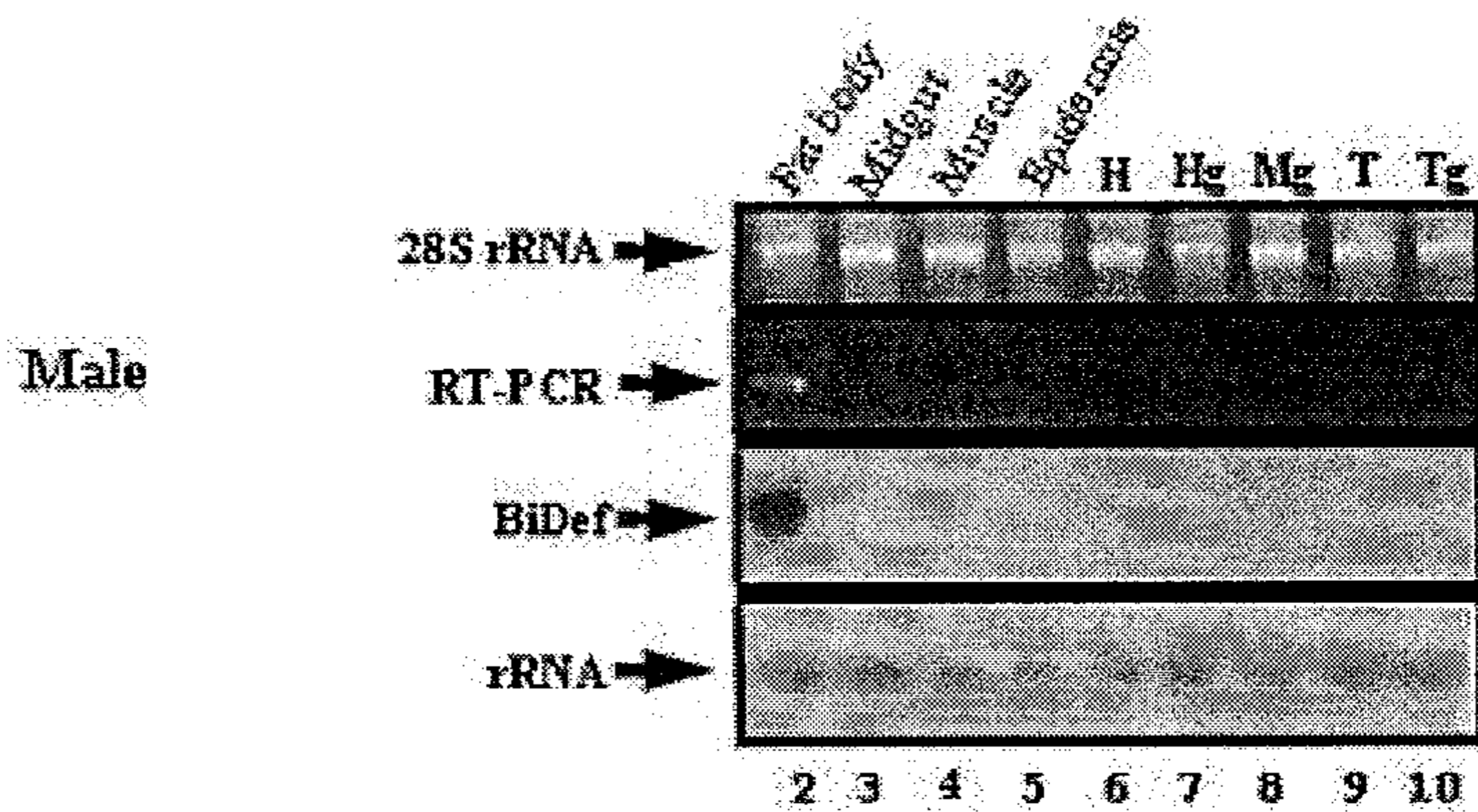
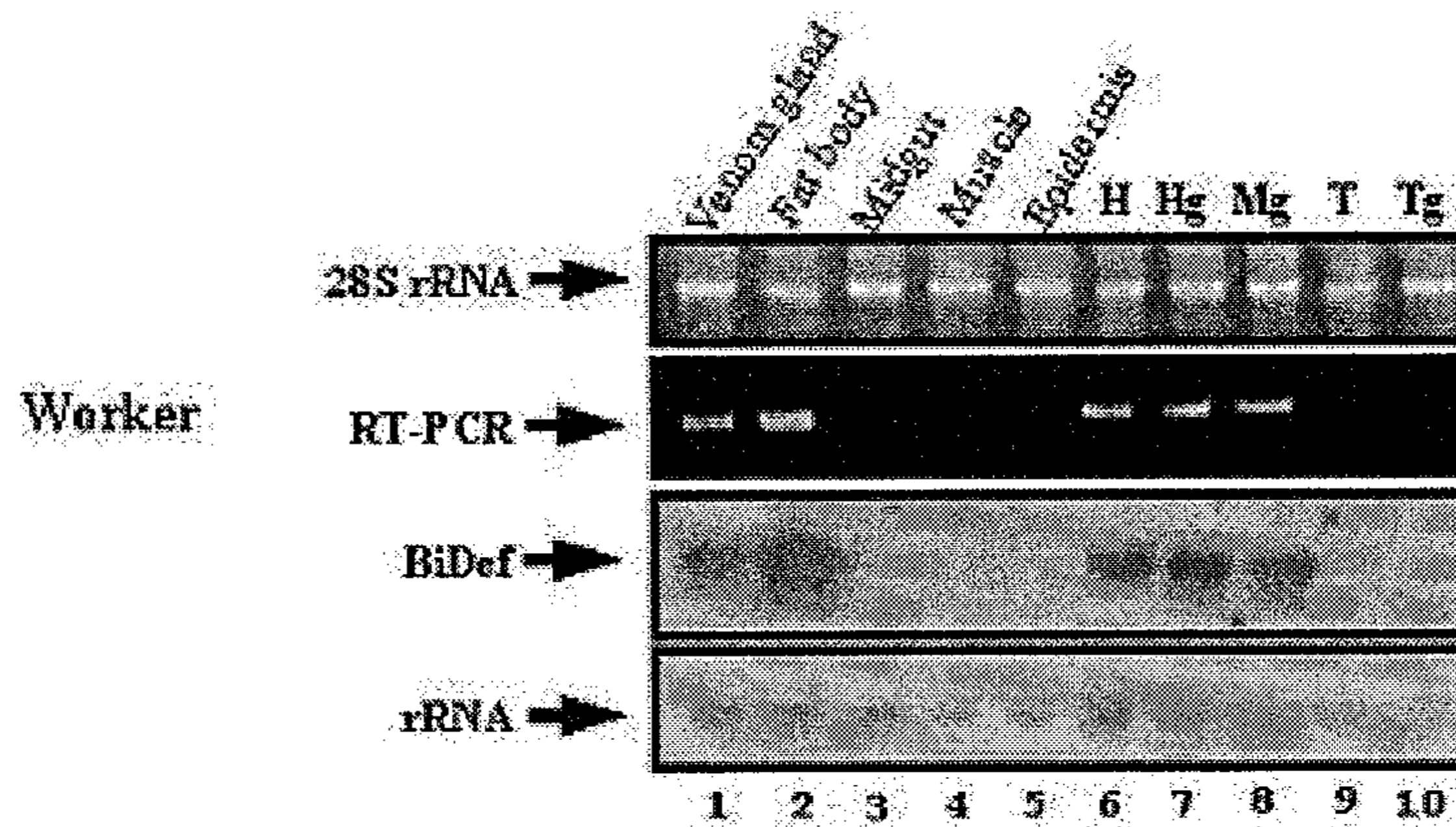
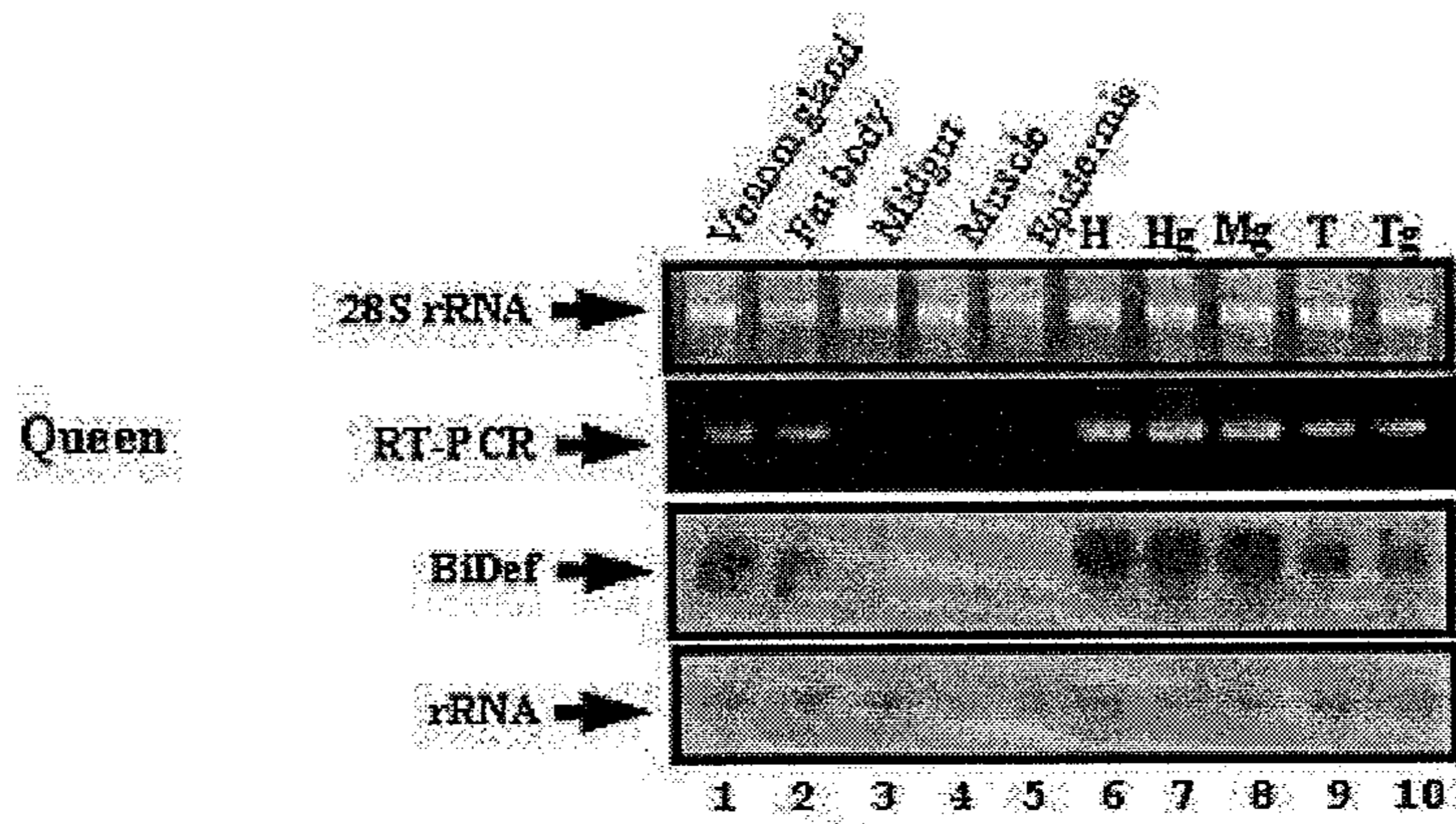


Fig. 6. Tissue distribution of the BiDef mRNA by RT-PCR and Northern blot hybridization. Total RNA was isolated from the venom gland (lane 1), fat body (lane 1), midgut (lane 3), muscle (lane 4), epidermis (lane 5), head (lane 6), hypopharyngeal gland (lane 7), mandibular gland (lane 8), thoraces (lane 9), and thoracic salivary gland (lane 10) of queen, worker and male, respectively. RT-PCR was performed under the conditions described in Materials and methods. The RNA was separated by 1.0% formaldehyde agarose gel electrophoresis, transferred onto a nylon membrane, and hybridized with radiolabelled BiDef cDNA. Transcripts are indicated on the right side of the panel by an arrow (BiDef). Ethidium bromide stain and Northern blot of rRNA are shown as a loading control.

라) 호박벌 유래 apidaecin

본 연구에서 그람음성균인 갈반병을 방제하기 위해 최종 선별된 항균단백질 유전자로써, 호박벌 cDNA 유전자은행으로부터 발현 유전자꼬리표 작성 중, 기존에 보고된 apidaecin 유전자와 상동성을 보이는 clone 62를 클로닝하고 전체 염기서열을 밝혔다 (Fig. 7A). 그 결과, *B. ignitus* apidaecin cDNA (BiApid)는 611 bp이고 ORF는 540 pb의 염기서열과 179 아미노산 서열로 이루어져 있었으며 polyadenylational signal, AATAAA는 589-594 염기서열에 위치하고 있었다. 분자량은 20561 Da, pI는 9.56으로 예상되었다.

기존에 보고된 apidaecin과의 비교에서 BiApid는 *Apis mellifera* apidaecin과 가장 높은 54%의 상동성을 보이며, prepeptide 및 propeptide 영역을 가지고 있고 apidaecin 유전자에서 보고되고 있는 활성영역인 ...R(K)P...PRPPHPRL(I)가 반복되고 있음을 알 수 있었다. 기본 구조는 leader sequence, pro sequence 및 unprocessed peptide를 갖고 있는 것으로 나타났으며, proline-rich insect antibacterial peptides로 알려진 abaecin이나 drosocin과는 다르게 pro sequence가 반복되는 특징을 보였다 (Fig. 7B). 또한, honey bee, bumble bee, Cicda Killer Bald-faced hornet, Yellow jacket & german wasp, 및 *C. disparis* 등의 apidaecin-type peptides는 대개 18개미만의 아미노산 내에서 동일하게 보존된 ...R(K)P...PRPPHPRL(I)서열이 존재하는 것으로 알려져 있다 (Casteels *et al.*, 1994). 곤충의 혈림프에서 기능을 갖기 위해서는 3단계들을 거치고 Carboxypeptidase, endopeptidase, dipeptidyl aminopeptidase의 효소들이 작용해야 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 이 유전자의 활성영역인 17개의 아미노산 잔기를 클로닝하여 갈반병 방제를 위한 유전자로 활용하였다.

BiApid 유전자가 발현되는 조직을 알아보기 위하여 여왕벌, 일벌 그리고 수벌로부

터 독샘, 지방체, 중장, 근육, 표피, 머리, 하인두샘, 턱샘, 침샘, 가슴 및 가슴샘을 채취하여 total RNA를 분리하고 RT-PCR 및 Northern blot 분석을 실시하였다. 그 결과, 여왕벌의 경우, 독샘, 지방체, 머리, 하인두샘, 침샘, 가슴 및 가슴샘 조직에서 발현되는 것으로 나타났으며, 일벌의 경우, 독샘, 지방체, 머리, 하인두샘 그리고 침샘에서 발현이 되었으며, 수벌의 경우에는 지방체 조직에서만 발현이 되는 것을 알 수 있었다 (Fig. 8). 이러한 결과들은 RT-PCR과 Northern blot 분석에서 똑같은 결과로 나타났으며, BiDef와 BiApid의 이러한 발현양상은 아직 기존에 보고되지 않은 결과들로써 호박벌에 대한 생리적인 연구가 더 필요하리라 사료된다.

(A)

```

-32                cagagatctgaccactagtcattagaaaatc
  1 ATGAAGAATTTTATCTTCGCTATTCTGGCTATTACCTTTGTGGTAGCCGCATCTACCACC
  1 M K N F I F A I L A I T F V V A A S T T
  61 GTAATCCCAATGACGTAACACTGAGCTCCGTCATAGTAGGGAAGCTGGACCGGAACCA
  21 V I P N A R K T E L R H S R E A G P E P
  121 GAMCCAAGTAATCGACCACCCCGACCTATAAGTCTCCCAACCAATTAATCCTCGCCTTCCT
  41 E P S N R P P R P I S L P P I N P R L P
  181 CGTGAAGCTGATCCAGAACCAGCAACCGACCGGTGTACGTTCCACCACCACGT
  61 R E A D P E P E P A N R P V Y V P P P R
  241 CCACCACATCCGCGTCTTCGTCGCGAAGCTGATCCAGAACCAGCAACCGCAACCGACCA
  81 P P H P R L R R E A D P E P E P A N R P
  301 GTGTACGTTCCACCACCACGTCCACCACATCCGCGTCTTCGTCGCGAAGCTGATCCAGAA
  101 V Y V P P P R P P H P R L R R E A D P E
  361 CCGGAACCAGCAACCGACCGGTGTACGTTCCACCACCACGTCCACCACATCCGCGTCTT
  121 P E P A N R P V Y V P P P R P P H P R L
  421 CGTCCGGAAGCTGATCCAGAACCAGCAACCGGTGTACGTTCCACCACCACGTCCACCACATCCGCGTCTT
  141 R R E A D P E P E V G Y R S M Y Y T R P
  481 TGTTTACTATTTTCGCACCTTCGTTATGGACCTCATGCAGATGAGGAATTATATTACTGA
  161 C L L F S H L R Y G P H A D E E L Y Y *
  541 ccaaacatcatatccgccaggctgaatgtacgttgaaactcgaagaagtatTTTTTatt
  601 tcctaataatacccaaggcgaattgaaatTTTTaacctaataactctgtaagatgtagtt
  661 aacttcacaataaaattggttattTTTTaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
  
```

(B)

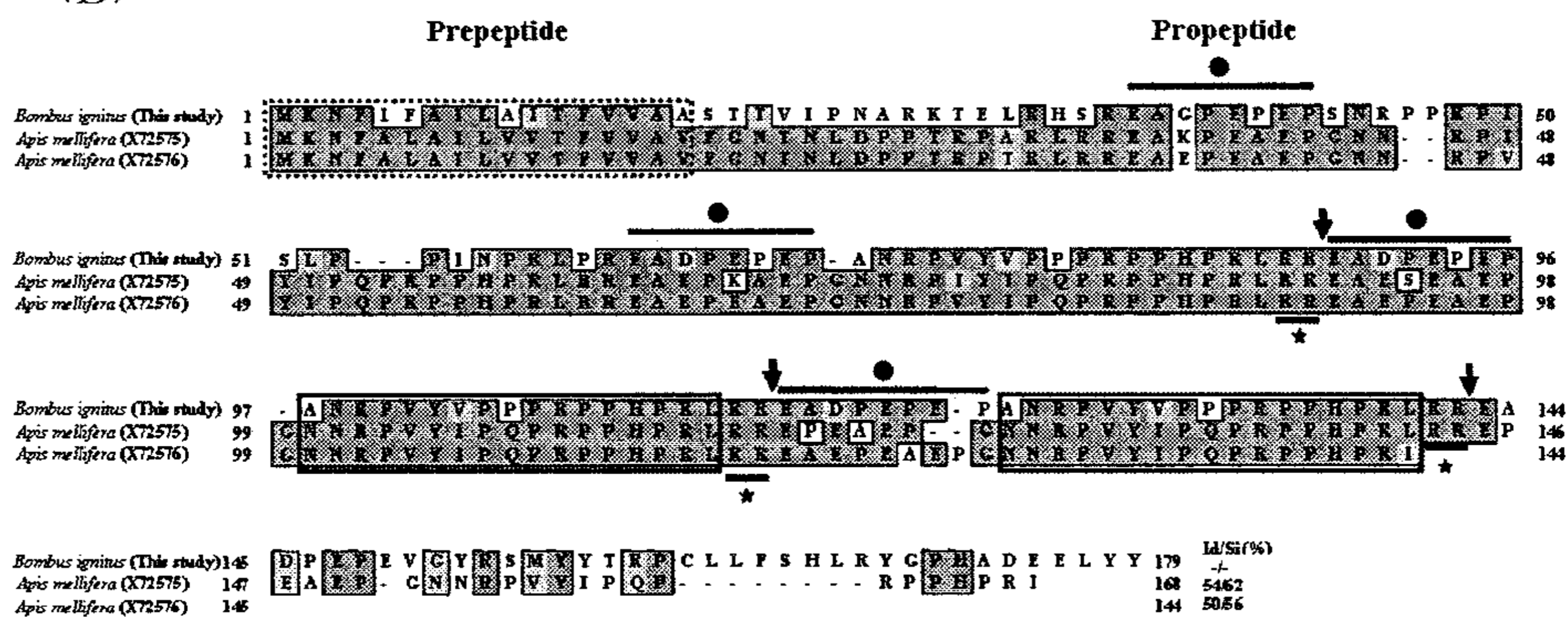
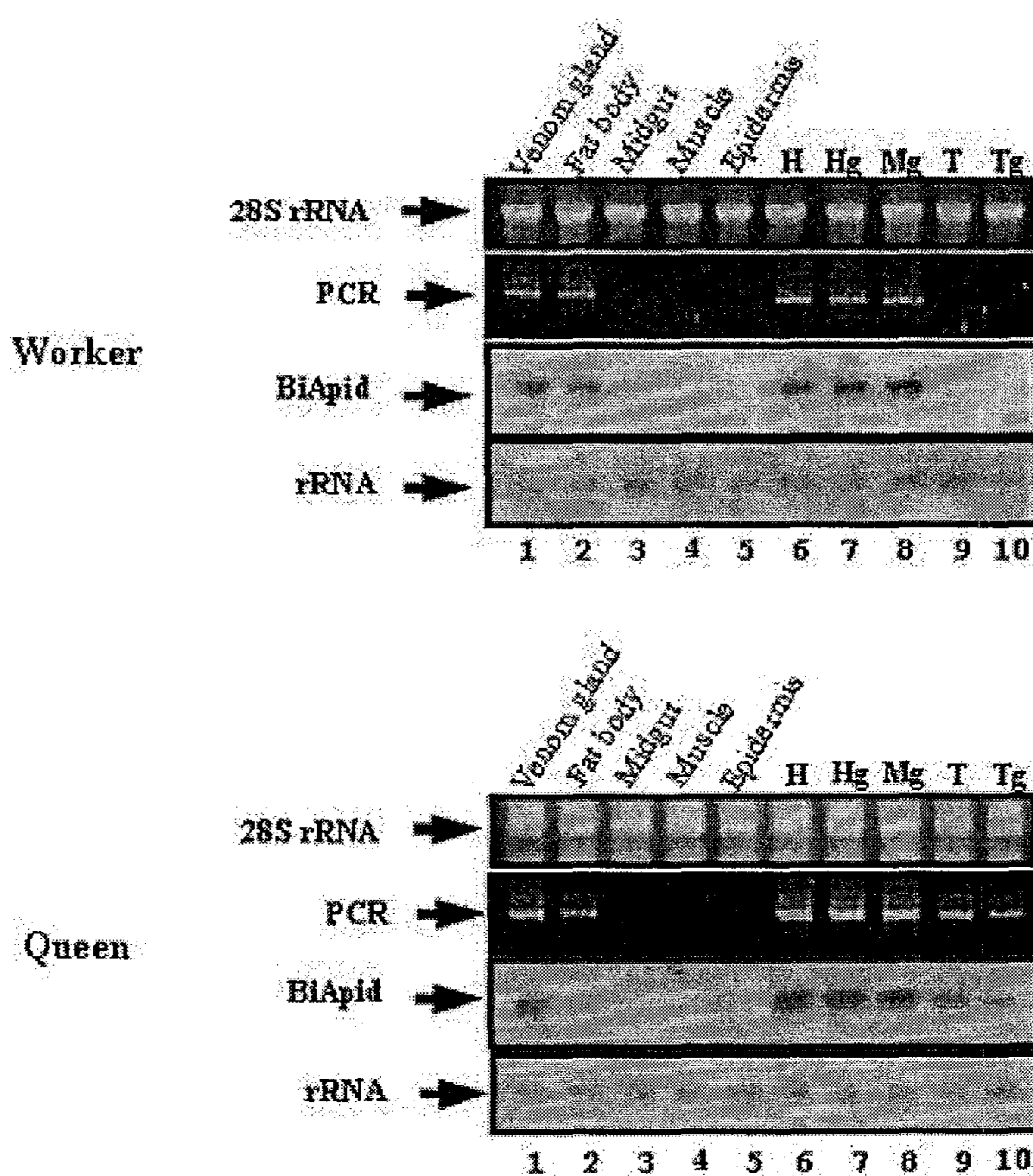


Fig. 7. cDNA sequence and structure of the apidaecin. Nucleotide sequence and predicated amino acid sequences of prepro-apidaecin cDNA clones numbers at the left indicate positions of the nucleotide and amino acid residues (A). The ATG start codon is boxed. The star symbol above the nucleotide sequence indicated sequences indicates the translational stop signal (TGA). Poly(A) adenylation signals (AATAAA) are indicated by line. (B) Comparison of the deduced amino acid sequence of apidaecin with that of other apidaecins. The pro-sequences are indicated by dotted box, the basic (RR) dipeptides by a star and mature peptides are indicated by an open box, respectively. Putative processing sites for prepro-apidaecin by an endopeptidase (↓) and a carboxypeptidase (★), and processing sites for dipeptidyl aminopeptidase (●). GenBank accession numbers are: *Apis mellifera* (X72575), *Apis mellifera* (X72576). BiApid sequence was used as a reference for the identity / similarity (Id/Si) values.



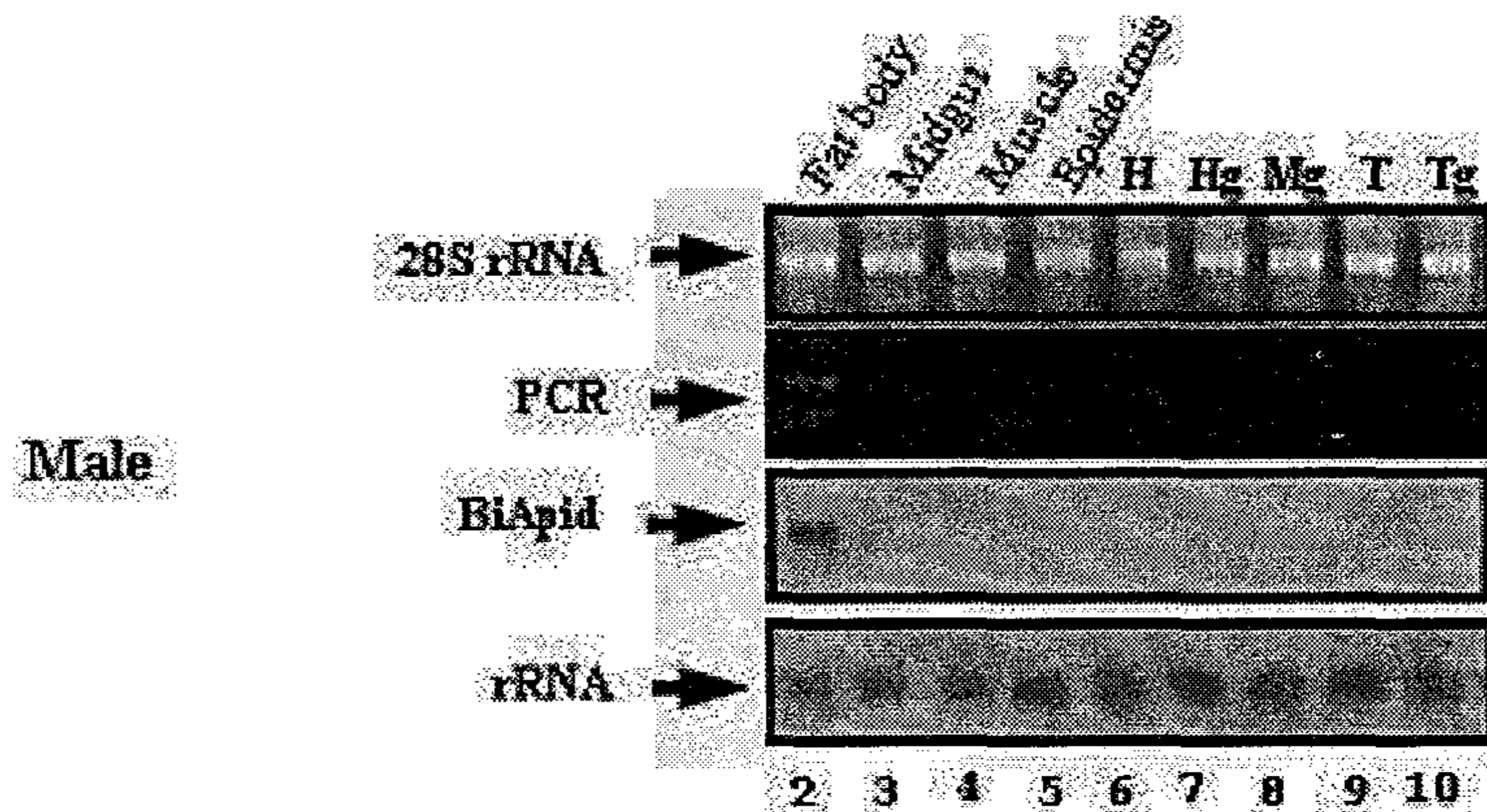


Fig. 8. Tissue distribution of the BiApid mRNA by RT-PCR and Northern blot hybridization. Total RNA was isolated from the venom gland (lane 1), fat body (lane 1), midgut (lane 3), muscle (lane 4), epidermis (lane 5), head (lane 6), hypopharyngeal gland (lane 7), mandibular gland (lane 8), thoraces (lane 9), and thoracic salivary gland (lane 10) of queen, worker and male, respectively. RT-PCR was performed under the conditions described in Materials and methods. The RNA was separated by 1.0% formaldehyde agarose gel electrophoresis, transferred onto a nylon membrane, and hybridized with radiolabelled BiApid cDNA. Transcripts are indicated on the right side of the panel by an arrow (BiApid). Ethidium bromide stain and Northern blot of rRNA are shown as a loading control.

나. 재조합 항균단백질의 특성 및 활성 검정

1) 재조합 단백질, BiApid의 발현 및 Western blot 분석

본 연구의 경우, BiApid의 pro-sequence의 mature apidaecin 17개의 아미노산만을 벡로로바이러스에서 발현하기 위해 pBAC1 vector에 cloning 작업을 수행하여 전이벡터 pBAC1-BiApid를 제작하였다. 전이벡터 pBAC1-BiApid 플라스미드 DNA와 viral DNA를 Sf9 곤충세포에 co-transfection 시켜 재조합 벡로로바이러스 AcNPV-BiApid를 제작하였다. 재조합 벡로로바이러스를 감염시켜 15% SDS-PAGE를 실시하였다 (Fig. 9A). 재조합 단백질 BiApid는 약 2 kDa으로 발현되었다.

His-tag Column을 이용하여 재조합 벡로로바이러스 AcNPV-BiApid를 감염시킨 곤충세포주로부터 재조합 단백질 BiApid를 분리하고 15% SDS-PAGE를 실시하였다

(Fig. 9B). 그 결과, 2일째, 3일째 재조합 배큘로바이러스를 감염시킨 곤충세포주에서만 약 2 kDa의 single band를 얻었다.

2) Western blot 분석

곤충세포주 Sf9에 재조합 배큘로바이러스 AcNPV-BiApid를 감염시키고 15% SDS-PAGE를 실시하고 Western blot 분석을 위하여 membrane에 transfer시켰다. 항체는 anti-His-Tag을 이용하여 Western blot을 실시하였다. 그 결과, 2일째, 3일째 재조합 배큘로바이러스를 감염시킨 곤충세포주에서만 약 2 kDa의 single band를 확인할 수 있었다 (Fig. 9C).

