발 간 등 록 번 호
11-1543000-002283-01

미생물 유전체 정보 활용 경제작물 미생물농약 개발 최종보고서

2018. 6. 29

주관연구기관 / (주) 팜한농
위탁연구기관 / 전북대학교

농림축산식품부

포스트게놈 다부처 유전체사업 R&D Report

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “미생물 유전체 정보 활용 경제작물 미생물농약 개발”(개발기간 : 2016. 2. 29 ~ 2018. 2. 28) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 6. 29

주관연구기관명 : ㈜팜한농(대표자) 박진수 (인)

김용환 (인)

주관연구책임자 : 신 택 수

위탁연구책임자 : 김 재 수

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

<table>
<tr><td>과제고유번호</td><td>916003-2</td><td>해 당 단 계
연 구 기 간</td><td>2016. 2. 29 ~
2018. 2. 28</td><td>단 계 구 분</td><td>(1단계/2단계)</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 사 업 명</td><td>단 위 사 업</td><td colspan="4">농식품기술개발사업</td></tr>
<tr><td>사 업 명</td><td colspan="4">포스트게놈 다부처 유전체 사업</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 과 제 명</td><td>대 과 제 명</td><td colspan="4">농림축산식품 미생물유전체전략연구사업단</td></tr>
<tr><td>세부 과제명</td><td colspan="4">미생물 유전체 정보 활용 경제작물 미생물농약 개발</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 책 임 자</td><td rowspan="2"></td><td>해당단계
참 여
연구원 수</td><td>총: 14명
내부: 14명
외부: 0명</td><td>해당단계
연 구 개 발 비</td><td>정부: 300,000천원
민간: 300,000천원
계: 600,000천원</td></tr>
<tr><td>총 연구기간
참 여
연구원 수</td><td>총: 14명
내부: 14명
외부: 0명</td><td>총 연구개발비</td><td>정부: 300,000천원
민간: 300,000천원
계: 600,000천원</td></tr>
<tr><td>연구기관명 및
소 속 부 서 명</td><td colspan="3">㈜팜한농 작물보호연구센터 PHC연구팀</td><td colspan="2">-</td></tr>
<tr><td>위 탁 연 구</td><td colspan="3">연구기관명: 전북대학교 산학협력단</td><td colspan="2">연구책임자: 김재수</td></tr>
</table>

<요 약>

1. 대량배양 및 생산 제조공정도 개발 및 안전성 확보
2. 상업화 목적의 미생물농약(유기농업자재)등록
   ○ 포장 약효시험 및 안전성(독성)시험 검증
   ○ 농촌진흥청 유기농업자재 공시
3. 현장적용 기술개발
   ○ 총채벌레류 발육단계별 총채싹의 약효 및 잔효성 평가
   ○ 저항성 총채벌레 개체군에 대한 총채싹 약효 평가
4. 총채벌레 살충성 진균 *B. bassiana* 균주의 유전체 분석 연구
   ○ 총채벌레 방제 활성이 높은 *Beauveria bassiana* ERL (또는 JEF) 균주의 Whole Genome Sequencing 및 염기서열 분석
   ○ 병원성(pathogenesis)과 관련된 유전자군 분석
5. 효능 관련 기능성 유전자 분석 및 검증
   ○ 살충활성 관련 유전자군 분석을 위한 RNA-seq을 이용, 총채벌레 침입 전후의 transcriptome 분석
   ○ Comparative transcriptome 분석 및 up and down regulated 유전자군 분석
   ○ Validation을 통한 살충활성 기능성 유전자 분석 및 검증
   ○ 총채벌레 살충성 미생물 (진균)의 작용기작 분석
   ○ *B. bassiana* JEF-007 Whole genome sequencing 분석
   ○ *B. bassiana* ERL836 Whole genome sequencing 분석

<보고서 면수>

129

〈 국문요약문 〉

코드번호	D-01

연구의 목적 및 내용	<연구목적> 곤충병원성 곰팡이를 NGS 기반 유전체 분석기술을 활용하여 총채벌레 방제용 미생물농약(유기농업자재)을 개발하고자 함. <연구내용> 1. *B. bassiana* ERL836의 대량배양 및 생산 제조공정도 개발 2. *B. bassiana* ERL836의 미생물농약(유기농업자재)등록 ○ 포장 약효시험 및 안전성(독성)시험 검증 ○ 총채벌레 방제용 유기농업자재 등록 3. *B. bassiana* ERL836의 현장적용 기술개발 ○ 총채벌레류 발육단계별 *B. bassiana* ERL836의 약효 평가 ○ 저항성 총채벌레 개체군에 대한 *B. bassiana* ERL836 약효 평가 4. 곤충병원성 진균 *B. bassiana* 균주의 유전체 서열 해독 및 정보 분석 ○ 살충성 진균 라이브러리를 활용한 총채벌레 방제활성 평가 ○ 총채벌레 방제 활성이 높은 *B. bassiana* ERL(또는 JEF) 균주의 Whole Genome Sequencing 및 염기서열 분석 ○ 병원성(pathogenesis)과 관련된 유전자군 분석 5. 총채벌레 살충성 관련 기능성 유전자 분석 및 검증 ○ 살충활성 관련 유전자군 분석을 위한 RNA-seq을 이용, 총채벌레 침입 전후의 transcriptome 분석 ○ Comparative transcriptome 및 up and down regulated 유전자군 분석 ○ Validation을 통한 살충활성 기능성 유전자 분석 및 검증 ○ 총채벌레 살충성 진균의 작용기작 분석 ○ *B. bassiana* JEF-007 Whole genome sequencing 분석 ○ *B. bassiana* ERL836 whole genome sequencing
연구개발성과	1. *B. bassiana* ERL836의 대량배양 및 생산 제조공정도 확립 2. *B. bassiana* ERL836의 미생물농약(유기농업자재) 등록을 통한 산업화 3. 총채벌레 발육단계별 *B. bassiana* ERL836 약효검증 4. 저항성 총채벌레 개체군에 대한 *B. bassiana* ERL836의 약효검증 5. *B. bassiana* ERL836의 유전체 분석 6. 총채벌레 살충성 관련 기능성 유전자 분석 및 검증
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	1. 입제 타입의 총채벌레 방제용 미생물농약 개발을 통한 글로벌 시장 선점 2. 유전체 분석기술 기반의 경제작물 해충방제용 미생물농약 개발 및 산업화 3. 화학농약과 혼용이 가능한 미생물농약 4. 화학농약 저항성 총채벌레 개체군의 관리 가능

중심어 (5개 이내)	곤충병원성 진균	총채벌레류 방제	미생물농약	유기농업자재	RNA 염기서열 분석

〈 SUMMARY 〉

코드번호	D-02

Purpose& Contents	<Purpose> This work was supposed to develop microbial pesticide(eco-friendly organic materials) based on the next generation sequencing technology-mediated analysis of entomopathogenic fungi, which is highly virulent against thrips. <Contents> 1. Development of manufacturing process for mass production of *B. bassiana* ERL836 2. Registration of *B. bassiana* ERL836 as microbial pesticide(eco-friendly materials) ○ Validation of field trials and toxicity tests for microbial pesticide registration ○ Registration of eco-friendly materials for thrips control 3. Development of field application technology of *B. bassiana* ERL836 ○ Assessment of insecticidal efficacy of *B. bassiana* ERL836 on each developmental stage of thrips ○ Assessment of insecticidal efficacy of *B. bassiana* ERL836 against insecticide resistance thrips population 4. Whole genome sequencing (WGS) analysis of an entomopathogenic fungi, *B. bassiana* ○ Assessment of insecticidal efficacy using thrips-pathogenic fungal library ○ Whole genome sequencing (WGS) analysis of *B. bassiana* ERL (or JEF) with high insecticidal efficacy against thrips ○ Analysis of pathogenesis-related genes in the fungi 5. Analysis and validation of functional gene related to pathogenesis with thrips ○ Transcriptome analysis of genes related to pathogenesis using RNA-seq in thrips ○ Analysis of gene family with up-down regulatory gene and comparative transcriptome ○ Verification and analysis of functional genes related insecticidal activity through validation ○ Analysis of mode of action of entomopathogenic fungi in thrips ○ Analysis of Whole genome sequencing on *B. bassiana* JEF007 and ERL836
Results	1. Establishment of manufacturing process for fermentation and mass production and fermentation of *B. bassiana* ERL836 2. Industrialization through registration of microbial pesticide(eco-friendly organic materials) of *B. bassiana* ERL836 3. Assessment of insecticidal efficacy of *B. bassiana* ERL836 on each developmental stage of thrips 4. Assessment of insecticidal efficacy of *B. bassiana* ERL836 against insecticide resistance thrips population 5. Whole genome sequencing (WGS) analysis of an entomopathogenic fungi, *B. bassiana* 6. Analysis and validation of functional gene related to pathogenesis with thrips
Expected Contribution	1. Dominance in global market through development of microbial pesticide with new granules type for thrips control 2. Development and industrialization of genomics-based microbial pesticides for pest management in highly valued crops 3. Microbial pesticides which can be mixed with chemical based insecticides for thrips control 4. Ability to manage insecticide resistance thrips population using developed microbial pesticide

Keywords	Entomopathogenic fungi	Thrips control	Microbial pesticide	eco-friendly organic materials	RNA sequencing

〈 Contents 〉

1. Overview of research project ····· 1

2. Current trends in research ····· 10

3. Research results ····· 13

Chapter 1. Development of manufacturing process for fermentation and mass production of *B. bassiana* ERL836 ····· 13

Chapter 2. Registration of *B. bassiana* ERL836 as microbial pesticide (eco-friendly materials) ····· 18

Chapter 3. Development of field application technology of *B. bassiana* ERL836 ····· 27

Chapter 4. Whole genome sequencing (WGS) analysis of an entomopathogenic fungi, *B. bassiana* ····· 35

Chapter 5. Analysis and validation of functional gene related to pathogenesis with thrips ····· 49

4. Accomplishments and expected contribution ····· 101

5. Applications of research result ····· 103

6. Overseas scientific information collected during the study ····· 104

7. Research securities ····· 105

8. Laboratory safety managemental performance ····· 107

9. Representative research achivements ····· 108

10. References ····· 110

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요 ····· 1

2. 국내외 기술개발 현황 ····· 10

3. 연구수행 내용 및 결과 ····· 13

1장 *B. bassiana* ERL836의 대량배양 및 생산 제조공정도 개발 ····· 13
2장 *B. bassiana* ERL836의 미생물농약(유기농업자재) 등록 ····· 18
3장 *B. bassiana* ERL836의 현장적용 기술개발 ····· 27
4장 총채벌레 살충성 진균 *B. bassiana*의 유전체 분석 연구 ····· 35
5장 총채벌레 살충성 관련 기능성 유전자 분석 및 검증 ····· 49

4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 ····· 101

5. 연구결과의 활용계획 등 ····· 103

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 ····· 104

7. 연구개발성과의 보안등급 ····· 105

8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설.장비현황 ····· 106

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 ····· 107

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적 ····· 108

11. 기타사항 ····· 109

12. 참고문헌 ····· 110

[별첨1] 연구개발보고서 초록
[별첨2] 자체평가의견서
[별첨3] 연구성과 활용계획서

1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-05

가. 연구개발 목적

○ 선행연구를 통하여 선발한 곤충병원성 곰팡이를 NGS 기반 유전체 분석기술을 활용하여 경제작물 해충을 효과적으로 방제하는 미생물농약(유기농업자재)을 개발 및 산업화하여 조기에 성과를 창출하고자 함.

나. 연구개발의 필요성

(1) 총채벌레 방제의 필요성

○ 1908년 미국 산호세깍지벌레가 석회유황합제에 대해 저항성이 보고된 이후, 전세계적으로 1950년에 137종으로 저항성 해충의 수가 증가하였고, 최근 541종으로 저항성 해충의 종과 수가 급증하고 있음.

○ 또한 기존 작물보호제의 장기간 동안의 사용은 생태계 파괴와 환경오염 등 심각한 환경독성의 폐해를 보이고 있으며, 따라서 신규 저독성/환경 친화형 작물보호제(천연식물보호제)의 개발이 절실함.

○ 기존 작물보호제의 사용으로 인한 환경 독성의 폐해를 줄이고 저항성 해충을 효율적으로 관리하기 위한 천연식물보호제의 연구개발이 시급하지만, 천연식물보호제의 특성을 감안하여, 효과적인 방제가 가능한 해충군의 선정이 필요함(대상 해충 선정 기준: 살충제 환경독성, 해충저항성, 천연식물보호제 적용가능성(표 1)).

○ 미생물을 이용한 해충 방제 측면에서, 저항성 발생 빈도가 가장 높고 대체 방제제의 요구도가 가장 높으며 천연식물보호제의 적용 가능성이 가장 높은 "총채벌레를 대상으로한 방제 연구개발"이 가장 시급히 추진되어야 함.

(2) 총채벌레 발생 및 방제 관리 현황

(가) 총채벌레 발생현황

○ 총채벌레는 시설재배지에서 꽃이 피는 모든 작물에 연중 발생해 작물체의 잎, 꽃, 줄기는 물론이고 열매까지 가해하며, 토마토, 고추 등 가지과 채소에서는 토마토반점위조바이러스(TSWV)와 같은 심각한 바이러스를 매개하며, 대표종으로는 꽃노랑총채벌레, 오이총채벌레, 대만총채벌레 등이 있음(그림 1).

표 1. 천연식물보호제 적용 가능 대상 해충 시장군

해충	시장규모 (단위:억원)	살충제 환경 독성[1]	저항성 해충 발현[2]	생물농약 적용가능	현재 사용중인 방제법	비고
나방류	110	+++	+++	○	천적, 화학농약	1980년대 중반 이후 저항성 해충 발현 빈도가 높으며, 생물농약으로 방제 가능함
진딧물	116	+	++	△	천적, 화학농약	합성피레스로이드계와 네오니코티노이드계에 대한 저항성이 높으나, 생물농약으로 방제가 용이하지 않음
응애	66	++	+++	△	천적, 화학농약	저항성 개체의 발생 빈도가 높으나, 생물농약으로 방제가 쉽지 않음
총채벌레	52	++	++++	●	화학농약	스피노사드와 네오니코티노이드계에 대해 저항성이 높으며, 생물농약으로 방제 가능함
풍뎅이	21	+++	++	●	화학농약	농작물 외 관상식물, 조경수에도 문제가 되는 해충으로 저항성 발현빈도 가 높으며, 생물적 방제가 가능함

선충	35	+++	++	○	화학농약, 물리적 방제	화학농약에 대한 방제 자체가 어려운 해충으로 새로운 대안이 필요한 해충군이며, 생물농약의 적용 검토가 필요한 시장임
바구미	20	+++	+++	●	화학농약	장기간의 화학적 방제로 인하여 저항성 발현이 높으며, 생물농약으로 방제가 가능함
깍지벌레	17	++	+	△	천적, 화학농약	저항성 해충으로 처음 알려진 해충이나 생물농약 적용 가능성이 낮음
멸구류	20	+++	++	●	화학농약	저항성 해충 발현 빈도가 높으나, 생물농약 적용에 대한 사전 검토가 필요함

(Rural Development Administration, 2010 and University of California, 2000)

(Dongbu Farm Hannong and Sungbo Chemical, 2012)

그림 1. 기주범위가 매우 넓은 총채벌레에 의한 피해양상과 서식 형태

○ 총채벌레는 국내뿐만 아니라 전세계적으로 발생량이 매우 많은 해충으로 북미, 남미, 유럽, 아시아 등 국제적인 관심을 받고 있는 해충이며, 전세계적인 연구개발 콘소시엄 및 산학협력 연구가 활발히 진행되고 있음(그림 2).

그림 2. 국외 총채벌레 발생 관련 주요 뉴스

○ 총채벌레는 1990년대 초반 해외로부터 농산물 수입이 많아지는 시기에 작물체와 함께 유입된 외래해충이며, 유입된 총채벌레는 농산물이나 육묘의 판매 경로를 따라 전국으로 확산됐음(그림 3).

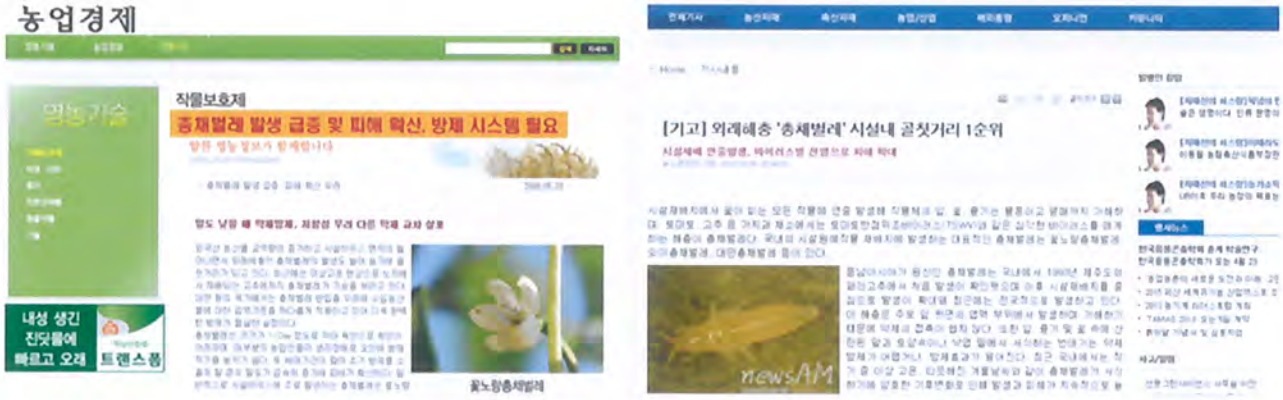


그림 3. 국외 총채벌레 발생 관련 주요 뉴스

○ 최근 국내에서는 작기 중 이상 고온, 따뜻해진 겨울날씨와 같이 총채벌레가 서식하기에 양호한 기후변화로 인해 발생과 피해가 지속적으로 늘어나고 있음.