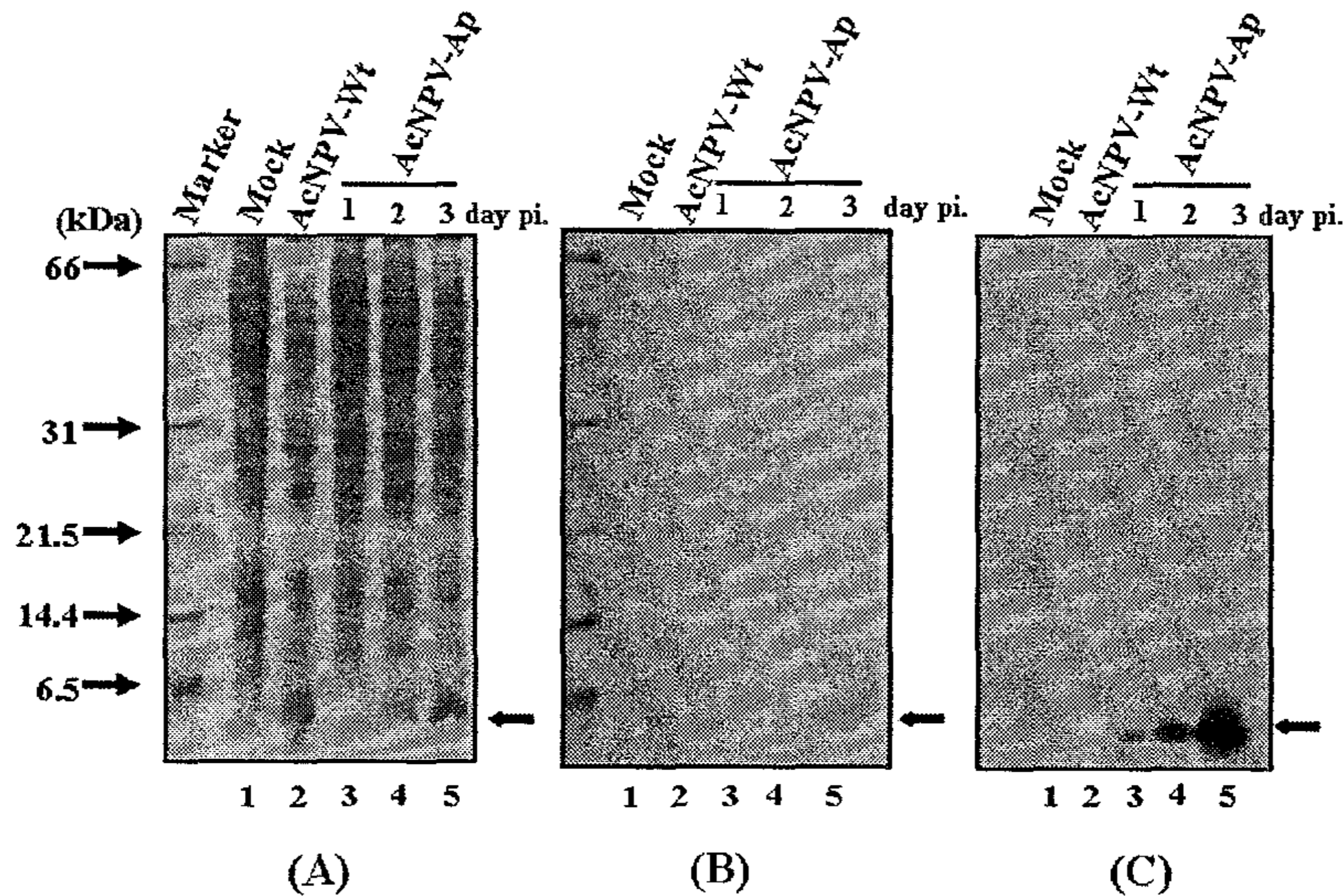
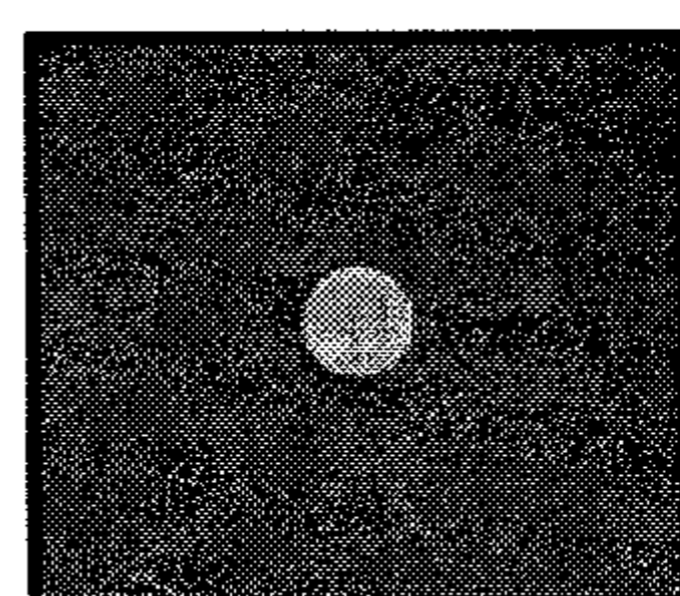
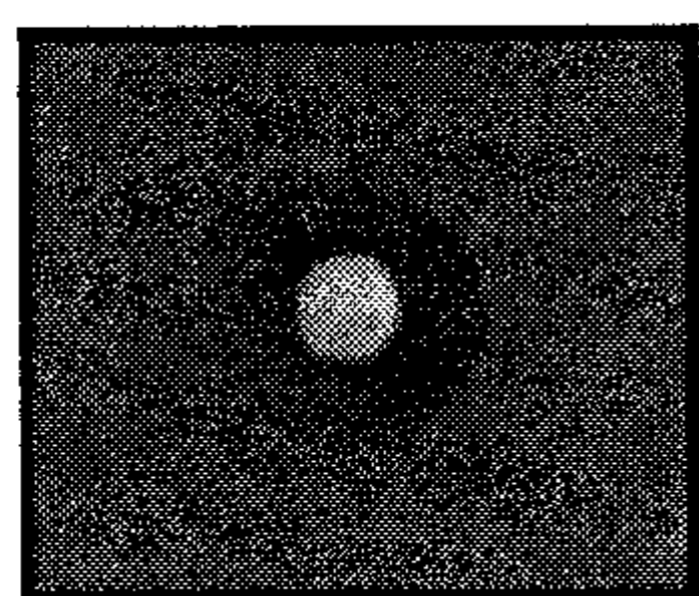


Fig. 9. SDS-PAGE and Western blot analysis of the recombinant 17-residue BiApid expressed in baculovirus-infected insect cells. Sf9 cells were mock-infected or infected with wild-type AcNPV and recombinant AcNPV (AcNPV-BiApid) at a MOI of 5 PFU per cell. Cells were collected at 3 days p.i. Total cellular lysates were subjected to 15% SDS-PAGE (A). The purified 17-residue BiApid was subjected to 15% SDS-PAGE (B), electroblotted and incubated with His tag antibody (C). The recombinant 17-residue BiApid is indicated by the arrow on the right side of the panel. Molecular weight standards were used as size markers.

3) Inhibition zone assay

정제한 재조합 단백질 BiApid에 대한 항균 실험을 실시하였다. LB plate에 그람 음성균인 *Pseudomonas tolassi*와 그람 양성균인 *Bacillus thuringiensis*를 도말하고 재조합 단백질 40 μg 을 포함한 100 μl 를 white disk에 첨가하여 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 48시간 동안 배양하였다. 그 결과, 그람 양성균인 *B. thuringiensis*에는 clear zone이 생성되지 않고 그람 음성균인 *P. tolassi*에만 clear zone이 생성되는 것을 확인하였다 (Fig. 10). 이러한 결과는 기존에 보고된 apidaecin의 결과와 일치하며 형질전환 Bt를 제작하는데 유용하게 사용되어질 수 있다.



Pseudomonas tolassi (Gram -) *Bacillus thuringiensis* 656-3(Gram+)

Fig. 10. Inhibition zone assay of the 17-residue BiApid against Gram-negative (A) and Gram-positive bacteria (B). The 17-residue BiApid was applied on disks (40 μg in 100 μl). Plates were incubated at 30 $^{\circ}\text{C}$. Inhibition zones were recorded after 48 h.

4) Minimal inhibitory concentration (MIC) assay

재조합 단백질 BiApid에 대한 항균 test를 실시하기 위하여 4가지 종류의 그람 음성균인 *E. coli* Top 10F', *P. tolassi*, *P. tolassi* ATCC33618 및 *P. aeruginosa*와 그람 양성균인 *B. thuringiensis* 656-3, *B. megaterium*, *B. subtilis* 및 *B. cereus*에 대한 MIC 값을 측정하였다 (Table 2). 그람 양성균에서는 전혀 항균활성을 나타내지 않았으며, 그람 음성균에서만 특이적으로 활성을 나타내었다. 그람 음성균인 *E. coli* Top 10F' (>20 μM)에서는 *P. tolaasii* (>125 μM) 보다 약 6.25배 높은 활성을 나타내는 것으로 나타내었다. 이러한 결과들은 apidaecin이 그람 음성균에만 항균활성을 가지는 것으로 보여준다. 이러한 결과들은 BiApid 유전자를 이용하여 본 연구에 중요한 재조합 Bt 656-3을 제작하는데 필수적인 유전자로 사료된다.

Table 2. Antibacterial activity against gram-negative and gram-positive bacterial of *B. ignitus* apidaecin peptide. Minimal inhibitory concentration (MIC) values are presented in μM

strain	Gram	MIC(μM) ^a
<i>E. coli</i> Top 10F	-	>20
<i>P. tolaasii</i>	-	>125
<i>P. tolaasii</i> ATCC33618	-	>160
<i>P. aeruginosa</i>	-	>149
<i>B. thuringiensis</i> 656-3	+	ND ^b
<i>B. megaterium</i>	+	ND
<i>B. subtilis</i>	+	ND
<i>B. cereus</i>	+	ND

^aMIC was defined as the lowest peptide concentration that prevented visible bacterial growth after 18h incubation at 30°C(Gram-)and 37°C(Gram+) in nutrient broth, with approximately $1.5-2.0 \times 10^5$ colony forming units/mL.

^bCan not defined MIC value (Using 300 μM Apidaecin peptide)

다. 재조합 Bt 656-3 균주의 제작

항세균성 형질전환 Bt 균주의 제작을 위한 후보 항세균 유전자로 분리한 호박벌 유래 Apidaecin-type 유전자 (*Apid* gene)를 확보하였다. 이 유전자는 꿀벌과 (*Apidae*) 곤충의 체액성 면역에 관여하는 것으로 잘 알려진 apidaecin과 높은 상동성을 보이는 유전자로서, 이 유전자의 효율적인 발현을 위한 클로닝 전략을 수립하고자 기존의 보고를 바탕으로 유전자 구조분석을 수행하였다. 그 결과, 기본 구조는 leader sequence, pro sequence 및 unprocessed peptide를 갖고 있는 것으로 나타났으며, proline-rich insect antibacterial peptides로 알려진 abaecin이나 drosocin과는 다르게 pro sequence가 반복되는 특징을 보였다. 또한, honey bee, bumble bee, Cicda Killer Bald-faced hornet, Yellow jacket & german wasp, 및 *C. disparis* 등의 apidaecin-type peptides는 대개 18개미만의 아미노산 내에서 동일하게 보존된 ...R(K)P...PRPPHPRL(I)서열이 존재하는 것으로 알려져 있다 (Casteels *et al.*, 1994). 곤충의 혈림프에서 기능을 갖기 위해서는 3단계들을 거치고 Carboxypeptidase, endopeptidase, dipeptidyl aminopeptidase의 효소들이 작용해야 하는 것으로 알려져 있다.

본 연구의 경우 pro sequence의 mature apidaecin 17개의 아미노산만을 Bt에서 발현

하기 위해 pLip vector에 cloning 작업을 수행하였다 (Fig. 11). BiApid 유전자의 클로닝 유무를 확인하기 위하여 PCR을 수행하였다 (Fig. 12). 이렇게 제작된 pLip-BiApid는 Bt 656-3 균주의 개량에 사용하였다.

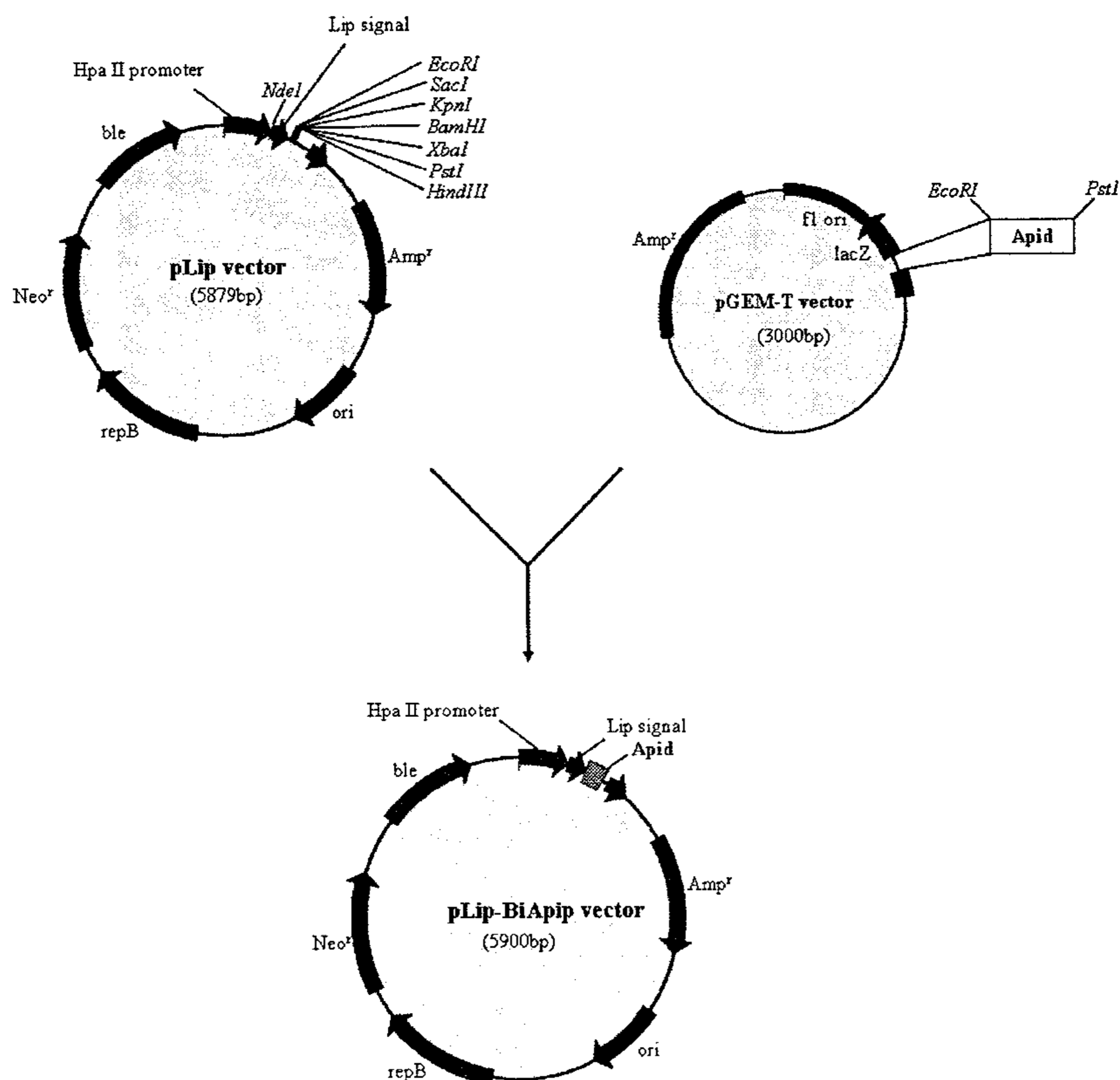


Fig. 11. Construction of the pLip-BiApid expressing BiApid under the control of Hpa II promoter.

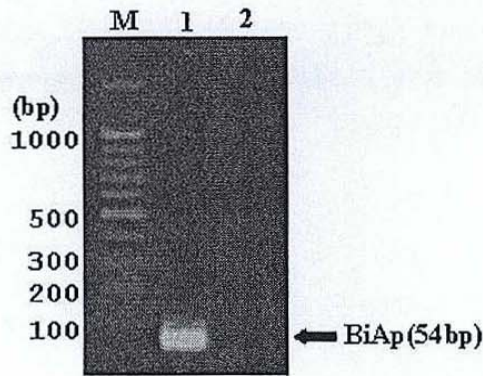


Fig. 12. PCR analysis of BiApid

라. 살충성 및 살균성 Bt 656-3 균주의 선발

버섯파리 특이적인 살충성을 갖는 Bt 656-3 균주에 pLip-BiApid를 electroporation 실시하여, Bt 656-3 균주에서 자체적으로 항세균성 단백질을 생산하도록 하였다. 선발된 개량형 Bt 656-3 균주는 항세균성 검정을 위하여 실험하였다. LB plate에 도말한 후, white disc에 개량형 Bt 656-3 배양액을 100 μ l를 넣고 30°C에서 48시간동안 배양하였다. 그 결과, *P. tolaasii*의 생장이 억제되어 clear zone이 생성되는 것을 확인하였다 (Fig. 13). 그러나 clear zone이 약하게 나타난 것으로 보아, 개량형 Bt 656-3에서 BiApid 유전자의 발현량이 많지 않은 것으로 사료되었다.

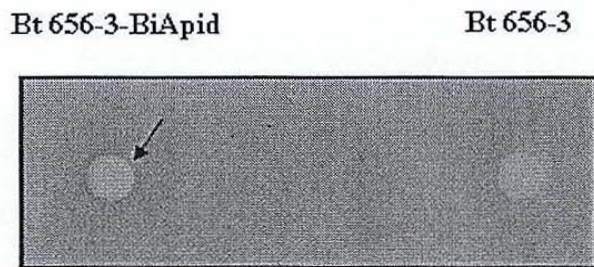


Fig. 13. Antibacterial test of recombinant Bt 656-3-BiApid and Bt 656-3.

마. 재조합 항세균성 미생물 (*Brevibacillus brevis*) 균주 제작

(1) Bt 독소 유전자 *cry1Ac* 유전자를 발현하는 재조합 항세균성 미생물 균주 제작

항세균성 미생물, *B. brevis*에서 *B. thuringiensis* 독소 유전자를 발현 가능성을 검토하기 위하여 제작한 재조합 *B. brevis* 균주, *B. brevis* 3101-3 (Fig. 14)으로부터 *cry1Ac* 유전자의 삽입여부를 판단하기 위하여 PCR을 수행하였다 (Fig. 15). 이 결과를 볼 때, 기 제작한 pHT1K-1Ac vector가 안정적으로 *B. brevis* 균주에 transformation 되어 있음을 확인하였다. 선별된 재조합 *B. brevis* 균주의 Bt 독소 유전자 *cry1Ac* 유전자 발현유무를 SDS-PAGE를 실시하고 Western blot 분석을 실시하였다 (Fig. 16). 그 결과, 재조합 항세균성 미생물 *B. brevis* 3101-3 균주는 wild type *B. brevis*와는 달리 약 130 kDa의 *cry1Ac* 독소 단백질이 발현되었으며, Western blot 분석에서도 재조합 항세균성 미생물, *B. brevis* 3101-3에서만 *cry1Ac* 독소 단백질이 발현된다는 것을 확인하였다. 이러한 결과를 고려해 볼 때, 항세균성 미생물에서 파리목 독소 유전자인 *cry4D* 유전자의 발현은 또 하나의 전략으로 그 가능성을 제시해 준다.

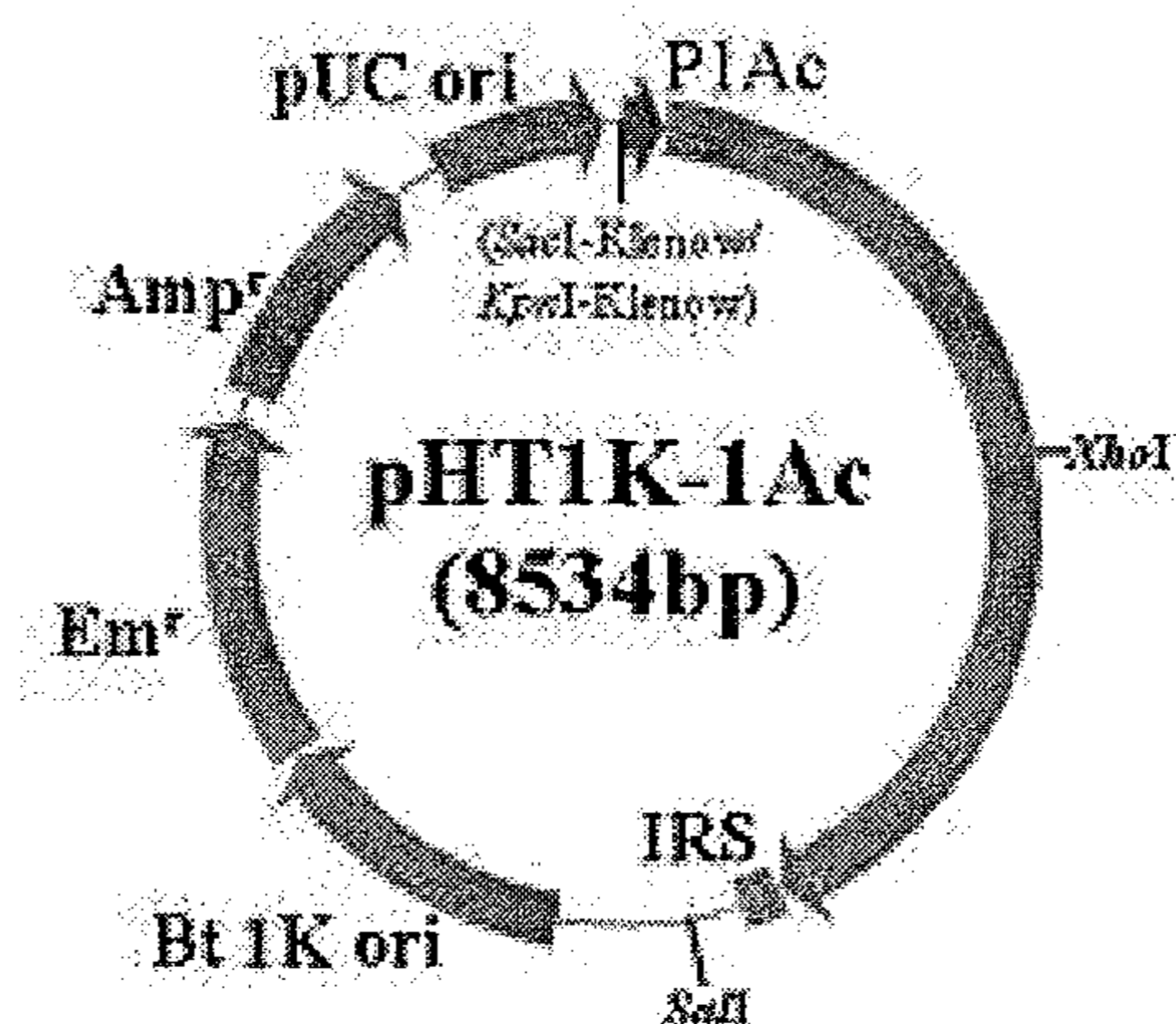


Fig. 14. Circular map of pHT1K-1Ac vector, expressing the *cry1Ac* gene in *B. brevis*.

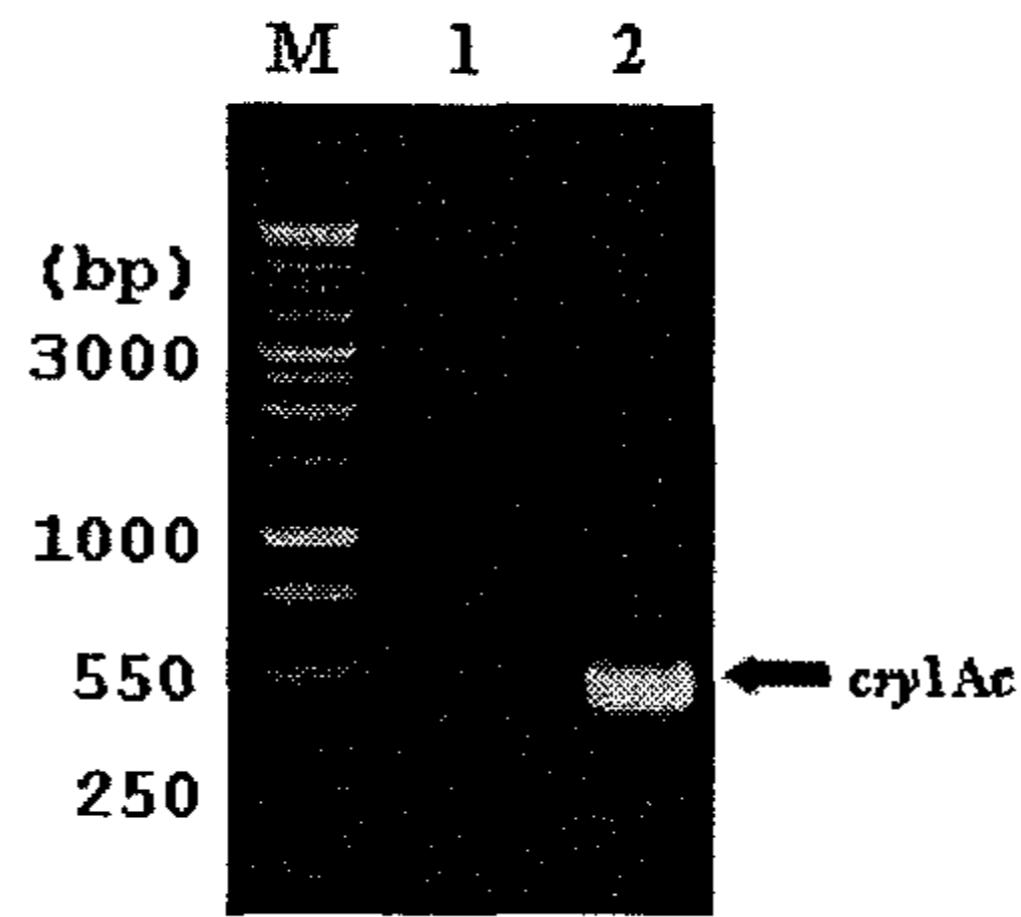


Fig. 15. Detection of *B. brevis* 3101-3 by PCR. The PCR products of *B. brevis* (lane 1) and *B. brevis* 3101-3 (lane 2) were analyzed by agarose gel electrophoresis.

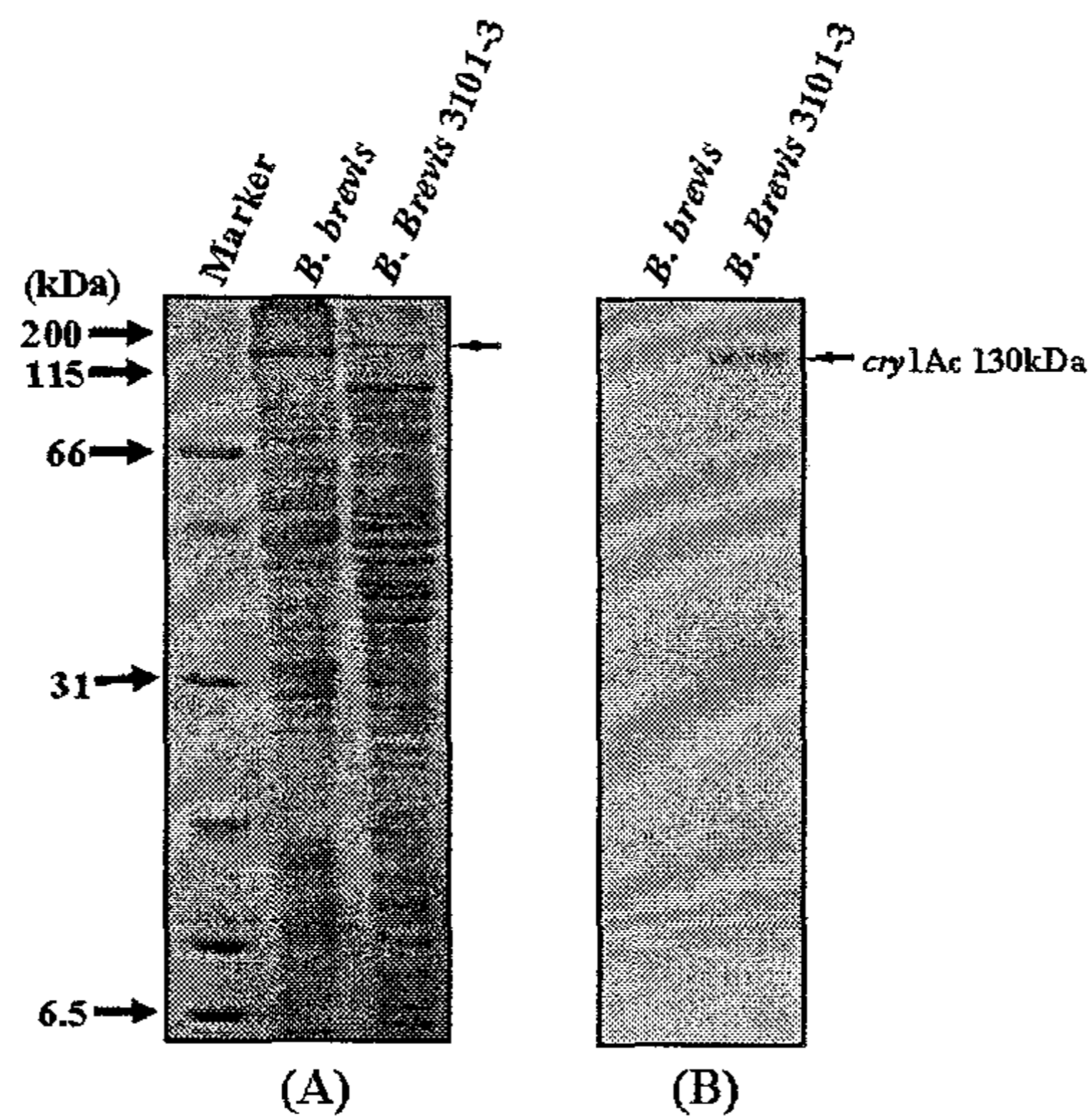


Fig. 16. SDS-PAGE and Western blot analysis of *B. brevis* 3101-3. *B. brevis* 3101-3 cells were incubated at 30 °C for 24 hours. Wild type *B. brevis* and *B. brevis* 3101-3 were subjected to 14% SDS-PAGE (A), electroblotted and incubated with cry1Ac antibody (B).

(2) 파리목 살충성 유전자 *cry4D* 유전자를 발현하는 재조합 항세균성 미생물 균주 제작

개량형 Bt 656-3-BiApid의 항세균성 활성이 예상과는 달리 미약하여 협동과제에서 분리, 동정한 항세균성 미생물, *Brevibacillus brevis*를 분양 받아, 이 항세균성 미생물에서 파리목에 살충성을 가지는 독소 단백질인 Bt 656-3의 *cry4D* 유전자를 클로닝하여 pLip vector에 ligation 시키고, pLip-cry4D를 제작 (Fig. 17)하여 *B. brevis*에 transformation을 시켜 항세균성 미생물에서 Bt crystal을 발현시키고자 하였다. 본 실험은 *B. brevis*를 개량하여 실험 중에 있으며 항세균 및 살충성을 갖는 새로운 미생물 제제로써, 기대가 된다.

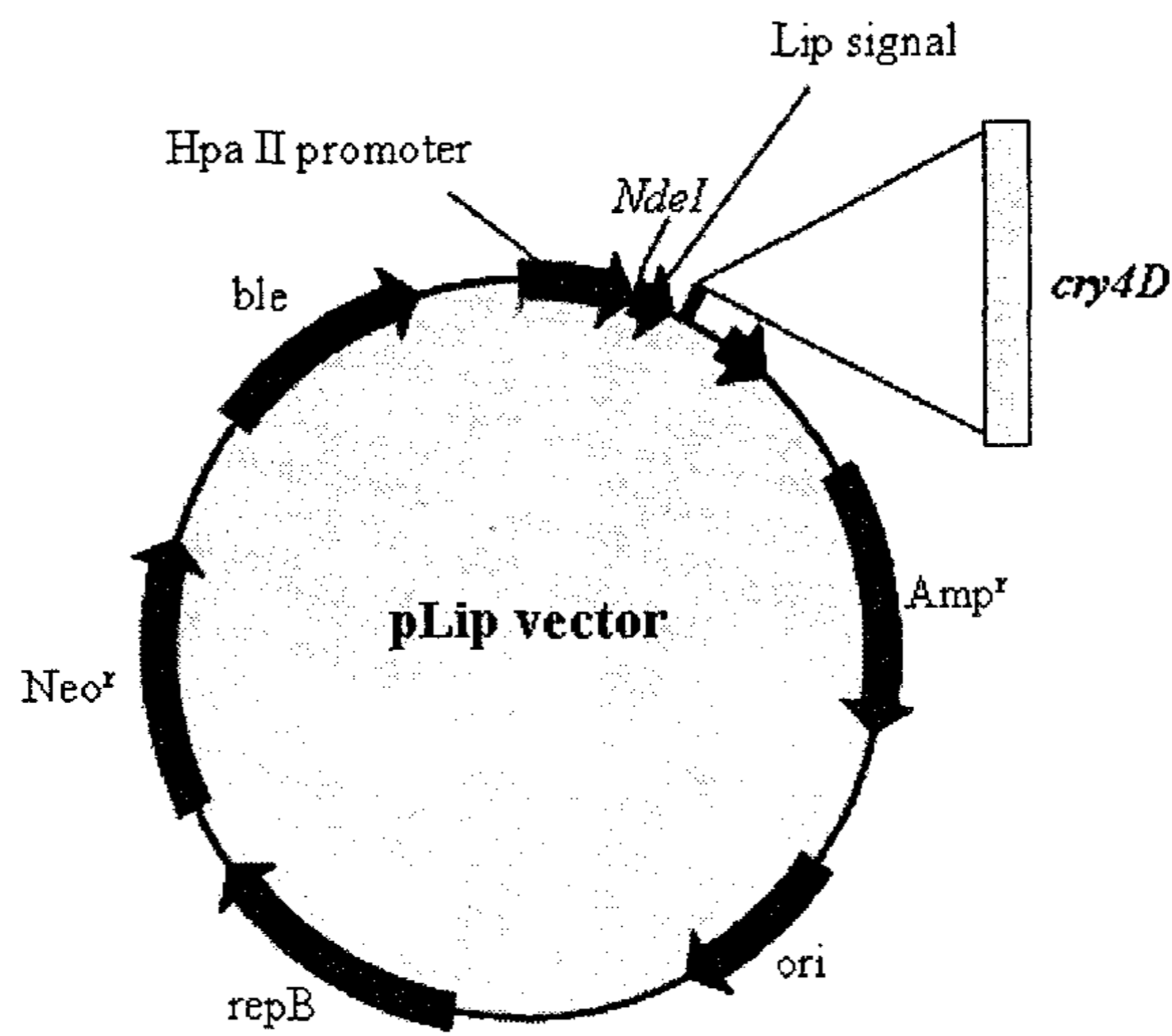


Fig. 17. Construction of the pLip-cry4 expressing *cry4D*.

제 2 절 항세균성 및 살충성 균주의 탐색, 대량배양 및 제제화

1. 재료 및 방법

가. 살충성 미생물 균주의 분리

1) 시료 채집

국내 느타리버섯 재배지 23개 지역과 전국 전답 등의 농업 및 산림지역을 대상으로 시료를 채집하였다. 시료 중에서 토양시료는 표토로부터 2-5 cm 깊이에서 수집하였으며, 산림시료 중에서 나뭇잎은 약 1 cm 이하의 높이에서 채집하였다. 또한, 버섯파리 피해지역의 주변 토양과 버섯으로부터 직접 시료를 채집하였다. 채집한 모든 시료는 4°C에서 보관하여, 이후 실험에 이용하였다.

2) *Bacillus thuringiensis* (Bt) 균주의 분리

Bt 균주의 분리는 Ohba와 Aizawa(1978)와 Park(1997)이 보고한 방법에 따라 분리하였다. 버섯 시료 및 토양 시료의 경우, 1 g 시료를 시험관에 넣고, 10 ml 멸균된 증류수로 현탁한 다음, 5분 동안 강하게 섞어 주었다. 미생물의 생장을 억제하고 선택적 Bt 균주의 배양을 위해 현탁된 시료를 80°C에서 10분간 열처리를 한 다음, 희석평판 배양법으로 100, 1000배로 희석하여 영양배지(nutrient agar; NA, Difco, Bacto^R)에 도말하였다. 산림 시료의 경우, 2-3 cm² 면적의 나뭇잎을 멸균된 칼로 자른 후, 1 ml의 멸균된 증류수를 넣고 막자사발을 이용하여 분쇄하였다. 1 ml의 분쇄된 시료를 시험관에 넣고 80°C에서 10분간 진탕하면서 열처리를 하였다. 상온에서 30분간 방치한 후 0.2 ml의 시료를 취해서 영양배지에 도말하였다. 각각의 배지들을 30°C에서 4-7일간 배양한 후에 형성된 *Bacillus* 콜로니들 중에서 외형이 Bt와 비슷한 콜로니들에 대해서 위상차 현미경으로 내독소 단백질과 포자의 형성 여부를 관찰하였다. 내독소 단백질을 형성하는 콜로니는 순수 배양하여 4°C에서 보관하면서 살충성 조사를 비롯한 기타 실험을 수행하였다.

나. 항세균성 미생물의 선발

1) 항세균성 미생물의 선발

각 지역의 토양으로부터 갈반병에 대한 항세균성 미생물을 분리하기 위하여 *Pseudomonas tolaasii*를 병원균으로 사용하여 double agar layer method 방법으로 총 265개의 균주로부터 screening을 실시하였다. 먼저, LB agar 배지에 antibacterial activity를 assay하고자하는 균주들을 5 mm 정도 streak 하고 LB broth 배지에 본 실험에서의 사용 병원균인 *P. tolaasii*를 밤새 배양하였다. 2일째, LB Top agar (LB broth에 0.7% agar)를 만들어서 autoclave 한 후에 40~45°C water bath에 식히고 밤새 배양한 *P. tolaasii* 배양액을 LB Top agar 1 ml당 100 µl 씩 넣은 후, *P. tolaasii* 배양액이 첨가된 LB Top agar를 1일차에 assay할 균주를 steak해놓은 plate 위에 5 ml씩 골고루 덮었다. 3일차에 LB Top agar에서 antibacterial activity에 의해 halo가 생긴 균주를 확인하고 그 지름에 따라 활성의 정도를 측정하였다.

2) 파리목 살충성 Bt균주의 선발

분리된 Bt에 대한 살충력검정은 나비목 곤충인 누에나방(*Bombyx mori*)과 파리목 곤충인 빨간집모기(*Culex pipens*)의 유충을 대상으로 1차 수행하였다. 분리된 각각의 Bt균주를 GYS(0.1% Glucose, 0.2% Yeast extract, 0.05% K₂HPO₄, 0.2% (NH₄)₂SO₄, 0.002% MgSO₄, 0.005% MnSO₄·4H₂O, 0.008% CaCl₂)배지에 접종하여 세포내에 포자와 내독소단백질이 형성되고 autolysis에 의해 이들이 세포외부로 방출될 때까지 30°C에서 5일간 배양한 후, 원심분리(7000 rpm, 10분간)를 통하여 균체 수거하여 생물검정 시료로 이용하였다.

누에나방의 경우, 2 g의 인공사료에 각각 200 ul의 시료들을 첨가하여, 3령 유충 20마리씩 처리하고 25°C에서 사육하면서 48시간 동안 치사율을 조사하였다. 대조구로서는 나비목에 대표적인 살충성을 보이는 *Bt* subsp. *kurstaki* HD-1처리구와 무처리한 것을 사용하였다. 한편 빨간 집모기의 경우, 3령의 모기유충 20마리를 20 ml의 포자와 내독소 단백질 혼합물이 포함된 50 ml conical 튜브에 넣고 먹이를 주지 않으면서 25°C에서 48시간 동안 치사율을 조사하였다. 대조구로서는 파리목에 강한 독성을 보이는 *Bt* subsp. *israelensis* 처리구와 무처리한 것을 사용하였다.

다. 선발 항세균성 및 살충성 미생물의 특성 분석

1) 항세균성 미생물의 특성 분석

가) Genomic DNA 분리, 16S rRNA PCR 및 염기서열 분석

갈반병에 대한 항세균성 활성을 나타내는 두 개의 항세균성 미생물을 선별하여 LB broth 5ml에 각각의 single colony를 침지하여 37°C 배양기에서 8시간 동안 배양하고 3000 rpm에서 10분간 원심분리를 실시하여 균만을 모았다. 균은 PBS로 3회 washing하고 Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI)을 사용하여 genomic DNA를 분리하고 PCR에 사용하였다. 16S rRNA-F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'와 16S rRNA-R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'를 사용하여 PCR을 수행하고 PCR product은 pGemT vector에 ligation하여 vector 내에 존재하는 T7-primer와 Sp6-primer를 이용하여 ABI 310 automated DNA sequencer (Perkin-ELmer Applied Biosystem, Foster City, USA)를 사용하여 염기서열을 분석하였다. 염기서열은 NCBI에서 제공하는 DNASIS와 BLAST program을 사용하여 기존에 보고된 염기서열과 비교하여 균을 동정하였다.

2) 살충성 미생물의 특성 분석

가) 선발 균주의 내독소 단백질 모양 관찰

포자를 형성하는 콜로니에서 그들의 크기와 형태 및 내독소 단백질의 모양을 관찰하기 위해서 위상차현미경 (Nikon Optiphot-2)을 이용하였다. 위상차 현미경의 시료는 소량의 Bt 배양액을 멸균된 증류수로 현탁한 후, 슬라이드글라스에 떨어뜨리고 커버글라스를 덮어서 Emulsion Oil상에서 1,500배 배율로 관찰하였다.

나) 선발 균주의 정성적 살충력 비교

(1) 포자수 측정

파리목 살충성으로 확인된 Bt 균주를 영양평판배지를 이용하여 내독소 단백질이 형성될 때까지 30°C에서 5일 동안 배양한 후, 멸균 증류수 spreading 방법으로 수거하였다. Bt 수거액 100 ul 씩을 취하여 900 ul 의 멸균된 3차 증류수를 섞어 vortexing과

inverting을 통하여 충분히 혼합한 후 $1 \times 10^{-1} \sim 1 \times 10^{-8}$ 까지 1/10씩 희석하였다. 그중 1×10^{-6} 부터 1×10^{-8} 까지의 희석액에서 각각 100 ul 씩 취하여 NA 배지에 3 반복으로 도말하여 배양한 다음, 형성된 colony 수를 측정하여 Bt 배양액의 포자수를 확인하였다.

(2) 정량적 살충력 검정

파리목 해충에 대한 정량적 생물검정은 빨간집모기(*Culex pipiens pallens*) 1종과 버섯파리류(*Lycoriella mali*와 *Coboldia fuscipes*) 2종을 대상으로 실시하였다. 빨간 집모기의 경우 3령 유충 10마리를 포자의 농도가 각각 10^5 , 10^4 , 10^3 cfu/ml 이 포함된 시험관에 넣고 25°C에서 48시간동안 치사율을 조사하였다. 버섯파리류의 경우 Bt농도를 10^4 - 10^{13} cfu/ml 단계별로 설정, 먹이균사를 5초간 침지하였다가 실온에서 10시간 건조시켜 각 처리구당 2령 유충 10마리씩을 사용하여 72시간동안 치사율을 조사하였다.

다) 편모항혈청 제조와 면역학적 분석

기존의 35종의 Bt에 대한 편모항혈청은 1978년 Ohba와 Aizawa의 방법에 준하여 제조되었다. Bt 균주의 단일 콜로니를 Luria-Bertani 배지 (pH 7.4, LB; maniatidis 등, 1982)가 포함된 플라스크내에서 24시간 동안 30°C에서 50rpm으로 천천히 흔들면서 배양하였다. 이 배양액을 원심분리한 후, 회수된 세포를 PBS(phosphate buffered saline) 용액으로 현탁하였다. 현탁한 집균체의 양과 동량의 0.25% formalin을 포함한 PBS를 섞고, 37°C에서 1시간 정치한 후, 다시 원심분리하여 PBS에 재 현탁하였다. 암컷 ICR mouse에 현탁액을 복강주사를 통하여 면역시켰다. 초기 면역은 Freund's complete adjuvant 동량을 섞어 주사하고, 이후 7일 간격으로 3차례에 걸쳐 Freund's complete adjuvant 동량을 섞어 주사하였으며, 마지막 면역은 현탁액을 직접 주사하였다. 마지막 면역후 3일에 채혈하여 serum만 따로 분리하고, 56°C에서 30분간 열처리를 한 후, -20°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다. 이렇게 준비된 편모항혈청을 이용한 응집 반응은 96 well plates를 이용하여 수행하였다(Laurent 등, 1996). 30°C 배양기에서 50rpm으로 8-10시간 동안 자란 Bt 배양액 100ul를 PBS 용액으로 50배 희석한 동량의 편모항혈청과 잘 섞고, 37°C에서 1 시간 동안 정치하며 튜브의 밑부분에 침전이 생기는 응집반응을 관찰하였다.

라. 선발된 Bt 균주의 살충성 유전자 탐색

1) 배양 배지와 균주

Bt 균주의 배양을 위해 사용한 배지는 각각 영양판배지 (NA), Luria-Bertani (LB), Glucose Yeast Extract Salt(GYS) 배지 (Kronstad *et al.*, 1983; Nickerson *et al.*, 1974)이며, 플라스미드 DNA 분리를 위해 LB 배지와 0.1% Yeast extract, 0.1% Glucose가 포함된 SPY 배지 (Nickerson *et al.*, 1974)를 사용하였다. 유전자 조작을 위한 숙주로는 *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen, USA) 균주를 사용하였으며, 연구 대상 Bt 균주로는 1차년도에 버섯파리에 독성을 보이는 것으로 검증된 DT-5, DT-6, DT-8, DT-10을 사용하였다.

2) 플라스미드 DNA의 분리

Bt 균주의 플라스미드 DNA 분리는 이미 보고된 alkaline lysis 방법을 개선하여 사용하였다. Bt 균주를 LB broth 배지에 접종하여 12~16시간 동안 28°C에서 1차 배양한 후, SPY 배지 (100 ml)에 재접종하여 O.D₆₀₀이 0.7이 될 때까지 배양하여 5,000 ×g에 5분간 원심분리 하여 균체를 회수하였다. 이렇게 회수된 균체로부터 QIAGEN Plasmid Midi Kit (Qiagen, Germany)을 사용하여 제조사의 방법에 따라 plasmid DNA를 분리하였다. 분리한 플라스미드 DNA는 100 μl의 TE 완충액에 녹여 이후 연구에 사용하였다.

3) Primer 및 PCR (Polymerase Chain Reaction)

PCR을 통해 Bt가 보유하고 있는 내독소 단백질 유전자 (*cry* 유전자)형과 cytolytic endotoxins 유전자 (*cyt* 유전자)형을 조사하기 위하여 지금까지 밝혀진 *cry* 및 *cyt* 유전자형에 대해 특이적인 primer sets를 제작하여 실험에 사용하였다 (Table 3). 각 primer들은 해당 유전자의 보존 영역으로 다른 유전자와 구별되는 영역을 선택해서 제작하였다. PCR을 위한 시료는 위에서 분리한 플라스미드 DNA를 주형으로 사용하였다. 주형 플라스미드 DNA 3ul, 각 primer 0.1 uM, Pyrobest polymerase (Takara co., Japan), dNTP mixture, Buffer를 넣은 다음, 멸균증류수로 전체부피를 50 μl로 맞추었다. DNA Thermal Cycler로 denaturation을 94°C에서 1분간, 50°C에서 1분간 annealing 그리고 extension은 72°C에서 1분간씩 33회 반복하여 PCR 반응을 수행하였다.

Table 3. Crystal gene-specific primers used in PCR analysis and the size their products

Primer set	Sequence (No. primers)	Size (bp)	Gene
cry1Aa	5'GAGCCAAGCGACTGGAGCAGTTTACACC	(28) 782	<i>cry1Aa</i>
cry1Ab	5'TCGAATTGAATTTGTTCC	(18) 238	<i>cry1Ab</i>
cry1Ac	5'TCACTTCCCATCGACATCTACC	(22) 550	<i>cry1Ac</i>
cry1B	5'GTCAACCTTATGAGTCACCTGGGCTTC	(27) 902	<i>cry1B</i>
cry1C	5'CAACCTCTATTTGGTGCAGGTTC	(23) 288	<i>cry1C</i>
cry1D	5'GGTACATTTAGATATTCACAGCCAC	(25) 465	<i>cry1D</i>
cry1E	5'CTTAGGGATAAATGTAGTACAG	(22) 961	<i>cry1E</i>
cry1F	5'CCGGTGACCCATTAACATTCCAATC	(25) 383	<i>cry1F</i>
cry13	5'ATCACTGAGTCGCTTCGCATGTTTGACTTTCTC	(33) -	<i>cry1</i>
cry1G5	5'ATATGGAGTGAATAGGGCG	(19)	235 <i>cry1G</i>
cry1G3	5'TGAACGGCGATTACATGC	(18)	
cry25	5'CAGATACCCTTGCTGGTGTA	(21)	1070 <i>cry2</i>
cry23	5'ATAGGCCCGTGCTCCACCAGG	(21)	
cry3ABD5	5'CCGAACAATCGAAGTGAA	(18) -	<i>cry3A,B,D</i>
cry3A3	5'ATAGATGGTCACTACTT	(17) 1964	<i>cry3A2-A6</i>
cry3B3	5'GAATCCTGTGCACCTAA	(17) 1359	<i>cry3B</i>
cry3D3	5'ATTGTTGACGGCAAGAA	(17) 1135	<i>cry3D</i>
cry3C5	5'CCTGAAAATTGCAGGCC	(17)	1074 <i>cry3C</i>
cry3uni3	5'AATTGATCAATAGAATC	(17)	
cry4A5	5'CGAGGTGAAATTTGCTCC	(18)	1032 <i>cry4A</i>
cry4A3	5'ATGGCTTGTTTCGCTACATC	(20)	
cry4B5	5'GGTGCTTCCTATTCTTTGGC	(20)	2610 <i>cry4B</i>
cry4B3	5'ATGGCTTGTTTCGCTACATC	(20)	
cry4B5	5'GGTGCTTCCTATTCTTTGGC	(20)	1393 <i>cry4B</i>
cry4B3	5'TGACCAGGTCCCTTGATTAC	(20)	
cry10A5	5'ATGAATCCATATCAAAATAAG	(21)	2040 <i>cry10A</i>
cry10A3	5'AAGAACTTTGTTTTAATTAAC	(21)	
cry11A5	5'ATGGAAGATAGTTCTTTAGAT	(21)	1932 <i>cry11A</i>
cry11A3	5'CTACTTTAGTAACGGATT	(18)	
cry5A5	5'ATGAAACTAAAGAATCAA	(18)	2174 <i>cry5A</i>
cry5A3	5'GGTAGATTTTAATTCTAC	(18)	

마. Bt - *E.coli* shuttle vector의 제작과 외래 유전자 발현

1) 배양배지와 균주

cry1Ac gene의 발현을 위한 도입균주로는 crystal을 만들지 않는 Bt subsp. *kurstaki* Cry⁻B 균주를 사용하였으며, *cry1Ac*만을 발현하는 Bt subsp. *kurstaki* HD-73을 대조균주로 이용하였다. *cry1Ac* gene 유전자의 클로닝 및 조작은 *E. coli*에서 수행하였으며, 형질 전환된 *E. coli*와 Bt 균주는 ampicillin과 erythromycin (50 mg/ml)이 각각 첨가된 NA 배지를 이용하여 선발하였다.

2) Competent cell의 제작과 electroporation

외래 유전자 도입을 위한 electroporation은 Lereclus *et al.* (1998)의 방법을 최적화하여 수행하였다. host 균주 Cry⁻B는 100 ml Brain Heart Infusion (BHI)에서 OD₆₀₀ 값 0.7이 될 때까지 30°C에서 배양한 후 배지량 1/10만큼의 멸균증류수로 2회 세척하고, pellet에 polyethyleneglycol (PEG) 600 (40%, w/v)에 resuspension 한 후 4°C의 electroporation cuvettes에 넣어 electroporation을 수행하였다. Electroporation은 Bio-Rad Gene Pulser apparatus를 사용하여 25 μF와 2.5 kV/cm, pulse controller 400 Ω의 조건에서 수행하였다.

3) 고효율의 새로운 셔틀벡터 제작

apidaecin 유전자를 Bt에서 발현하기 위한 Expression Vector System 개발을 개발하기 위하여, 선행적으로 최소 복제원점 (origin of replication)을 확인하고자 기존 셔틀벡터 pHT3101 (Lereclus *et al.*, 1989)의 각기 다른 부위를 복제원점으로 갖는 pHT261과 pHT1K vector를 각각 제작하였다 (Fig. 18). SF (5'-CGAATTCGAGCTCGGTACCCG-3') 와 SR (5'-CACTCAAAGGCGGTAATACGG-3') oligonucleotide primer set를 이용하여 pHT3101의 6.4 kb 단편을 증폭한 후, self-ligation하여 pHT3101-S를 제작하였다.

BTSV-261F (5'-CGTTTTTGAACACCACGATATCTA-3')와 BTSV-MCSR (5'-GGGTTTTCCAGTCACGACGTTG-3') oligonucleotide primer set를 이용하여 pHT3101-S의 3.3 kb 단편을 증폭한 후, self-ligation하여 pHT261을 제작하였다. 또한, pHT1K의 경우에는 pHT3101-S를 template로 하여 BTSV-EmrF (5'-TCCCCTTAGAAGCAAACCTTAAGAGTG-3')와 BTSV-1KoriR (5'-TCTGGTAGTTGCTTCAGTACTCTACA-3') oligonucleotide primers를 이용하

여 4.7 kb 단편을 증폭한 후, self-ligation하여 제작하였다.

4) pHT1K-1Ac의 제작

Bt에서 목적 유전자의 발현에 필요한 promoter와 transcriptional terminator의 도입 및 유전자 발현을 검증하기 위하여 *cry1Ac* gene, native promoter 및 transcriptional terminator를 갖는 pHT1K-1Ac를 제작하였다. pHT1K-1Ac의 제작을 위하여 기 제작된 pProAc로부터 제한효소를 처리하여 *cry1Ac* gene을 분리한 후 이를 pHT1K에 클로닝 하였다 (Fig. 19).

바. 항세균성 미생물의 활성검정

갈반병에 대한 항세균성 활성을 보이는 균주 23개의 균주를 확보하고 이들 중, 가장 지속적이고 항세균성 활성이 강한 *Brevibacillus brevis* 균주의 항균활성을 알아보기 위하여 배양액을 채취하여 그람양성균 Bt 656-3 및 그람음성균 *P. tolaasii*에 대한 항세균 활성검정을 실시하였다.

또한, *B. brevis* 균주의 배양시간에 따른 항균활성 측정을 실시하기 위하여 LB broth 배양액 300ml에 균을 접종한 다음, 12시간 마다 배양액을 채취하여 3000 rpm에서 10분간 원심분리를 실시하고 그 상등액을 이용하여 white disk에 나타난 저지원을 측정하여 그 항균활성을 나타내었다.

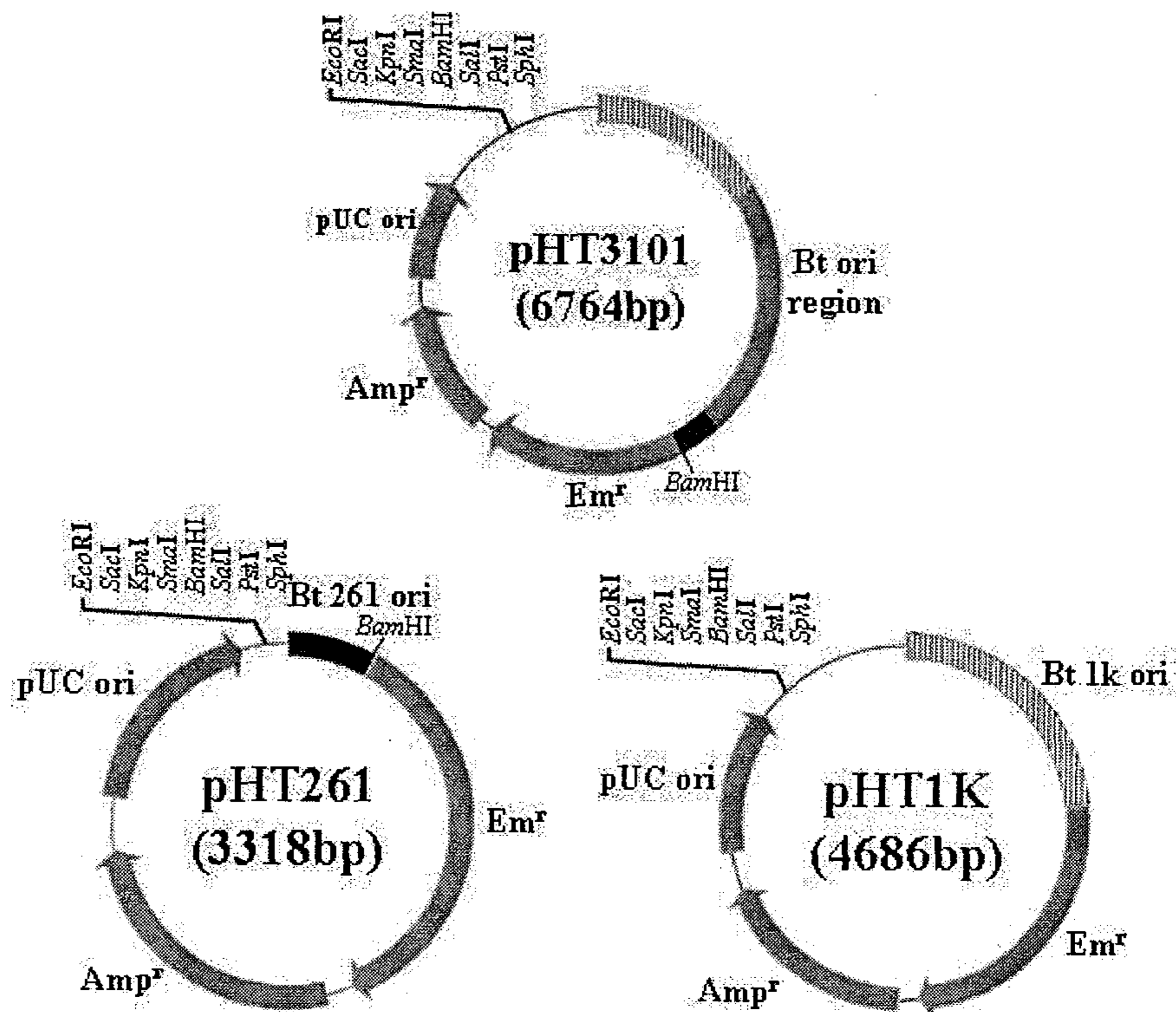


Fig. 18. Circular map of *B. thuringiensis*-*E. coli* shuttle vectors, pHT3101, pHT261 and pHT1K. The black solid and striped boxes indicated previously reported minimal replication origin of 261 bp and 1 kb, respectively. pUC ori, replication origin of *E. coli*; Em^r, erythromycin resistance gene; Amp^r, ampicillin resistance gene.

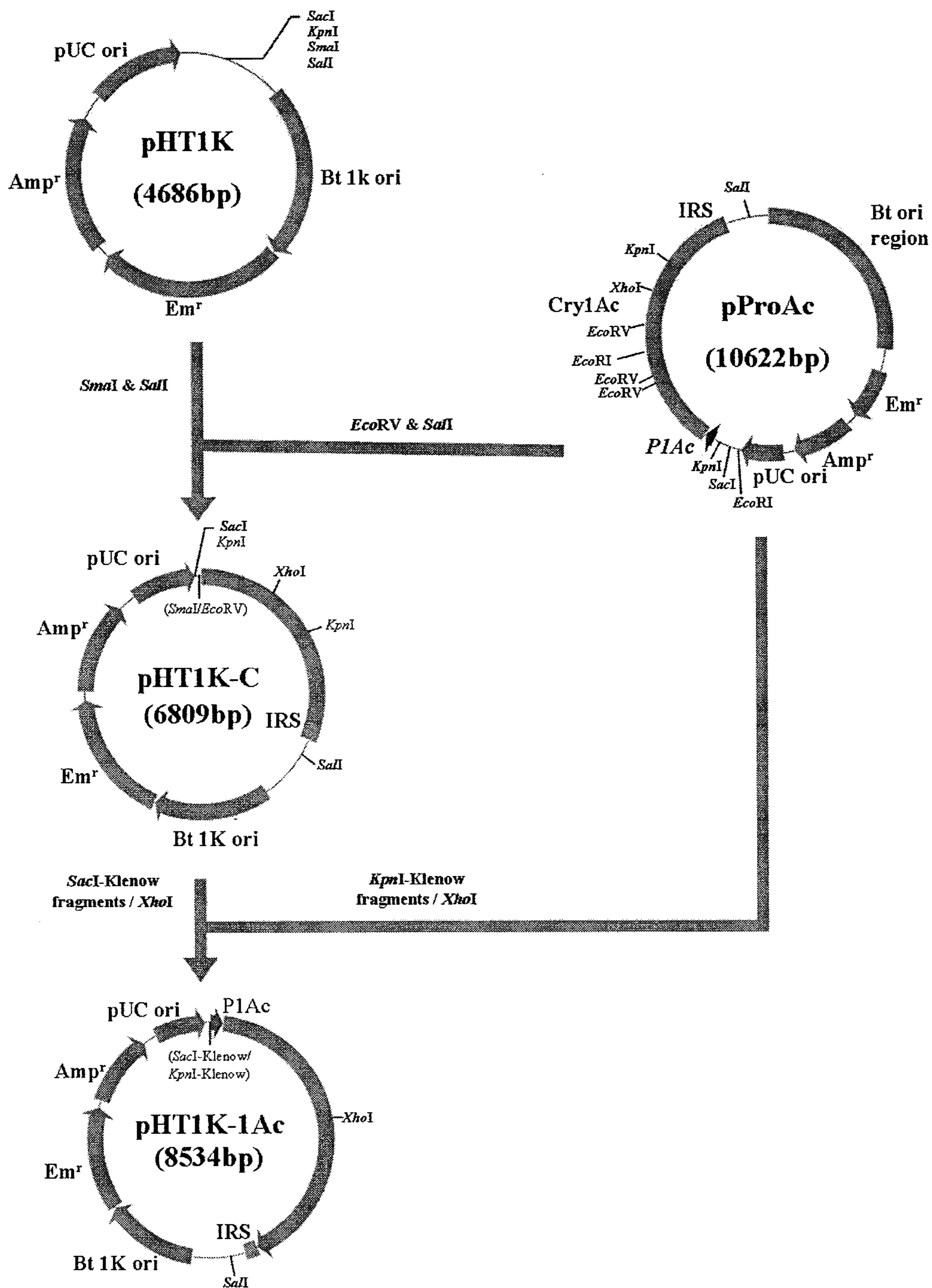


Fig. 19. Construction map of the pHT1K-1Ac expressing cry1Ac under control of the native promoter. IRS: Inverted repeat sequences outside the gene (transcriptional terminator), P1Ac: *cry1Ac* promoter

2. 결과 및 고찰

가. 살충성 미생물의 분리

1) 살충성 *B. thuringiensis*의 분리

Bt는 다양한 자연환경에서 분포하는 것으로 알려져 있으며, 기후에 따른 분포로 열대에서 냉대까지 분포하며, 서식환경으로 볼 때, 사막, 동굴 등의 건조환경에서부터 늪지 등의 습한 환경에서도 분리되고 있는 것으로 보고되고 있다 (Martin과 Travers, 1989). 전국의 농업지역과 산림지역을 대상으로 하여 유용한 Bt 균주를 분리하기 위하여, 농업지역의 토양, 벼섯 재배지, 산림지역의 낙엽, 생엽 등의 다양한 장소에서 시료를 채집하였다 (Fig. 20).

지역적으로는 평야와 산림이 분포한 충남, 전북, 경기지역과 산악지역이 많은 강원, 경북지역을 비롯한 전국을 대상으로 299개의 시료를 채집하였으며, 이들 시료에서 Bt 균주를 분리하기 위해, 80°C에서 3분간 열처리를 하고, 영양배지에서 배양하여 형성되는 콜로니를 조사하였다. 형성된 콜로니들 중에서 성장하는 형태로 Bt 균주를 선발하고, 이들 콜로니들 중에서 포자와 내독소 단백질을 형성하는 것을 위상차 현미경으로 선발하였다. 전국을 대상으로 채집한 299개 시료 중에서 88개 균주를 분리하였다 (Table 4).



Fig. 20. Collection map of *B. thuringiensis* in Korea.

Table 4. Distribution of the collected *B. thuringiensis*

Locality	No. sample examined	No. Bt isolated
경기도	24	14
충청북도	8	2
충청남도	43	14
경상북도	57	18
경상남도	9	1
전라북도	76	20
전라남도	17	4
강원도	65	15
Total	299	88

분리된 Bt 균주를 나비목 곤충인 누에나방 유충과 파리목 곤충인 빨간집모기 유충을 실험곤충으로 1차 살충성 검정을 수행한 결과 (Table 5), 전체의 73.8%가 나비목에만 살충성을 보였었고, 살충력은 약하지만 나비목과 파리목에 양독성을 보이는 균주가 4.5% 그리고 내독소 단백질은 형성하지만, 독성이 없는 균주가 10.2% 분리되었다. 한편 빨간집모기에만 강한 살충성을 보이는 균주는 10개가 분리되었는데, 이들 10개 균주를 각각 DT-1 - DT-10로 명명하고, 이후 살충력 비교와 함께 특성 시험을 수행하였다.

Table 5. Insecticidal activities of *B. thuringiensis*

Insect species	Insecticidal Activity (%)	
<i>Bombyx mori</i> (Lepidopteran)	65	(73.8)
<i>Culex pipiens</i> (Dipteran)	10	(11.5)
Lepidopteran/ Dipteran	4	(4.5)
Non-toxic	9	(10.2)
Total	88	(100)

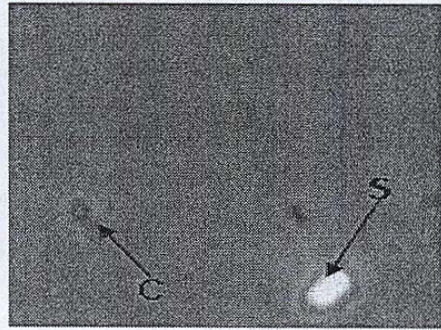
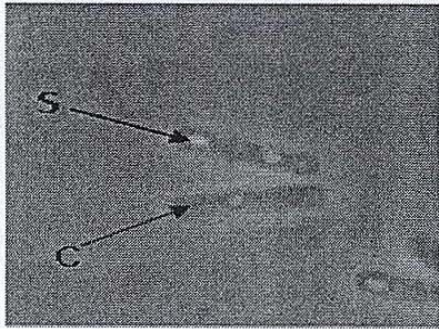
2) 선발된 Bt 균주의 내독소 단백질 형태 관찰

선발된 Bt 균주들이 세포내에서 그리고 autolysis 이후에 관찰되어지는 내독소 단백질의 형태는 각 균주마다 다양하게 나타났으나, 내열성 포자는 타원형으로 일정하였다. 내독소 단백질의 형태는 대체로 마름모형, 부정형, 구형 그리고 두 개 이상의 단백질이 섞여 있는 혼합형을 갖는 균주들이었으며, 내독소 단백질이 일반적으로 특정 나비목, 파리목, 나비/파리목 등에 독성을 보이는 것으로 보고되는 것과는 달리 독성과 단백질 형태가 직접적으로 연관되지 않는다고(Fig. 21).