○ 총채벌레 살충제 판매량은 2005년에 비해 1.9배 증가하였으며, 이 결과를 통해 총채벌레 피해가 늘었으며 이를 방제하기 위한 농민의 노력이 늘었음을 추정할 수 있음(그림 4).

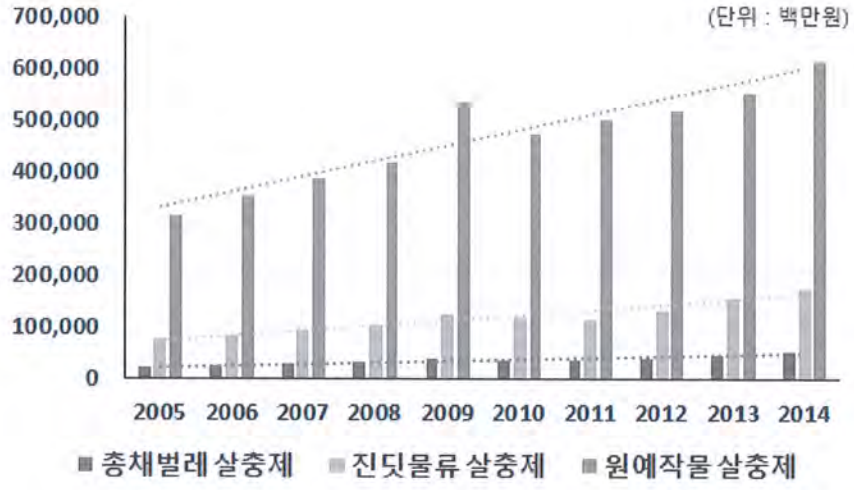


그림 4. 2005~2014년도 총채벌레 살충제 판매량

○ 2014년 전체 원예작물 살충제 시장 규모는 약 614 억원 정도이며, 그 중 진딧물류 살충제는 약 174 억의 시장 규모를 가지며 총채벌레 시장은 진딧물류 살충제 시장의 30%를 차지하고 있음.

(3) 총채벌레 방제 및 살충제 개발 현황

○ 총채벌레는 꽃피는 시기에 피해가 많이 나타나는 해충으로 온실 내에서 발생여부를 주의 깊게 관찰하여 조기에 방제하여야 함.

○ 지상부 잎이나 꽃에 서식하는 유충, 성충을 표적으로 방제함과 동시에 토양 내에 서식하는 번데기도 방제해야 방제효과를 높일 수 있음.

○ 우리나라에서 총채벌레 방제용으로 피리프록시펜, 피네토람, 피리달릴, 스피네토람, 티아클로프리드, 티아메톡삼 등 353품목이 오이, 딸기, 고추, 국화, 장미, 복분자, 무화과 등 다양한 작물에 등록되어 있음(한국작물보협회, 2017).

○ 2005년 높은 판매량을 보인 이미다클로프리드 수화제는 매년 수요량이 줄어드는 반면, 에마멕틴벤조에이트 유제는 2005년 이미다클로프리드 수화제에 비해 낮은 판매량을 보였으나 매년 판매량이 증가하여 2015년에는 총채벌레 살충제 중 가장 높은 판매량을 보이고 있음(표 2).

표 2. 총채벌레 살충제의 연도별 판매량

품목명	2012년	2013년	2014년
노발루론 액상수화제(수)	3,941	4,369	4,554
디노테퓨란 제품류	3,904	4,579	5,452
루페뉴론 유제 제품류	4301	5740	7005
보스칼리드.크레속심메틸액상수화제(수)	1,626	1,685	2,233
사이안트라닐리프롤 제품류	0	2,386	9,338

설폭사플로르 액상수화제	8,386	6,140	6,572
스피노사드 입상수화제 제품류	2,732	2,129	2,953
아바멕틴 제품류	9666	19,032	22,673
아세타미프리드 제품류	8,628	9,689	9,841
아세페이트 제품류	2150	1656	1,176
아크리나트린 액상수화제	1,514	1,259	1,668
알파사이퍼메트린.플루페녹수론유제	1,033	1,102	1,072
에마멕틴벤조에이트 제품류	25016	35,900	38,385
에토펜프록스.테부페노자이드제품류	848	1032	1032
이미다클로프리드 수화제 제품류	16,098	14,627	14182
클로란트라닐리프롤.티아메톡삼액상수화제	1,036	3,507	4,318
클로르페나피르 제품류	9,185	10,241	12,219
클로르피리포스.디플루벤주론제품류	1044	2,787	1,160
클로티아니딘 제품류	12,210	11,196	10,244
티아메톡삼 입상수화제(10%)	5,191	6,660	7,135
티아클로프리드 액상수화제	3,566	4,628	7,727
플로니카미드 입상수화제(수)	7,868	8,904	13,447

○ 총채벌레의 일반적인 방제법으로는 작물체의 정식과 함께 토양 중 총채벌레 번데기를 방제할 목적으로 입제를 미리 처리하는 방법과 작물체 지상의 약충과 성충을 방제하기 위한 엽면살포 방법이 있음. 하지만 지상부의 엽면살포를 연용하게 되면 저항성이 강해지기 때문에 유효성분과 계통이 서로 다른 약제를 3가지 이상을 조합해 번갈아 가면서 살포하는 법을 권장함. 발생 초기인 경우 살충제를 7~10일 간격으로 2~3회 살포하고, 밀도가 높은 시기에는 7일 간격으로 적어도 4회 이 상의 약제 살포를 권장하고 있음.

○ 하지만, 총채벌레는 증식력이 강하고 약제에 대해서도 높은 내성을 나타내기 때문에 일반적인 방제법으로는 충분한 효과를 기대할 수 없으며 시설 내로 침입한 후 1개월 정도 지나면 한 세대가 경과해 이후에는 알, 유충, 번데기, 성충 등 다양한 령기가 혼재해 발생하기 때문에 약제 방제가 어려워짐.

○ 특히 최근 연구 개발된 화학농약 중에서 spinosad, acetamiprid, denotefuran, abamectin등의 약제들에 대한 총채벌레의 저항성이 급증하여, 효과적인 방제가 어려운 현실에 직면해 있음(그림 5).

(Se Jin Lee in IMBL, 2014) (USDA ARS, 2014) (MSU, 2014)

* 출처: 전북대학교 곤충미생물공학 연구실, 2014, Michigun State University

그림 5. 총채벌레 발생 및 기존 화학농약에 대한 저항성 발현

○ 화학농약에 대한 저항성을 보이는 총채벌레 개체수의 밀도 증가가 급증하고 있으며, 대표적인 총채벌레 저항성 화학약제로는 carbamite계 살충제(bendiocarb, carbosulfan, methiocarb 등), organophosphate계 살충제(methomyl, chlorpyrifos, diazino 등), synthesized pyrethroid계 살충제(acrinathrin, befenthrin, cyhalothrin, deltamethrin, esfenvalerate, permethrin 등), neonicotinoid계 살충제(imidacloprid, acetamiprid, dinotefuran 등), 미생물 유래 생화학 물질(spinosad), Mectin계 살충제(abamectin, milbamectin 등)가 보고 되었음(그림 6).

(4) 현장 농가의 대응 현황

○ 총채벌레 방제를 위하여 점착트랩을 이용하여 예찰하고 있으며, 시중에 판매되고 있는 화학약제를 사용하여 총채벌레 방제에 힘쓰고 있으나 저항성 발달이 매우 높아 현재 농가 입장에서는 선택할 수 있는 방제 방법이 거의 없음.

○ 총채벌레는 꽃 속, 잎 뒷면, 과실 표면이나 꼭지 등에 서식하고 있어 농민들은 방제에 어려움을 느끼고 있음.

○ 급증하는 총채벌레 방제를 위한 고활성 작물보호제에 대한 요구가 아주 높음.

(5) 살충성 진균을 이용한 총채벌레 방제 필요

① 살충성 미생물 연구 개발 현황

○ 주요 살충성 미생물 중에서 세균으로는 *B. thuringiensis* (Bt제)가 대표적이며 이외에도 모기방제용 *B. sphaericus*와 Japanese beetle(굼벵이) 방제용 *B. popiliae*가 일부 산업화 되어 있음.

○ 대부분의 Bt제들은 전체 살충제 시장에서 가장 큰 시장을 갖고 있는 나방류 해충 방제용으로 연구개발 및 산업화되어 있으며, 이외에도 일부 Bt제들은 딱정벌레목 해충(*B. tenebrionis*)과 위생해충으로서 모기 방제용(*B. israelensis*)으로 널리 사용되고 있음(대표적인 Bt제 제품으로는 Thuricide WP와 Dipel WP 등이 있음).

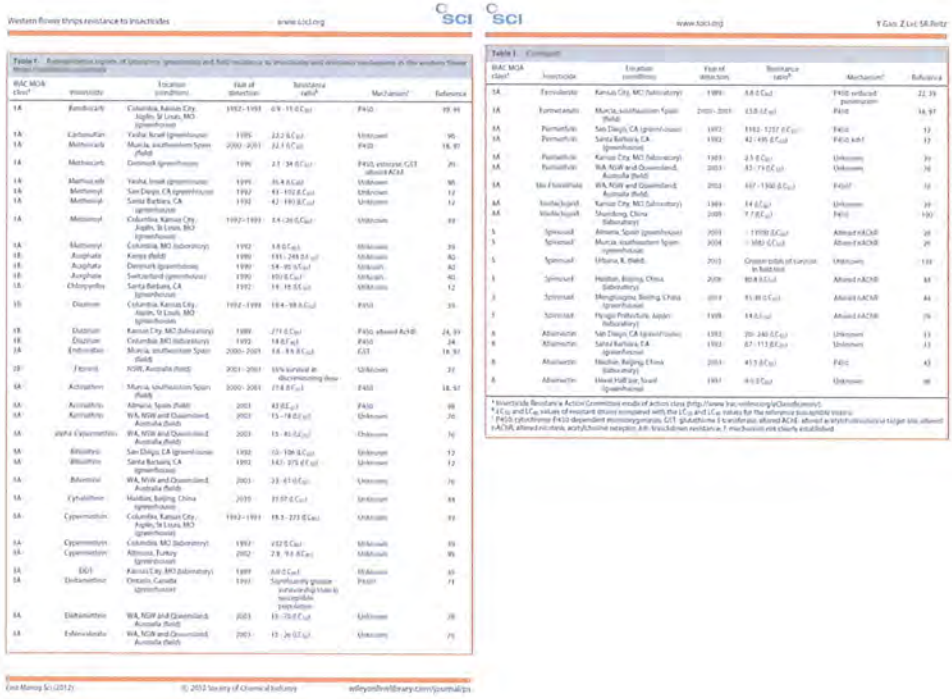


그림 6. 총채벌레 저항성 발현 화학농약 목록

○ 곤충병원성 진균으로는 *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium lecanii*, *Isaria fumosorosea* 등이 대표적인 생물적 방제제로 이용되고 있으며(BCPC, 2014), *B. bassiana*와 *M. anisopliae*는 나비목과 딱정벌레목을 포함한 다양한 해충군에 병원성을 가지고 있음(그림 7).

○ *B. bassiana* 제품군으로는 BotaniGard, Naturalis-L, Mycotal, Beauverin, Boverol 등이 있으며, *M. anisopliae* 제품군으로는 Bio-Catch-M, Green Muscle, BioGreen 등이 있음. *L. lecanii*는 주로 매미목 해충인 진딧물류에 효과적이며 대표적인 제품으로는 Vertalec이 많이 알려져 있음. *I. fumosorosea*는 매미목 해충 중에서 온실가루이와 담배가루이에 효과적인 것으로 알려져 있으며, PreFeRal, Priority 등의 제품이 판매되고 있음.

균주	생산 제품명	제형	안정성
Beauveria bassiana	**Botanigard, Naturalis-L, Mycotrol, Bio-powder, Beauverin, Boverol, Proecol**	**WP, SC**	**1yr (≤20℃)**
Beauveria brongniartii	**Betel, Schweizer Beauveria**	**WP**	**1yr (≤2℃)**
Verticillium lecanii	**Mycotal, Bio-Catch Vertalec**	**WP**	**0.5yr (≤4℃)**
Metarhizium anisopliae	**Bio-Catch-M, Met 52**	**WDG**	**1yr (≤4℃)**
Metarhizium flavoviride* var. *flavoviride	**BioGreen**	**WP**	**0.5yr (≤4℃)**
Paecilomyces fumosoroseus	**PreFeRal, Priority**	**WP, WDG**	**0.5yr (≤4℃)**

*출처: Biopesticide Manual (BCPC, 2014)

그림 7. 곤충병원성 곰팡이를 이용한 제품 개발현황

○ 곤충병원성 바이러스에는 nucleopolyhedrovirus(NPV)와 granulovirus(GV)가 대표적이며 이외에도 최근에는 Polydnavirus도 많은 관심이 기울여지고 있음. GV보다는 NPV의 산업화가 더 많이 이뤄져 있으며 주요 대상 해충은 나비목에 국한되어 있음. 대표적인 제품으로는 *Lymantria dispar* (짚시나방) 방제용으로 사용되고 있는 Gypchek, *Heliothis Zea*(담배나방) 방제용 Elcar, *Spodoptera exigua*(파밤나방) 방제용 Spodex등이 있음.

2. 국내외 기술개발 현황

코드번호	D-04

○ 총채벌레와 같은 흡즙성 해충을 효과적으로 방제할 수 있는 살충성 미생물로는 곤충 병원성 진균이 가장 효과적인 것으로 알려져 있음(그림 8). 그러나 아직 국내에서의 연구개발은 초기 단계에 머물고 있으며, 주로 진행되는 연구들은 국내 토종 균주의 분리 및 확보, 특성 규명과 살충효과 및 대량생산, 제형화와 관련된 산업화 기술 위주의 연구개발이 진행되고 있음.

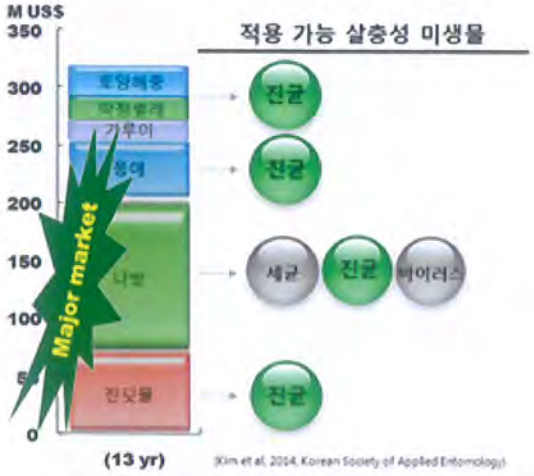


그림 8. 살충성 진균의 적용 가능 스펙트럼 및 타겟 시장

○ 기존 지상부 총채벌레만을 방제하는 전략에서 탈피하여, 지하부 토양에 존재하는 총채벌레(번데기 stage)를 동시에 방제하는 전략을 병행함으로써 종합적인 총채벌레 방제 시스템을 구출할 필요가 있음(그림 9).

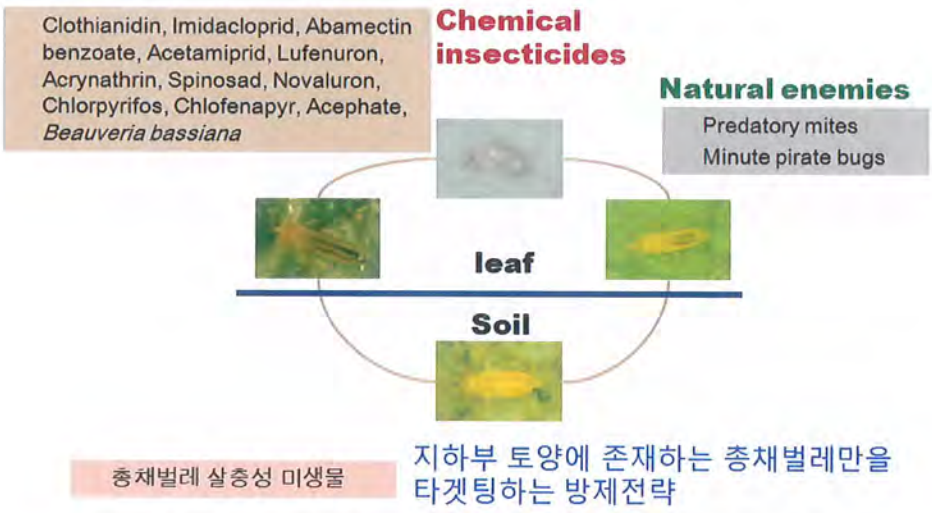


그림 9. 총채벌레 타겟형 신규 생물농약 연구개발 전략

○ 총채벌레 약충 및 번데기 형태만을 선택적으로 치사시키고(Targeting), 고활성(Effective), 경제성(Economical), 환경안정성(Environmental)을 목표로 하는 작물보호제로서, 투자 대비 연구개발 비용 및 기간이 짧은 생물농약 연구개발에 집중해야 함(e-Biopesticide 연구).