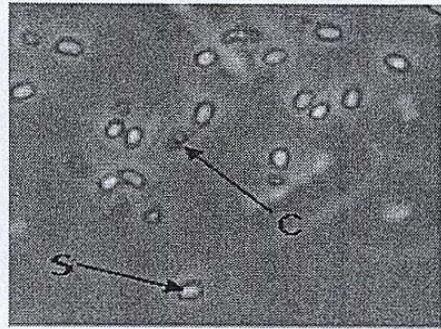
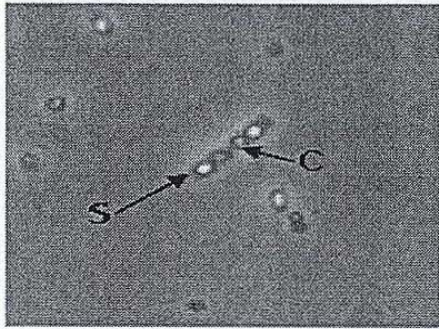
Cell 내

Cell lysis 후

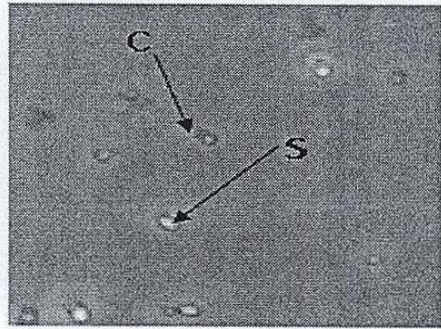
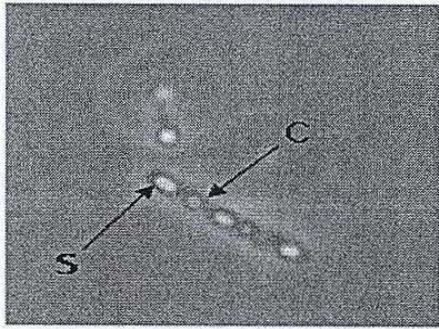
DT-1



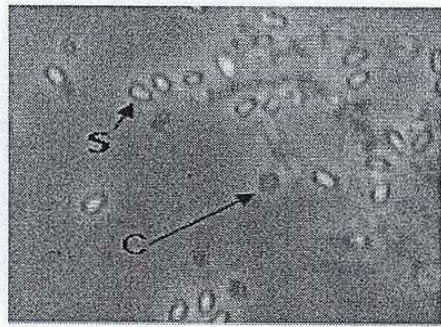
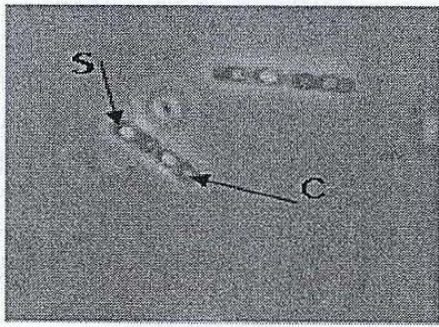
DT-2



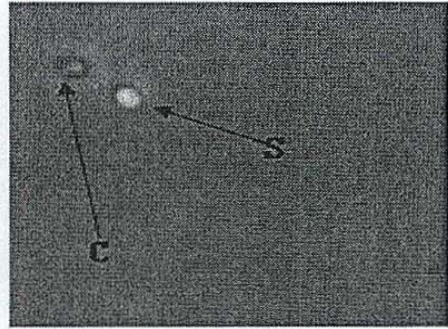
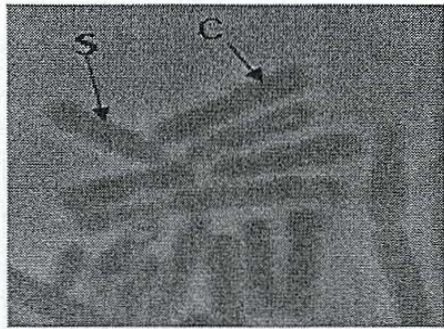
DT-3



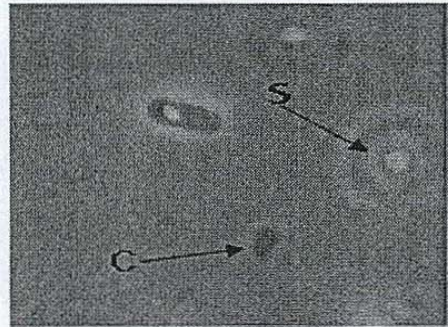
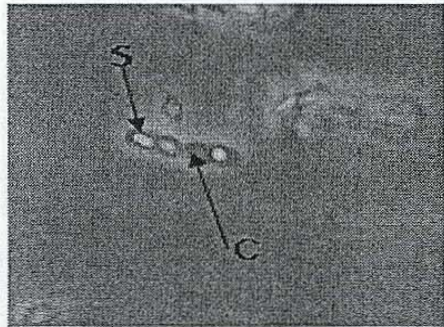
DT-4



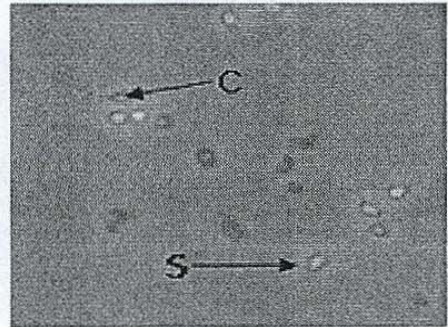
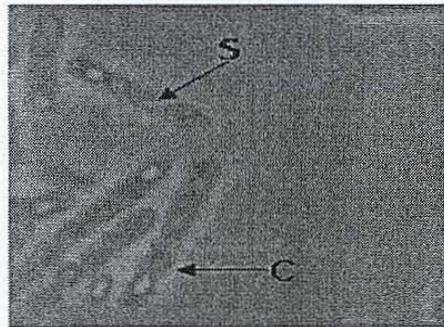
DT-5



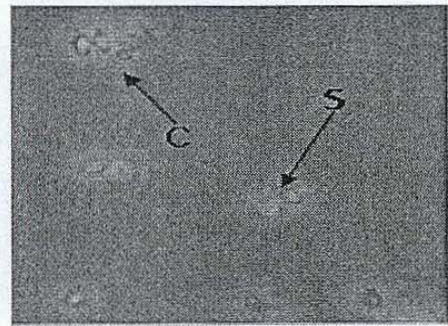
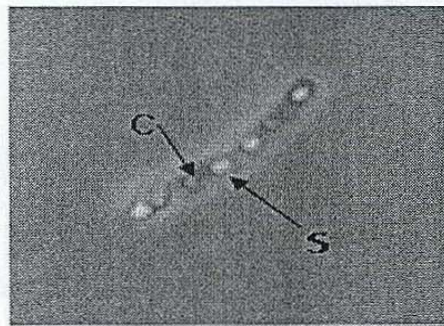
DT-6



DT-7



DT-8



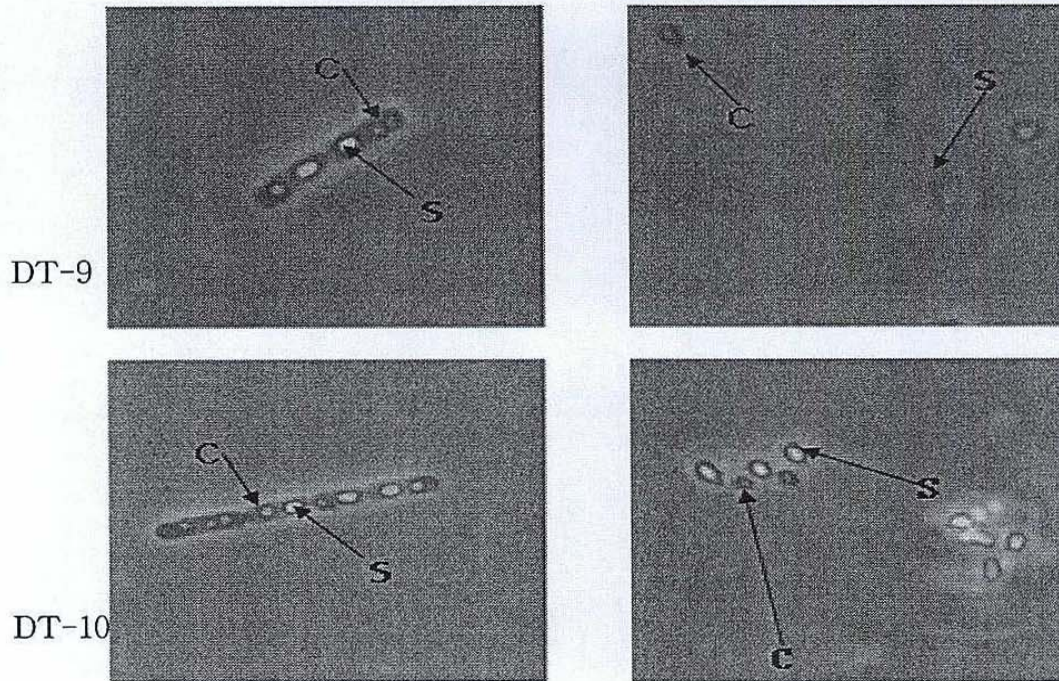


Fig. 21. Microscope of spore and crystal of selected Bts.

3) 선발된 Bt 분리균주의 정량적 살충력 검정

선발된 10개 분리균주의 파리목 곤충에 대한 정량적 생물 검정을 실시하였다. 빨간 집모기(*Culex pipiens pallens*) 대상의 경우, 대부분의 선발균주가 1×10^5 cfu/ml와 1×10^4 cfu/ml의 농도에서 90%이상의 높은 살충력을 보였고(Fig. 22 and 23), 낮은 농도(1×10^3 cfu/ml)에서도 DT-4, DT-5, DT-8, DT-10균주는 70% 이상의 살충력을 보였다. 그중에서도 DT-5 균주의 경우 모기유충에 강력한 살충력을 보이는 *Bt* subsp. *israelensis*와 비견할 정도의 살충력을 보였다 (Fig. 24).

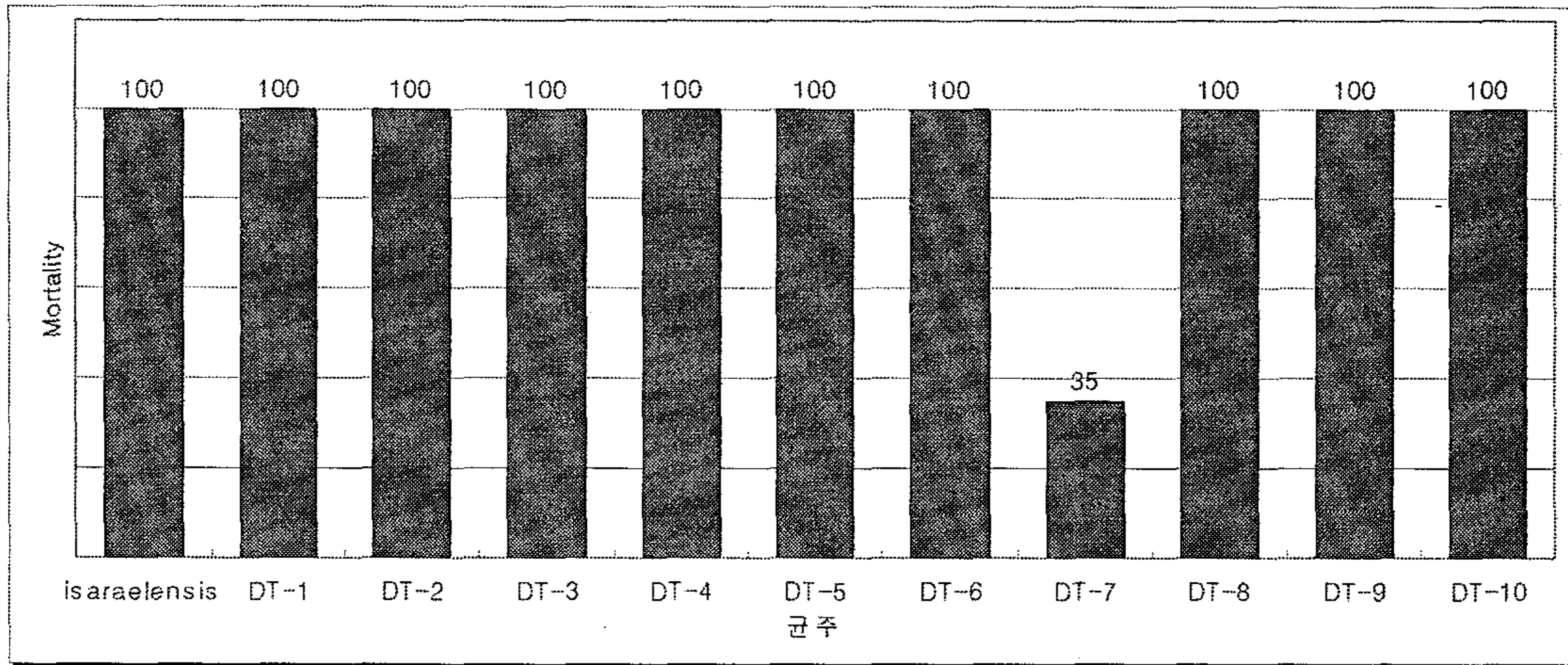


Fig. 22. Insecticidal effect of DT-4, DT-5, DT-8, DT-10 and DT-11 against *Culex pipiens* (Bt Concentration: 1×10^5 cfu/ml).

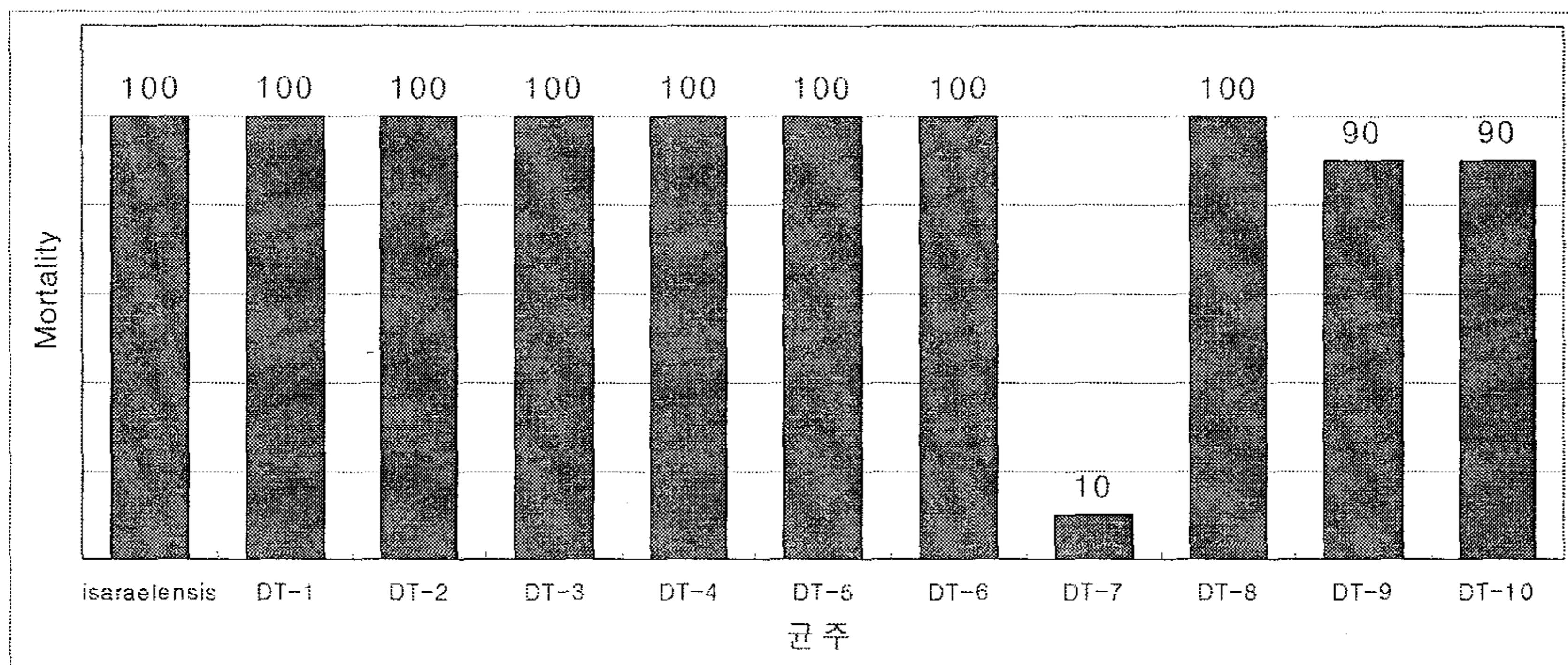


Fig. 23. Insecticidal effect of DT-4, DT-5, DT-8, DT-10 and DT-11 against *C. pipiens* (Bt Concentration: 1×10^4 cfu/ml).

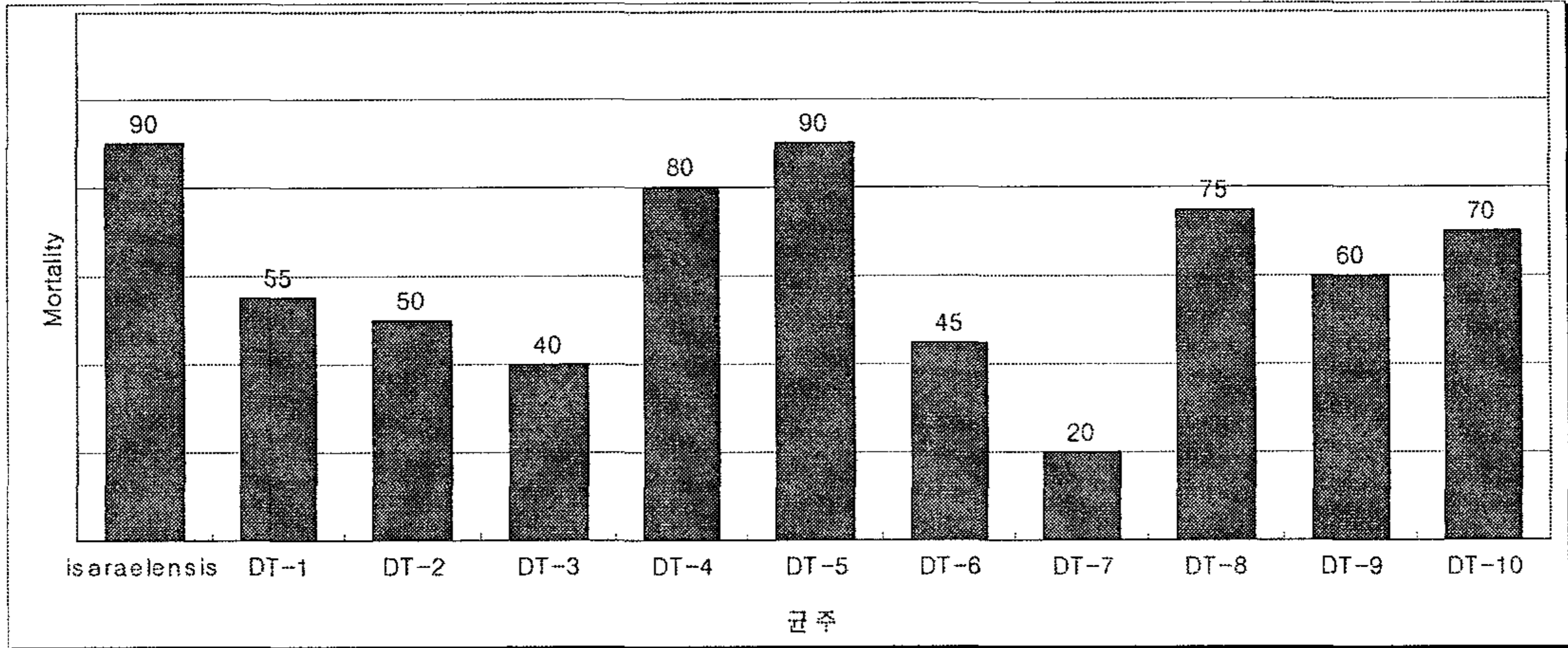


Fig. 24. Insecticidal effect of DT-4, DT-5, DT-8, DT-10 and DT-11 against *C. pipiens* (Bt Concentration: 1×10^3 cfu/ml).

한편, 2종의 버섯파리류에 대한 살충력 검정결과, DT-7과 DT-9을 제외한 대부분의 분리균주들이 살충력을 보였으나, *Lycoriella mali*보다는 *Coboldia fuscipes*에 대한 살충력이 모두 높은 경향을 보였다 (Table 6 and 7). 그 중에서도, DT-6, DT-8 그리고 DT-10이 다른 균주에 비해 높은 살충력을 보였고, 가장 높은 살충력을 보인 균주는 DT-10이었다.

Table 6. Insecticidal effect of *B. thuringiensis* strains against *Lycoriella mali*

균주	LD ₅₀	95% Fiducial Limits	
DT-1	9.73×10 ¹²	1.92×10 ¹²	9.38×10 ¹³
DT-2	8.67×10 ¹²	2.60×10 ¹²	2.57×10 ¹⁵
DT-3	3.10×10 ¹²	9.06×10 ¹¹	9.61×10 ¹³
DT-4	9.73×10 ¹²	3.34×10 ¹²	2.05×10 ¹⁵
DT-5	3.90×10 ¹²	1.14×10 ¹²	1.75×10 ¹⁴
DT-6	2.69×10 ¹²	5.14×10 ¹¹	7.50×10 ¹³
DT-7	NT	NT	NT
DT-8	1.40×10 ¹²	3.19×10 ¹¹	2.07×10 ¹³
DT-9	NT	NT	NT
DT-10	4.73×10 ¹¹	1.10×10 ¹¹	5.24×10 ¹²

NT: non-toxic

Table 7. Insecticidal effect of *B. thuringiensis* strains against *Coboldia fuscipes*

균주	LD ₅₀	95% Fiducial Limits	
DT-1	6.56×10 ¹¹	2.35×10 ¹¹	3.49×10 ¹²
DT-2	4.79×10 ⁹	2.48×10 ⁹	9.27×10 ⁹
DT-3	7.93×10 ⁸	3.30×10 ⁸	2.98×10 ⁹
DT-4	6.56×10 ⁹	3.30×10 ⁹	1.29×10 ¹⁰
DT-5	1.26×10 ¹⁰	6.71×10 ⁹	2.27×10 ¹⁰
DT-6	7.26×10 ⁸	3.94×10 ⁸	1.32×10 ⁹
DT-7	NT	NT	NT
DT-8	5.88×10 ⁶	1.80×10 ⁶	1.83×10 ⁷
DT-9	NT	NT	NT
DT-10	2.38×10 ⁶	4.78×10 ⁵	6.62×10 ⁶

NT: non-toxic

4) 편모항혈청 면역 반응 결과

파리목에 속하는 모기 유충과 버섯 파리류에 살충력을 보이는 DT-5, DT-6, DT-8,

DT-10 균주의 특성을 알아보기 위하여, 편모항체를 이용한 편모 항원성을 조사하였다. 편모 항원성 동정은 96 well plates에서 실험하였으며, type strain인 *Bt* subsp. *aizawai*, *israelensis*, 그리고 *kurstaki* 와 함께 실행하였다. 그 결과 DT-5의 경우 기존의 편모항혈청과 반응을 하지 않았고, 나머지 균주는 모두 8a8b 항원을 가지는 *Bt* subsp. *morrisoni*와 8a8c 항원을 가지는 *Bt* subsp. *ostriniae*에 편모항원성을 보였다 (Table 8).

Table 8. H agglutination test of *B. thuringiensis* strains

H serotype	Serovar	Sample						
		<i>aizawai</i>	<i>israelensis</i>	<i>kurstaki</i>	DT-5	DT-6	DT-8	DT-10
1	<i>thuringiensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
2	<i>finitimus</i>	-	-	-	-	-	-	-
3a	<i>alesti</i>	-	-	-	-	-	-	-
3a3b	<i>kurstaki</i>	-	-	+	-	-	-	-
3a3d	<i>sumiyoshiensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
3a3d3e	<i>fukuokaensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
4a4b	<i>sotto</i>	-	-	-	-	-	-	-
4a4c	<i>kenyae</i>	-	-	-	-	-	-	-
5a5b	<i>galleriae</i>	-	-	-	-	-	-	-
6	<i>entomocidus</i>	-	-	-	-	-	-	-
7	<i>aizawai</i>	+	-	-	-	-	-	-
8a8b	<i>morrisoni</i>	-	-	-	-	+	+	+
8a8c	<i>ostriniae</i>	-	-	-	-	+	+	+
8b8d	<i>nigeriensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
9	<i>tolworthi</i>	-	-	-	-	-	-	-
10	<i>darmstadiensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
11a11b	<i>toumanoffi</i>	-	-	-	-	-	-	-
11a11c	<i>kyushuensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
12	<i>thompsoni</i>	-	-	-	-	-	-	-
13	<i>pakistani</i>	-	-	-	-	-	-	-
14	<i>israelensis</i>	-	+	-	-	-	-	-
15	<i>dakota</i>	-	-	-	-	-	-	-

16	<i>indiana</i>	-	-	-	-	-	-	-
17	<i>tohokuensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
18	<i>kumamotoensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
19	<i>tochigiensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
20a20b	<i>yunnanensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
20a20c	<i>pondicheriensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
21	<i>colmeri</i>	-	-	-	-	-	-	-
22	<i>shandongiensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
23	<i>japonensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
24	<i>neoleonensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
25	<i>coreanensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
26	<i>silo</i>	-	-	-	-	-	-	-
27	<i>mexicanensis</i>	-	-	-	-	-	-	-

이상의 결과를 살펴보면, 분리균주 DT-5의 경우 모기유충에 대한 강력한 살충력과 기존의 보고된 Bt strain과는 다른 편모 항원성을 보임으로써 새로운 Strain으로의 등록과 함께 모기 유충방제를 위한 새로운 미생물 살충제 개발의 중요 자원으로 이용될 수 있을 것으로 기대된다. 분리균주 DT-6, DT-8 그리고 DT-10는 모두 버섯파리류에 살충성을 보이며, 항혈청 실험에서 *Bt* subsp. *morrisoni*와 *Bt* subsp. *ostriniae*에 같은 편모항원성을 보임으로써 버섯파리류의 살충성과 Serotype의 연관관계에 대한 병리학 및 분류학적 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다. 그 중에서도 DT-10의 경우, 모기 살충성 뿐만 아니라 2종의 버섯파리류 유충 모두에 높은 살충력을 가진 균주로 분자 생물학적 특성 규명과 함께 새로운 항균성단백질 유전자의 도입을 위한 본 과제 이후 연구에 가장 적합한 분리균주로 판단된다.

나. 선발된 Bt 균주의 살충성 유전자 탐색

모기유충과 버섯파리를 대상으로 수행한 1차년도 생물검정 결과에서 낮은 LD₅₀ 값을 보여 효과적인 미생물살충제로의 개발 가능성을 갖는 것으로 판단된 DT-5, DT-6, DT-8 및 DT-10 균주의 분자생물학적인 특성을 알아보기 위하여 이들의 전체 플라스미드 패턴을 확인하였다 (Fig. 25). 그 결과, 이들 균주는 일반적으로 내독소 단백질

유전자가 존재하는 것으로 보고된 high molecular weight의 large plasmid pattern은 서로 유사하였으나, low molecular weight의 small plasmid pattern은 서로 다른 pattern을 보임으로써 이들 균주가 서로 다른 분자생물학적 특성을 갖는 균주임을 확인할 수 있었다.

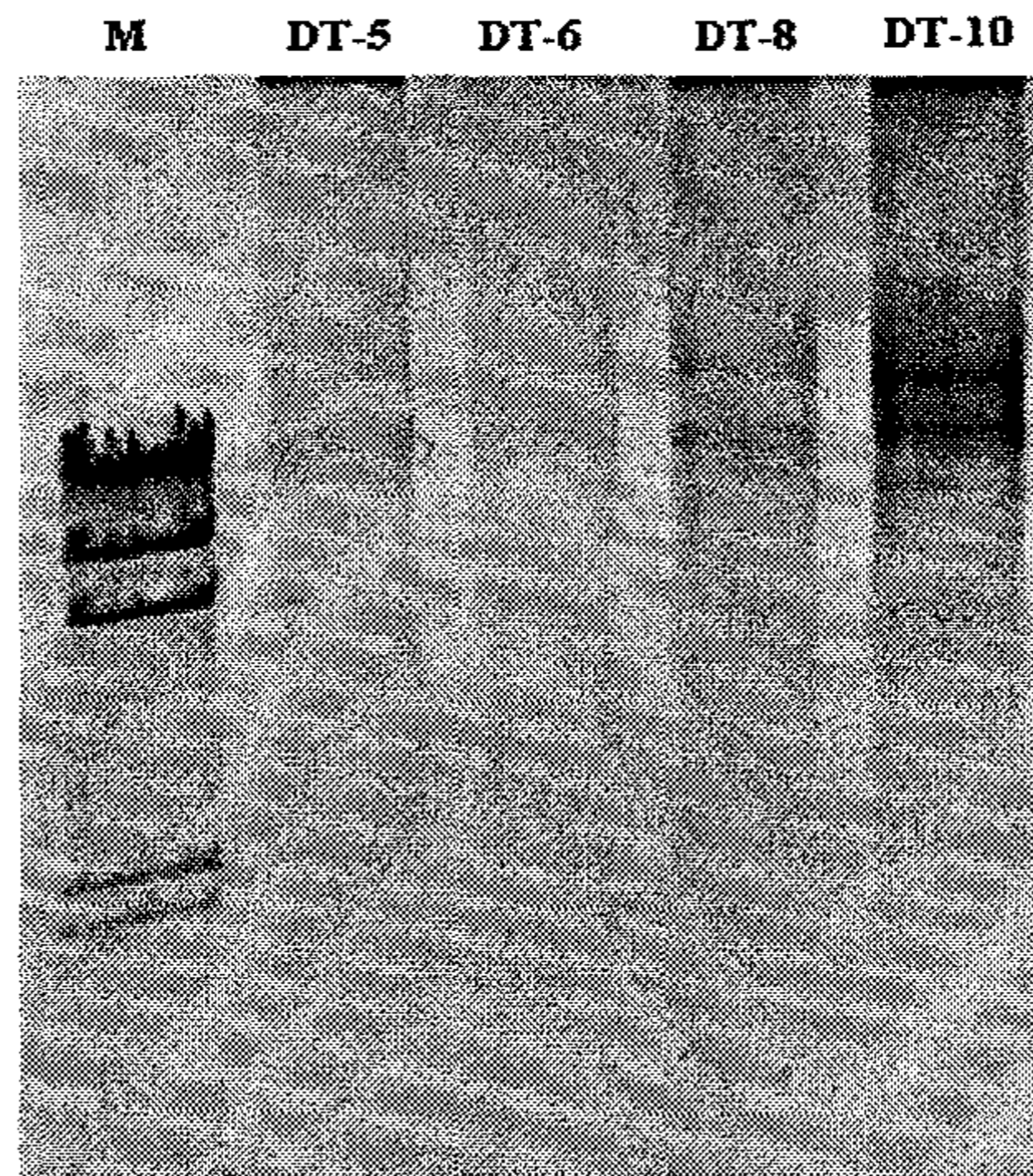


Fig. 25. Electrophoresis pattern of total plasmid DNA. M indicates lambda DNA digested with *HindIII*.

선발 균주들의 특성을 좀 더 자세히 알아보기 위하여, 각각의 내독소 단백질 유전자의 specific primer set를 이용하여 4종의 선발 균주들의 plasmid DNA를 주형으로 각 균주의 내독소 단백질 유전자 profile을 확인하였다. 그 결과, DT-5균주는 *cry4A*, *cry4B*, *cry10A* 및 *cry11A*를, DT-6 균주는 *cry4A*, *cry11A* 및 *cry4B*를, DT-8 균주의 경우에는 *cry4A*, *cry4B* 및 *cry11A*를, DT-10 균주는 *cry4A*, *cry4B*, *cry10A*, *cry11A*를 갖는 것으로 각각 나타났다 (Fig. 26, 27, 28 and 29). 이러한 결과로부터 위에서의 전체 plasmid pattern 비교결과와 동일하게 이들 균주가 서로 다른 내독소 단백질 유전자를 보유한 균주라는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 이들 균주가 보유한 내독소 단백질 유전자 profile은 1차년도에 수행한 모기 유충과 버섯파리 2종에 대해 높은 독성을 보인 생물검정 및 H-serotype이 8a8b로 Bt subsp. *morrisoni*였던 편모항원성 검정과 일치하는 결과였다. 즉, 파리목 곤충에 높은 살충성을 보이는 대표적인 균주인 Bt subsp. *morrisoni* PG-14 균주의 경우 *cry4A*, *cry4B*, *cry10A*, *cry11A* 유전자를 갖는 것으로 보고되어 있으며, 본 연구에서의 선발 균주들 또한 *cry4A*, *cry4B*, *cry10A* 및 *cry11A*에 특이적으로 증폭되는 유전자를 보유하는 것으로 나타남으로써 기존의 보고들과 일관성을 보여주었다.