○ 살충성 진균을 지상부가 아닌 토양(고습 조건, 영양분 존재)에 처리함으로써, 처리된 미생물의 원활한 증식과 장기적인 생태계 정착을 유도함으로 토양으로 들어오는 총채벌레를 효과적으로 방제할 수 있음(Ecological Biocontrol, 그림 10).

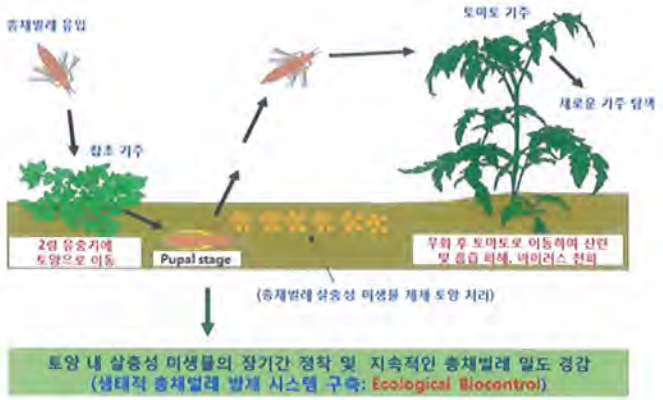


그림 10. 살충성 진균을 이용한 총채벌레 방제 시스템 제안

○ 살충성 진균에 대한 유전체 연구는 주로 미국 Maryland University의 St. Leger group을 중심으로 이뤄지고 있으며 여기에 중국 과학자(Dr. Wang 등)들이 대거 참여하고 있음. 이 group은 주로 곤충병원성 진균 중에서 *M. anisopliae* 와 *B. bassiana* 균주를 중심으로 연구하고 있으며, 곤충에 대한 병원성과 곤충의 면역기작과 관련되는 유전자들에 대한 연구를 활발히 진행하고 있음.

○ 살충성 진균에 존재하는 병원성 관련 유전자들은 살충성 유전자, 열안정성 유전자, 포자형성 관련 유전자들로, 현재 알려진 유전자들은 일부에 국한되어 있음. 살충성 관련 유전자로는 곤충 표피를 분해하는 효소(glycosylase, protease, aminopeptidase, lipase 등) 들과 병원성에 관여하는 것으로 알려져 있는 2차대사산물(beauvericin, beauverolide, oxalic acid, ayclopeptide, destruxin, oosporin 등)들이 있으며 이 외에도 다양한 알려지지 않은 유전자들 존재할 것으로 판단됨.

○ 흡즙성 해충 방제를 위한 살충성 진균의 연구개발이 진행되고 있으나, 국내외적으로 경쟁력을 갖출 수 있는 제품 개발을 위한 핵심 기술로서의 유전체 기반 병원성 인자(genomics-based insecticdial factor)에 대한 연구가 절실한 상황임.

○ 열안정성 관련 유전자들은 살충성 진균 제품의 유통기간과 직결되는 아주 중요한 기능성 유전자군이며, 현재까지 다른 종류의 진균류에서 알려져 있는 heat shock protein과

thermotolerance와 관련성이 높은 삼투압, 건조, 염 조건에 저항성을 갖는 유전자군도 중요한 역할을 할 것으로 판단됨.

○ 포자형성 관련 유전자군은 살충성 진균의 제품 생산성과 관련이 높은 유전자군으로, 어떠한 유전자들이 chronological conidiogenesis에 영향을 미치는지가 중요한 연구 대상임.

○ 최근 누에와 옥수수 조명나방에 대한 살충성 진균의 유전체에 대한 연구가 집중적인 조명을 받고 있음(그림 11).

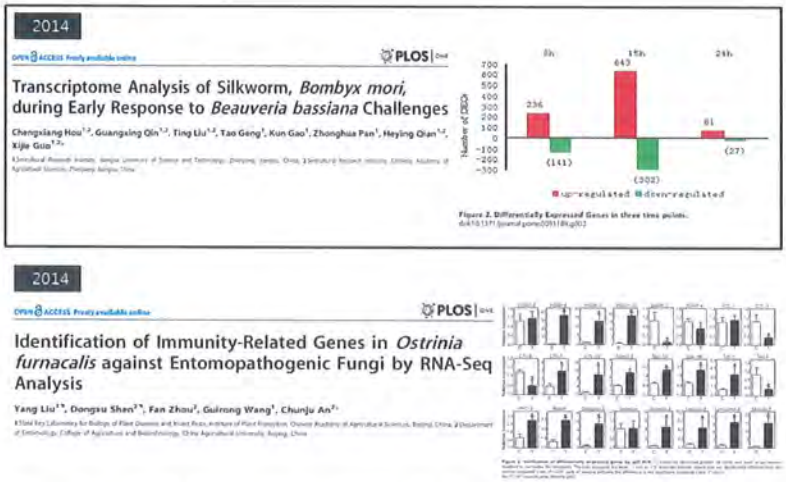


그림 11. 살충성 진균의 전사 유전체 연구(누에, 조명나방)

○ 살충성 진균인 *B .bassiana*의 stage별 병원성 유전체 발현과 진화에 대한 연구 내용들이 최근 주요 논문에 발표되고 있으며, 이러한 내용을 바탕으로 병원성 기작에 대한 심도 있는 추가 연구들이 진행되고 있음(그림 12).

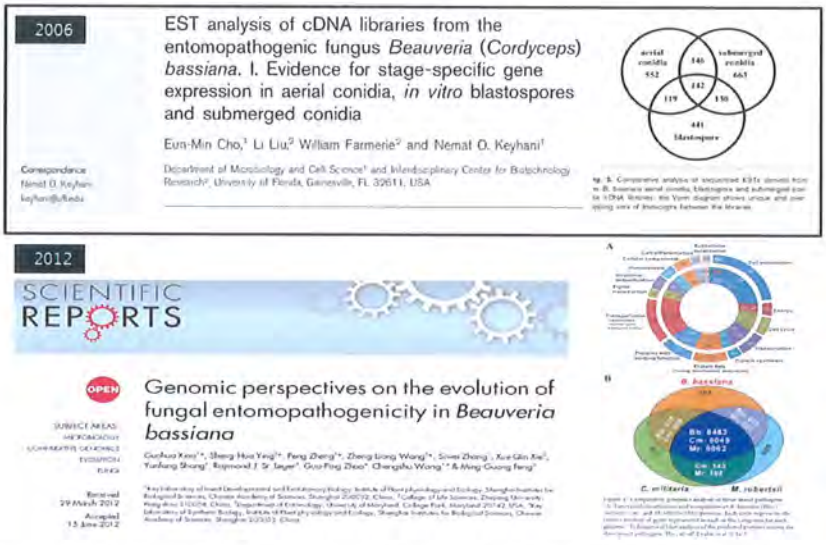


그림 12. 살충성 진균인 *B. bassiana*의 stage별 병원성 유전체 발현 및 진화

3. 연구수행 내용 및 결과

코드번호	D-05

1장 *B. bassiana* ERL836의 대량배양 및 생산 제조공정도 개발

미생물의 생리생태학적 정보를 기반으로한 대량배양 및 생산 제조공정도 기술은 개발하고자 하는 미생물의 산업화를 위한 가장 기본적이고 중요한 핵심 기술 중 하나이다. 일반적으로 미생물은 영양원의 종류·량, 서식 환경 등의 다양한 조건에 따라 증식속도 및 물질생산 등이 상이하게 나타날 수 있기 때문에 목적으로 하는 미생물의 대량생산에 있어 이러한 조건들을 최적화하는 것이 우선적으로 선행되어야한다. 이러한 최적 배양조건들은 스케일업(scale-up)에 따라 배양조건들이 변동될 수 있기 때문에 생산 및 경제적 측면을 반영한 최적 제조공정도 확보가 중요하며 생산된 미생물 배양체의 안정성 및 목적 효과의 향상 등을 위하여 최적 제형화 연구가 병행되어야 만 할 것이다. 본 연구에서는 생물농약 개발 균주로 선발된 *Beauveria bassiana* ERL836 의 대량배양 연구를 통한 최적배양 공정도 확보 및 최적 제형 확보를 목적으로 수행되었으며 연구방법 및 연구결과는 다음과 같다.

1절. 대량생산 제조공정도 개발

1. 최적 배양배지의 선발

B. bassiana ERL836의 conidia 수율을 극대화하기 위한 기초시험으로 배양 배지의 선발 연구를 수행하였다. 배양 배지 후보군으로 10여종의 곡물을 대상으로 기초배양을 진행하였으며 이중 쌀, 기장, 소맥분 3종을 대량배양을 위한 후보군 원료로 선별하였다. 선별된 후보군 원료에서의 *B. bassiana* ERL836 균주의 배양시간 당 포자수를 확인한 결과, 그림 1과 같이 기장에서 단위시간 당 가장 높은 포자수를 확보할 수 있음을 확인하였다.

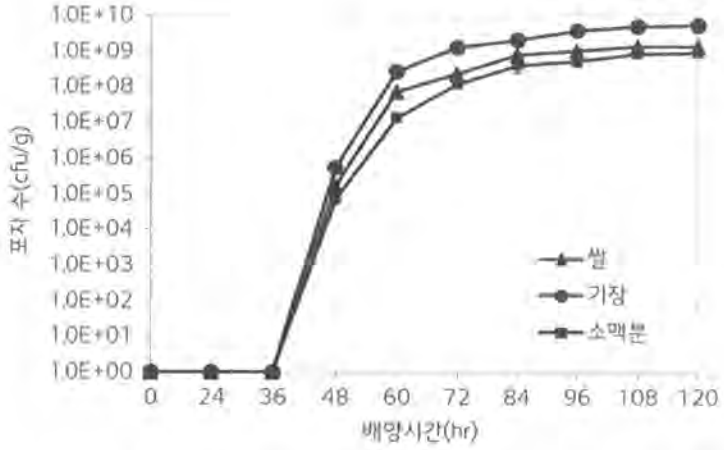


그림 1. *B. bassiana* ERL836의 배양원료에 따른 시간별 생육 포자수 그래프

2. 배양조건의 확립

배양시간, 온도 등의 물리적 조건에 따른 *B. bassiana* ERL836 conidia의 최적 수율 조건을 확립하기 위한 기초시험을 수행하였다. 시험방법은 최종 선발된 기장 배지 내 *B. bassiana* ERL836 을 접종한 후, 배양시간(0~192h)에 따른 온도별(20, 25, 30℃) 생육 포자수(cfu/g)를 조사하였다. 시험 결과, 25℃ 조건에서 가장 단기간 내 *B. bassiana* ERL836 conidia 확보 및 최대 수율 확보가 가능하였으나, 30℃의 고온조건에서는 포자 생성을 하지 않았다(그림 2).

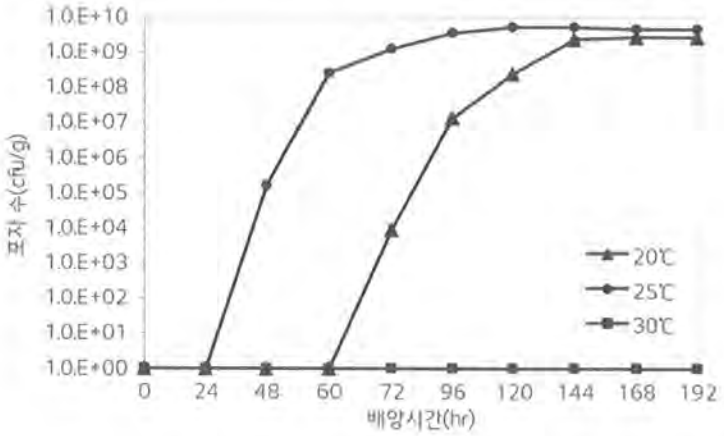


그림 2. *B. bassiana* ERL836 배양 온도에 따른 시간별 생육 포자수 그래프

B. bassiana ERL836 접종량에 따른 배양시간별 포자 수율 시험 결과, 모든 접종농도에서 배양 24h 이후부터 포자가 확인되었으며 단위시간 당 가장 높은 포자수 획득이 가능한 농도는 1 (v/v)로 조사되었다. 하지만, 최종목표 수율인 1.0×10^9(cfu/g) 도달되는 시점인 96h 기준으로 판단하였을 때, 접종농도 1 (v/v)과 0.1 (v/v)의 차이는 보이지 않았으므로 0.1 (v/v)을 최적 접종량으로 선정하였다(그림 3).

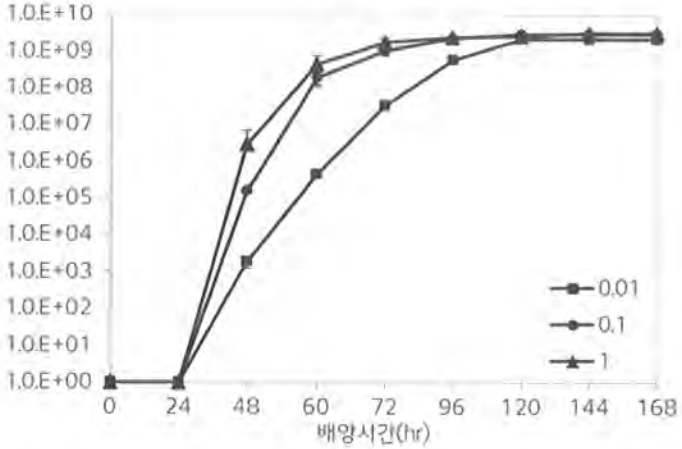


그림 3. *B. bassiana* ERL836 접종량에 따른 시간별 생육 포자수 그래프

3. 대량생산 제조공정도 확립

기초시험을 통해 확립된 배양조건을 바탕으로 목표 수율을 도달하기 위한 Plant scale (장비 Capa. 500kg ~ 1000kg scale)에서의 배양 제조공정을 확립한 후, *B. bassiana* ERL836의 대량생산을 진행하였다. Plant scale 의 공정단계는 원료, 종국(seed)의 확보, 전처리, 증자, 냉각 및 입국, 제국, 출국 및 포장으로 크게 구분되며 각 단계별 품질기준은 표 1과 같다.

표 1. Plant scale 제조공정도 및 품질기준

공정단계	공정내용	품질기준
원료	-	-
종국	-	포자수, 1.0×10^9 cfu/g
전처리	원료를 물에 2시간 침지	-
증자	원료의 물을 제거하여 증자기를 넣고 100℃ 이상의 고온에서 10분간 이상 증자	-
냉각 및 입국	증자가 된 후, 원료를 종국(seed)과 함께 혼합하여(접종량 0.1%(v/v)) 배양기에 투입.	증자 후 일반세균수, 1.0×10^4 이하
제국	25±2℃의 온도에서 96시간 배양	배양온도 25±2℃, 배양습도 90% 이상
출국 및 포장	배양이 완료된 고상원제를 포장 단위로 포장	포자수, 4.0×10^9 cfu/g 이상

2절. 대량생산 배양물의 최적 제형 확립

1. 대량생산된 배양물의 최적 제형 확립

본 연구에서는 토양 내 서식하는 총채벌레 번데기를 방제하기 위한 안정적인 약효 발현 제형을 선발해내고자 최적 제형화 연구를 진행하였다. 포장 내 다양한 발육단계가 혼재되어 있는 총채벌레류의 생태적인 특성 상 지속적으로 약효를 발현할 수 있는 제형을 탐색한 결과, 야외조건에서 안정적인 약효 발현 및 장기보관에 유리한 GR (Granule, 입제) 제형을 선발하였으며 그림 4에 따른 제조 처방전 과정을 거쳐 대량생산된 *B. bassiana* ERL836 배양액의 제형화를 진행하였다.

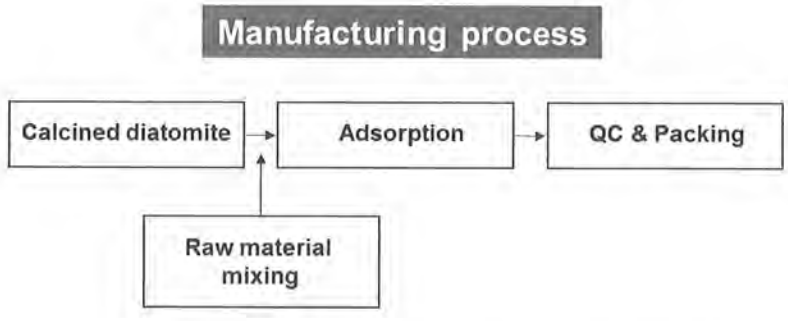


그림 4. *B. bassiana* ERL836 GR 제형 제조공정도

2. 최적 제형의 물리이화학적 분석

대량생산 및 최적 제형화를 거친 시제품의 산업화를 위한 적합성을 확인하기 위하여 기 확립된 물리이화학적 QC 기준에 따른 분석을 수행하였으며 그 결과는 표 2와 같다. 분석 결과, 생산된 *B. bassiana* ERL836 시제품은 회갈색의 형상, pH 8.2, 가비중(g/㎤) 0.873, 습도 7.8%(105℃, 10분), 경도 98.6%, 입도 99.1%(35 mesh 상부)를 나타내었으며 시제품의 물리이화학적 QC 기준에 모두 통과하였으며 토양처리를 위한 최적 제형으로 적합함을 확인하였다.