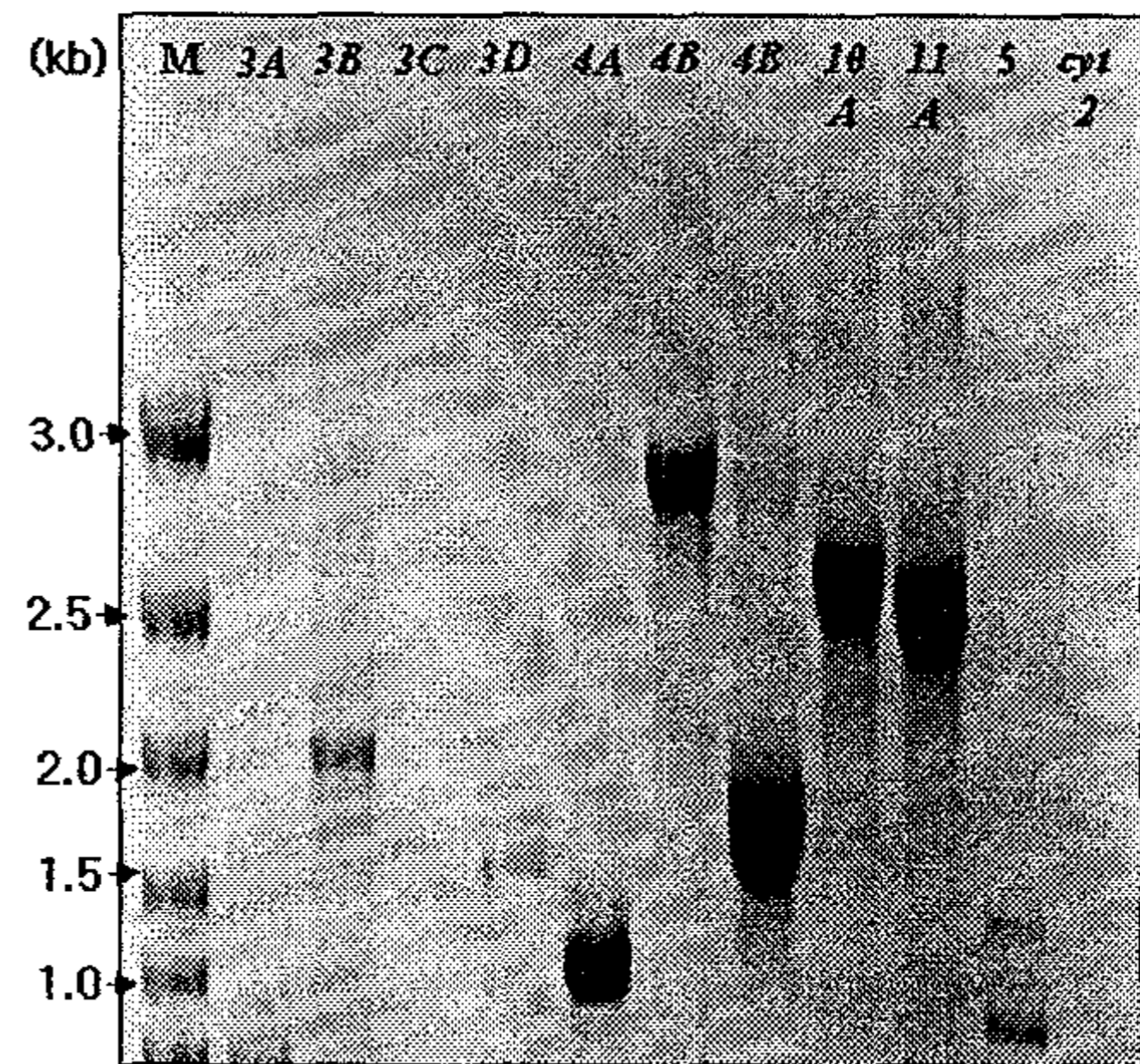
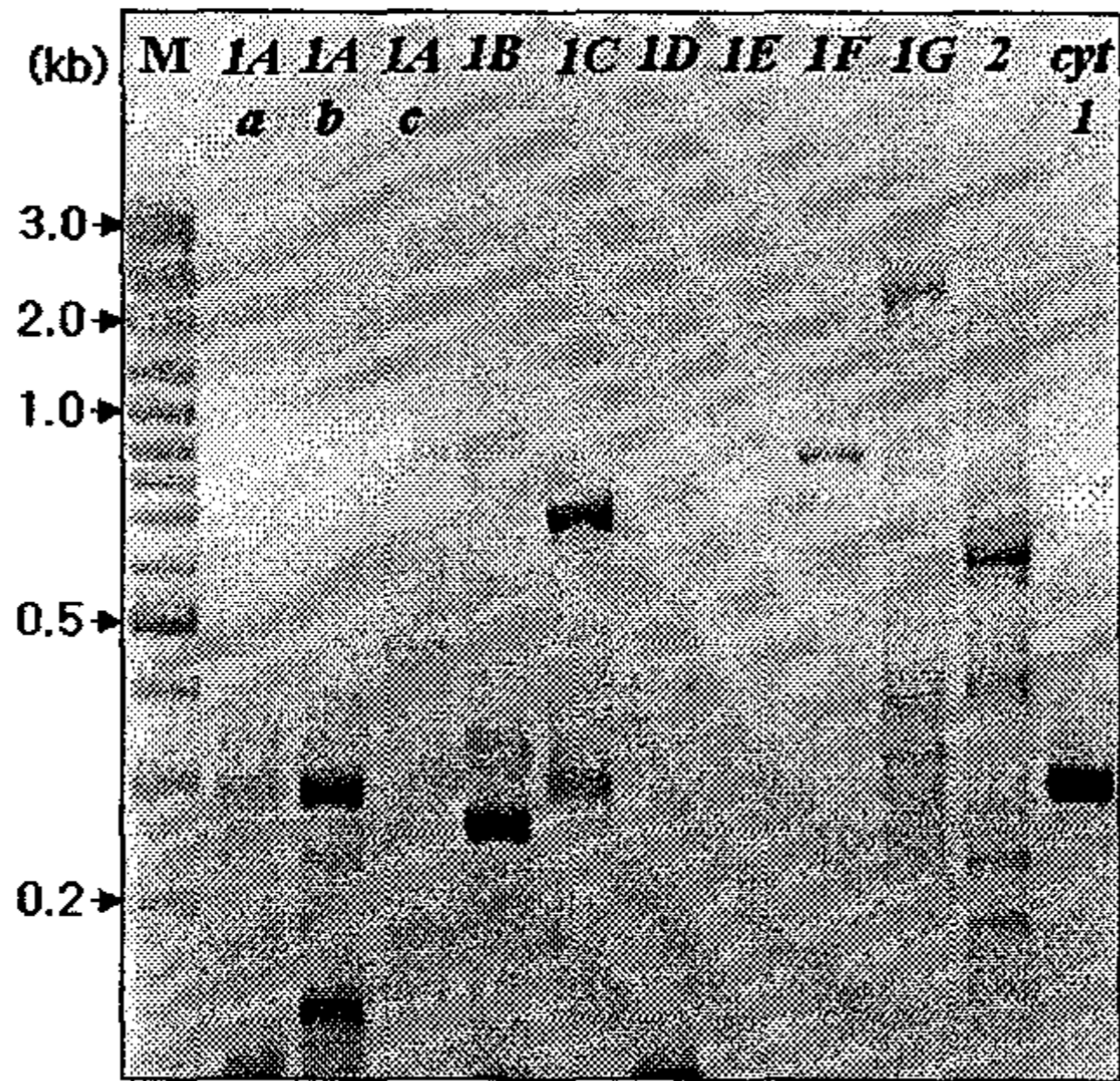


Fig. 26. Profiles of crystal protein genes encoded in Bt subsp. *morrisoni* DT-5. M: Size marker of 100bp ladders

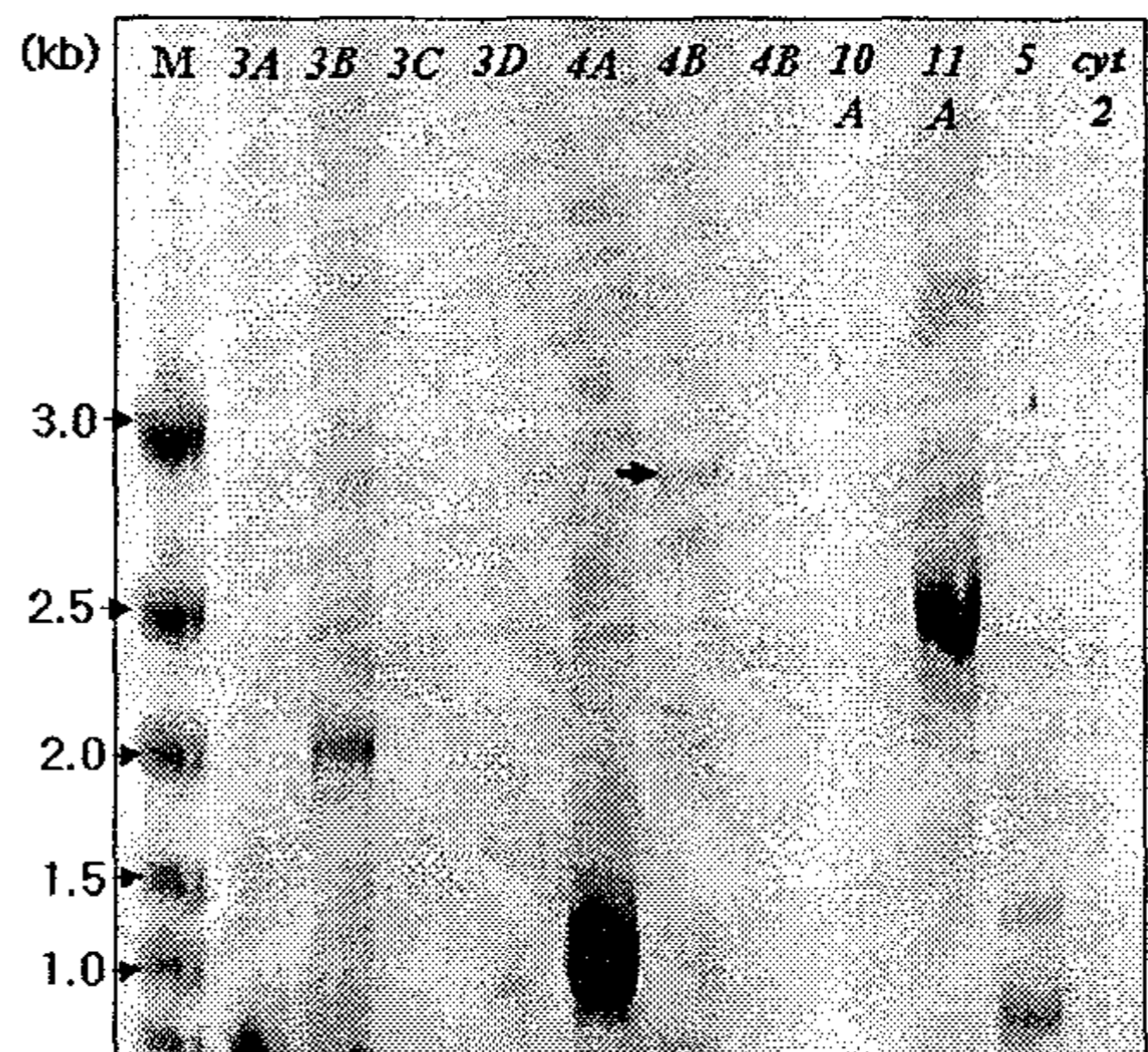
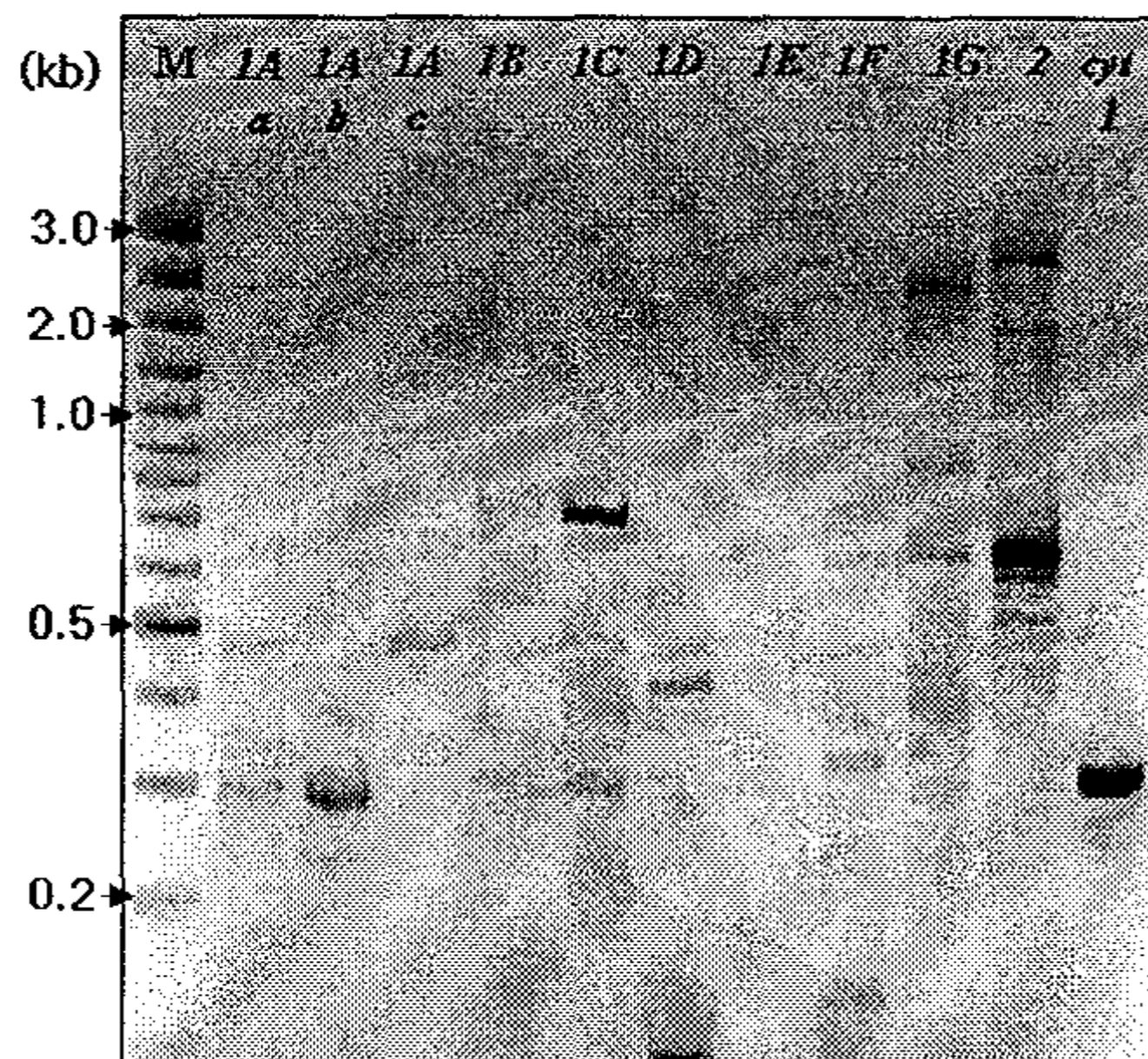


Fig. 27. Profiles of crystal protein genes encoded in Bt subsp. *morrisoni* DT-6. M: Size marker of 100bp ladders

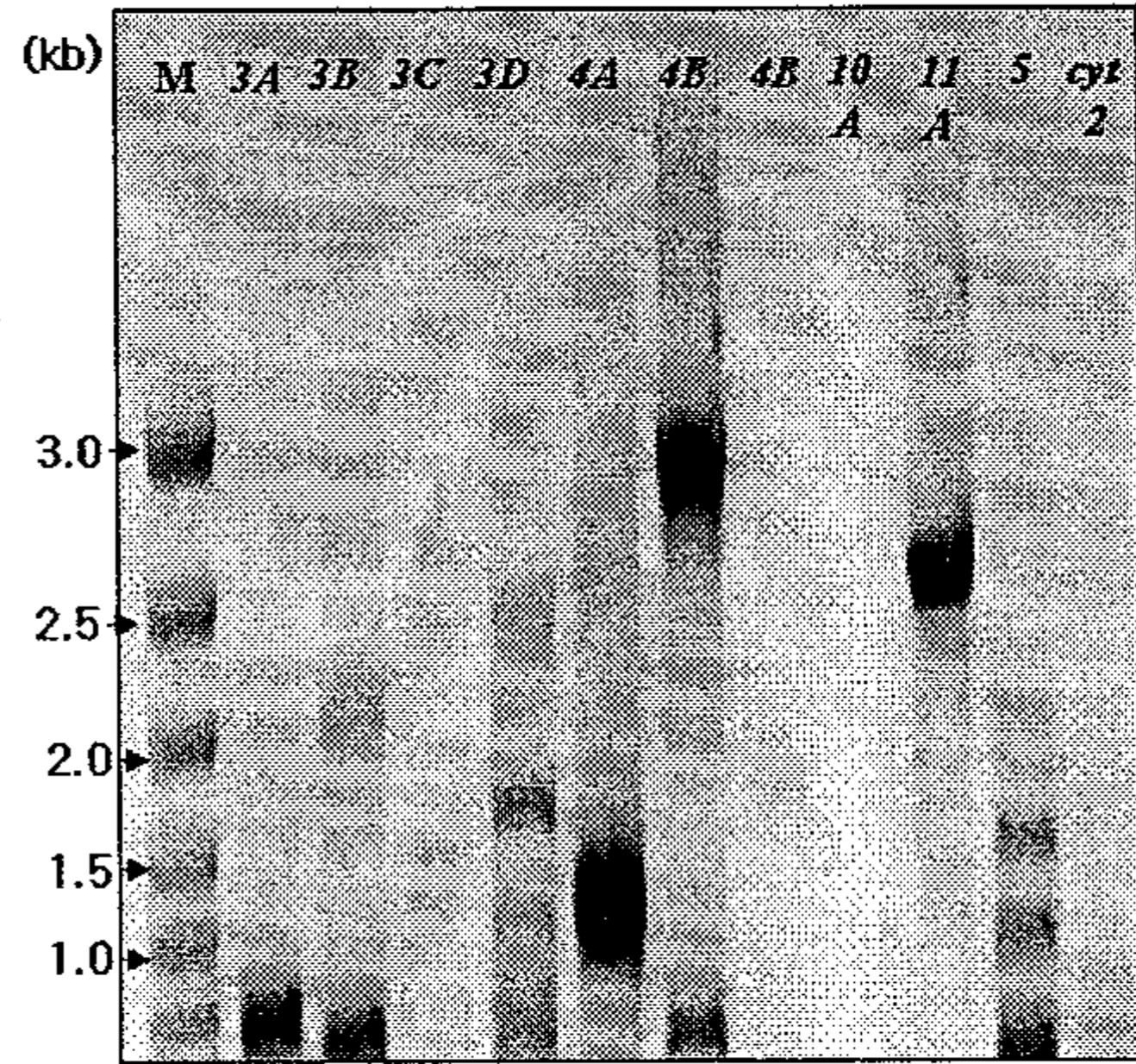
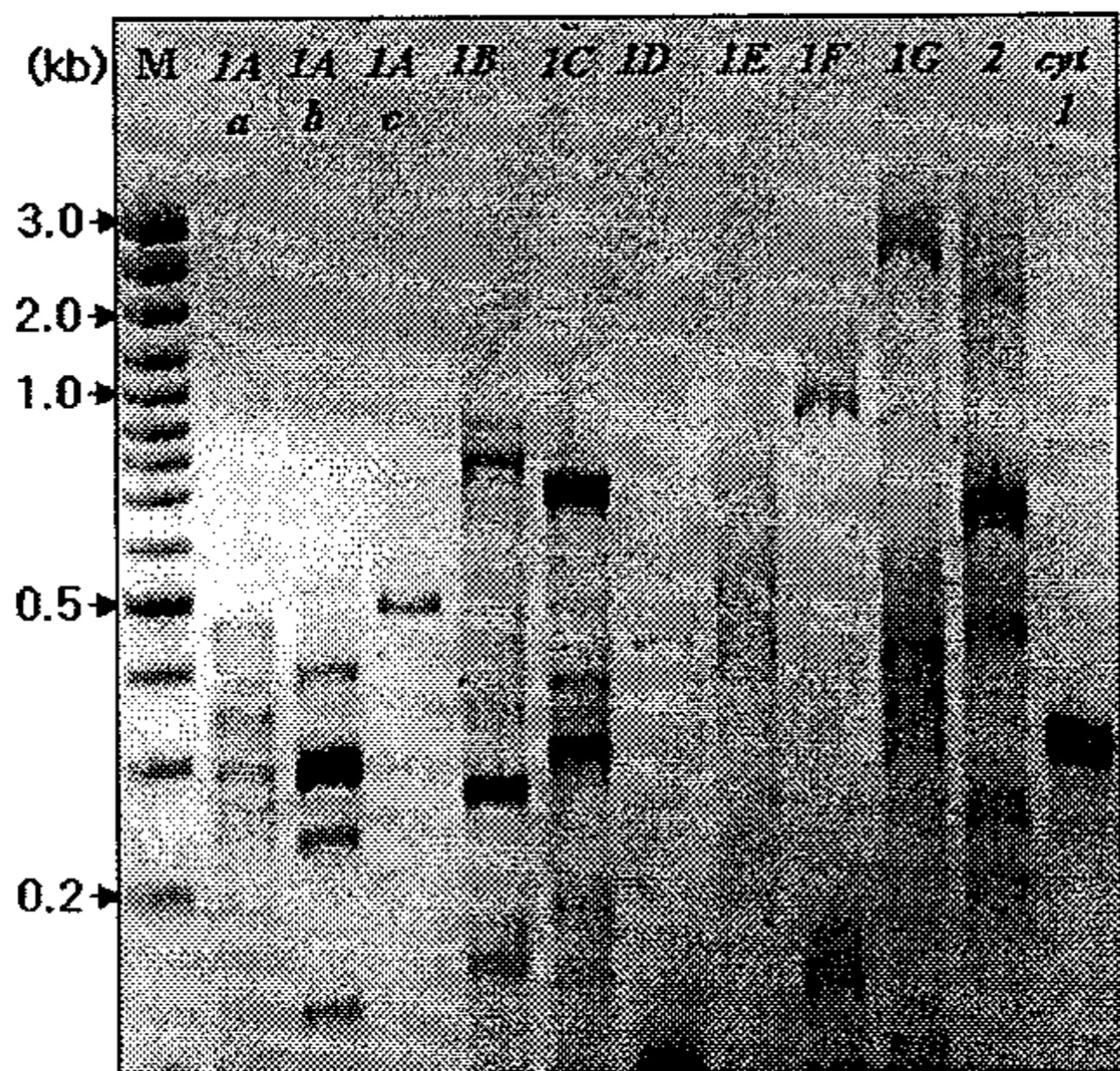


Fig. 28. Profiles of crystal protein genes encoded in Bt subsp. *morrisoni* DT-8.
M: Size marker of 100bp ladders

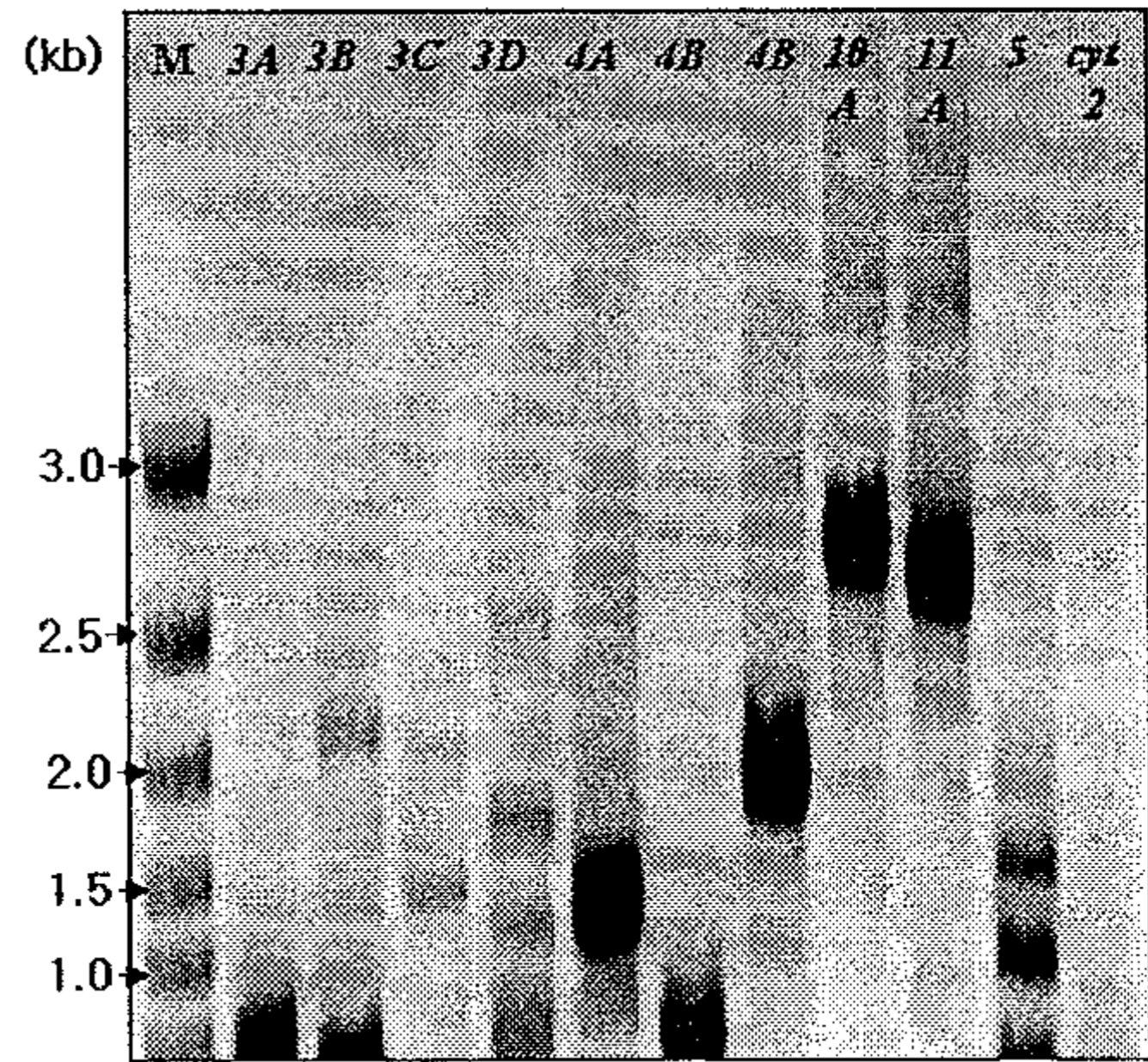
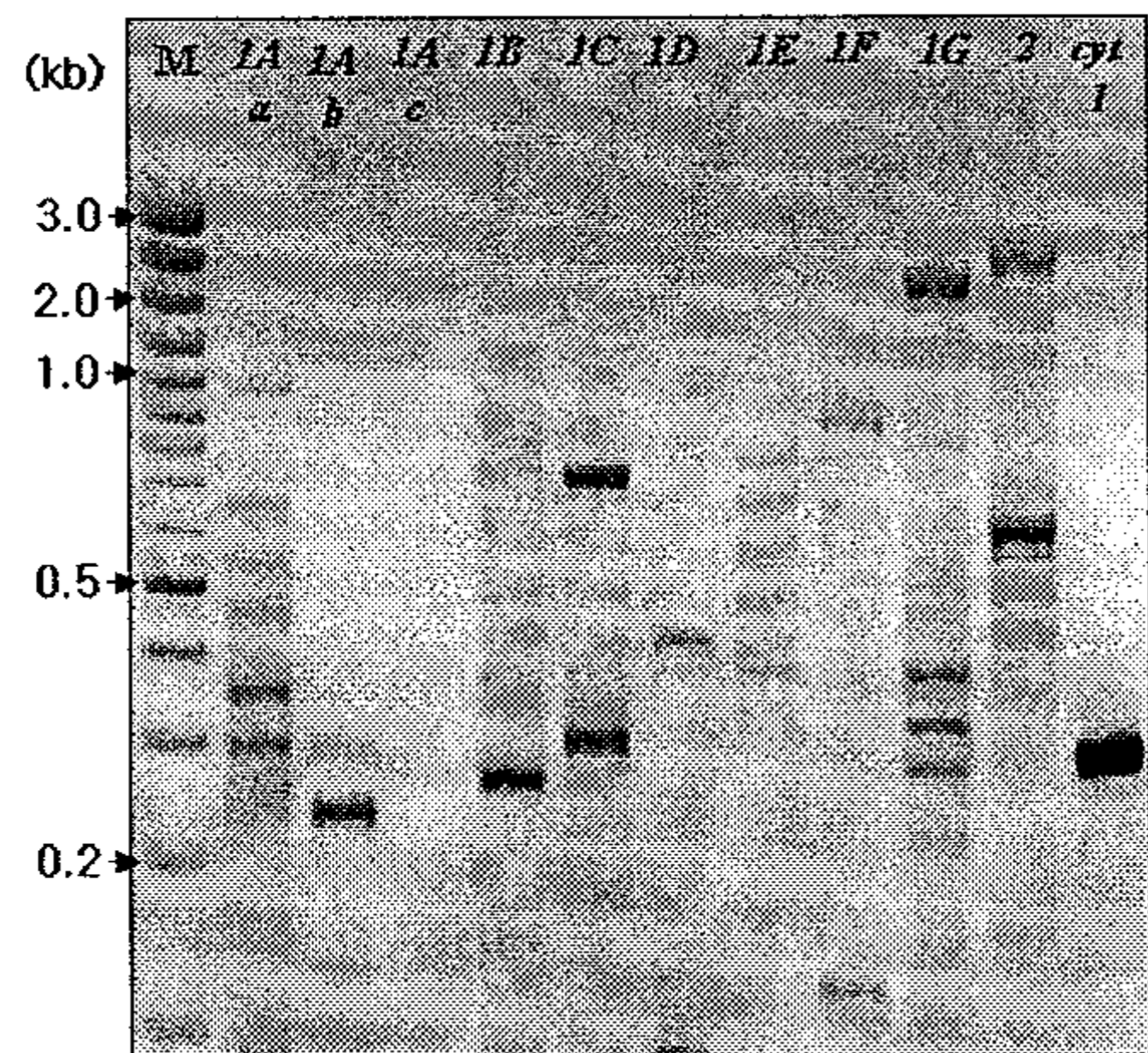


Fig. 29. Profiles of crystal protein genes encoded in Bt subsp. *morrisoni* DT-10.
M: Size marker of 100bp ladders

다. Bt-*E.coli* Shuttle vector의 제작과 외래 유전자의 발현

버섯파리에 살충성을 보이는 Bt 균주에 항세균성 유전자를 도입하고자 보다 효율성 높은 셔틀벡터를 제작하였다 (Fig. 30). 제작한 pHT261과 pHT1K 벡터는 *E. coli*에서 복제를 위한 pUC ori, MCS (multi cloning site) 및 ampicillin과 erythromycin 저항성

유전자를 공통적으로 보유하고 있으나, Bt에서의 자가 복제를 위한 복제원점으로 각각 261 bp와 1 kb를 함유한 구조상의 차이를 보이는 서플백터이다.

pHT261과 pHT1K가 보유한 복제 원점의 기능성 발취 여부와 형질전환 효율성을 검증하기 위해 Cry⁻B에 transformation 하였으며, 이 때 pHT3101과의 transformation 효율성 비교를 위해 각기 다른 DNA량 (100, 200, 400 ng)을 사용해 electroporation을 수행하였다. pHT261 벡터의 경우 erythromycin에 저항성을 갖는 transformant colony를 얻지 못한 반면, pHT1K의 경우에는 모벡터인 pHT3101보다 5.1~13.1 배의 효율성을 갖는 것을 확인할 수 있었다 (Table 9). 이로써 pHT3101의 2.9 kb 복제원점 부분에서 최소 복제원점이 1 kb 이라는 것을 확인할 수 있었고, 이렇게 제작된 pHT1K 벡터의 크기가 pHT3101보다 약 2.0 kb 작아짐으로써 얻어진 효율성으로 보다 손쉽게 Bt에 외래 유전자를 도입할 수 있게 되었다.

추가적으로 pHT1K 벡터를 사용해 Bt에서 유전자의 발현 가능성을 알아보기 위해 먼저 대표적인 cry 유전자인 *cry1Ac* 를 자신의 프로모터와 transcriptional terminator 구조를 갖춰 pHT1K 벡터에 클로닝 하였다. 역시 제작 후에 제한효소 절단 pattern으로 확인했다 (Fig. 31). 제작된 pHT1K-1Ac는 기존 pHT3101에 *cry1Ac*를 넣은 pProAc보다 크기면에서 약 2.1 kb 가 작아졌다. 온전히 구조적으로 안정한 *cry1Ac* 가 발현된 것인지를 확인하기 위한 SDS-PAGE 실험을 실행하였다. Bt 균주를 GYS 배지로 4~5일 동안 28°C에서 배양하여 autolysis를 확인한 후 원심분리하여 균체를 수거하고, 수거한 침전물을 1 M NaCl, 1 mM EDTA 용액으로 3회 세척하고 초음파 분쇄기로 세포를 파괴한 후, Laemmli (1970)의 방법을 개선하여 전기영동을 수행하였다. Fig. 32에서 pHT1K-1Ac는 기존에 *cry1Ac*만을 발현하는 Bt subsp. *kurstaki* HD-73 과 동일한 133 kDa의 단백질을 만들어 내며, 기존에 pHT3101에서 *cry1Ac*를 발현하는 pProAc의 발현산물과도 동일한 분자량을 보였다. 추가적으로 동일한 *cry1Ac*를 발현하는 pHT1K-1Ac와 pProAc의 발현효율을 비교하기 위한 SDS-PAGE를 진행한 결과로 연속적인 희석농도에서 발현량의 차이가 없는 것을 알 수 있었다 (Fig. 33). 이상의 결과, pHT1K 벡터는 *E.coli*와 Bt에서 모두 복제 가능한 특성을 갖으며 Bt에서 새로운 유전자를 도입하고 발현하는데 효율적임을 확인할 수 있었다.

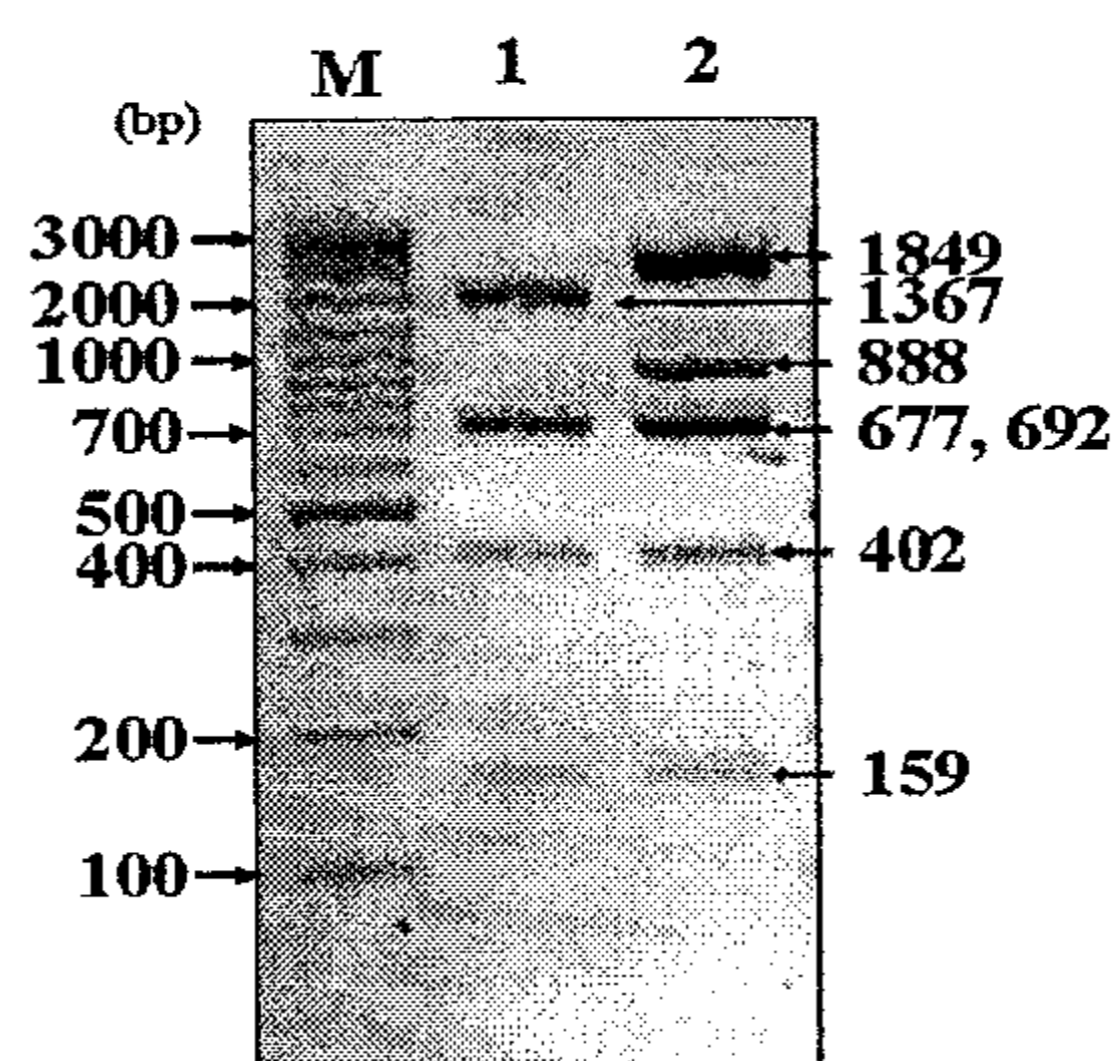


Fig. 30. Electrophoresis pattern of pHT261 and pHT1K digested with *DraI*. M: Size marker of 100bp ladders, 1: pHT261, 2: pHT1K

Table 9. Transformation efficiency of *B. thuringiensis*-*E. coli* shuttle vectors, pHT3101, pHT261 and pHT1K into acrySTALLIFEROUS *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* Cry B.