표 2. *B. bassiana* ERL836 GR 시제품의 물리이화학분석 결과

Test code	QC	Result	Method
Appearance	Brown G.	Brown G.	Visual observation
pH(10%)	8.0±1.0	8.2	Electric pH meter
Specific gravity(g/㎤)	0.87±0.05	0.87	Specific gravity measure
Moisture(%, 105℃, 10min)	≤10.0	7.8	Moisture meter(FD-610)
Hardness(%)	≥98.0	98.6	Hardness measure
Granularity(%, 35mesh)	≥98.0	99.1	Granularity measure

3절. 원제 및 제품의 저장안정성 확립

1. 원제의 저장안정성 분석

대량생산된 *B. bassiana* ERL836 원제의 저장안정성을 확보하기 위하여 2년간 상온(25℃)에서의 포자수 변화를 조사하였다. 저장안정성 분석 전, *B. bassiana* ERL836의 포자수를 조사한 결과, 1.4×10^{9} cfu/g 로 확인되었으며 매달 일정한 날짜에 저장된 시료를 채취하여 포자수 변화를 분석하였다. 2년간 조사 결과, 최종 포자수는 초기 포자수의 약 40%가 감소한 8.5×10^{8} cfu/g 로 나타났으나(그림 5) 감소된 최종 포자수가 총채벌레에 약효를 나타내는 제품의 유효농도 범위내에 포함되기 때문에 약효의 안정성 측면에서는 문제점을 나타내지 않았다.

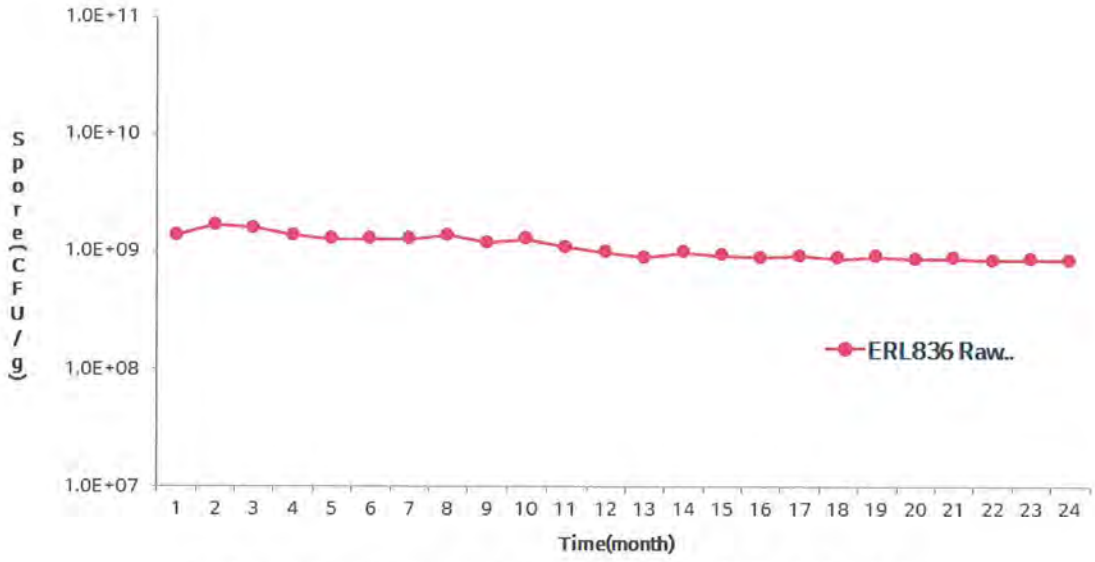


그림 5. *B. bassiana* ERL836 의 저장안정성 분석 결과

2. 제품의 저장안정성 분석

제형화 및 증량제가 첨가된 *B. bassiana* ERL836 원제의 저장안정성 변화를 확인하기 위한 시험을 수행하였다. 제품의 유통과정에 있어 여러 악조건을 고려한 가혹경시 시험 결과, 상온25℃(상온) ~ 34℃까지는 52주가 지난 기간에서도 시제품의 *B. bassiana* ERL836 spore 수가 일정하게 유지됨을 확인하였으며 이는 일반적인 생물농약의 유통기한인 1년을 넘어선 2년 이상의 유통기한을 확보하였음을 의미한다. 하지만 36℃ 이상의 고온에서는 지속적으로 포자수가 감소하였기 때문에 유통과정 및 제품 보관에 있어서 고온의 조건을 유의해야 할 것이다(그림 6).

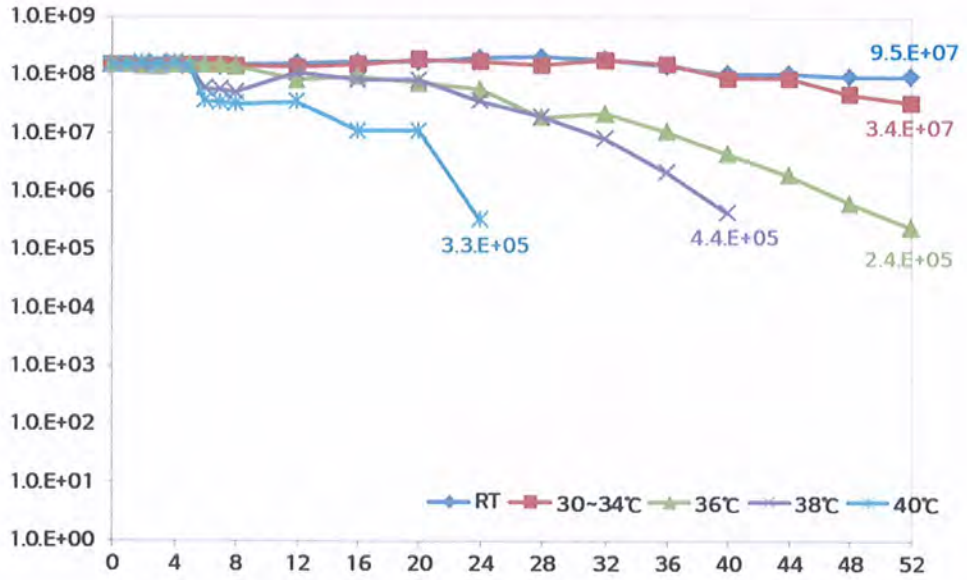


그림 6. *B. bassiana* ERL836 GR의 저장안정성 분석 결과

2장 *B. bassiana* ERL836의 미생물농약(유기농업자재) 등록

총채벌레목(Thysanoptera; thrip)은 원예·화훼·과수 등 다양한 작물에 대한 직접적인 가해뿐만 아니라 여러 식물바이러스를 매개하여 경제적 피해를 야기 시키는 대표적인 미소해충 중 하나이다. 총채벌레 방제연구는 여러 연구자들에 의하여 화학적·생물학적·경종적 분야에서 다방면으로 진행되오고 있으나, 가장 관행적이고 일반적인 방법은 화학농약을 활용한 화학적 방제라 할 수 있다. 하지만, 화학농약의 잦은 노출에 의한 저항성 개체군의 출현으로 고비용·장기간에 걸쳐 개발되었음에도 불구하고 저항성 총채벌레에 의해 무력화되고 있는 실정이다. 총채벌레의 난방제화 가속화는 농산물의 품질 저하 및 수확량 감소로 이어져 지속가능한 농업을 위협하고 있다. 생물농약은 화학농약 저항성 발현 여부와 상관없이 총채벌레 개체군을 제어할 수 있는 대체방제제로 각광받아 왔으나 환경요인에 대한 민감한 감수성, 미생물에 대한 기본지식, 정확한 약효 도출을 위한 복합적인 시험방법이 요구되기 때문에 외부 환경에 노출된 포장시험에서는 시험에 대한 많은 노하우와 전문성이 요구된다. 이와 더불어, 사용자가 목적으로 하는 해충에 대한 효율적이고 안정적인 방제를 위해서는 제품 유효성분에 대한 정확한 작용기작 및 전문기관에 의한 약효약해·독성시험 등이 수행되는 미생물농약(유기농업자재)으로의 등록이 무엇보다도 중요하다. 개발 균주의 상업화를 위한 생물농약 등록 추진 연구는 *B. bassiana* ERL836 의 유기농업자재 공시를 위한 총채벌레 포장 약효시험(2회) 및 안전성(독성)시험을 위주로 수행되었으며 연구방법 및 연구결과는 다음과 같다.

1절. 포장 약효 시험

1. 오이 꽃노랑총채벌레 약제방제 효과 시험

가. 1년차 포장시험

본 시험은 총채벌레 방제용 유기농업자재로의 공시를 추진하기 위한 자료로 활용하기 위하여 충남 논산시 가야곡면 오이농가에서 수행되었으며 시험포장지의 경종적 개요는 표 3과 같다. 시험은 농촌진흥청 고시 "농약의 등록기준 약효 및 약해 시험기준과 방법"에 준하여 계획하였으며 시험에 사용된 작물은 오이(싱싱백다다기), 대상해충은 꽃노랑총채벌레(*Frankliniella occidentalis*)로 선정하였다. 약제처리 방법 및 시험구 배치 정보는 표 4, 5와 같으며 대상해충은 자연발생량이 적어 10월 14일 2x4x3m^3 망사(200mesh) 설치 후 누대사육 중인 꽃노랑총채벌레를 10월 20일 구당 200마리 이상 접종하여 수행하였다(그림 7). 개발된 *B. bassiana* ERL836 GR제품은 총채벌레 번데기를 대상으로하는 입제 제품이나 토양 내 번데기의 확인이 용이치 않아 접종한 총채벌레 1세대가 번데기 과정을 거치는 점을 착안, 이들의 1세대가 번데기를 거치고 나온 성충이 되어 나오는 시기에 맞추어 화방 및 엽을 조사하여 방제가를 산출하였다. 약해시험은 외관상의 약해유무로 판정하였다(표 6).

표 3. 시험포장지 경종적 개요

재배방법	정식	재식거리	멀칭여부	타약제 처리내용
시설 (11월 초순 가온 시작)	9월14일	50cm	비닐멀칭	없음

표 4. 시험약제의 약효약해시험방법

시험약제	주성분 함량(%)	약 효 시 험		약 해 시 험	
		희석배수 및 사용량	처리시기 및 방법	기준량	배량
B. bassiana ERL836	5	3kg/10a	정식 전 토양표면처리 (9/13)	3kg/10a (9/13)	6kg/10a (9/13)
무처리	-	-	-	-	-

표 5. 시험구배치(난괴법) 및 시험면적

구 분	처리수	반복수	총 구수	구당면적	소요면적
약 효	2	3	6	20㎡	120㎡
약 해	3	3	9	5㎡	45㎡

*약제살포 전후 기상상황 : 약제처리 전 후, 약효 약해에 영향을 줄만한 기상변화 없었음

그림 7. 대상해충 접종(좌) 및 시험처리구 망사 설치 전경(우)

표 6. 약효약해시험조사 방법

구 분	조사항목	조사횟수	조사일자	조사방법
약효시험	생충수	2회	11월18일 11월25일	약제처리 후 다발생기 7일 간격 2회, 구당 생충수 조사
약해시험	외관상 약해유무	3회	9월21일 9월28일 10월5일	약제처리 7, 14, 21일 후 신초, 경엽에 대한 외관상 약해유무 달관조사(0-5)

약제처리 시험 결과, *B. bassiana* ERL836 GR 처리구 방제가는 무처리구 대비 66일차 73.5%, 73일차 77.1%의 방제가를 나타내었으며 처리구간 방제가는은 통계적으로 유의한 차이를 보였다(표 7).

표 7. 꽃노랑총채벌레에 대한 약효시험 결과

처리일자	처리구	생충수(마리/구)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)
		Ⅰ반복	Ⅱ반복	Ⅲ반복	평균		
66일차	*B. bassiana* ERL836	22	16	14	17.3	b	73.5
	무처리	61	59	76	65.3	a	-
C.V.(%) ---------- 21.0							

처리일자	처리구	생충수(마리/구)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)
		Ⅰ반복	Ⅱ반복	Ⅲ반복	평균		
73일차	*B. bassiana* ERL836	21	18	12	17.0	b	77.1
	무처리	97	76	50	74.3	a	-
C.V.(%) ---------- 29.4							

가을작기에 재배되는 오이(싱싱백다다기)에 대한 *B. bassiana* ERL836의 기준량 및 배량에 대한 약해 시험 결과, 약제처리 7, 14, 21일이 경과하여도 약해는 관찰되지 않아 유기농업자재로의 공시 조건을 충족하였다(표 8).

표 8. 꽃노랑총채벌레에 대한 약해시험 결과

시험약제	시험작물(품종)	약해정도(0-5)		비고
		기준량	배량	
B. bassiana ERL836	오이(싱싱백다다기)	0	0	약해없음

나. 2년차 포장시험

본 시험은 총채벌레 방제용 유기농업자재로의 공시를 추진하기 위한 자료로 활용하기 위하여 충남 논산시 가야곡면 오이농가에서 수행되었으며 시험포장지의 경종적 개요는 표 9와 같다. 시험은 농촌진흥청 고시 "농약의 등록기준 약효 및 약해 시험기준과 방법"에 준하여 계획하였으며 시험에 사용된 작물은 오이(싱싱백다다기), 대상해충은 꽃노랑총채벌레(*Frankliniella occidentalis*)로 선정하였다. 약제처리 방법 및 시험구 배치 정보는 표 10, 11과 같으며 대상해충은 자연발생량이 적어 2x4x3m^3 망사(200mesh) 설치 후 누대사육 중인 꽃노랑총채벌레를 구당 200마리 이상 접종하여 수행하였다. 개발된 *B. bassiana* ERL836 GR제품은 총채벌레 번데기를 대상으로하는 입제 제품이나 토양 내 번데기의 확인이 용이치 않아 접종한 총채벌레 1세대가 번데기 과정을 거치는 점을 착안, 이들의 1세대가 번데기를 거치고 나온 성충이 되어 나오는 시기에 맞추어 화방 및 엽을 조사하여 방제가를 산출하였다. 약해시험은 외관상의 약해유무로 판정하였다(표 12).

표 9. 시험포장지 경종적 개요

재배방법	정식	재식거리	멀칭여부	타약제 처리내용
시설	4월11일	50cm	비닐멀칭	없음

표 10. 시험약제의 약효약해시험방법

시험약제	주성분 함량(%)	약 효 시 험		약 해 시 험	
		희석배수 및 사용량	처리시기 및 방법	기준량	배량
B. bassiana ERL836	5	3kg/10a	정식 전 토양표면처리 (4/11)	3kg/10a (4/11)	6kg/10a (4/11)
무처리	-	-	-	-	-

표 11. 시험구배치(난괴법) 및 시험면적

구 분	처리수	반복수	총 구수	구당면적	소요면적
약 효	2	3	6	20㎡	120㎡
약 해	3	3	9	5㎡	45㎡

*약제살포 전후 기상상황 : 약제처리 전 후, 약효 약해에 영향을 줄만한 기상변화 없었음

그림 8. 시험처리구 망사 설치 전경(좌), 망사 내부(중), 토양표면 내 처리된 *B. bassiana* ERL836(우)

표 12. 약효약해시험조사 방법

구 분	조사항목	조사횟수	조사일자	조사방법
약효시험	생충수	2회	6월 3일 6월10일	약제처리 후 다발생기 7일간격2회, 구당 20꽃에 대한 생충수 조사
약해시험	외관상 약해유무	3회	4월18일 4월25일 5월 2일	약제처리 7, 14, 21일 후 신초, 경엽에 대한 외관상 약해유무 달관조사(0-5)

약제처리 시험 결과, *B. bassiana* ERL836 GR 처리구 방제가는 무처리구 대비 53일차 79.3%, 73일차 78.5%의 방제가를 나타내었으며 처리구간 방제가는 통계적으로 유의한 차이를 보였다(표 13). 이는 유기농업자재 공시시 요구되는 충해관리용자재 조건인 방제가 60%를 상회하는 수준으로 유기농업자재 공시를 위한 조건을 충족하였다.

표 13. 꽃노랑총채벌레에 대한 약효시험 결과

처리일자	처리구	생충수(마리/구)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)
		Ⅰ반복	Ⅱ반복	Ⅲ반복	평균		
53일차	*B. bassiana* ERL836	18	27	39	28.0	b	79.3
	무처리	137	112	157	135.3	a	-
C.V.(%) ---------- 16.8							

처리일자	처리구	생충수(마리/구)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)
		Ⅰ반복	Ⅱ반복	Ⅲ반복	평균		
60일차	*B. bassiana* ERL836	29	34	55	39.3	b	78.5
	무처리	180	152	217	183.0	a	-
C.V.(%) ---------- 12.7							

봄작기에 재배되는 오이(싱싱백다다기)에 대한 *B. bassiana* ERL836의 기준량 및 배량에 대한 약해시험 결과, 약제처리 7, 14, 21일이 경과하여도 약해는 관찰되지 않아 유기농업자재로의 공시 조건을 충족하였다(표 14).

표 14. 꽃노랑총채벌레에 대한 약해시험 결과

시험약제	시험작물(품종)	약해정도(0-5)		비고
		기준량	배량	
B. bassiana ERL836	오이(싱싱백다다기)	0	0	약해없음

2절. 안전성(독성) 시험

토양 내 총채벌레 번데기를 방제하기 위한 *B. bassiana* ERL836 GR(제품명: 총채싹)의 유기농업자재 충해관리용자재 공시를 위해 요구되는 독성시험 항목은 1) 꿀벌 독성시험, 2) 담수어류 독성시험, 3) 랫드 급성경피 독성시험, 4) 토끼 피부자극성시험, 5) 토끼 안점막자극성시험으로써 각 독성시험 항목은 농촌진흥청 인증 농약시험연구기관인 ㈜한국생물안전성연구소에서 수행되었다. 각 독성시험별 시험·조사방법 및 평가결과는 다음과 같다.

1. *B. bassiana* ERL836 GR(제품명: 총채싹)의 꿀벌 독성시험

가. 시험 장소: 충북 음성군, ㈜한국생물안전성연구소

나. 시험 제품: *B. bassiana* ERL836 GR(제품명: 총채싹)

다. 대상 생물: 꿀벌(*Apis mellifera*)

라. 시험 방법

1차 시험은 *B. bassiana* ERL836 GR(제품명: 총채싹) 기준량 대비 10, 50, 100배 높은 농도에서 꿀벌에 spray처리, 2차 시험은 *B. bassiana* ERL836 GR(제품명: 총채싹) 기준량의 5배 높은 농도 희석액을 꿀벌에 spray처리

마. 조사 방법: 처리 후 12일(1차), 10일(2차)째 누적 치사 수 조사

바. 평가 결과

① 1차 시험 결과 무처리의 누적치사율은 20.0%, *B. bassiana* ERL836 GR(제품명: 총채싹) 기준량 보다 10, 50, 100배 높은 농도의 누적치사율은 각각 53.3%, 76.0%, 96.0%임.

② 2차 시험 결과, 무처리 누적치사율은 21.3%, *B. bassiana* ERL836 GR(제품명: 총채싹) 기준량 보다 5배 높은 농도의 누적 치사율은 17.3%로 관찰됨.

③ 시험 결과, *B. bassiana* ERL836 GR(제품명: 총채싹) 기준량 보다 5배 높은 농도에서 유의적 차이가 없어 꿀벌에 대한 영향이 없음으로 평가함.

2. *B. bassiana* ERL836 GR(제품명: 총채싹)의 담수어류(잉어) 독성시험

가. 시험 장소: 충북 음성군, ㈜한국생물안전성연구소

나. 시험 제품: *B. bassiana* ERL836 GR(제품명: 총채싹)

다. 대상 생물: 잉어(*Cyprinus carpio*)

라. 시험 방법

수조 내 물 10L에 *B. bassiana* ERL836 GR(제품명: 총채싹)의 기준량(1000배) 농도로 희석한 후, 수조에 잉어 살포하여 독성을 관찰하였으며 시험용액은 7일 간격으로 교체

마. 조사 방법: 잉어 살포 후 24시간 간격 총 30일간 일반중독증상 및 누적 치사 수 조사

바. 평가 결과

① *B. bassiana* ERL836 GR(제품명: 총채싹) 1000배에서의 30일간 잉어에 대한 담수 어류영향시험 결과, 시험 종료시까지 치사 개체는 관찰되지 않았으며 어떠한 중독증상도 관찰되지 않았음.

② 시험 종료 후, 육안으로 미생물 감염여부 실시한 결과 아가미, 장기 및 근육에 대해 무처리와 비교하였을 때 육안 상 차이가 없어 담수어류에 대한 독성이 없음으로 평가함..

3. *B. bassiana* ERL836 GR(제품명: 총채싹)의 랫드에 대한 급성경구 독성시험

가. 시험 장소: 충북 음성군, ㈜한국생물안전성연구소

나. 시험 제품: *B. bassiana* ERL836 GR(제품명: 총채싹)

다. 대상 생물: 랫드(*Rattus norvegicusalbinus*)

라. 시험 방법

B. bassiana ERL836 GR(9.53×10^6 CFU/ml)을 경구투여용 존데(Sonde)를 이용하여

랫드에 2ml를 위내에 1회 강제 투여

마. 조사 방법

① 투여 후 24시간 간격 총 21일간 일반중독증상 및 누적 치사 수 조사

② 미생물 체외 배출 상황 조사 미생물 체내 잔존상황 조사

바. 평가 결과

① *B. bassiana* ERL836 GR(제품명: 총채싹) 2ml 희석액을 랫드에 경구투여한 결과, 일반중독증상 및 치사개체 발생은 없었음.

② 투여 후 1, 3, 7일 및 14일째 대변을 채취하여 체외 배출 균수를 측정한 결과, *B. bassiana* ERL836 GR(제품명: 총채싹)은 랫드에 단회 경구 투여 시 급성독성으로 인한 영향은 없었음.

③ 투여 후 3, 7, 14, 21일째에 부검하여 신장, 뇌, 간장, 폐, 비장, 위, 혈액, 임파절에서의 균수를 측정한 이상의 시험결과, *B. bassiana* ERL836 GR(제품명: 총채싹)은 랫드에 단회 경구 투여 시 급성독성으로 인한 영향이 없음으로 평가함.

4. *B. bassiana* ERL836 GR(제품명: 총채싹)의 랫드에 대한 급성경피 독성 시험

가. 시험 장소: 충북 음성군, ㈜한국생물안전성연구소

나. 시험 제품: *B. bassiana* ERL836 GR(제품명: 총채싹)

다. 대상 생물: 랫드(*Rattus norvegicusalbinus*)

라. 시험 방법:

① 처리 하루 전 랫드 등부위에 5x6 cm 제모 실시, 4x5cm 면적의 거즈에 *B. bassiana* ERL836 GR($9.53x10^6$ CFU/ml) 희석액을 2ml을 묻힘.

② 제모 부위를 Conban(self-adferentwrap) 으로 고정시킨 후, 시험제품을 경피처리함

마. 조사 방법: 처리 후 24시간 간격 총 14일간 일반중독증상 및 누적 치사 수 조사

바. 평가 결과

① *B. bassiana* ERL836 GR($9.53x10^6$ CFU/ml) 희석액 2ml를 랫드에 경피 노출한 결과, 모든 개체에서 특이한 일반중독증상 및 치사동물은 없었음.

② 랫드에 대한 *B. bassiana* ERL836 GR(제품명: 총채싹)의 LD_{50} 값은 $9.53x10^6$ CFU/ml 이상으로 모든 개체가 살아 있어 통계처리가 불가능하였으며 최종적으로 *B. bassiana* ERL836 GR(제품명: 총채싹)은 랫드의 경피에 대한 독성이 없음으로 평가함.

5. *B. bassiana* ERL836 GR(제품명: 총채싹)의 토끼에 대한 피부자극성 시험

가. 시험 장소: 충북 음성군, ㈜한국생물안전성연구소

나. 시험 제품: *B. bassiana* ERL836 GR(제품명: 총채싹)

다. 대상 생물: New Zealand White 계 토끼(*Lepus coreanus*)

라. 시험 방법

① 처리 하루 전, 토끼 등부위에 15x15 cm 제모 실시하고 2x3cm 면적의 거즈에 *B. bassiana* ERL836($9.53x10^6$ CFU/ml)을 0.5g 묻힘.

② 제모 부위에 도포한 후 소정의 증류수를 이용하여 직접 처리, 4시간 후 거즈를 제거한 후, 피부에 잔여물이 남지 않도록 증류수로 세척함.

마. 조사 방법: 처리 후 24시간 간격 총 3일간 일반중독증상 및 누적 치사 수 조사

바. 평가 결과

① 토끼 피부자극성시험 결과, 모든 개체에서 특이한 일반중독증상 및 치사동물은 없었음.

② 처리 후 1, 24, 48, 72시간 경과 피부반응 조사 결과, 어떠한 피부반응도 관찰되지 않아 *B. bassiana* ERL836 GR은 토끼 피부에 대한 자극성이 없음으로 평가함.

6. *B. bassiana* ERL836 GR(제품명: 총채싹)의 토끼에 대한 안점막자극성 시험

가. 시험 장소: 충북 음성군, ㈜한국생물안전성연구소

나. 시험 제품: *B. bassiana* ERL836 GR(제품명: 총채싹)

다. 대상 생물: New Zealand White 계 토끼(*Lepus coreanus*)

라. 시험 방법

① *B. bassiana* ERL836($9.53x10^6$ CFU/ml)을 시험 개시 전 막자사발로 분쇄 후, 좌안에 시험물질 0.1 g을 1초간 처리함

마. 조사 방법: 처리 후 24시간 간격 총 7일간 일반중독증상 및 누적 치사 수 조사

바. 평가 결과

① *B. bassiana* ERL836($9.53x10^6$ CFU/ml) 5 g을 토끼에 대한 안점막자극성시험 결과, 모든 개체에서 특이한 일반중독증상 치사는 없었음.

② 처리 후 1, 24, 48시간에 안점막반응 조사 결과, 어떠한 반응도 관찰되지 않아 *B. bassiana* ERL836 GR은 토끼에 대한 안점막자극성이 없음으로 평가함.

3절. 유기농업자재 공시

B. bassiana ERL836 GR의 산업화는 가장 빠르게 시장 내 진입이 가능한 농촌진흥청 유기농업자재로의 공시를 추진하였다. 공시를 위한 공인서류(약효약해시험 및 독성시험 등)는 농촌진흥청의 심의를 거쳐 2017년 총채벌레 방제용 유기농업자재 충해관리용자재(제품명: 총채싹(5% GR), 공시번호: 2-5-149)로 공시되었다(그림 9). 공시현황은 그림 10과 같이 국립농산물품질관리원 유기농업자재정보시스템 공시현황표(http://tims.rda.go.kr)에서 확인할 수 있으며 기존 유기농업자재와는 다른 새로운 제형(입제), 방제 컨셉(총채벌레 번데기 시기), 저장안정성(2년 확보)으로 총채벌레 방제 시장에서 좋은 효과를 거두고 있다. 총채싹의 제조·판매기업인 팜한농과 공동개발기관인 전북대학교의 연구성과로 개발된 총채싹 제품은 제품출시 년도인 2017년 현재 판매계획 대비 300%를 초과달성하였으며 추후 개발 제품의 수요는 증가할 것으로 기대된다.

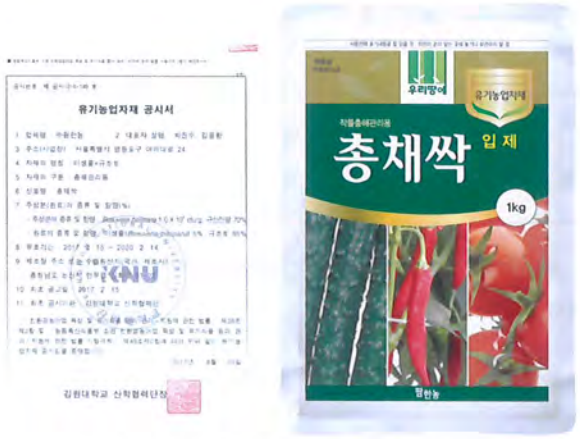


그림 9. 총채싹 공시증 및 제품

그림 10. 국립농산물품질관리원 유기농업자재정보시스템 공시현황표(출처 : http://tims.rda.go.kr)

3장 *B. bassiana* ERL836의 현장적용 기술개발

미생물농약의 현장적용 기술개발은 현장에서의 방제효과 극대화 및 제품의 적용확대 측면에서 반드시 필요한 과정 중 하나로서 과학적이고 정밀한 시험을 통하여 얻어진 결과를 필수적으로 요구하게 된다. 또한, 농업 현장 내의 성공적인 기술 적용은 제품 사용자의 신뢰성 확보 및 제품의 장기적인 사업화에도 영향을 미치기 때문에 보다 다양한 변수에서의 다각화된 시험이 필요하다. 본 연구에서는 시설 내에서 연중 발생하여 다양한 발육단계가 혼재되어 있는 총채벌레류의 생태적인 특성을 고려한 발육단계 별 약효 평가, 약제저항성 개체군의 효율적 관리를 위한 저항성 총채벌레 개체군 대상의 생물검정시험, 처리된 제품의 약효지속기간 확보를 위한 기초시험 등을 수행함으로써 상업화제품으로 개발된 '총채싹'(유효균주: *B. bassiana* ERL836 GR)의 현장적용 기술 적용에 활용하고자 하였다.

1장. 총채벌레류 발육단계별 총채싹의 약효 평가

1. 재료 및 방법

가. 시험충 채집

시험에 사용된 대만총채벌레(*Frankliniella intonsa*)와 꽃노랑총채벌레(*Frankliniella occidentalis*)는 표 15에 표기된 지역 및 작물에서 2017년 5월~12월에 채집하였으며 일부 감수성 계통은 국립농업과학원 계통을 분양받아 시험에 사용하였다.

표 15. 채집 계통명과 채집 장소

종명	계통명	채집 및 분양 일자	채집장소	기주	비고
꽃노랑총채벌레	FO_FH	2017.05.22	팜한농시험포장	멜론	야외 계통
꽃노랑총채벌레	FO_RDA_N	2017.08.09	국립농업과학원 분양	강낭콩	실험실보유계통
꽃노랑총채벌레	FO_RDAHC_R1	2017.08.09	국립원예특작과학원	장미	야외 계통
꽃노랑총채벌레	FO_GG_C1	2017.08.09	경기농업기술원	국화	야외 계통
꽃노랑총채벌레	FO_RDAHC_Lab1	2014.07.29	국립원예특작과학원	장미	실험실보유계통
꽃노랑총채벌레	FO_GG_C2	2017.08.24	경기농업기술원	국화	야외 계통
꽃노랑총채벌레	FO_RDAHC_R2	2017.08.24	국립원예특작과학원	장미	야외 계통
대만총채벌레	FI_FH	2017.05.22	팜한농시험포장	멜론	야외 계통

나. 시험충 사육

본 시험에 사용된 총채벌레류인 대만총채벌레와 꽃노랑총채벌레는 식물바이러스의 매개 및 작물체에 직접적인 피해를 야기하는 대표적인 농업해충으로 야외 계통을 채집하여 실내에

서 사육하여 시험에 사용하였다. 야외채집 개체군의 사육은 곤충사육디쉬(지름 91.4 × 40mm, SPL Life Sciences)에 탈지면을 깔고 증류수 4ml을 분주하여 수분을 유지하였으며 그 상단부에 필터페이퍼를 깔아 젖은 탈지면에 의한 익사충을 방지하였다. 총채벌레의 먹이원으로는 발아된 강낭콩 떡잎을 약 10-20개를 넣어 공급하였으며 100~200마리의 성충을 접종하여 산란을 유도하였다. 먹이는 3-4일 간격으로 교체해 주었으며 곰팡이가 발생하면 새로운 사육통과 먹이로 교체해 주었다.

다. 시험방법

본 시험은 총채싹 원제를 대상으로 수행되었으며 시험에 사용된 원제의 유효균수는 약 5.0×10^9 로 조사되었다. 시험에 사용된 희석수는 Triton-X가 0.005% 포함된 3차 증류수 용액을 사용하였으며 120×(유효균수: $4.5\times10^6/cm^2$), 480×(유효균수: $1.1\times10^6/cm^2$), 1920×(유효균수: $2.8\times10^5/cm^2$), 7680×(유효균수: $7.0\times10^4/cm^2$), 30720×(유효균수: $1.7x10^4/cm^2$)로 연속 희석하여 각기 다른 농도의 처리구를 제조하여 준비하였다. 희석한 약제 처리는 젖은 탈지면과 필터페이퍼가 깔린 지름 50mm 페트리디쉬(Cat#310050, SPL Life Sciences)에 해당하는 총채벌레 종의 성충, 번데기, 약충을 각각 10~15마리 접종한 후 희석된 농도별 용액 2ml를 충체에 접촉처리 하였다. 처리 후, 강낭콩 떡잎을 먹이원으로 제공하였으며 뚜껑을 덮고 파라필름으로 감아 시험충의 이탈을 방지하였다. 각 농도 별 처리는 3반복으로 수행하였으며 사충율을 1일 간격으로 5일 동안 현미경 하에서 관찰하였다. 대조구로는 Triton-X가 0.005% 포함된 3차 증류수 용액을 이용하였다. 본시험에 앞서 생물검정법의 적합성을 알아보고자 각 총채벌레류의 발육태별 대조구(Triton-X가 0.005% 포함된 3차 증류수)사충율을 5일간 일일조사하여 사충율의 변화를 조사하였다.

라. 감수성 수준 산출

감수성 지표는 Abott의 공식을 따라 보정사충율을 산출한 후, SPSS를 이용하여 probit 분석을 통해 도출하였다. 발육단계별 비교는 반수치사균수(LF_{50} : Median of lethal fungi)를 기준으로 하였다.

2. 시험결과

가. 대조구 사충율

대만총채벌레와 꽃노랑총채벌레의 발육단계별 대조구의 일일 사충율을 5일 간 조사한 결과, 두 종의 평균 사충율은 성충은 2.7~12.4%, 번데기는 2.2~5.6%, 그리고 약충은 2.4~6.6%로 나타나 꽃노랑총채벌레 성충 5일차를 제외하고는 모두 10% 미만의 사충율을 나타내었다(그림 11). 이러한 결과는 실험 기법이 생물활성을 평가하기에 적합함을 의미한다 볼 수 있다.