Vector used for electroporation	Quantity of electroporated DNA (ng)	Number of transformant colonies resistant to erythromycin
pHT1K	100	40.0±32.2 cd*
	200	116.3±24.0 b
	400	342.0±173.3 a
pHT261	100	No transformant
	200	No transformant
	400	No transformant
pTH3101	100	3.0±2.6 d
	200	9.3±4.0 d
	400	66.7±28.9 c

* Different letters behind means indicate significant difference (n=4, p<0.05, Duncan's multiple range test).

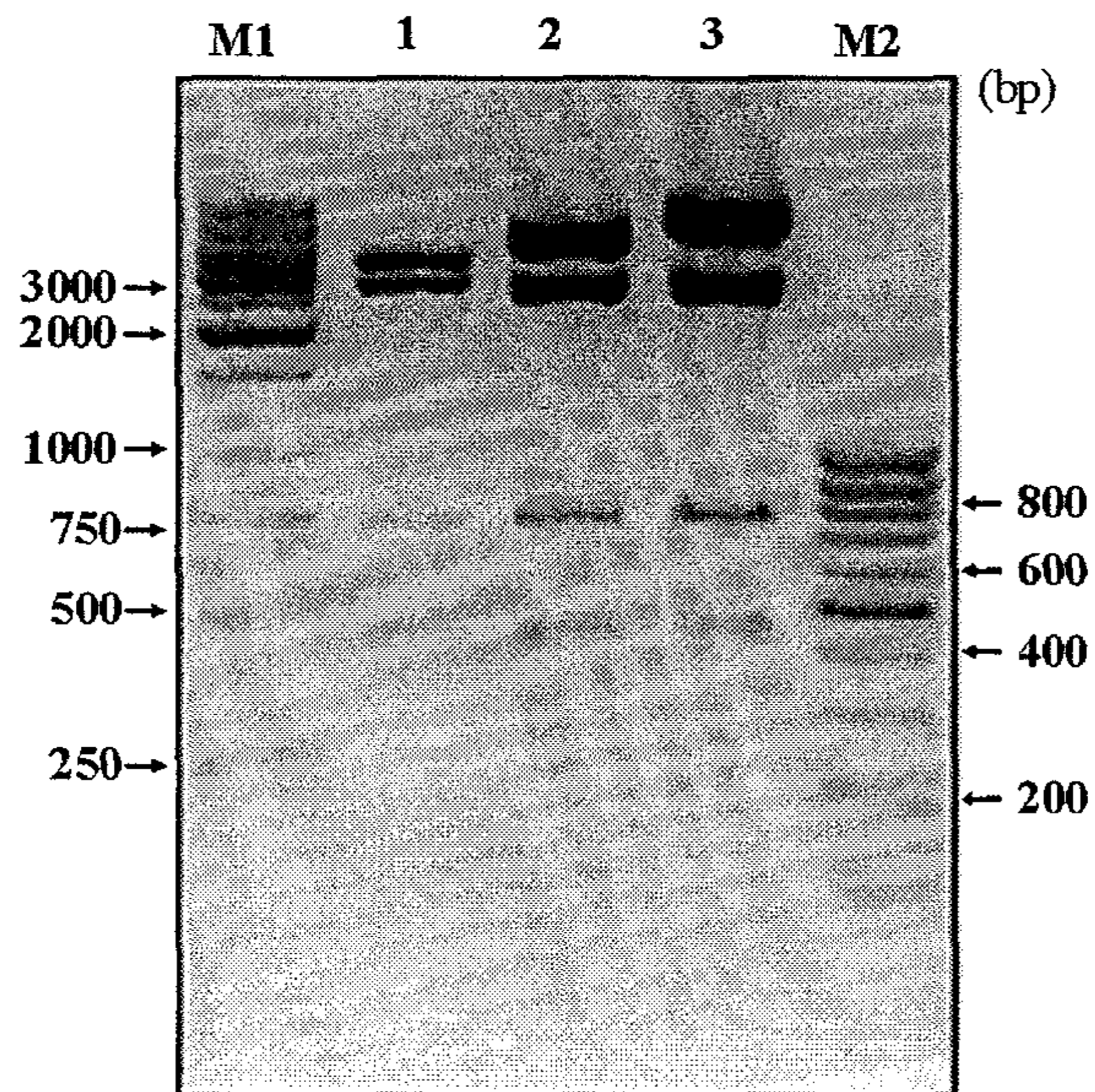


Fig. 31. Restriction endonuclease digestion pattern of pHT261-1Ac, pHT1K-1Ac and pProAc. The vectors were digested with *EcoRI*. Lanes: M1, 1kb DNA ladder; 1, pHT261-1Ac; 2, pHT1K-1Ac; 3, pProAc M2, 100bp DNA ladder

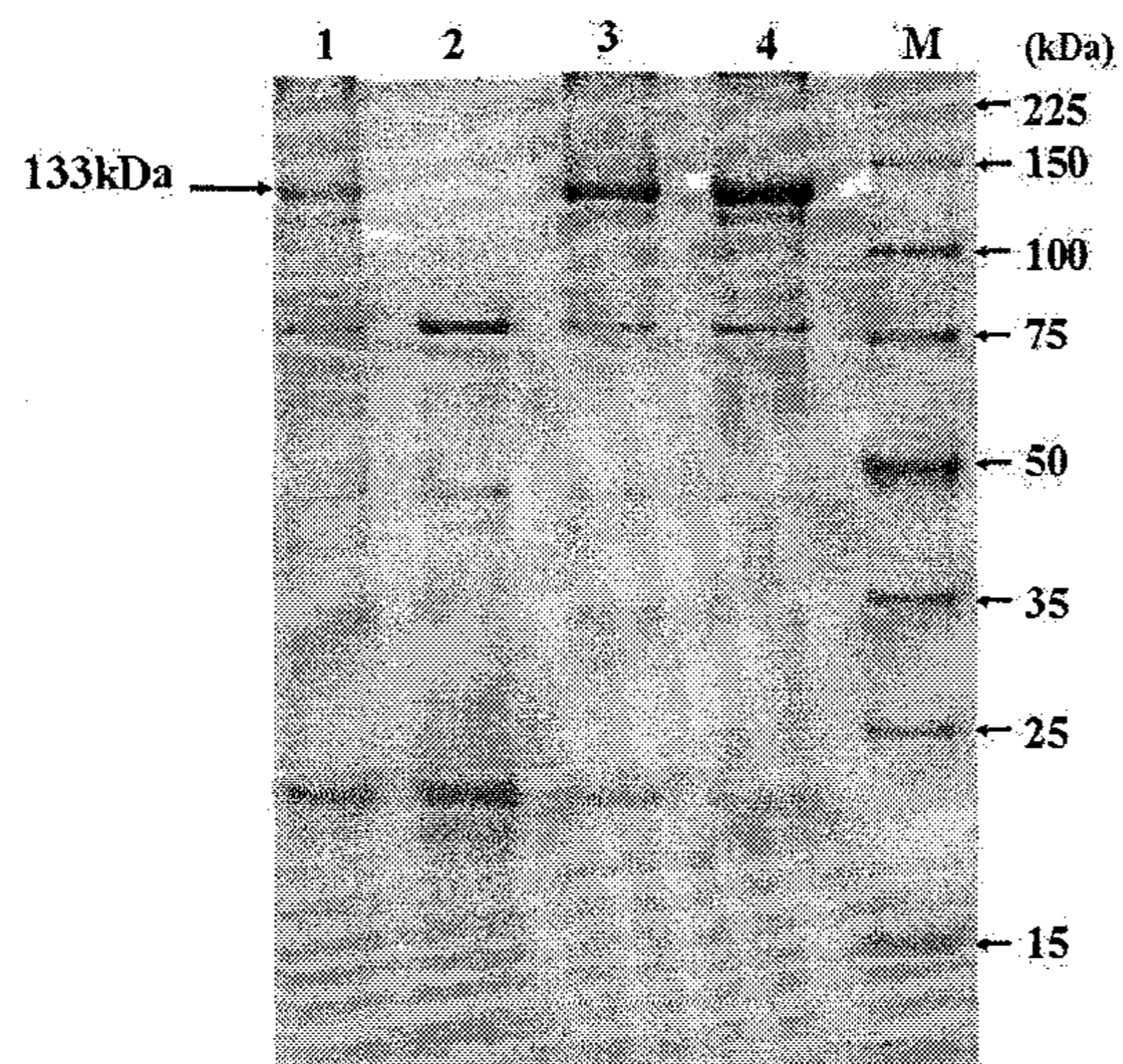


Fig. 32. SDS-PAGE of Insecticidal crystal proteins produced by Bt Cry^B strains transformed with the pHT1K-1Ac and pProAc. Lanes: M, Molecular weight standard; 1, Bt subsp. *kurstaki* HD-73; 2, pHT1K/CB; 3, pHT1K-1Ac/CB; 4, pProAc/CB

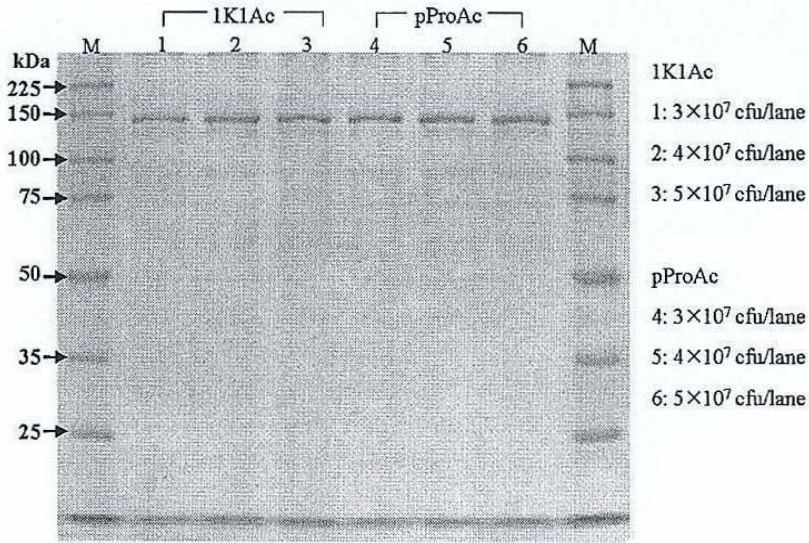


Fig. 33. M: Novagen™ 69079. 7 ul*

*A 7-ul load contains 0.7 ug for each of the protein sizes, except for 50-kDa band, which contains twice as much protein (1.4 ug) for easy reference.

라. 분리된 항세균성 미생물의 특성 분석

1) 항세균성 미생물의 분리

본 연구에서 분리한 갈반병에 대한 항세균성 미생물의 특성을 분석한 결과, 총 23개의 균주를 확보하고 23개 균주 중, 지속적 검정을 통해 길항력이 가장 우수하고 지속적으로 유지되는 135번 균주와 204번 균주를 선발하였다. Fig. 34에서 보는 바와 같이 검정 대상균인 *P. tolaasii*에 대한 활성을 보이는 균주를 선발하였다.

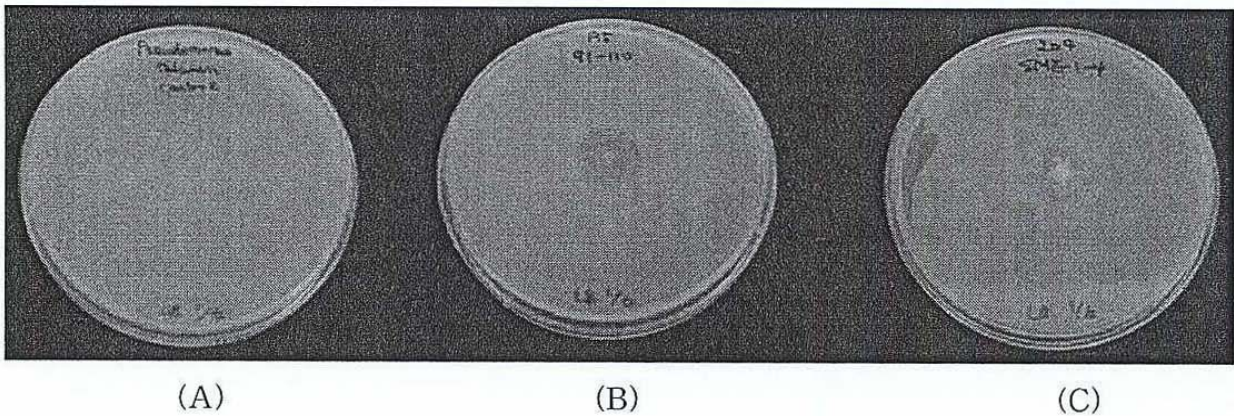


Fig. 34. Screening of antibacterial activity of two strains against *P. tolaasii*.

Table 10에서 나타난 바와 같이 *P. tolaasii*에 대한 가장 길항력이 우수한 균주인 135번 균주는 그람 양성균으로 간균이며 내생포자를 가지고 호기성 미생물인 것으로 확인되었다. 204번 균주 역시 같은 성격을 가지는 것으로 나타났다.

Table 10. 기초동정 자료

91-110 (sample 135)	SME 1-4 (sample 204)
Gram +	Gram +
간균	간균
내생포자 관찰됨	내생포자 관찰됨
호기성	호기성
Oxidase +	Oxidase +

2) 항세균성 미생물의 특성 분석

선별한 2개의 균주의 정확한 균 동정을 위하여 genomic DNA를 분리하고 PCR primers: 8F;5'-agagtttgatcctggctcag-3'와 1492R: 5'-ggttaccttggtacgactt-3' 16S rRNA를 이용하여 PCR을 수행하여 염기서열을 밝히고 GenBank database와 비교하였을 때, 91-110 (135번)은 *Brevibacillus brevis*로, SME 1-4는 *Brevibacillus formosus*로 동정되었다 (Fig. 35). 선별된 2개의 항세균성 미생물 중, 가장 활성이 강한 *B. brevis*를 최종적으로 선발하고 본 과제 연구에 사용하였다.

(A) 91-110 (135번): *Brevibacillus brevis*로 동정

GACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAGGGTCTTCGGACCCTAGCGGCGGA
 CGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTCTCAGACCGGGATAACATAGGGAACTTATGCTAATA
 CCGGATAGGTTTTTAGATCGCATGATCTGAAAAGAAAAGATGGCTTCGGCTATCACTGGGAGATGG
 GCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTG
 AGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA
 ATTTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTTCGGATTGT
 AAAGTTCTGTTGTTAGGGACGAATAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTGACG
 AGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAT
 TTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCTATGTAAGTCTGGTGTAAAGCCCCGGGGCTCAACCCC
 GGTTTCGCATCGGAACTGTGTAGCTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGCGGTATTCCACGTGTAGCGGTG
 AAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGA

GGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTG
CTAGGTGTTGGGGGTTTCAATACCCTCAGTGCCGCAGCTAACGCAATAAGCACTCCGCCTGGGGAG
TACGCTCGCAAGAGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTT
TAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCGCTGACCGCTCTGGAGACAGAG
CTTCCCTTCGGGGCAGCGGTGACAGGTGGTGCCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTG
GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCTTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACTCTAGAG
AGACTGCCGTCGACAAGACGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTG
GGCTACACACGTGCTACAATGGTTGGTACAACGGGATGCTACCTCGCGAGAGGACGCCAATCTCTT
AAAACCAATCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATC
GCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGGGA
GTTTGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCGCAAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGGTAGATGAN
CTGGGGTG

gi|46560089|gb|AY591911.1|Brevibacillus brevis strain B15 16S ribosomal RNA gene,
partial sequence
Length=1495
Score = 2831 bits (1428), Expect = 0.0
Identities = 1454/1460 (99%), Gaps = 2/1460 (0%)
Strand=Plus/Plus

gi|58618231|gb|AY887081.1| Brevibacillus brevis 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence
Length=1559
Score = 2807 bits (1416), Expect = 0.0
Identities = 1452/1460 (99%), Gaps = 3/1460 (0%)
Strand=Plus/Plus

(B) SME 1-4 : *Brevibacillus formosus*로 동정

GACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAGTCTCTTCGGAGGCTAGCGGCGGA
CGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTCTCAGACTGGGATAACATAGGGAAACTTATGCTAATA
CCGGATAGGTTTTTGGATCGCATGATCCGAAAAGAAAAGATGGCTTCGGCTATCACTGGGAGATGG
GCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGAGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTG
AGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA
ATTTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTTCGGATTGT
AAAGTTCTGTTGTTAGGGACGAATAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTGACG
AGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAT
TTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCTATGTAAGTCTGGTGTAAAGCCCGGGGCTCAACCCC
GGTTCGCATCGGAAACTGTGTAGCTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGCGGTATTCCACGTGTAGCGGTG
AAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGA
GGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTG
CTAGGTGTTGGGGGTTTCAATACCCTCAGTGCCGCAGCTAACGCAATAAGCACTCCGCCTGGGGAG
TACGCTCGCAAGAGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTT
TAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCGCTGACCGCTCTGGAGACAGAG

CTTCCCTTCGGGACAGCGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGG
GTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTATCTTTAGTTGCCAGCATT CAGTTGGGCACTCTAGAGA
GACTGCCGTCGACAAGACGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGG
GCTACACACGTGCTACAATGGTTGGTACAACGGGATGCTACCTCGCGAGAGGACGCCAATCTCTTA
AAACCAATCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCG
CGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGGGAG
TTTGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCGCAAGGAGCCAGCCGCGAAGGTGGGGTAGATGACT
GGGGTG

gi|21666259|gb|AF378234.1|Brevibacillus formosus strain LMG 16101 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence
Length=1488
Score = 2843 bits (1434), Expect = 0.0
Identities = 1450/1458 (99%), Gaps = 0/1458 (0%)
Strand=Plus/Plus

gi|45544488|dbj|AB112712.1| Brevibacillus formosus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain :
DSM 9885T
Length=1486
Score = 2841 bits (1433), Expect = 0.0
Identities = 1450/1456 (99%), Gaps = 0/1456 (0%)
Strand=Plus/Plus

Fig. 35. The results of GenBank alignment for sample 135 (A) and sample 204 (B).

3) 항세균성 미생물의 활성검정

먼저, 선별한 *B. brevis*의 그람양성균 Bt 656-3 및 그람음성균 *P. tolaasii*에 대한 항세균 활성검정을 실시하였다. 그 결과, 본 실험에서 방제의 대상인 *P. tolaasii*에만 강한 항세균 활성을 나타냈으며, 살충성 미생물로 사용될 Bt 656-3에는 전혀 활성을 나타내지 않았다 (Fig. 36). 이러한 결과는 Bt 656-3 균주와 항세균성 미생물인 *B. brevis* 균주를 같이 방제제로 사용 가능성을 제시해 준다. 그리고 *B. brevis* 균주의 배양시간에 따른 항균활성을 측정하였다 (Fig. 37). 배양 후, 12시간째 배양액에서부터 활성이 나타났으며, 36시간째부터 강한 활성이 나타나 5일째까지 강한 활성이 유지됨을 알 수 있었다. 이러한 결과로 볼 때, 새로 분리한 *B. brevis*는 강한 항세균 활성을 나타내는 새로운 미생물 제제로써 연구의 가치가 있을 것으로 사료된다.

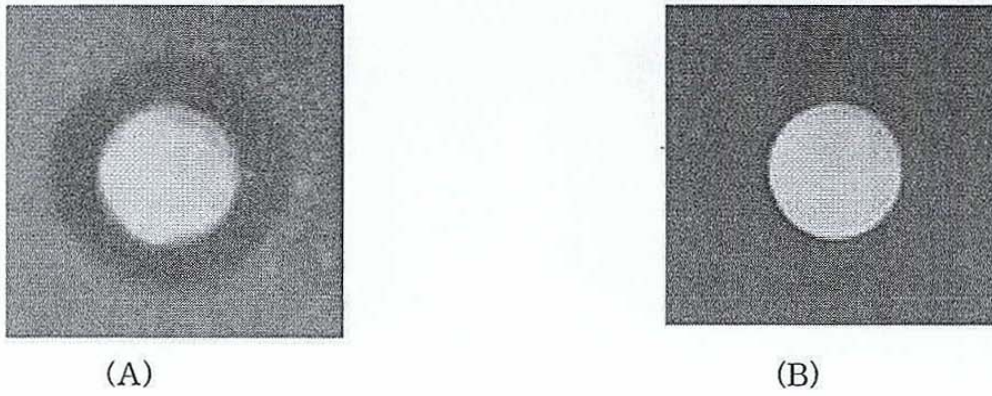


Fig. 36. Antibacterial test of *B. brevis* against *P. tolaasii* (A) and Bt 656-3 (B).

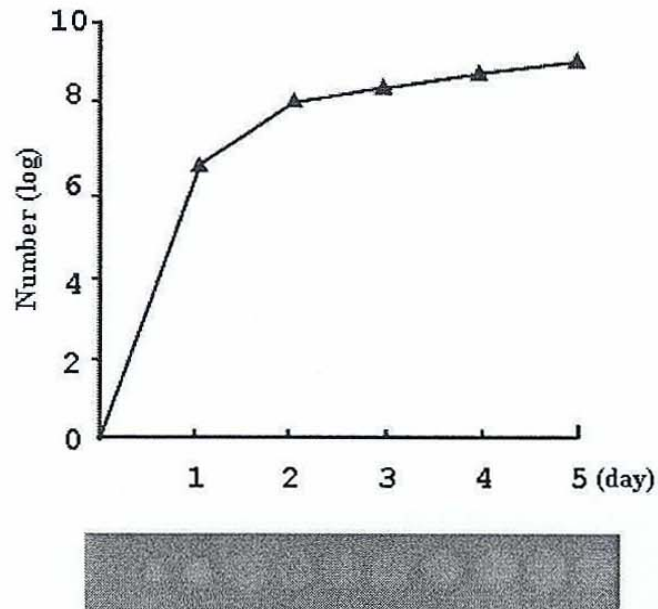


Fig. 37. Comparison of antibacterial activity of *B. brevis* dependant on growth.

제 3 절 생물검정 및 재배사 실증시험

1. 재료 및 방법

가. 생물검정용 시료 확보

1) 생물검정용 버섯파리류 해충 (*L. mali* 및 *C. fuscipes*) 실내 사육 및 제공

가) 버섯파리류 해충 (*L. mali* 및 *C. fuscipes*)의 채집 및 실내사육

본 연구에 필요한 버섯파리류 해충 (*L. mali* 및 *C. fuscipes*)은 국내 버섯재배농가에서 채집하여 버섯병발생의 가장 중요한 질병매개 해충인 해충 (*L. mali* 및 *C. fuscipes*) 두 종을 확보하여 버섯균사를 먹이로 제공하였다. 이 버섯종균은 PDA (potato dextrose agar)배지에 팽이버섯 종균을 접종하여 배양한 후 이를 버섯파리의 먹이로 제공하여 실험실내에서 버섯파리류 해충 (*L. mali* 및 *C. fuscipes*)을 인공사육하였다.

나) 느타리 및 팽이버섯의 실험실 배양

느타리버섯과 팽이버섯의 실험실 배양을 위하여 그 종균을 구입하여 PDA 배지에 배양하였다. 배양된 팽이버섯균사와 버섯파리는 생물검정을 위한 시료로 사용되었다.

다) 버섯파리류 해충 (*L. mali* 및 *C. fuscipes*)의 제공

확보된 버섯파리는 각각 따로 분류되어 사육하였고 그 3령기의 버섯파리 유충들은 살충성미생물인 *B. thuringensis*의 살충력 검정을 위한 시료로 제공되었다. 각각의 버섯파리 3령기 유충은 *B. thuringensis* sample의 살충력 검정을 위하여 *B. thuringensis* sample의 CFU (colony forming unit)을 계산하기 위하여 NA배지에 희석비율로 각 희석 비율당 20마리씩 처리하여 그 살충력을 검정하였는데, 이를 위하여 3령기의 유충이 각각의 처리구당 20두씩 제공되었다.

2) 생물검정용 세균성 갈반병 균주 (*P. tolaasii*)의 배양 및 제공

가) 세균성 갈반병 균주 (*P. tolaasii*)의 분리

각 지역에서 채취한 이병자실체의 이병부위를 절단한 다음 2% 차아염소산나트륨 용액과 70% 에탄올로 1~2분간 침지하여 표면 소독한 다음 살균수로 씻었다. 이 시료들을 상법에 따라 마쇄한 후 King's B배지에 도말 또는 희석하여 25℃ 항온기에서 1~2일간 배양하였다.

나) White line 검정

배양한 균주들을 Wong과 Preece (1979)의 방법에 따라 *Pseudomonas* agar F (PAF) 배지에 일직선으로 희석 배양하고 WLRO (white line reacting organism)균주와 대치 배양할 때 균주사이에 white line을 형성 유무를 관찰하였으며, 형광성을 띄는 colony를 분리 하였다.

다) 병원성 검정 및 제공

선별된 균주의 갈반병 유발유무를 보기위하여 밀폐용기 (28×22×9cm)내의 여지에 멸균수를 가하고 느타리버섯, 팽이버섯의 자실체를 올려놓은 다음, PAF배지에서 배양된 세균을 도포 접종하여 15℃ 항온기에서 24-48시간 배양하면서 접종부위의 갈변 및 부패유무로 병원성을 확인하였다. 이때 접종원은 병원세균을 nutrient broth (NA) 배지에서 24시간 배양 후 원심하여 세균현탁액을 약 10^{10} cfu/ml농도로 조절한 것을 이용하여 실험에 사용하였다.

라) 갈반병 균주의 PCR 분석 및 계통도 분석

분리된 균주의 유전적 특성을 규명하기위하여 16S rRNA의 보존영역의 염기서열을 ABI 310 염기서열 분석기기를 이용하여 분석하였고 그 계통을 구명하기 위하여 Phylogenetic analysis를 사용하여 *P. tolaasii*의 계통을 분류하여서 동정하였다. 아울러 갈반병 발생의 원인이 되는 tolaasin유전자의 유무를 PCR (polymerase chain reaction)법을 이용하여 PCR 산물을 확보하여 염기서열을 분석하였다.

마) 갈반병 균주의 생리화학적 특성 규명

생리화학적 특성을 규명하기 위하여 saline 용액에 *P. tolaasii*를 현탁하여 건조된 기질이 들어있는 cupules에 접종하여 배양 후, 발색시약을 첨가하여 물질의 대사유무를 색의 변화로 판정하였다.

나. 살충력 및 항균력 검정

Bt 656-3 균주 및 *B. brevis* 균주의 버섯파리에 대한 살충력 및 갈반병에 대한 항균력을 검정하기 위하여 실내 간이 느타리버섯 재배상을 아크릴로 제작하여 배양실에서 조사하였다. 간이 균상의 크기는 66 cm × 33 cm × 33 cm으로 제작하였다. 공시충은 본 실험실에서 인공사육 중인 2종의 버섯파리 *L. mali*와 *C. fuscipes* 3령 유충을 100:100 마리씩 사용하고 갈반병을 유발하는 *P. tolaasii* 병원세균을 24 시간 배양 후 원심분리하여 세균현탁액을 약 10^{11} cfu농도를 분무하여 다량의 갈반 현상을 유발하였다.

살충력 및 항균력 검정을 위해 배양된 Bt 656-3을 원심분리를 통하여 독소 및 포자가 포함되어있는 배양침전물을 수거하고 진공건조하여 배양물을 분말화 하여 기존 느타리버섯 재배사내 버섯파리류 해충의 환경친화적 방제제 개발 연구에서 본 Bt 656-3의 최적 농도인 2.5×10^8 cfu의 농도를, *B. brevis*의 경우는 5×10^8 cfu의 농도를 살포하여 버섯파리에 대한 살충력 및 갈반병에 대한 항균력을 조사하였다.

실증시험에서는 버섯균상에 *P. tolaasii* 병원세균을 5×10^{11} cfu와 버섯파리 *L. mali*와 *C. fuscipes* 3령 유충을 200:200 마리씩 사용하여 병해충을 유도하고 버섯파리에 대한 살충력 및 갈반병에 대한 항균력을 조사하기 위하여 Bt 656-3은 $1/25 \times 10^9$ cfu/m²의 농도를, *B. brevis*의 경우는 2×10^9 cfu/m²의 농도를 살포하여 관찰하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 생물검정용 버섯파리류 해충 (*L.mali* 및 *C. fuscipes*) 실내 사육 및 제공

1) 버섯파리류 해충 (*L. mali* 및 *C.fuscipes*)의 채집 및 실내사육

본 연구에 필요한 버섯파리류 해충 (*L. mali* 및 *C. fuscipes*)은 국내 버섯재배농가에서 채집하여 버섯병발생의 가장 중요한 질병매개 해충인 *L. mali* 및 *C. fuscipes* 두 종을 확보하여 PDA (potato dextrose agar)배지에 팽이버섯 종균을 접종하여 배양한 후 이를 버섯파리의 먹이로 제공하여 실험실내에서 인공 사육하였으며 사육된 버섯파리들의 전체 생활사를 조사하여 3령기 유충을 본 연구에 이용하였다 (Fig. 38 and Table 11).

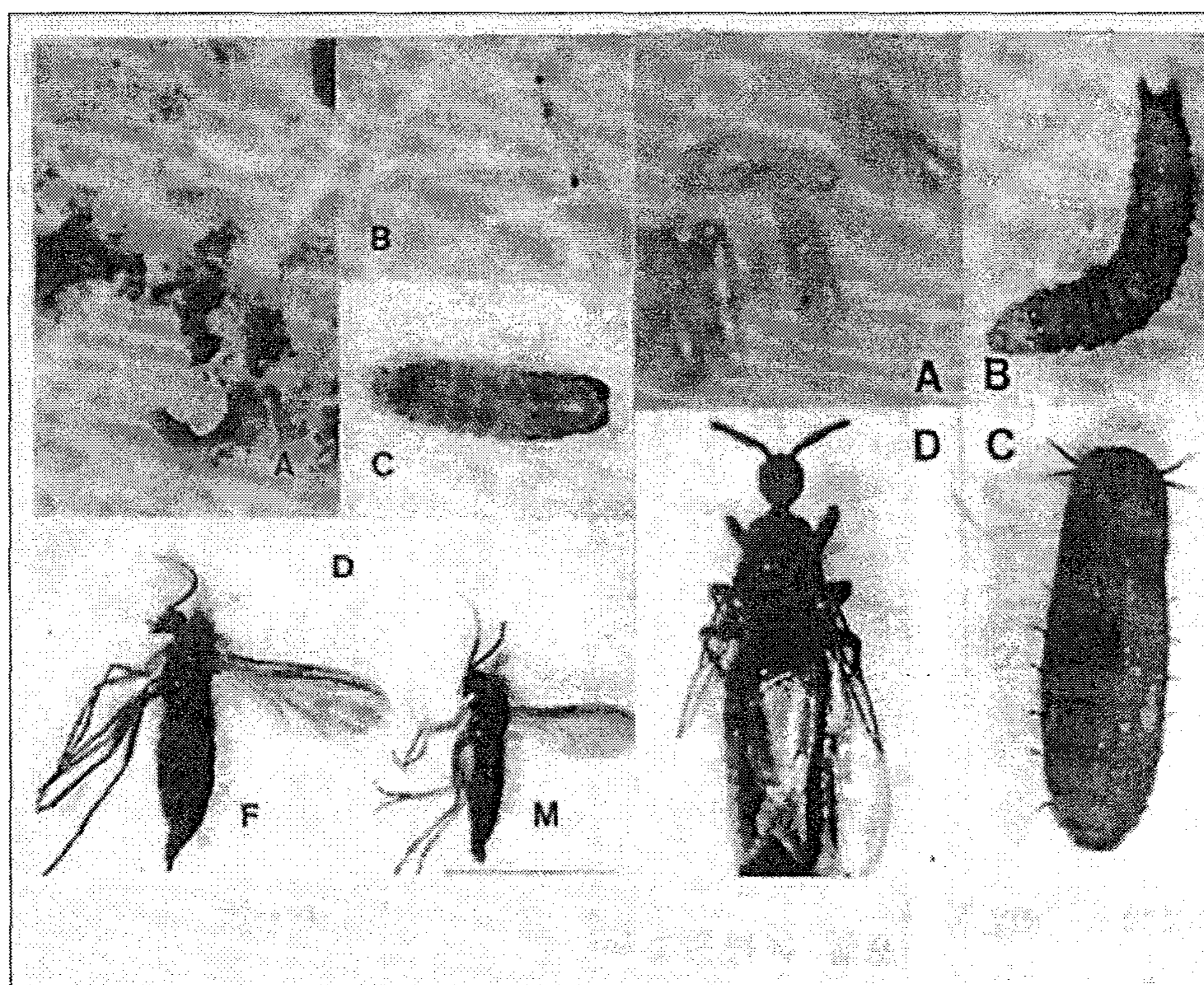


Fig. 38. The life 버섯파리류 해충 (*L. mali* 및 *C. fuscipes*)의 생활사별 형태.