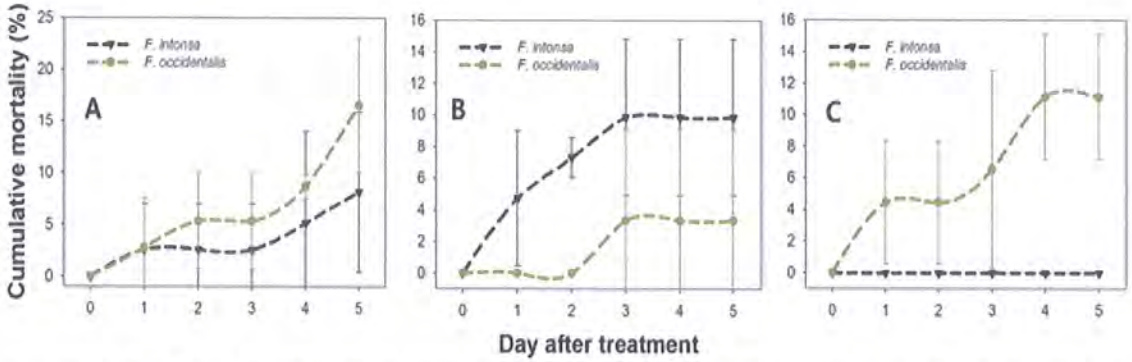


그림 11. 대만총채벌레와 꽃노랑총채벌레의 성충(A), 번데기(B), 약충(C)에 대한 대조구의 5일 동안 누적사충율(%)

나. 총채벌레류의 발육단계별 총채싹 감수성 평가

대만총채벌레와 꽃노랑총채벌레의 성충, 번데기, 약충 별 총채싹 원제의 감수성을 5일 동안 조사한 결과, 전반적으로 번데기와 약충은 처리 3일차부터 방제효과가 나타났으며 성충은 4일차부터 사충이 발생하기 시작하였다(그림 12).

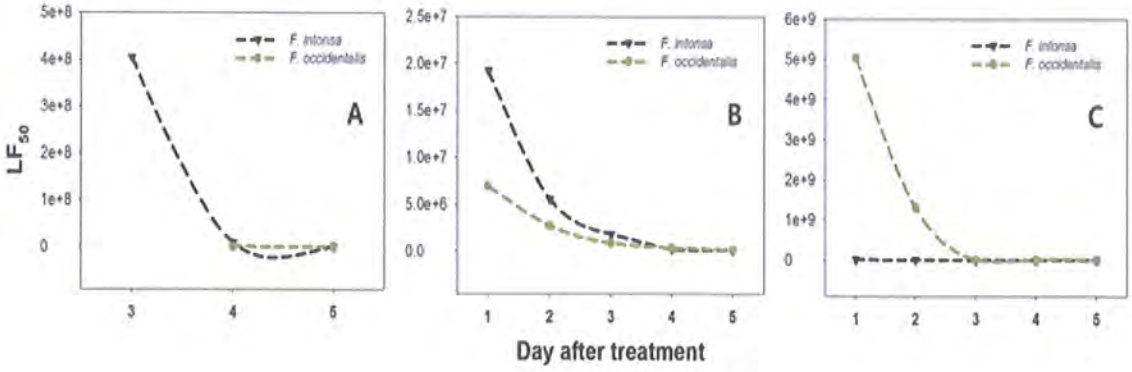


그림 12. 대만총채벌레와 꽃노랑총채벌레의 성충(A), 번데기(B), 약충(C)에 대한 5일동안 LF_{50}의 변동

다. 발육단계별 5일차 총채싹 감수성 비교

발육 단계별 대만총채벌레와 꽃노랑총채벌레의 감수성 수준 비교 결과, 두 계통 모두 유사한 수준의 감수성을 보였다. 또한 총채싹은 번데기에 대한 약효가 가장 높았고, 그 다음 성충과 약충 순서로 효과를 보였다(그림 13). 이러한 결과는 번데기를 포함하여 성충과 약충에도 효과가 있음을 의미한다.

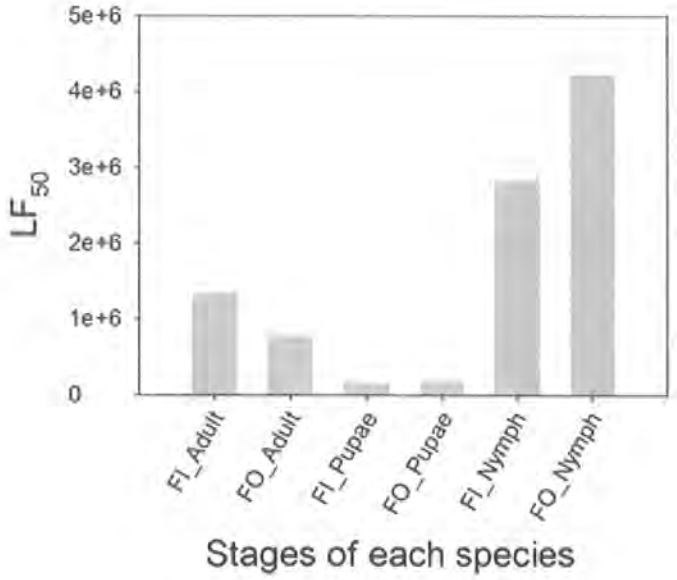


그림 13. 대만총채벌레와 꽃노랑총채벌레의 성충, 번데기, 약충의 5일차 LF_{50}

2절. 저항성 총채벌레 개체군의 선발

1. 재료 및 방법

저항성 총채벌레 개체군 시험은 이미 저항성 개체군이 보고된 꽃노랑총채벌레를 대상으로 진행되었으며 권 등(2015)이 보고한 꽃노랑총채벌레 저항성 진단용 키트를 활용하여 4개의 살충제(Acrinathrin, Chlorfenapyr, Spinosad, Thiamethoxam)에 대한 저항성 여부를 확인하였다. 저항성 진단용 키트는 각 살충제의 진단농도가 처리된 바이엘병으로 구성되어 있으며 꽃노랑총채벌레의 각 지역 계통의 성충을 접종하여 8시간 내 사충율을 조사하는 방법으로 수행되었다.

나. 시험결과

Acrinathrin, Chlorfenapyr, Spinosad, Thiamethoxam 4개 약제를 대상으로 실험실 보유 및 지역 계통의 저항성 존재 여부를 진단한 결과, 지역 계통은 진단 농도에서 매우 낮은 사충율을 보였다(그림 14). 특히, FO_GG_C2와 FO_RDAHC_R2의 계통은 시험에 사용된 모든 살충제에 대해서 모두 30% 미만의 사충율을 보이는 복합저항성 계통을 나타내었으며 저항성 총채벌레 개체군으로 선발하였다. 또한, 모든 살충제에서 상대적으로 높은 감수성을 나타내었던 FO_RDA_N 계통을 상대적인 감수성 계통으로 선정하였다.

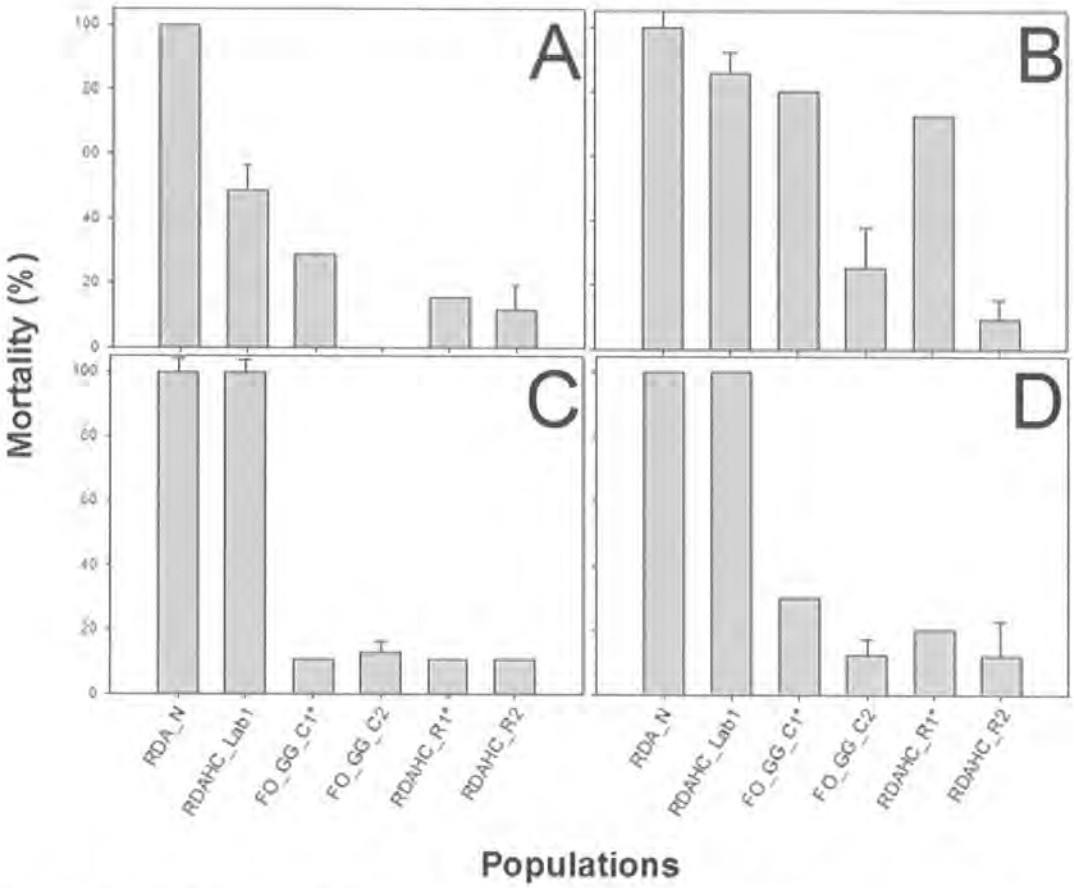


그림 14. 잔류접촉법을 이용한 6개 계통의 Acarinathrin(A), Chlorfenapyr(B), Spinosad(C), Thiamethoxam(D)에 감수성 평가 결과 (*표시는 1반복 수행된 집단임)

3절. 저항성 총채벌레 개체군에 대한 총채싹 약효 평가

1. 재료 및 방법

본 시험은 총채싹 원제를 대상으로 수행하였으며 희석수는 Triton-X가 0.005% 포함된 3차 증류수 용액을 사용하였다. 시험방법은 발육단계별 개발 제품의 약효 평가와 동일한 방법으로 수행하였으며 시험결과는 Abott의 공식을 따라 보정사충율을 산출한 후, SPSS를 이용하여 probit 분석을 통해 도출하였다. 저항성 개체군 반수치사균수(LF_{50} : Median of lethal fungi)를 기준으로 하였다.

2. 시험결과

복합저항성을 보이는 FO_GG_C2와 RDAHC_R2계통을 대상으로 총채싹 원제를 처리한 후, 감수성 계통인 RDA_N와 LF_{50} 값을 비교한 결과(그림 15), 저항성 계통의 LT_{50} 수준은 6.3×10^5 ~ 3.6×10^6 로 감수성 꽃노랑총채벌레 개체군의 LT_{50}과 유사하거나 낮은 값을 나타내었다. 이는 방제를 하고자 하는 총채벌레류의 저항성 여부와 상관없이 포장 내에서 안정적인 방제효과를

나타낼 수 있는 점을 시사하며 심각한 복합저항성 문제로 총채벌레 방제에 손을 대지 못하는 환경에서 이들 개체군을 효율적으로 관리할 수 있는 새로운 방제전략 솔루션을 제시한다 할 수 있을 것이다.

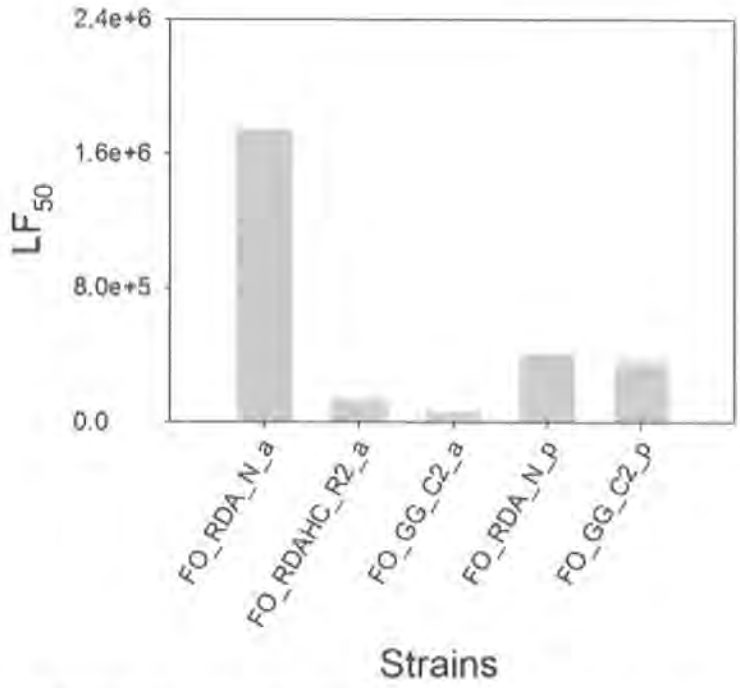


그림 15. 복합저항성 2개 계통의 *B. bassiana* ERL836에 대한 4일차 LF_{50}
(_a, 성충; _p, 번데기)

4절. 총채벌레 발육단계별 총채싹 잔효성 평가

1. 재료 및 방법

본 시험은 상대적으로 대량증식이 용이한 대만총채벌레를 대상으로 수행되었으며 총채싹 원제의 120×, 1920× 희석액을 준비한 후 앞서 언급한 젖은 탈지면과 필터페이퍼가 깔린 페트리디쉬에 각 농도별 희석 용액을 처리하여 약액이 도포될 수 있도록 처리하였다. 약액 처리 후 3일과 7일이 지나고 각각 대상 해충을 10~15마리씩 접종하였으며 접종 1일이 지난 후 떡잎이 발아된 강낭콩을 먹이원으로 제공하였다. 사충율은 약액 처리구에 접종 후, 5일 동안 일일 사충수를 조사하였으며 약액 처리 7일 시험구에서는 3일 동안 사충율을 조사하였다.

2. 시험 결과

가. 대만총채벌레 성충에 대한 총채싹 잔효성 평가

3일차와 7일차 시험구에 처리된 총채싹에 대한 사충율 결과는 그림 16과 같다. 약액 3일차 접종 처리구에서는 시험충 접종 4일차부터 약효가 나타나 최소 약액 3일까지는 총채싹이 잔효

됨을 알 수 있었으나, 7일차 시험구에서는 저습으로 인한 높은 무처리구 사충율로 인하여 평가하는데 한계가 있었다

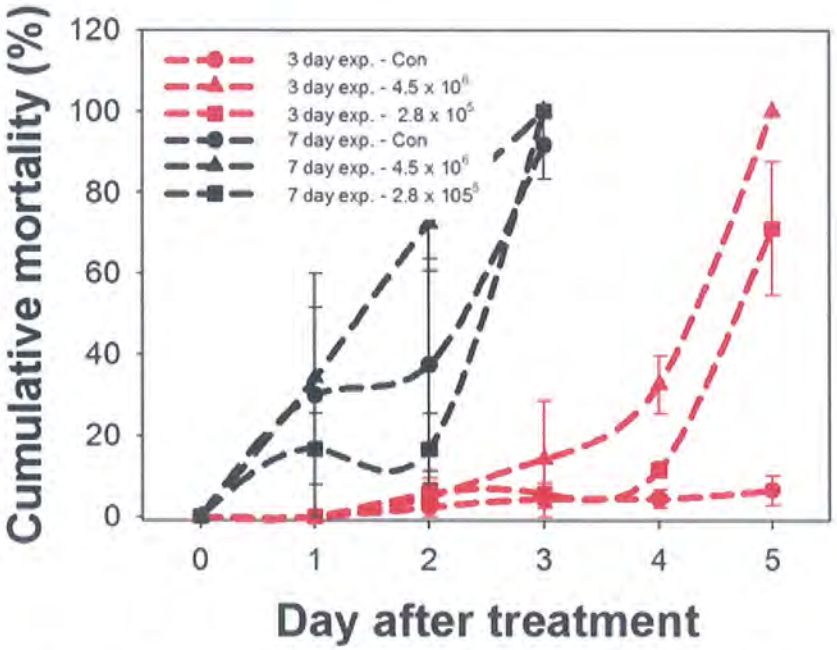


그림 16. 총채싹의 대만총채벌레 성충에 대한 잔효성 평가

나. 대만총채벌레 번데기에 대한 총채싹 잔효성 평가

3일차와 7일차 시험구에서 대조구 대비 처리 약량과 비례하여 잔효성을 확인할 수 있었으나(그림 17) 그 사충율은 전반적으로 낮았다. 이러한 이유는 번데기의 이동성이 성충에 비해서 낮아서 기인하는 것으로 사료된다.

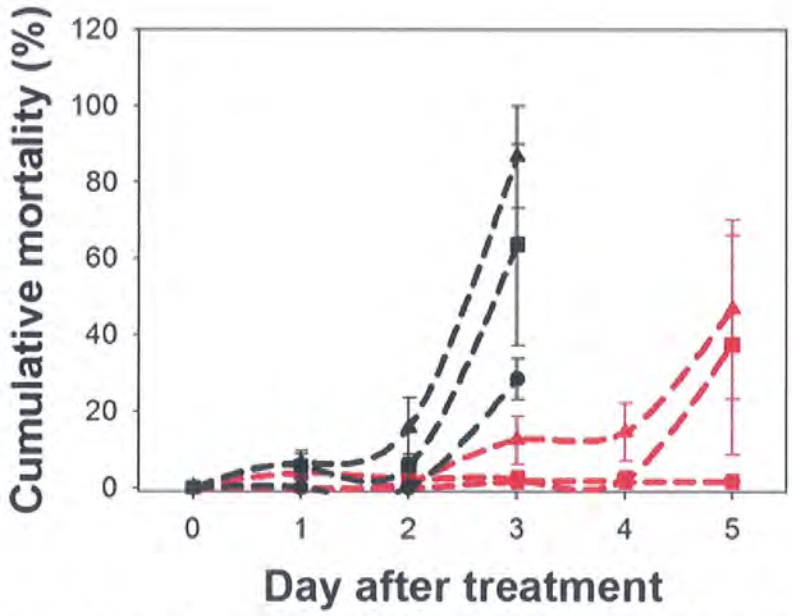


그림 17. 총채싹의 대만총채벌레 번데기에 대한 잔효성 평가

다. 대만총채벌레 약충에 대한 총채싹 잔효성 평가

총채싹의 잔효성은 약충에서 성충과 번데기보다 더 분명하게 나타났다(그림 18). 3일차 시험구에서 농도와 유관한 사충율이 확인된 반면, 7일차 처리구에서는 농도와 유관하지는 않지만 대조구 대비 높은 사충율을 나타내어 약충에 대해서도 잔효성이 있는 것으로 판단된다.

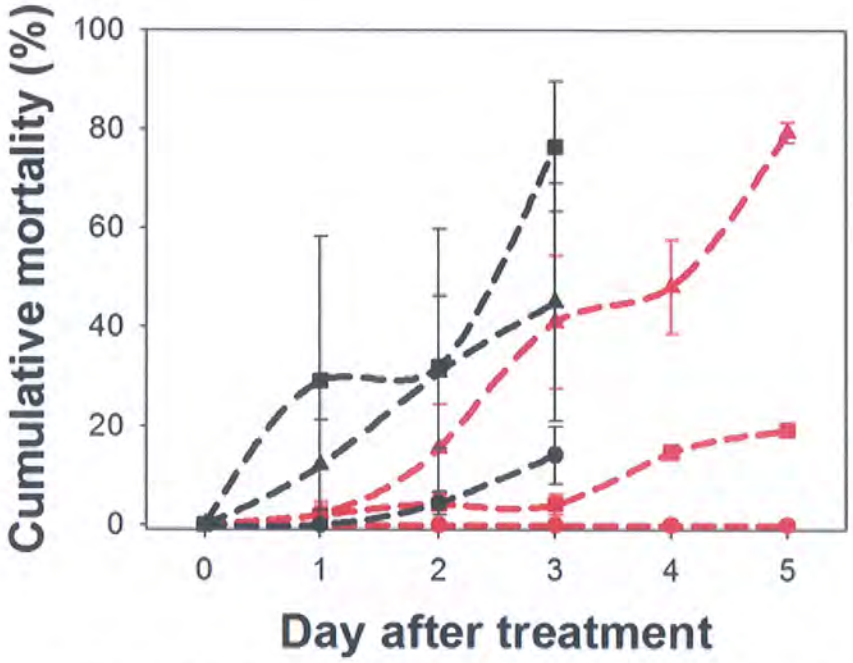


그림 18. 총채싹의 대만총채벌레 약충에 대한 잔효성 평가

4장 총채벌레 살충성 진균 *B. bassiana* 균주의 유전체 분석 연구

곤충병원성 진균 라이브러리를 이용한 총채벌레 방제 활성평가 및 총채벌레에 병원성이 있는 균주의 Whole genome sequencing 및 염기서열 분석을 진행하고자 하였다.

1절. 선정 균주의 유전체 서열 해독 및 정보 분석

1. 곤충병원성 미생물 라이브러리를 활용한 총채벌레 방제활성 평가

가. 총채벌레 사육 및 유지관리시스템 확보

꽃노랑총채벌레(*Frankliniella occidentalis*)는 국립농업과학원으로부터 분양받아 사육되었다. 꽃노랑총채벌레의 사육은 플라스틱 사육용기(20×20×30cm^3), 사육실 온도 25±2℃, 상대습도 40±10%, 광조건 16L:8D 조건에서 진행되었으며 먹이공급은 빨간강낭콩(성우종묘)의 떡잎을 공급하였다. 떡잎의 건조를 예방하기 위해 사육케이지의 바닥면에 물에 적신 면솜을 깔고, parafilm로 위를 덮어 습도를 조절하였다. 떡잎은 2일 간격으로 교체하여 꽃노랑총채벌레의 높은 산란율을 유지하였다. 그림 19와 같이 꽃노랑총채벌레 사육조건 및 유지 관리시스템을 구축하였음.

그림 19. 꽃노랑총채벌레 사육방법 확립.(a), 파종 10 일 후 강낭콩; (b), 총채벌레 사육케이지; (C), 총채벌레 암·수 사진.

나. 곤충병원성 미생물 증식 및 감염체(conidia) 확보, egfp 발현 mutant 제작

(1) 곤충병원성 미생물 동정

꽃노랑총채벌레에 병원성을 갖는 곤충병원성곰팡이 *B. bassiana* ERL836과 ERL1578은 University of Vermont(USA)에서 분양받아 ¼ Sabrouraud Dextrose Agar(¼SDA) 배지, 25±1℃, 암조건에서 계대 배양 후 실험에 사용되었다. ERL836(KU886562) 균주와 ERL1578(KU886563) 균주의 ITS sequence는 Genbank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)에 등록되었다. ERL836 (KCCM11506P)의 ITS seqeunce는 또한 korean federation of culture collection(KFCC)에 다음과 같은 과정을 통해 *B. bassiana*로 동정 후 등록되었다(그림 20, 21).

① gDNA extraction

5일간 25℃ 암조건에서 배양된 ERL836에서 균사가 많은 부분을 1x1 cm 로 긁어내 1.5 ml tube에 extraction buffer(1 M KCl, 100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA) 400 ul와 함께 넣고 30 초씩 3회 반복하여 마쇄한다. 마쇄액은 4℃에서 10,000 rpm으로 6 분간 원심분리 후, 상층액 350 ul와 Isopropanol 300 ul를 혼합한 다음, 다시 4℃에서 13,000 rpm으로 10분간 원심분리하여, DNA를 침전시켰다. 침전물을 70% 에탄올로 세척하고 건조한 후 EB buffer에 용해하였다.

② PCR 검정

PCR기기를 사용하여 다음과 같은 조건에서 증폭하였다. 처음에 94℃에서 5분, 94℃ 60초, 62℃ 30초, 72℃ 30초를 30회 실시하였고, 최종적으로 72℃에서 3분간 post maturation 시켰다. Forward primer인 ITS 1의 염기서열은 5' -TCC GTA GGT GAA CCT GCG G- 3'이고, reverse primer인 ITS 4의 염기서열은 5`-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3`이며, PCR산물의 전기영동은 0.8% agarose gel + EtBr을 사용하여 140 V로 25분 실시한 후 사진촬영을 하였다.

③ Purification

PB와 PRC 산물을 5:1 volume으로 혼합한 후, Qiaquick spin column 에 옮겨, 13,000 rpm으로 1분간 원심분리한 후 상층액을 제거하였다. 그 후 700 ㎕ PE buffer 넣고 5분 기다린 후 13,000 rpm으로 1분간 원심분리를 2회 반복하였다. Spin column 에 남아있는 용액을 1.5 ㎖ E-tube로 옮긴 후 50 ㎕ EB를 넣고 5분 기다린 후 또 다시 13,000 rpm으로 1분간 원심분리를 2회 반복하였다. 최종적으로 얻어진 산물은 4 ℃에 보관하였다. 최종적으로 얻어진 산물을 마크로젠(http://dna.macrogen.com/kor/)에 보내 시퀀싱 의뢰를 진행하였다.

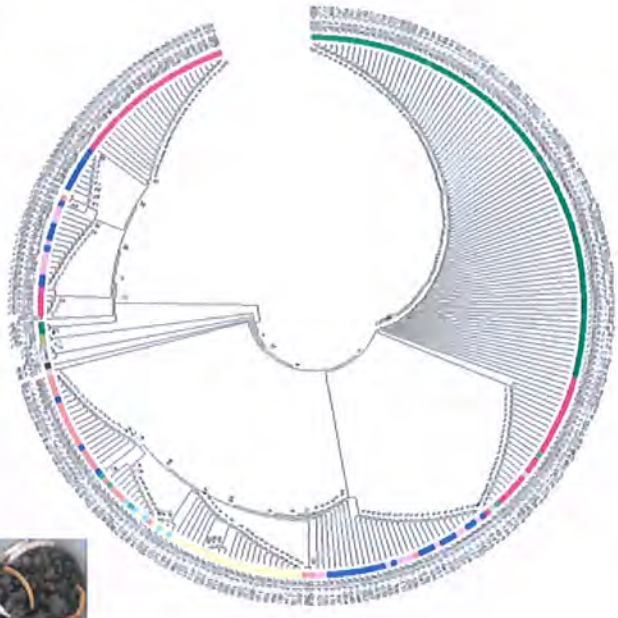


그림 20. 곤충병원성진균 라이브러리

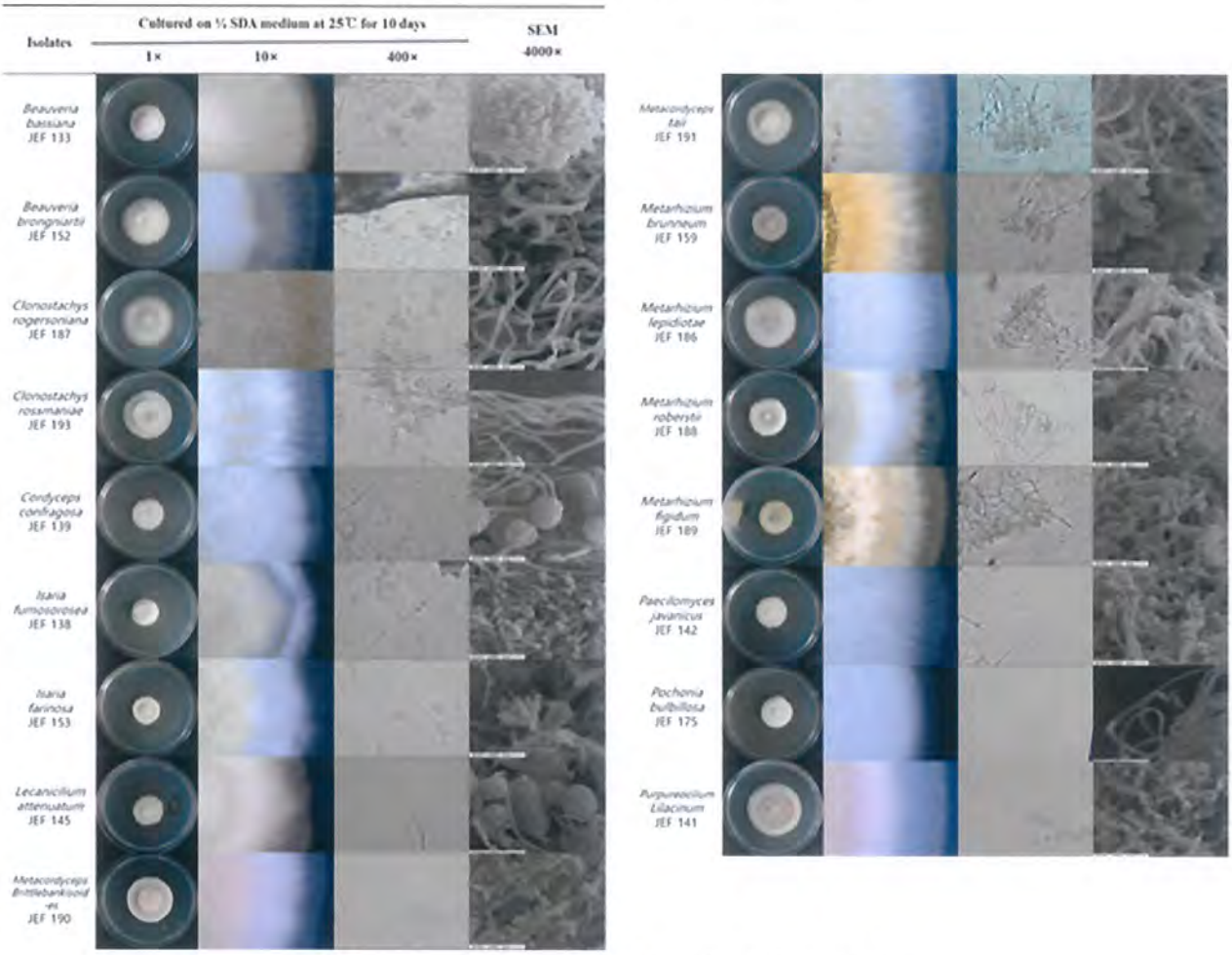


그림 21. 곤충병원성진균의 다양한 형태

(2) egfp 발현 mutant 제작

곤충병원성진균에 의해 치사된 개체 확인 및 mycosis를 관찰하고자, 녹색형광유전자(egfp, enhanced green fluorescent protein)를 곤충병원성 진균에 도입하여 mutant를 제작하였다.

① pBARKSI-egfp vector 제작

pBluescript II KS(+)-egfp에서 *egfp* expression cassette를 pBARKS1 vector에 cloning하기 위해, pBluescript II KS(+)-egfp와 pBARKS1 vector를 *Cla*I, *Sac*I 제한효소를 이용하여 절단한 뒤, *egfp* expression cassette를 pBARKS1 vector에 integration 시켰다. pBARKSI-egfp vector는 gphA promoter에 의해 발현되는 EGFP gene과 fungal selection marker로 사용되는 phosphinothricin (PPT) resistant *bar* gene이 존재한다.

② *B. bassiana* transformation

B. bassiana 균주의 blastospores에 앞서 제작된 pBARKSI-egfp vector를 제한효소를 이용하여 *B. bassiana*에 integration 시키는 REMI 방법을 이용하여 transformation을 진행하였다. 그 후 *B. bassiana* EGFP-transformant(*Bb*-egfp)는 600 ul phosphinothricin(PPT)가 함유된 Czapek 배지에서

배양되었으며, 이를 이용한 병원성검정을 통해 총채벌레에서 감염양상을 확인하였다.

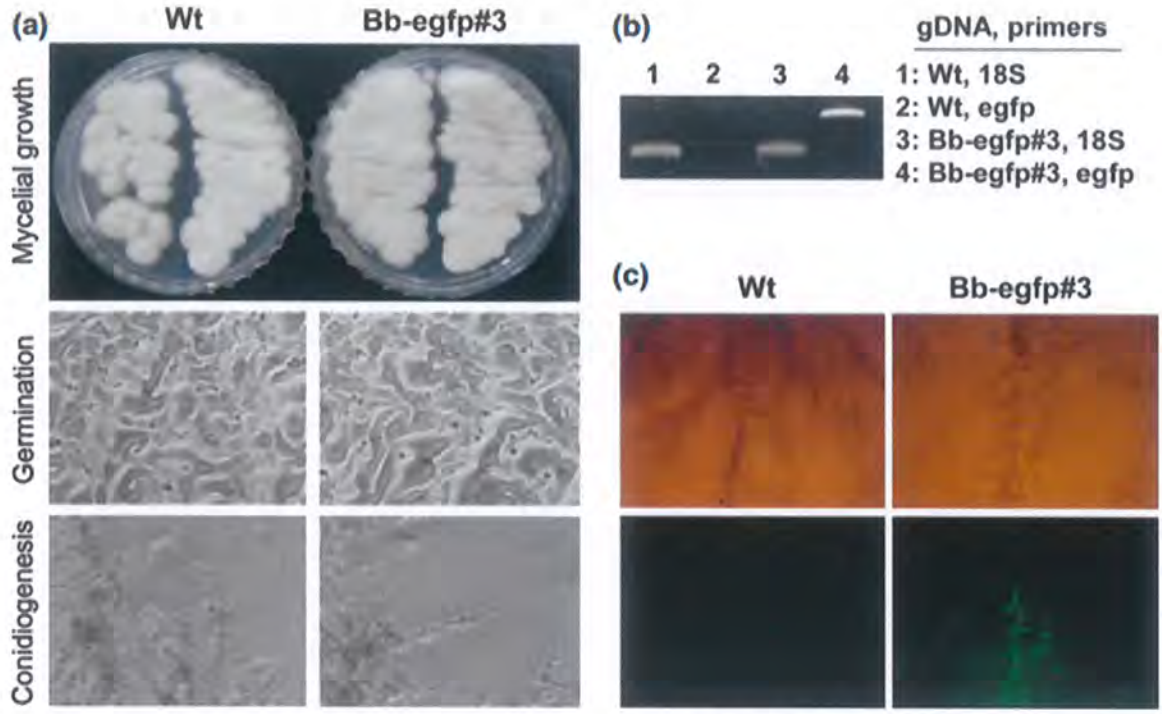


그림 23. Bb-egfp#3의 향상된 형광단백질 (egfp) 유전자 발현. (a) 25℃ 온도 조건으로 1/4SDA 배지에 배양된 wild type과 Bb-egfp#3. 균사체 (배양 7일차), 배양 18시간 후 발아 양상, 배양 4일차의 포자 생성 형태, (b) 18S rRNA (18S)과 egfp (egfp) 프라이머를 이용한 Bb-egfp#3의 역전사 PCR (Reverse transcription-PCR) 분석, (c) 형광현미경 상의 wild type과 Bb-egfp#3의 EGFP 발현 확인 (배양 4일차).

(3) *B. bassiana*-egfp mutant를 이용한 고체배양

egfp를 발현하는 *Beauveria bassiana*의 고체배양은 다음과 같은 방법으로 진행되었다(그림 24).