Table 11. 버섯파리류 해충(*L. mali* 및 *C. fuscipes*)의 생활상

학명	<i>L. mali</i>	<i>C. fuscipes</i>
발생 규모	연중 전국적 대발생	주로 하절기 전국적 대발생
특성	유충의 직접인 피해 성충의 비행력이 좋아 병매개의 확산력이 강함 생활사 짧음 발생부위에는 버섯 병해가 만연	유충의 직접인 피해 성충의 비행과 균상 위로의 이동에 의해 병해매개 심각 산란수 많음 발생부위에는 버섯 병해가 만연
재배사 피해	유충 + 성충	유충 + 성충

2) 버섯파리류 해충(*L. mali* 및 *C. fuscipes*)의 제공

확보된 버섯파리는 각각 따로 분류하여 사육하였고 그 3령기의 버섯파리 유충들은 살충성 미생물인 *B. thuringensis*의 살충력 검정을 위한 시료로 제공되었다. 각각의 버섯파리 3령기 유충은 *B. thuringensis* sample의 살충력 검정을 위하여 사용되었으며 20마리씩 처리하여 그 살충력을 검정하였다.

나. 생물검정용 세균성갈반병 (*P. tolaasii*) 균주의 배양 및 제공

1) White line 검정

버섯에서 분리한 세균 12개 균주를 Pseudomonas agar F (PAF)배지에서 *P. reactans* (WLRO) 균주와 대치배양할 경우 white line 배색 침강선)을 형성하는 균주는 P9와 P10, 2개 균주로 나타났으며 나머지 10개 균주는 white line을 형성하지 못하였다 (Fig. 39). *P. tolaasii* 추정 균주 12 sample 을 선별하여 각각의 형광물질 형성능을 검정하여 본 결과 12 sample 모두 형광물질은 유도되었다. 한편 P1를 비롯한 10개 균주는 *P. tolaasii*와 대치 배양할 때 white line이 유도되지 않았으며, 이들 균주는 느타리조직에 병원성이 없는 부생성 *Pseudomonas*였다.

2) 16S rRNA 염기서열, 계통도 분석 및 tolaasin 유전자 염기서열 분석

분리한 P9 및 P10 균주의 genomic DNA로부터 16S rRNA 영역을 PCR로 증폭하고 염기서열을 밝혀, 기존에 보고된 *P. tolaasii* 및 *P. aeruginosa* 균주의 16S rRNA 영역과 비교하였다 (Fig. 40). 그 결과, P9 및 P10 균주는 *P. tolaasii*와 100% 일치하여 *P. tolaasii*로 판단되었다. 그리고 계통도 분석에서도 P9 및 P10 균주는 *P. tolaasii* 계열과 같은 그룹을 형성하며 높은 상동성을 보였다 (Fig. 41). 선발된 *P. tolaasii* (P10) 균주로부터 갈반병 독소 유전자인 tolaasin 유전자를 클로닝하고 염기서열을 밝혔다 (Fig. 42 and 43).

3) 세균학적 특성

P9 및 P10 균주에 대한 세균학적 특성을 조사한 결과는 Table 12 및 13과 같다. 이들 균주는 King's B 배지에서 배양하면 blue 형광성을 나타내었고 arginine dehydrolase, gelatin 액화능은 양성 반응을 보인 반면, VP, indol 생성, 질산염 환원은 음성 반응을 나타내었다. 공시균은 6°C, 30°C에서 배양할 경우에도 성장하였는데 이 특성은 Paine (1919)이 보고한 *P. tolaasii* 성장 온도 범위와 유사하였다. 탄수화물 중, 탄수화물 중 거의 모든 탄수화물을 이용할 수 있었고 L-arabinose를 포함한 몇 종의 물질은 이용하지 못하였다.

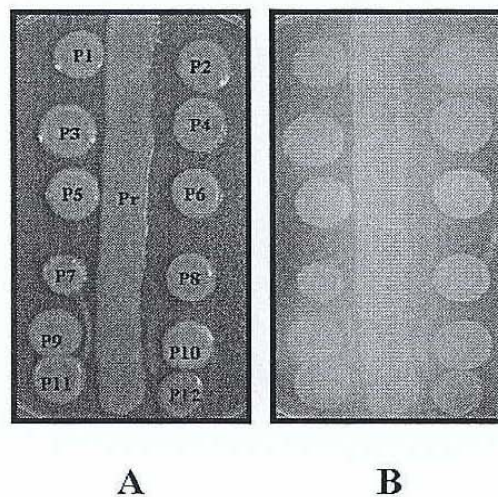


Fig. 39. White line (A) and fluorescent pigment (B) test of *P. tolaasii* and *Pseudomonas reactants*.

			30			60
P9	GCAGTGGGGA	ATATTGGACA	ATGGGCGAAA	GCCTGATCCA	GCCATGCCGC	GTGTGTGAAG
P10
<i>Ps. tolaasii</i>
<i>Ps. aeruginosa</i>
			90			120
P9	AGGTCTTCG	GATTGTRAG	CACTTTAAGT	TGGGAGGAG	GGCAGTTGCC	TARTACGTAA
P10
<i>Ps. tolaasii</i>
<i>Ps. aeruginosa</i>G..AGTC.TG
			150			180
P9	CTGTTTTGAC	GTTACCGACA	GATAAGCAC	CGGCTAACTC	TGTGCCAGCA	GCCGCGGTAA
P10
<i>Ps. tolaasii</i>
<i>Ps. aeruginosa</i>A...T	C.....
			210			240
P9	TACAGAGGGT	GCRAGCGTTA	ATCGGAATTA	CTGGGCCTAA	AGCGCGCGTA	GGTGGTTTGT
P10
<i>Ps. tolaasii</i>
<i>Ps. aeruginosa</i>	...GA.....CAG
			270			300
P9	TAGTTGGAT	GTGAAATCCC	CGGGCTCAC	CTGGGAACTG	CATTCAAAC	TGACTGACTA
P10
<i>Ps. tolaasii</i>
<i>Ps. aeruginosa</i>	C.....C.....	...ACTGAG...
			330			360
P9	GAGTATGGTA	GAGGGTGGTG	GAATTTCTG	TGTAGCGGTG	AAATGCGTAG	ATATAGGAAG
P10
<i>Ps. tolaasii</i>
<i>Ps. aeruginosa</i>C.....
			390			420
P9	GAACACCGT	GGCGAAGGCG	ACCACCTGGA	CTAATACTGA	CACTGAGGTG	CGAAGCGGTG
P10
<i>Ps. tolaasii</i>
<i>Ps. aeruginosa</i>G.....
			450			480

Fig. 40. P9 and P10의 16S rRNA의 보존영역 염기서열 분석

P9	GGGAGCAAAC	AGGATTAGAT	ACCCTGGTAG	TCCACGCCGT	AAACGATGTC	AACTAGCCGT
P10
<i>Ps. tolaasii</i>
<i>Ps. aeruginosa</i>	G.....
			510			540
P9	TGGAGCCTT	GAGCTTTTAG	TGGCGCAGCT	AACGCATTAA	GTTGACCGCC	TGGGGAGTAC
P10
<i>Ps. tolaasii</i>
<i>Ps. aeruginosa</i>	...G.T....	...A.C....GA...	..C.....
			570			600
P9	GGCCGCAGG	TTAAACTCA	AATGAATTGA	CGGGGGCCCG	CACAAGCCGT	GGAGCATGTG
P10
<i>Ps. tolaasii</i>
<i>Ps. aeruginosa</i>
			630			660
P9	GTTTAATTGG	AGGCACGCG	AGAACCTTA	CCAGGCCTTG	ACATCCAATG	AACTTCCAG
P10
<i>Ps. tolaasii</i>
<i>Ps. aeruginosa</i>T.....	...G.TGA.
			690			720
P9	AGATGGATTG	GTGCCTTCGG	GAACATTGAG	ACAGGTGCTG	CATGGCTGTC	GTGAGCTCGT
P10
<i>Ps. tolaasii</i>
<i>Ps. aeruginosa</i>TCA..C
		738				
P9	GTCGTGAGAT	GTTGGGTT				
P10				
<i>Ps. tolaasii</i>				
<i>Ps. aeruginosa</i>				

Fig. 40. 그림 계속.

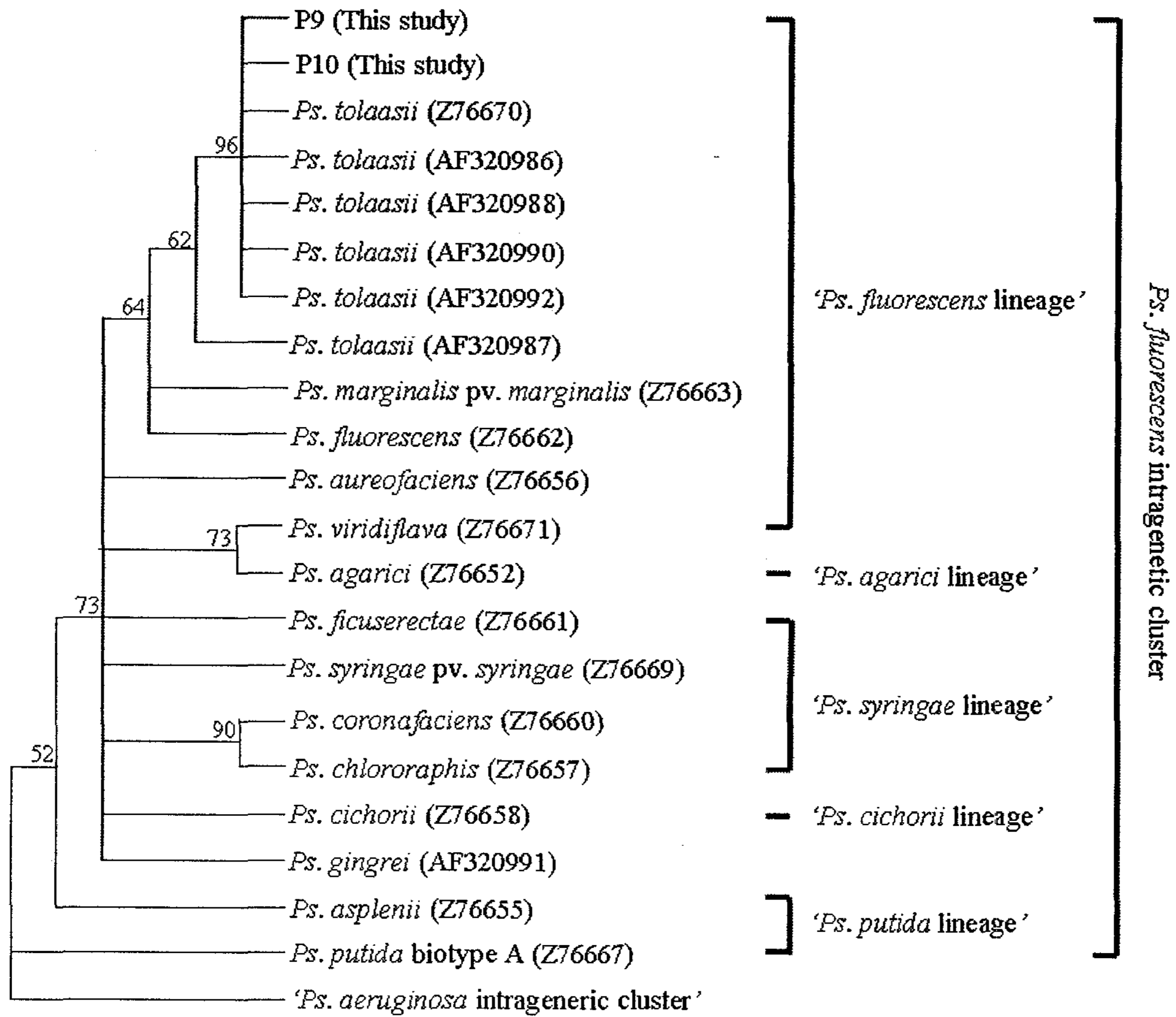


Fig. 41 *P. tolaasii* P9과 P10의 계통도



1, 4 : *P. tolaasii* ATCC 51309

2, 5 : *P. tolaasii* P9

3, 6 : *P. tolaasii* P10

Fig. 42. *P. tolaasii* 균주내의 tolaasin 유전자를 PCR로 확인

1	ATCCGATCC	CTTCGGCGTT	TACCTGGGTG	TTTACCGGCC	TGCGTTTGTC	GGTGCCTTAC
61	GCGCTGATTG	GCGCGCTGGT	GGGCGAGATC	ATCGCGGCCA	ACCGTGGGCT	GGGCTATTTG
121	CTCTCGGACG	CGGCCTCGCA	GTTGACACT	GCCGGCGTGT	TCGCCTCGCT	GGTGGGCATC
181	ATTGCCCTGG	CGCTGATCCT	CACACCCGCG	GTGAGGCTCG	CCGACGCA	GCTGATGCCG
241	TGGAAAGCCA	ACGAGCCCGA	ACGTGAAGTC	GCGGTTTAAAC	CCCCTCTATT	GCTGGAGTTT
301	GATCCTGCTT	AAGCGTCTCG	TGATTGCCGG	TCTGTTGTGC	GCCTCGTTTT	TACCCGCCGC
361	ACAGGCTCAG	GATCTGACCA	AAGTGACCCT	CGCATTCCC	AGCGAAGGTT	TCCTGTATGT
421	GCCGATTTAT	GTGGCGCAGA	AGCAGGGTTA	CTTTG		

Fig. 43. *P. tolaasii* 균주의 tolaasin 유전자의 일부영역의 DNA염기서열

Table 12. API 20 검정

characters	Present isolates	
	P9	P10
Fluorescent pigment	+	+
ONPG	-	-
ADH	+	+
LDC	-	-
ODC	-	-
CIT	-	-
H ₂ S	-	-
URE	-	-
TDA	+	+
IND	-	-
VP	-	-
GEL	+	+
GLU	+	+
MAN	-	-
INO	-	-
SOR	-	-
RHA	-	-
SAC	-	-
MEL	+	+
AMY	-	-
ARA	+	+
OX	±	±
NO ₂	-	-
N ₂	-	-
White line test	+	+
Rapid pitting test (browning test)	+	+
Growth at		
6°C	+	+
30°C	+	+

+ : Positive reaction, - : Negative reaction, ± : Weak

Table 13. API 50 검정

characters	Present isolates		characters	Present isolates	
	P9	P10		P9	P10
	Glicerol	+		+	D-cellobiose
Eritritol	-	-	D-maltose	+	+
D-arabinose	-	-	D-lactose (bovine origin)	+	+
L-arabinose	-	-	D-melibiose	+	+
D-Ribose	+	+	D-saccharose(sucrose)	+	+
D-Xilose	+	+	D-trehalose	+	+
L- Xilose	+	+	Inulin	+	+
D-Adonitol	-	-	D-melezitose	+	+
Methyl- β D-xylopyranoside	-	-	D-raffinose	+	+
D-galactose	-	-	Amidon(starch)	+	+
D-glucose	+	+	Glycogen	+	+
Dfructose	+	+	Xylitol	+	+
D-mannose	+	+	Gentiobiose	+	+
L-sorbose	\pm	+	D-turanose	+	+
L-rhamnose	-	-	D-lyxose	\pm	\pm
Dulcitol	-	-	D-tagatose	+	+
Inositol	-	-	D-fucose	\pm	\pm
D-sorbitol	\pm	\pm	D-arabitol	+	+
Methyl- α D-mannopyranoside	\pm	\pm	L-arabitol	+	+
Methyl- α D-glucoopyranoside	\pm	\pm	Potassium Gluconate	+	+
N-acetylglucosamine	+	+	Potassium 2-ketogluconate	+	+
Amygdain	+	+	Potassium 5-ketogluconate	+	+
Arbutin	+	+	Ferric citrate	+	+
Esculin	+	+	Salicin	+	+

+ : Positive reaction, - : Negative reaction, \pm : Weak

4) 병원성 검정

선발된 P9 및 P10 균주의 갈반병 유발유무를 보기위하여 배양액에 버섯을 침지하여 갈반병 형성을 관찰한 결과, 접종부위가 움푹패이며 황변, 갈변시키는 강한 병원성을 나타내었다. 이병자실체가 성숙할 경우 대와 갓은 전체적으로 연약하고, 초코렛색이나 갈색으로 변색되며, 만지면 심한 비린내가 나는 물기가 배어나오는 특징이 있었다. 이상의 느타리버섯 이병자실체에서 분리한 세균의 세균학적 성질과 병원성검정에 관한 실험으로 세균성 갈반병의 기존의 보고 (Suyama와 Fuji 1993, 김 등 1994)에서와 같이 *P. tolaasii*에 의해 발병하는 병임을 확인하였다 (Fig. 44).

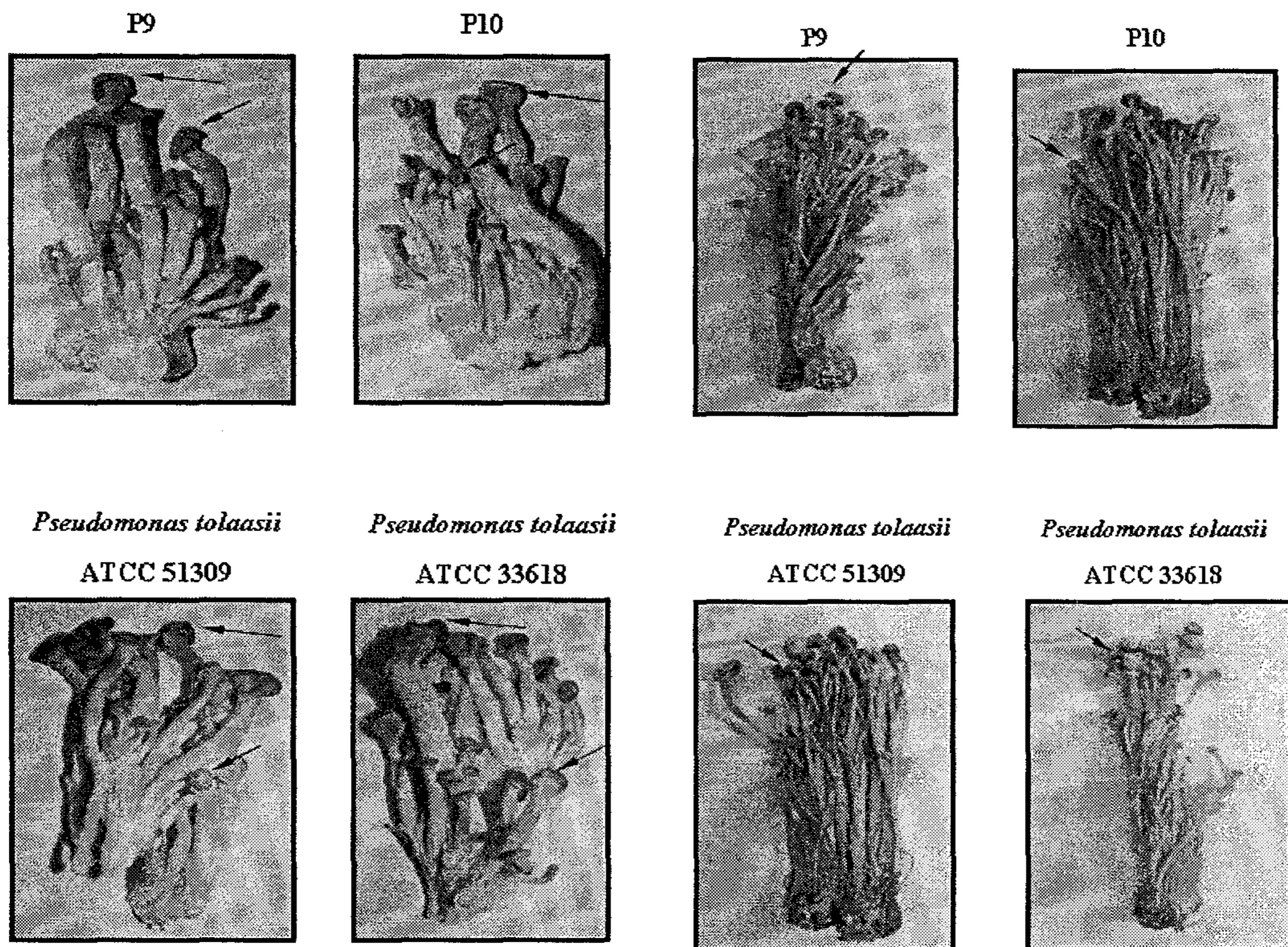


Fig. 44. P9과 P10의 느타리버섯과 팽이버섯에의 발병유무확인

4) 버섯 종균 실험실 배양 및 갈반병 유도

느타리버섯과 팽이버섯의 실험실 배양을 위하여 그 종균을 구입하여 PDA(potato

dextrose agar) 배지에 배양하였다 (Fig. 45). 분리한 *P. tolaasii* 세균현탁액을 균사배지 상에 도포하여서 25℃ 항온기에서 1~2일간 배양 후 갈변현상을 유도하였다 (Fig. 46).

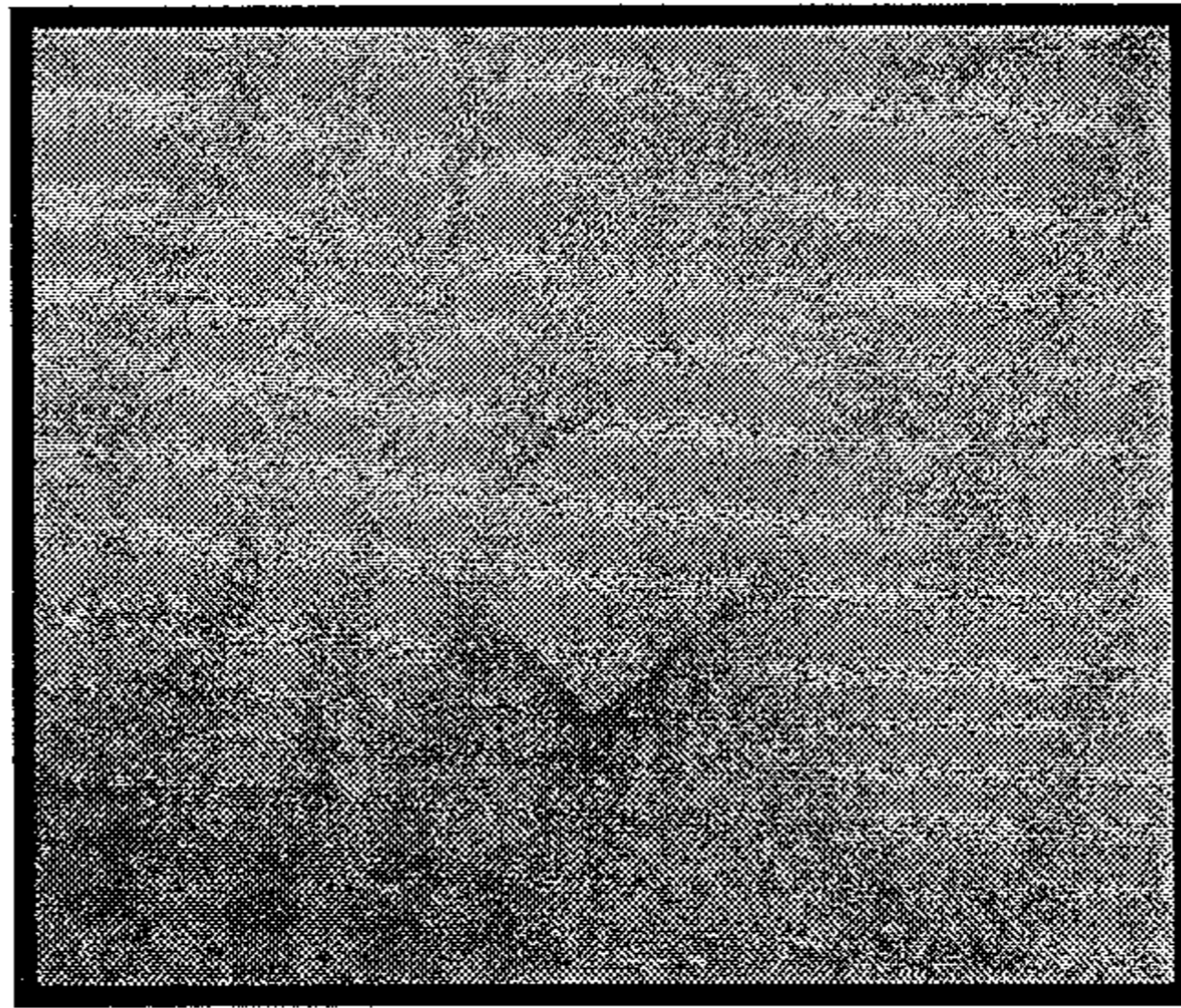


Fig. 45. 계대배양 가능한 팽이버섯 종균 배양사진

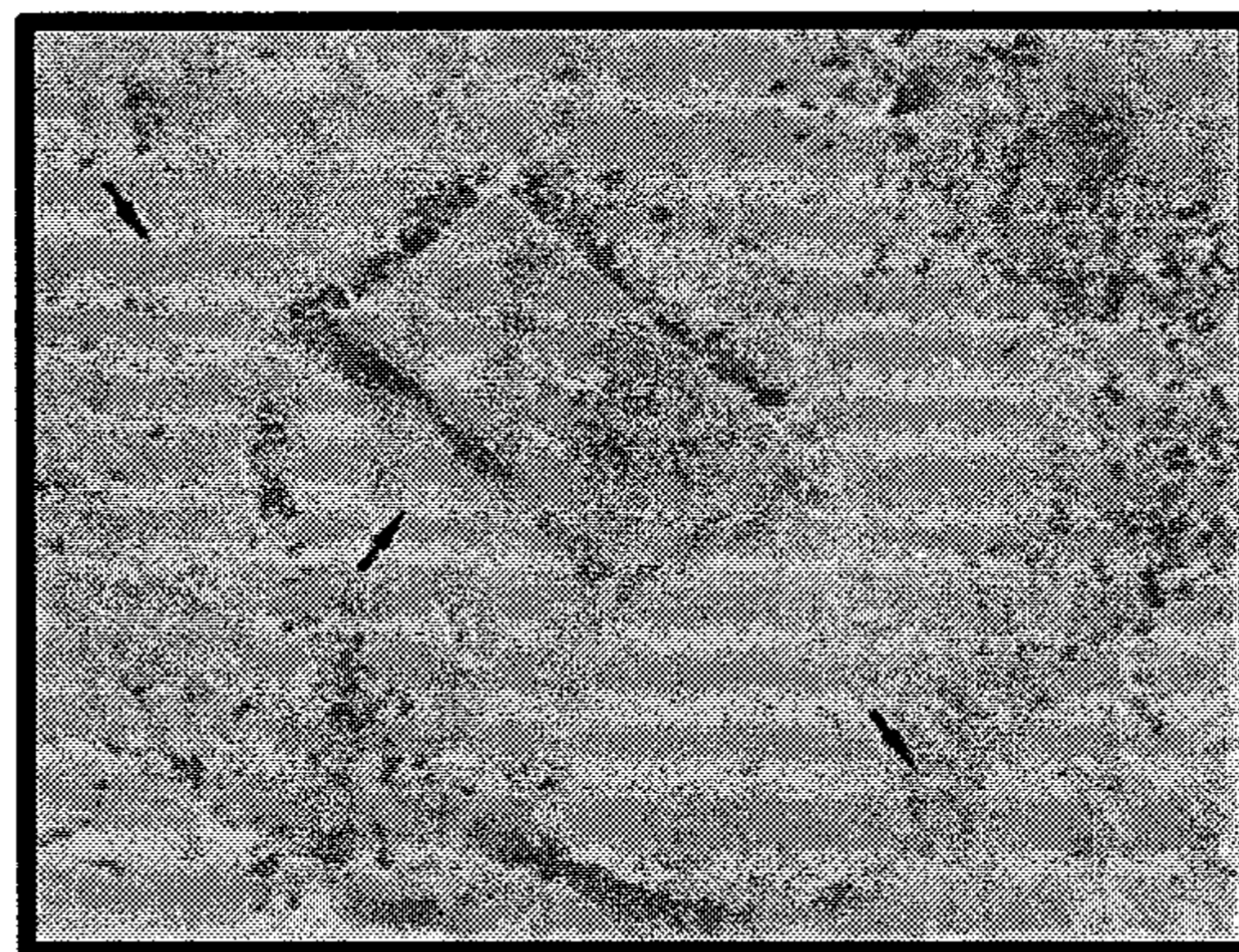


Fig. 46. *P. tolaasii* 균주의 세균성 갈반병 유도 확인

다. 살충력 검정

계대배양 가능한 버섯파리류 해충의 생활사를 검정하였으므로 각 well당 3령기 유충 20두씩을 살충성 유전자 탐색을 위한 시료로 사용되어졌다 (Fig. 47).

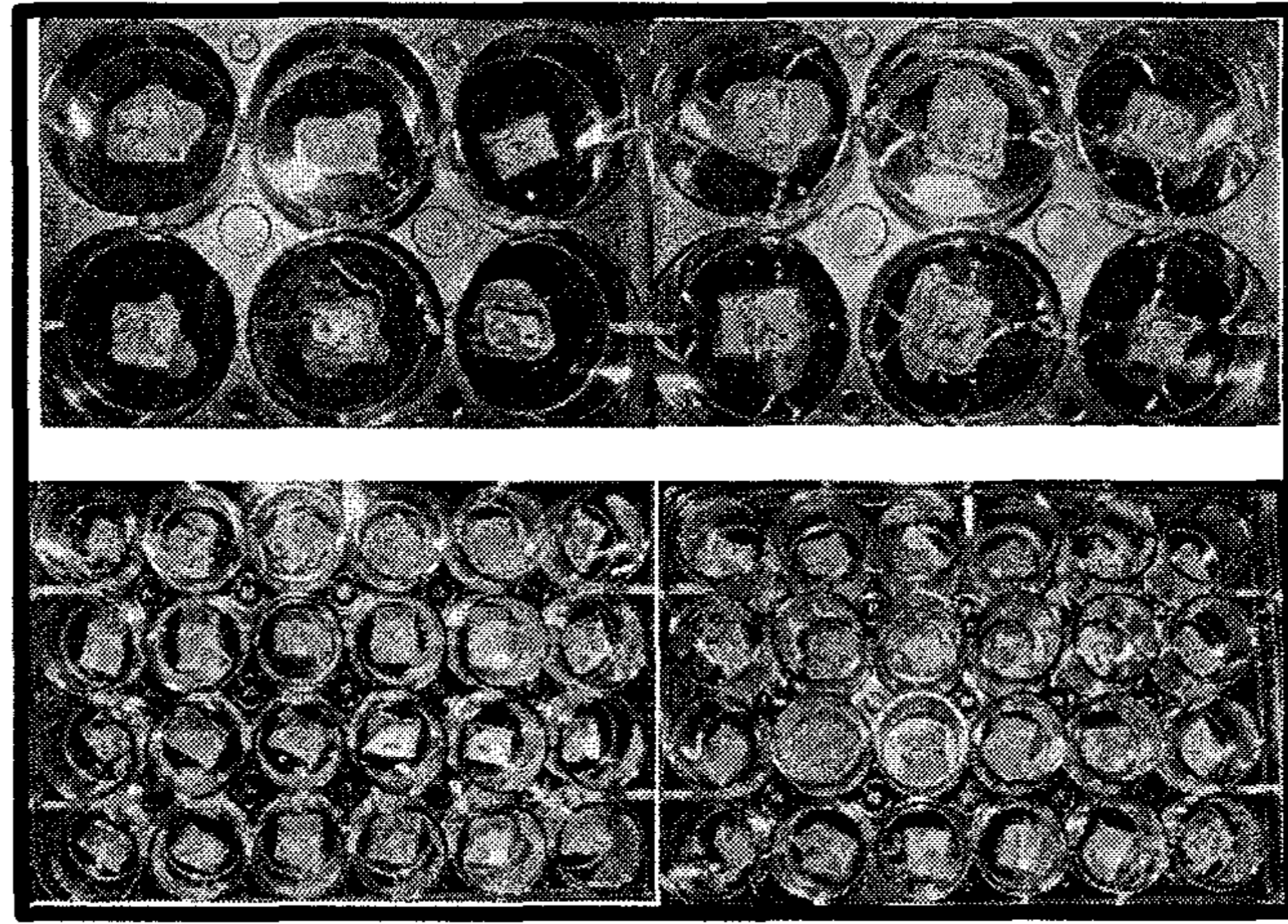


Fig. 47. 버섯파리를 이용한 살충 미생물탐색을 위한 시료로의 사용

라. 실증 시험

살충력 및 항균력 검정을 위해 제작된 실내 간이 느타리버섯 재배상에 버섯파리 2종과 갈반병 병원세균을 접종하고 재조합 Bt 656-3-BiApid 제제의 살충력 및 항균력 효과를 검정하였다. Fig. 48에서 보는 바와 같이 버섯파리 해충과 갈반병을 접종한 재배상에 아무것도 가하지 않은 재배상의 경우 버섯배지에서 대량의 갈반병이 유도되었으며 버섯균사 또한 버섯파리에 의해 상해를 입어 버섯이 자라지 못 하였다 (Fig. 48A). Bt 656-3을 처리한 경우, 버섯파리에 대한 살충력으로 버섯에 대한 피해는 없었으나, 버섯 끝부분이 갈색으로 변하며 심한 비린내가 나는 등 갈반병에 의해 상품으로의 가치가 전혀 없었다 (Fig. 48B). 그러나 본 연구에서 사용한 Bt 656-3 및 *B. brevis*를 처리한 경우, 버섯파리는 전혀 해를 입히지 못하고 갈반병은 배지에만 약간의 갈반 현상이 일어나 버섯의 성장이 다른 처리구와 비교하여 확연한 차이를 나타내었다 (Fig. 48C). 이러한 결과는 Bt 656-3 및 *B. brevis*가 버섯파리를 포함한 갈반병 방제를 위한 종합적 방제제로 충분한 효과를 기대 한다.

실증시험에서는 Bt 656-3과 *B. brevis* 제제를 동시에 처리하여 무처리구와 처리구를 비교 관찰하였다. 제제는 발이시부터 느타리버섯 최종 수확 시까지 45일 동안 3일 간격으로 10회 살포하였다. 그 결과, Fig. 49에서 보는 바와 같이 무처리구의 경우 지속적인 버섯파리 유충에 의한 종균의 손상과 버섯파리에 의해 매개되는 각종 세균이나 곰팡이의 오염에 따라 느타리버섯이 자라지 못하는 결과를 가져왔지만, 처리구의 경우 버섯파리에 대한 90% 이상의 살충력을 가지며 갈반병도 현저히 저해되는 것을 알

수 있었다.

이상에서와 같이 벼싹파리에 대한 Bt 656-3 및 갈반병에 대한 *B. brevis*를 복합적으로 처리하였을 경우 방제 효과를 증대시키고 벼싹파리 및 갈반병에 대한 느타리버섯 수확량 감소를 최소화 할 수 있을 것으로 기대 된다.

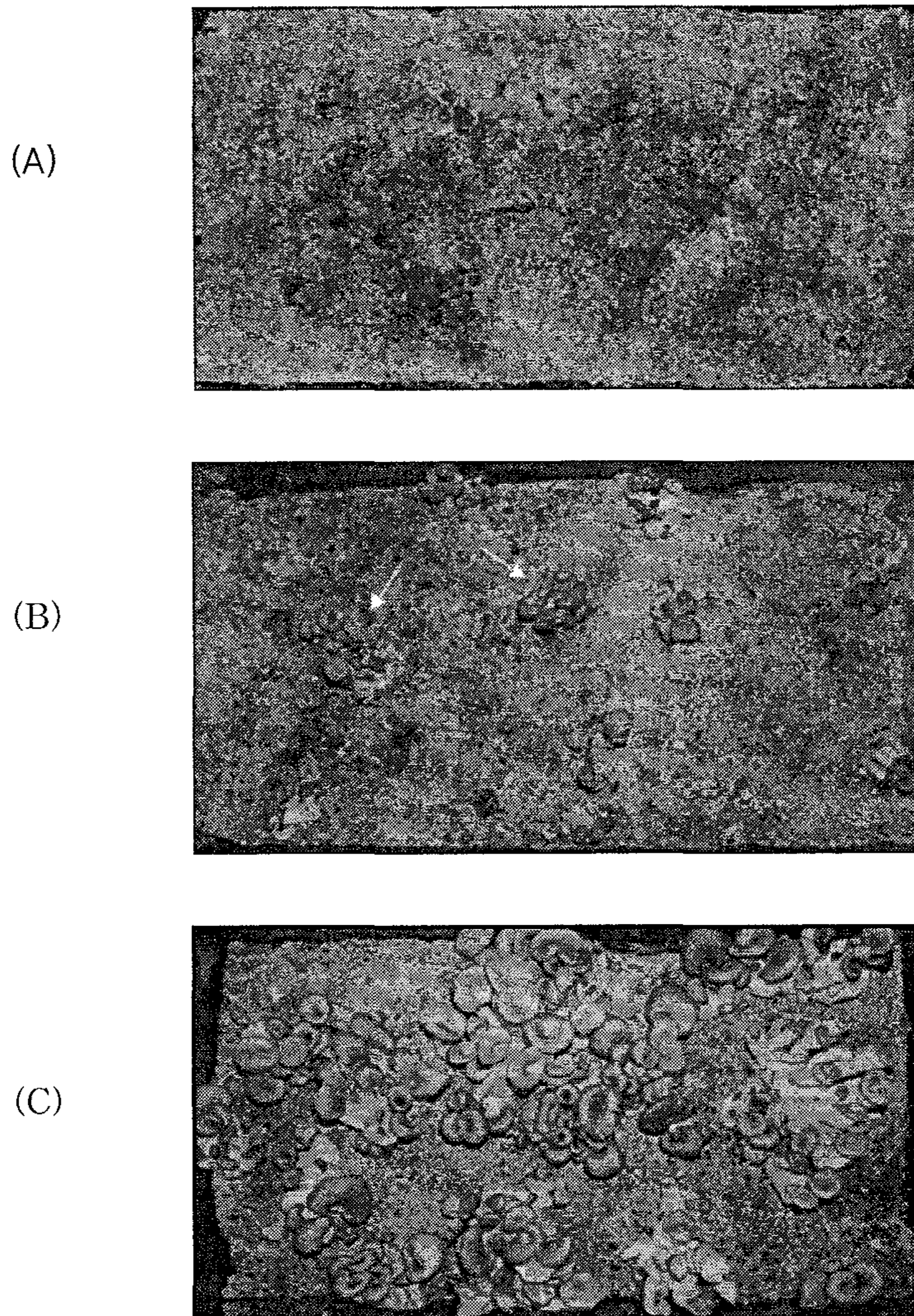


Fig. 48. Insecticidal and antibacterial effect of Bt 656-3 and *B. brevis*. (A), *P. tolaasii* (10^{11} cfu) + *L. mali* (100 L) + *C. fuscipes* (100 L) ; (B), *P. tolaasii* + *L. mali* + *C. fuscipes* + Bt 656-3 (2.5×10^8 cfu) ; (C), *P. tolaasii* + *L. mali* + *C. fuscipes* + Bt 656-3 (2.5×10^8 cfu) + *B. brevis* (5×10^8 cfu).

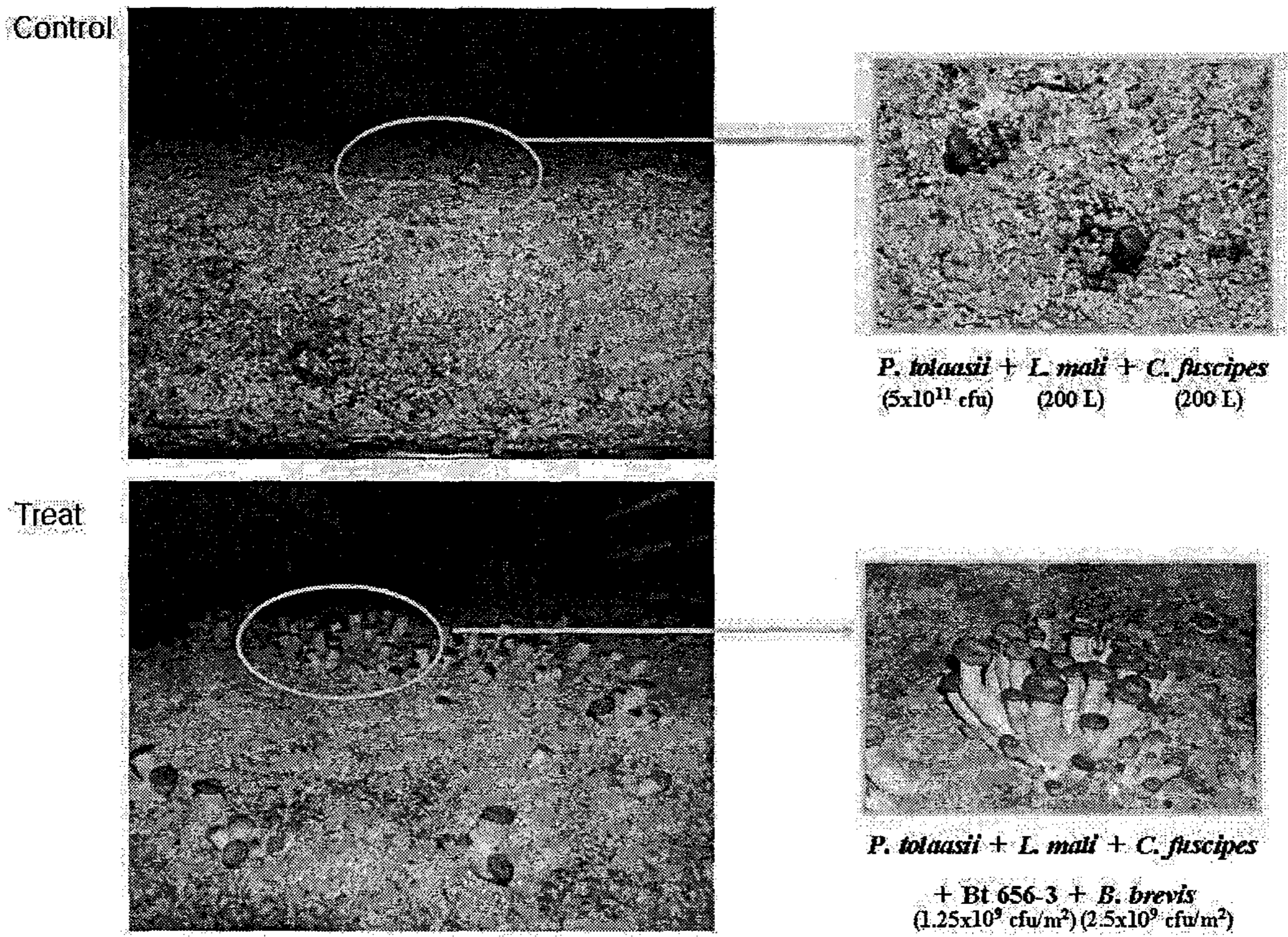


Fig. 49. Insecticidal and antibacterial effect of Bt 656-3 and *B. brevis* in mushroom house.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발목표의 달성도

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척 도 (점수)
1차년도 (2004)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 항세균성 및 살충성 미생물 균주의 탐색 ○ 항세균성 유전자 확보 ○ 생물검정용 시료 확보 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 항세균성 및 살충성 미생물 균주의 분리 (40) ○ 항세균성 유전자 확보 (40) ○ 생물검정용 시료 확보 (20)
2차년도 (2005)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 항세균성 및 살충성 미생물 균주의 특성 및 대량배양 ○ 살충성 및 살균성 재조합 Bt 656-3 균주의 제작 선발 ○ 생물검정 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 항세균성 및 살충성 미생물 균주의 특성 및 대량생산 (40) ○ 살충성 및 살균성 재조합 Bt 656-3 균주의 선발 (40) ○ 생물검정 (20)
3차년도 (2006)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 항세균성 및 살충성 미생물 균주 제제의 시작품 제작 ○ 개량 Bt 656-3 균주 제제의 시작품 제작 ○ 재배사 실증 시험 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 항세균성 및 살충성 미생물 균주 제제의 시작품 제작 (40) ○ 개량 Bt 656-3 균주 제제의 시작품 제작 (40) ○ 재배사 실증 시험 (20)
최종평가	<ul style="list-style-type: none"> ○ 항세균성 및 살충성 미생물 균주의 등록 및 특허출원 ○ 개량 Bt 656-3 균주의 등록 및 특허출원 ○ 효율성 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 항세균성 및 살충성 미생물 균주의 등록 및 특허출원 (45) ○ 개량 Bt 656-3 균주의 등록 및 특허출원 (45) ○ 효율성 분석 (10)

제 2 절 관련분야의 기술발전예의 기여도 및 기대효과

가. 기술적 측면

- 화학적 방제가 곤란한 버섯에 피해가 극심한 주요병인 세균성갈반병과 주요해충인 버섯파리류의 환경친화적 종합적 방제 기술 개발
 - 항세균성 및 살충성 Bt 및 미생물 제제 개발
- 항세균성 및 살충성 Bt 제제 개발 기술은 타 병해충 방제를 위한 환경친화적 종합적 방제 기술 제고
- 버섯 병해충 동시 방제가 가능한 환경친화적 종합적 방제제 개발은 아직까지 시도되지 않은 새로운 기술로 기술의 선점과 독점이 가능함.
- 버섯 병해충의 환경친화적 방제제 개발은 버섯의 고품질·안정적 재배 기술 확립에 기여뿐만 아니라 생물농약 기술 발전에 기여

나. 경제·산업적 측면

- 우리나라 버섯 생산 및 재배에 있어서 가장 심각한 피해를 입히고 있는 주요병해인 세균성갈반병과 주요해충인 버섯파리의 지속적인 발생에도 불구하고 화학적 방제가 곤란한 버섯 병해충을 동시에 방제할 수 있는 환경친화적 종합적 방제 기술 개발에 의해 줄임으로서 생산성 향상과 안정적 재배로 농가의 소득 증대에 기여
- 주요 병해충의 동시 방제가 가능한 환경친화적 종합적 방제제 개발은 병해충의 피해 감소에 따른 비용절감과 아울러 버섯의 연중재배와 단지화가 가능하여 지속적인 농가 고소득 작목으로 농가 소득 증대
- 버섯 병해충의 환경친화적 방제제 개발은 안정적인 그리고 고품질의 버섯생산에 따른 경쟁력 확보로 수출 촉진과 아울러 수출 전략작목으로 육성이 가능할 것으로 전망됨
- 버섯 주요 병해충의 환경친화적 방제제 개발 기술은 생물농약 기술 발전에 기여함으로써 국내 생물농약 산업의 경쟁력 확보가 가능하고 아울러 국내·외에 등록과 함께 수출이 가능함

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

선발된 항세균성 및 개량된 살충성 Bt와 그 제제는 화학적 방제제에 비해 적은 연구개발비와 비교적 간단한 등록 규정으로 단시간에 개발이 가능하기 때문에 관련 기업의 생물연구팀과 상호협력 하에 시작품을 제작·평가하고 균주와 제제 특허 등록과 함께 관련 기업에 이전함으로써 산업화를 추진하여 생물농약으로 등록하고 현장에 보급하며 국외에 수출을 추진하고자 한다. 현재 문제시 되고 있는 화학농약이 아닌 친환경적이며 버섯의 유전자 변형을 일으킨 GMO 작물이 아닌 방제제로 사용되고 있는 Bt의 유전자 변형이므로 상품에 대한 안정성 또한 문제시 되지 않으므로 실용화 가능성을 입증하였다.

기존에 보고한 느타리버섯 재배사내 버섯파리류 해충의 환경친화적 방제제 개발 연구에서 보고된 Bt 656-3 균주는 이미 춘천시농업기술센터에 균주를 분양하고 버섯파리 방제를 위한 제제화 기술 등을 기술 이전하여 버섯재배 농가에 Bt 656-3 균주가 사용되고 있다. 따라서 본 연구에서 개발한 개량 Bt 656-3-BiApid는 버섯파리와 갈반병에 대한 방제제로서 기술이전이 가능하리라 사료되며, 새로 발견한 *Brevibacillus brevis* 균주 또한 갈반병에 대한 강한 항세균성을 가지므로 방제제로서 실용화가 가능함을 기대한다.

제 6 장 참고문헌

- Adang M. J., Staver M. J., Rocheleau T. A., Leighton J., Barker R. F., Thompson D. V. (1985) Characterized full-length and truncated plasmid clones of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 and their toxicity to *Manduca sexta*. *Gene* 36: 289-300.
- Ayers, T. T and Lambert, E. B. 1995. Controlling Mushroom disease with chlorinated water. *Plant Disease Reporter* 39(11):829-836.
- Bae J. S., Kim I., Kim S. R., Jin B. R., Sohn H. D. (2001) Mitochondrial DNA sequence variation of the mushroom pest flies, *Lycoriella mali* (Diptera: Sciaridae) and *Coboldia fuscipes* (Diptera: Scatopsidae), in Korea. *Appl Entomol Zool* 36: 451-457.
- Bashan, Y. and Okon, Y. 1981. Integrated control of bacterial blotch in Israel. *The Mushroom Journal* 97:29-33.
- BCPC (1998) The biopesticide manual. 1st edition.
- Boman, H.G. (2003) Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J. Intern. Med.* 254, 197-215.
- 부경생 (2000) 한국의 생물농약기술. 과학과 기술.
- Bulet, P. and Stöcklin, R. (2005) Insect antimicrobial peptides: structure, properties and gene regulation. *Protein Pept. Lett.* 12, 3-11.
- Cantwell, G. E. and W. W. Cantello (1984) Effectiveness of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in controlling a Sciarid fly, *Lycoriella mali*, in mushroom compost. *J. Econ. Entomol.* 77: 473 - 475.
- Casteels-Josson, K., Zhang, W., Capaci, T., Casteels, P. and Tempst, P. (1994) Acute transcriptional response of the honeybee peptide-antibiotics gene repertoire and required post-translational conversion of the precursor structures. *J. Biol. Chem.* 269, 28569-28575.
- Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F. and Tempst, P. (1993) Functional and chemical characterization of hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide that is infection-inducible in the honeybee (*Apis mellifera*). *J. Biol. Chem.* 268: 7044-7054.
- Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., Vaeck, M. and Tempst, P. (1989) Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *EMBO J.* 8: 2387-2391.
- Casteels, P., Ampe, C., Riviere, L., Damme, J. V., Elicone, C., Fleming, M., Jacobs

- F. and Tempst P. (1990) Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). *Eur. J. Biochem.* 187, 381-386.
- Casteels-Josson, K., Capaci, T., Casteels, P. and Tempst, P. (1993) Apidaecin multipetide precursor structure: a putative mechanism for amplification of the insect antibacterial response. *EMBO J.* 12, 1569-1578.
- 차동열 (1998) 버섯재배기술 및 출하요령 - 버섯 재배상의 문제점과 대책. 농협중앙회 농협버섯전국협의회. 17 - 50.
- 차동열 (1998) 버섯 병해충 - 느타리버섯 재배 환경과 안전생산. 농민저널 월간 버섯. 39 - 55.
- 차동열, 박정식, 유창현, 김광포, 전창성, 이두원. 1997. 느타리버섯 재배기술과 경영. 농민신문사.
- Chang J. H., Je Y. H., Roh J. Y., Park H. W., Jin B. R., Lee D. W., Kim S. H., Yang Z. W., Kang S. K. (1999) Isolation and characterization of a strain of *Bacillus thuringiensis* serovar *kenyae* encoding only δ -endotoxin Cry1E. *Appl Entomol Zool* 34: 379-382.
- Chang J. H., Roh J. Y., Je Y. H., Park H. W., Jin B. R., Woo S. D., Kang S. K. (1998) Isolation of a strain of *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* HD-1 encoding δ -endotoxin Cry1E. *Lett Appl Microbiol* 26: 387-390.
- Chang, S. T., Buswel, J. A. and Chiu, S. W. 1993. Mushroom biology and mushroom products. The Chinese University Press.
- Chernysh, S., Cociancich, S., Briand, J.P., Hetru, C., Bulet, P., (1996) The inducible antibacterial peptides of the hemipteran insect *Palomena prasina* - Identification of a unique family of proline-rich peptides and a novel insect defensin. *J. Insect Physiol.* 42, 81-89.
- Choi K. H., Kim S. R., Cho E. S., Yang W. J., Jin B. R., Takeda M., Sohn H. D. (2000) Developmental and life history characteristics of the oyster mushroom fly, *Coboldia fuscipes* (Diptera: Scatopsidae). *Appl Entomol Zool* 35: 495-498.
- Choi K. H., Park H. C., Kang P. D., Kang S. K., Sohn H. D. (1997) Development characteristics and life cycle of a sciard fly (*Lycoriella* sp.) in indoor rearing. *Korean J Appl Entomol* 36: 77-82.
- 전창성 (1998) 버섯 병해충 - 느타리버섯 세균성갈반병과 푸른곰팡이병. 농민저널 월간버섯. 56 - 61.
- Clancy G. (1981) Observations of mites associated with the low yielding crops of cultivated *Agaricus bisporus* in Australia. *Mushroom Sci* XI: 233-244.

- Clift A. D. (1979) The identity, economic importance and control of insect pests of mushroom in New South Wales of Australia. *Mushroom Sci* X: 367-383.
- Cociancich, S., Dupont, A., Hegy, G., Lanot, R., Holder, F., Hetru, C., Hoffmann, J.A., Bulet, P., (1994) Novel inducible antibacterial peptides from a hemipteran insect, the sap-sucking bug *Pyrrhocoris apterus*. *Biochem. J.* 300, 567-575.
- CPL Sci. Inf. Ser. Ltd. (1999) Biopesticides 5th Edition. CPL Sci. Inf. Ser. Ltd Report number 991.
- De Barjac H., Frachon E. (1990) Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. *Entomophaga* 35: 233-240.
- Dimarcq, J.L., Bulet, P., Hetru, C. and Hoffmann, J. (1998) Cysteine-rich antimicrobial peptides in invertebrates. *Biopolymers* 47, 465-477.
- Dimarcq, J.L., Zachary, D., Hoffmann, J.A., Hoffmann, D. and Reichhart, J.M. (1990) Insect immunity: expression of the two major inducible antibacterial peptides, defensin and dipteracin, in *Phormia terranova*. *EMBO J.* 9, 2507-2515.
- Fermor, T. R. and Lynch, J. M. 1988. Bacterial disease of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* : screening, isolation and characterization of bacteria antagonistic to the pathogen (*Pseudomonas tolaasii*). *J. of Appl. Bacteriol.* 65:179-187.
- Fermor, T. R., Henry, M. B., Fenlon, J. S., Glenister, M. J., Lincoln, S. P. and Lynch, J. M. 1991. Development and application of biocontrol system for bacterial blotch of the cultivated mushroom. *Crop Protection* 10(4):271-278.
- Goldberg L. J., Margalit J. (1977) A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles gambiae*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti*, and *Culex pipiens*. *Mosquito News* 37: 355-358.
- Goor, M., Vantomme, R., Swings, J., Gillis, M., Kersters, K. and De ley, J. 1986. Phenotypic and genotypic diversity of *Pseudomonas tolaasii* and white line reacting organisms isolated from cultivated mushrooms. *J. Gen. Microbiol.* 132:2249-2264.
- Hall, F. R and J. J. Menn (1999) Biopesticides use and delivery. 628pp.
- Healey, K. W. and Harvey, J. M. 1989. Control of *Pseudomonas tolaasii* by *Pseudomonas fluorescens*. *Aust. J. of Biotechnol.* 3:250-251.
- Hetru, C., Hoffmann, D., Bulet, P., (1998) Antimicrobial peptides from insects. In: Brey, P.T., Hultmark, D. (Eds.), *Molecular Mechanisms of Immune Responses*

- in Insects. *Chapman & Hall, London*, pp. 40.66.
- Hoffmann, J.A. and Hetru, C. (1992) Insect defensins: inducible antibacterial peptides. *Immunol. Today* 13, 411-415.
- Hoffmann, J.A. and Reichhart, J.M. (2002) *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nat. Immunol.* 3, 121-126.
- Höfte H., Whiteley H. R. (1989) Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Rev* 53: 242-255.
- Ibarra J. E., Federici B. A. (1986) Paraspore bodies of *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* (PG-14) and *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* are similar in protein composition and toxicity. *FEMS Microbiol Lett* 34: 79-84.
- 한용식, 신관철, 김광포 (1997) 버섯파리류 *Mycophila* sp. 유충에 의한 양송이 자실체 오염 방지에 관한 실험. *농시논문집* 19: 21-26.
- Je, Y.H., Chang, J.H., Choi, J.Y., Rooh, J.Y., Jlin, B.R., O'reilly D.R. & Kang S.K. (2001) A defective viral genome maintained in *Escherichia coli* for the generation of baculovirus expression vectors. *Biotechnol. Lett.* 23:575-582.
- Jones K. A., Burges H. D. (1998) Technology of formulation and application. in *Formulation of microbial biopesticides: Beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments*. H. D. Burges (Ed.), Kluwer Academic Publishers.
- 전창선, 차동열. 1988. 느타리버섯 병해발생조사. 농업기술연구소 시험연구 보고서 생물부편 794-800.
- 정환채. 1983. 느타리버섯의 벗짚배지 발효방법에 관한 연구. *한국균학회지* 11:177-181.
- Jung S. T., Hong J. S. (1991) Changes of volatile components of *Pleurotus sajor-caju* during storage. *Kor. J. Mycol.* 19, 292-298.
- Jung S. T., Hong J. S. (1991) Volatile components of oyster mushrooms (*Pleurotus* sp.) cultivated in Korea. *Kor. J. Mycol.* 19, 299-305.
- Kalman S., Kiehne K. L., Libs J. L., Yamamoto T. (1993) Cloning of a novel *cry1C*-type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae*. *Appl Environ Microbiol* 59: 1131-1137.
- 김광포 (1990) 버섯 해충의 생태 및 방제. *최신원예* 4: 43 - 47.
- 김종완, 권순익, 강희진, 1995. 인공 재배버섯에 병을 일으키는 *Pseudomonas* 속 병원 세균에 관한 연구-2. 세균성 갈색점무늬병의 병원세균 *Pseudomonas tolaasii* 와 white line 형성균의 세균학적 성질. *한국식물 병리학회지* 11(4):353-360.
- 김종완, 김근희, 강희진. 1994. 인공 재배버섯에 질병을 일으키는 *Pseudomonas* 속 병원 세균에 관한 연구-1. 인공재배버섯의 부패 변성 원인 세균에 대하여. *한국 식물 병*

- 리 학회지 10(3):197-210.
- 김호산 (1998) 새로운 균주 *Bacillus thuringiensis* NT0423의 특성 및 제제화. 서울대학교 박사학위논문.
- Krieg A., Huger A. M., Langenbruch G. A., Schnetter W. (1983) *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* : ein neuer, gegenüber larven von coleopteren wirksamer pathotyp. J Appl Entomol 96: 500-508.
- Krieg A., Schnetter W., Huger A. M., Langenbruch G. A. (1987) *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*, strain B1256-82: a third pathotype within the H-serotype 8a8b. System Appl Microbiol 9: 138-141.
- Kronstad J. W., Schnepf H. E., Whiteley H. R. (1983) Diversity of locations for *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes. J Bacteriol 154: 419-428.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
- Laurent P., Ripouteau H., Dumanoir V. C., Frachon E., Lecadet M. M. (1996) A micromethod for serotyping *Bacillus thuringiensis*. Lett Appl Microbiol 22: 259-261.
- 이흥수 (1998) 버섯 병해충 - 버섯재배에 피해를 일으키는 해충류에 관한 고찰 (느타리버섯을 중심으로). 농민저널 월간버섯. 89 - 101.
- 이흥수 (1999) 식용버섯의 배지제조와 재배기술 - 느타리 버섯파리 예방과 방제. 한국버섯연구회 버섯 3(2): 141 - 149.
- 이상범 (2000) 미생물농약의 개발현황 및 전망. 농약과학소식 4(2): 9-18.
- 이순원 등 (1999) 병해충종합관리(IPM)에서 과실종합생산(IFP)으로의 발전방향. 원예과학기술지 17(3): 400-406.
- Lee H. S., Kim K. C., Park C. G., Shin W. K. (1999) Description of fungus gnat, *Lycoriella mali* Fitch (Diptera: Sciaridae) from Korea. Korean J Appl Entomol 38: 209-212.
- Levashina, E.A., Ohresser, S., Bulet, P., Reichhart, J.M., Hetru, C., Hoffmann, J.A., (1995) Metchnikowin, a novel immune-inducible protein rich peptide from *Drosophila* with antibacterial and antifungal properties. Eur. J. Biochem. 233, 694-700.
- Liao, Y. M., Tu, C. C. and Jeng, J. J. 1980. Control of bacterial blotch of mushroom. Taiwan Mushroom 4:34-41.
- Lindmark, H., Johansson, K.C., Stoven, S., Hultmark, D., Engstrom, Y., Soderhall, K., (2001) Enteric bacteria counteract lipopolysaccharide induction of antimicrobial peptide genes. J. Immunol. 167, 6920-6923.

- MacIntosh S. C., Stone T. B., Sims S. R., Hunst P. L., Greenplate J. T., Marrone P. G., Perlak F. J., Fischhoff D. A., Fuchs R. L. (1990) Specificity and efficacy of purified *Bacillus thuringiensis* proteins against agronomically important insects. *J Invertebr Pathol* 56: 258-266.
- Martin P. A. W., Travers R. S. (1989) Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl Environ Microbiol* 55: 2437-2442.
- Mazumdar-Shaw K., Suryanarayan S. (2003) Commercialization of a novel fermentation concept. *Adv Biochem Engin/Biotechnol* 85: 29-42.
- Nair, N. G. and Fahy, P. C. 1972. Bacteria antagonistic to *Pseudomonas tolaasii* and their control of the brown blotch of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *J. Appl. Bacteriol.* 35: 439-442.
- Nair. N. G., and Fahy. P. C. 1973. Toxin production by *Pseudomonas tolaasii* Paine. *Aust. J. biol. Sci.* 26:509-512.
- Nickerson K. W., St. Julian G., Bulla L. A. Jr. (1974) Physiology of spore forming bacteria associated with insects: radiorespirometric survey of carbohydrate metabolism in the 12 serotypes of *Bacillus thuringiensis*. *Appl Microbiol* 28: 129-132.
- 농약공업협회 (2000) 농약사용지침서. 823 pp.
- Norris J. R. (1964) The classification of *Bacillus thuringiensis*. *J Appl Bacteriol* 27: 439-447.
- Ohba M., Aizawa K. (1978) Serological identification of *Bacillus thuringiensis* and related bacteria isolated in Japan. *J Invertebr Pathol* 32: 303-309.
- O'reilly, D.R., Miller, L.K. & Luckow, V.A. (1992) *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*. W.H. Freeman & Co., New York.
- Padua L. E., Ohba M., Aizawa K. (1984) isolation of a *Bacillus thuringiensis* strain (serotype 8a:8b) highly and selectively toxic against mosquito larvae. *J Invertebr Pathol* 44: 12-17.
- Paine, S. G. 1919. Studies in bacteriosis II. A brown blotch disease of cultivated mushrooms. *Ann. Appl. Biol.* 5:206-219.
- Park H. W., Roh J. Y., Je Y. H., Jin B. R., Oh H. W., Park H. Y., Kang S. K. (1998) Isolation of a non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* strain belonging to serotype H8a8b. *Lett Appl Microbiol* 27: 62-66.
- 박용환, 고승주, 김동수. 1975. 벧짚을 이용한 느타리버섯 재배에 관한 연구. 제1보. 재배재료에 관한 시험. *농사시험연구보고* 19:93-97.
- Rees, A A., Moniatte, M., Bulet, P. (1997) Novel Antibacterial Peptides Isolated

- from a European Bumblebee, *Bombus pascuorum* (Hymenoptera, Apoidea) *Insect Biochem. Mol. Biol.* Vol. 27. No. 5. pp. 413-422.
- Roh J. Y., Park H. W., Jin B. R., Kim H. S., Yu Y. M., Kang S. K. (1996) Characterization of novel non-toxic *Bacillus thuringiensis* isolates from Korea. *Lett Appl Microbiol* 23: 249-252.
- Royse, D. J., and P. J. Wuest. 1980. Mushroombrown blotch : effects of chlorinated water on disease intensity and bacterial populations in casing soil and on pilei. *Phytopathology* 70: 902-905.
- Russell R. M., Robertson J. L., Sauvin S. E. (1977) POLO: A new computer program for probit analysis. *Bull Entomol Soc Am* 23: 209-213.
- 산림청. 1993(제 23호). 임업통계연보, IV. 임업생산 및 공급, 1. 임산물 생산량, 버섯.
- 신관철, 전낙범. 1991. 느타리버섯 세균성 갈반병의 병원균 분류 동정 및 생물학적 방제. *농사 논문집* 34:1-10.
- 신관철. 1987. 느타리버섯 벗짚배지에 발생하는 유해균류. *학국균학회지* 15:92-98.
- Shirata, A., Sugaya, K., Takasugi, M and Monde, K. 1995. Isolation and biological activity of toxins produced by a Japanese strain of *Pseudomonas tolaasii*, the pathogen of bacterial rot of cultivated oyster mushroom. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 61: 493-502.
- Suyama, K and Fuji, H. 1993. Bacterial disease occurred on cultivated mushroom in Japan. *J. Agri. Sci. Tokyo Nogyo Daigaku* 38:35-50.
- Tolaas, A. G. 1915. A bacterial disease of cultivated mushrooms. *Phytopathology* 5:51-54.
- Tu, C. C., Liao, Y. M. 1981. Control of bacterial blotch of mushroom with bactericides. *Mush. Sc.* XI:313-323.
- Tucker, C. M. and Routin, J. B. 1942. The mummy disease of the cultivated mushroom. *Univ. Missouri Agr. Exp. Sta. Res. Bull.* 358: 27p.
- 유승헌 (1999) 식용버섯의 배지제조와 재배기술 - 느타리버섯 주요 병해의 원인과 방제대책 (세균성 갈반병과 푸른곰팡이병을 중심으로). *한국버섯연구회 버섯* 3(2): 131 - 139.
- Vidhyasekaran P., Sethuranman K., Rajappan K., Vasumathi K. (1997) Powder formulations of *Pseudomonas fluorescens* to control pigeonpea wilt. *Biological Control* 8: 166-171.
- Wells, J. M., Sapers, G. M., Felt, W. F., Butterfield, J. E., Jones, J. B., Bouzar, H and Miller, F. C. 1996. Postharvest discoloration of the cultivated mushroom

- Agaricus bisporus* caused by *Pseudomonas tolaasii*, *P. reactans* and *P. gingeri*. *Phytopathology* 86: 1098-1104.
- Wetzel H. A. (1981) Integrated pest management. *Mushroom News* 29: 29-33.
- Wong, W. C. and T. F. Preece. 1980. *Pseudomonas tolaasii* in mushroom crops : A note on primary and secondary sources of the bacterium on a commercial farm in England. *J. Appl. Bacteriol.* 49:305-314.
- Yamamoto T., Powell G. K. (1993) *Bacillus thuringiensis* crystal protein : recent advances in understanding its insecticidal activity. In: Kim L (ed) *Advanced Engineered Pesticides*. NY: Marcel Dekker, pp 3-42.
- Yoon, H.J., Kim, S.E., Kim, Y.S., (2002) Temperature and humidity favorable for colony development of the indoor-reared bumblebee, *Bombus ignitus*. *Appl. Entomol. Zool.* 37, 419-423.
- Yoon, H.J., Kim, S.E., Kim, Y.S., Lee, S.B., (2004) Colony developmental characteristics of the bumblebee queen, *Bombus ignitus* by the first oviposition day. *Int. J. Indust. Entomol.* 8, 139-143.
- Young, J. M. 1970. Drippy gill—a bacterial disease of cultivated mushrooms caused by *Pseudomonas agarici* n. sp. *N.Z.J. Agric. Res.* 13:977-990.
- Zarkower, P. A., Wuest, P. J., Royse, D. J and Myers, B. 1984. Phenotype traits of fluorescent *Pseudomonas* causing bacterial blotch of *Agaricus bisporus* mushroom and mushroom-derived fluorescent *Pseudomonas*. *Can. J. Microbiol.* 30:360-367.