① Italian millet(*setaria italica*)를 500 ml 플라스틱 배양병에 200 g씩 담는다.
② 과정①에 citric acid(320 ul의 50% stock soultion)이 함유된 100 ml의 증류수를 넣고 잘 섞어준다.
③ 과정②의 플라스틱 배양병을 90±1℃ water bath에서 1시간동안 heating 후 121℃ 온도 조건에서 15분간 멸균한다.
④ 충분히 식힌 후, 20 ml Sabouraud dextrose broth(SDB; Difco)에서 25±1℃, 150 rpm 조건으로 6일간 진탕배양된 균주를 5 ml 접종한다.

그림 24. 기장을 활용한 *B. bassiana* ERL836 대량생산

다. Spray 방법을 통한 살충활성 assay

Bb-egfp mutant를 이용한 병원성 검정(spray)은 다음과 같은 실험실 조건에서 확인되었다.

(1) 실험 방법

지름 2.0 cm의 강낭콩 잎 disc 3장을 증류수 1 ml이 처리된 filter paper가 있는 petri dish(지름, 90 mm)에 놓은 뒤, 3 ml의 *B. bassiana*-egfp mutant의 포자현탁액은 강낭콩 잎 disc에 spray 처리 되었다. 10마리의 꽃노랑총채벌레 암컷 성충은 균주가 처리된 강낭콩 잎에 접종되었으며, 균주를 처리하지 않은 조건은 무처리구로 설정되었다. 본 실험은 3반복으로 진행되었으며, 처리구 및 무처리구는 25±1℃, 16:8h(L/D) 조건에서 매일 생충수를 조사하였다. 생충수 조사는 형광현미경을 이용하여 진행되었다.

(2) 실험 결과

처리 3일 후 강낭콩 잎에서 균주에 감염된 꽃노랑총채벌레가 확인되었다(그림 25a). *Bb*-egfp mutant를 처리한 조건에서는 처리 2일 후 66.6%, 4일 후 89.3%의 사충률이 확인되었다. 또한 균주처리 6일 후에 무처리구에서는 5% 미만의 사충률을 보인 반면 처리구에서 모든 총채벌레 개체가 치사됨을 확인 하였다(그림 25b). *Bb*-egfp mutant에 감염된 총채벌레를 형광현미경 하에서 관찰한 결과 총채벌레의 충체의 표면에서 egfp signal이 확인되었다(그림 25c).

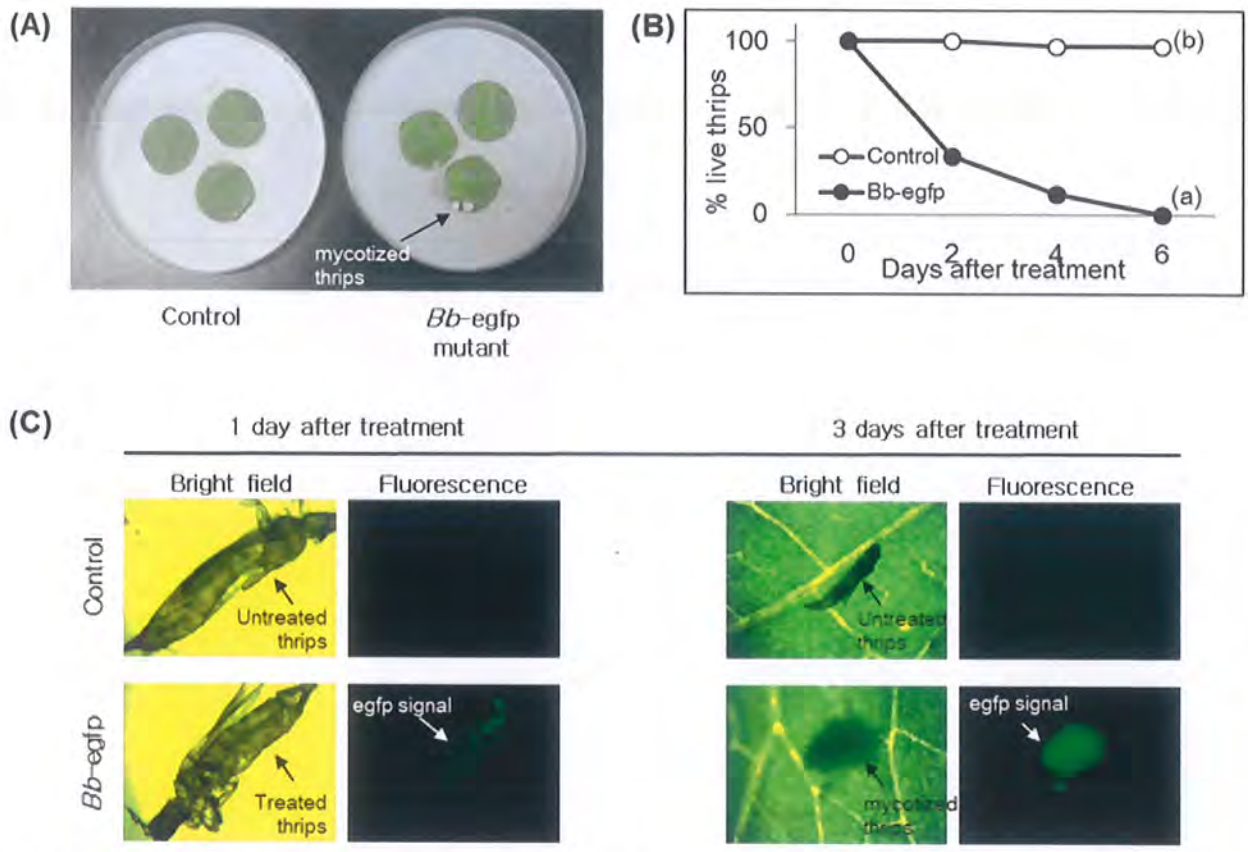


그림 25. 실험실 조건에서의 꽃노랑총채벌레에 대한 *B. bassiana*-egfp (Bb-egfp)의 병원성 검정. (A) Petri dish 상의 콩 잎면에 Bb-egfp를 처리 후 3일차에 확인한 감염된 꽃노랑총채벌레, (B) 꽃노랑총채벌레에 대한 Bb-egfp의 병원성. Tukey's HSD test에서 처리구간의 유의한 차이를 확인 ($p > 0.05$), (C) Bb-egfp 처리 후 1일차와 3일차에 형광현미경 상으로 관찰한 감염된 꽃노랑총채벌레

라. 치사개체 확인 및 mycosis 관찰 및 검증

(1) 실험 방법

지름 15 cm, 높이 20 cm의 pot에 토마토(높이 25 cm)를 파종한 뒤, 30 ml의 물을 공급하여 수분함량이 높은 토양에 2 g의 *Bb*-egfp 고체배양산물(GR)이 처리되었다(그림 26b). 균주 접종 후 모든 처리구에는 매일 30 ml의 증류수가 처리되었으며, 균주를 처리하지 않은 조건은 무처리구로 설정되었다. 처리 7일 후 15마리의 꽃노랑총채벌레 암컷 성충은 토마토 잎에 접종되었으며, 번데기 시기의 꽃노랑총채벌레에 대한 균주의 효과가 조사되었다. 본 실험은 3반복으로 진행되었다.

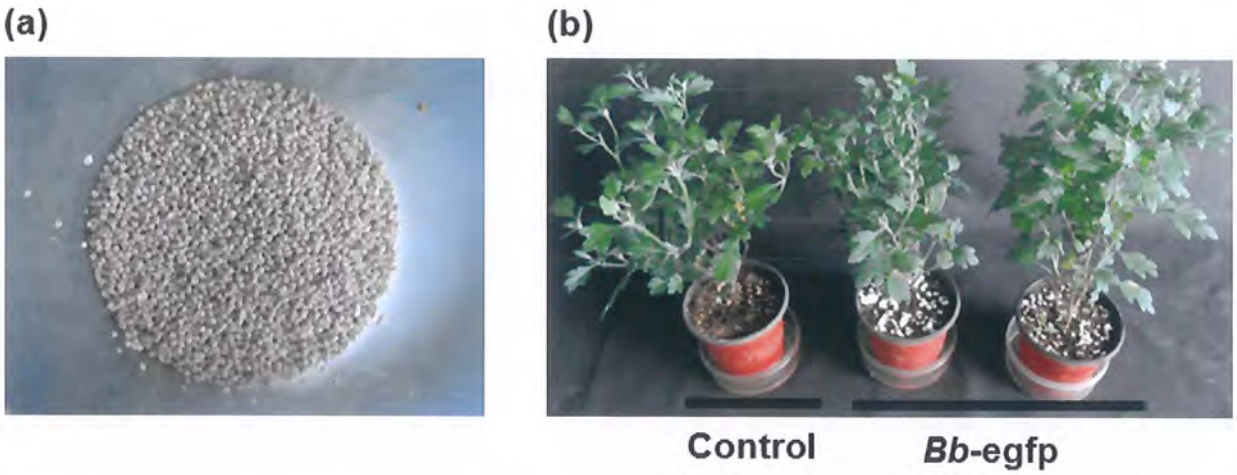


그림 26. *Bb*-egfp granule(GR) 토양처리. (a), Italian millet를 이용한 *Bb*-egfp GR; (b), 토양에 처리된 *Bb*-egfp GR.

(2) 실험 결과

Bb-egfp GR 처리 3일 후 균주가 처리된 토양의 표면에서 부풀어 오른 fungal granules가 확인되었다(그림 27). 또한 처리된 균주는 식물체(토마토)의 생장에 어떠한 부정적인 영향도 미치지 않는 것으로 확인되었다.

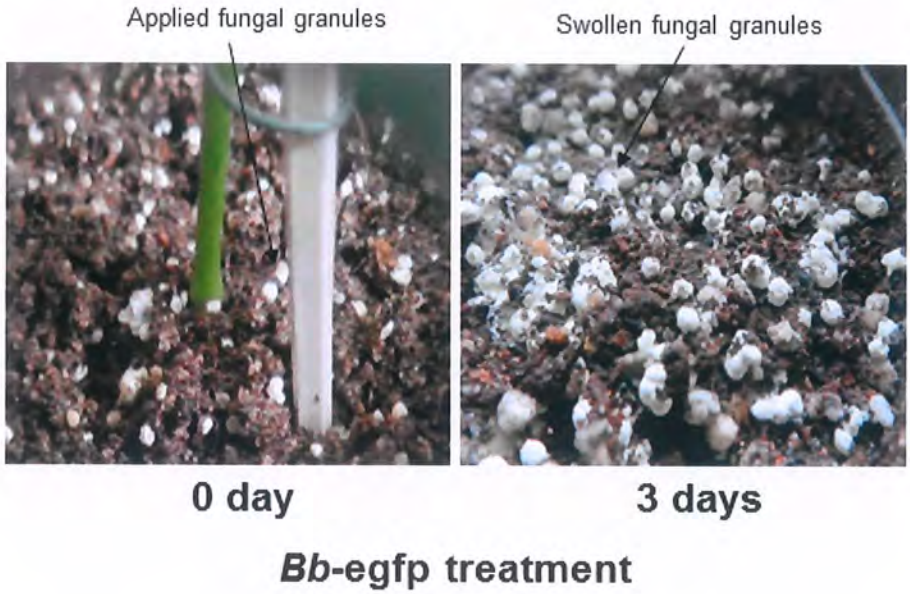


그림 27. *Bb*-egfp GR 토양처리 3일 후

현미경 관찰을 통해 *Bb*-egfp GR이 처리된 토양에서 강한 형광이 발현되는 것을 확인되었으며(그림 28a), 균주에 접촉된 꽃노랑총채벌레 pupae 또한 확인되었다(그림 28b). 본 실험의 결과는 *Bb* GR을 토마토작물에 처리함으로써, 토양 내 꽃노랑총채벌레 pupae를 감염시킬 수 있다고 판단되어진다.

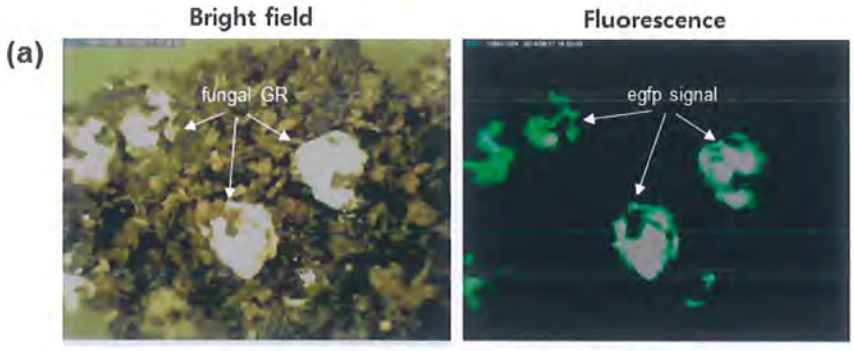


그림 28. 토양에 처리된 *Bb*-egfp GR 관찰. (a), 토양에서 *Bb*-egfp GR의 colonization; (b), *Bb*-egfp 균사에 접촉되어진 꽃노랑총채벌레 pupae

2. 총채벌레 방제 활성이 높은 *B. bassiana* ERL(또는 JEF) 균주의 Whole Genome Sequencing 및 염기서열 분석

가. Whole Genome Sequencing을 위한 균주 배양 및 샘플 preparation

(1) 실험 방법

B. bassiana 균주의 유전체 서열 해독 및 정보 분석을 위해 먼저 *B. bassiana* JEF007을 ¼SDA 배지에 25℃ 조건으로 7일 배양한 후, 배양된 3개의 agar block을 SSYP(1 g of Soluble starch, 0.25 g of Yest extract, 0.25 g of Peptone/100 ml) 배지에 넣고 28℃, 150 rpm 조건으로 3일 배양 되었다. 배양액은 원심분리기를 이용하여 균사 및 포자를 분리하였으며, 동결건조기를 통해 2일 동안 건조되었다. 건조된 sample은 CTAB buffer를 이용하여 genomic DNA extraction 되었으며, DNA는 정량 후 전기영동을 진행하였다.

(2) 실험 결과

DNA 정량 결과 88.484 ng/ul 농도가 확인되었으며, 전기영동을 통해 DNA가 확인 되었다 (그림 29).

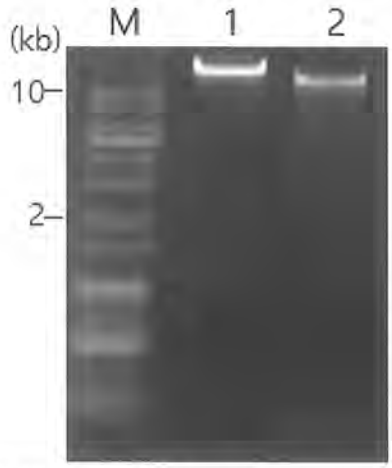


그림 29. 전기영동을 통한 *B. bassiana* JEF007 DNA 확인
M: 1kb(+) marker, 1: control(50ng), 2: JEF007

나. Sequencing 및 염기서열 분석

(1) 실험 결과

확보된 DNA는 PacBio RS II를 이용하여 sequencing 되었으며, De novo assembly를 통해 분석되었다. *B. bassiana* JEF007의 평균 read 길이와 N50은 8,471 bp와 12,025 bp 이었으며, total base 및 total read 수는 각 각 5,464,060,849 bp와 645,008 이었다(표 16).

표 16. WGS의 raw data

Mean Subread length	Total Number of Bases	N50	Number of Reads
8,471	5,464,060,849	12,025	645,008

Assembly를 통해 39개의 contig를 확보하였으며, 총 길이는 36,538,394 bp 이었다. 또한, N50은 3,115,233bp 이었으며, 평균 contig의 길이는 936,881 bp이었다(표 17).

표 17. Assembly 결과

Number of contigs	Total Length	N50	Max Length	Min Length	Avg Length
39	36,538,394	3,115,233	4,836,080	5,751	936,881

각 contig의 길이, GC(%), depth는 표 18과 같았다.

표 18. 39개 Contig의 정보

Contig Name	Length (bp)	GC %	Depth
contig1	4,836,080	47.80	104
contig2	4,313,377	47.20	104
contig3	3,721,617	48.50	104
contig4	3,539,716	50.20	107
contig5	3,115,233	46.70	102
contig6	2,580,292	48.60	105
contig7	2,356,961	50.40	107
contig8	2,191,280	43.90	102
contig9	1,987,760	50.80	107
contig10	1,591,247	48.70	107
contig11	977,447	51.20	109
contig12	957,547	52.20	107
contig13	681,700	48.10	106
contig14	677,945	49.60	106
contig15	561,348	45.90	105
contig16	508,980	47.0	101
contig17	390,418	50.30	109
contig18	260,236	26.70	87
contig19	246,642	44.20	91
contig20	225,477	46.40	107
contig21	178,896	42.30	97
contig22	105,676	44.80	100
contig23	100,976	53.40	114
contig24	72,605	24.50	71
contig25	57,124	53.70	108
contig26	38,876	49.70	170
contig27	38,659	52.30	965
contig28	31,210	27.0	699
contig29	25,046	39.70	28
contig30	22,032	25.70	34
contig31	21,250	32.40	1
contig32	21,017	51.60	35
contig33	20,327	35.50	3
contig34	18,324	19.0	13
contig35	17,304	51.30	19
contig36	17,020	38.40	35
contig37	16,589	20.70	15
contig38	8,409	20.30	1
contig39	5,751	21.0	1
Total	**36,538,394**	**48.04**	**105**

다. Data filtering/Mapping/Annotation

Annotation을 통해 10,857개의 유전자가 확인되었으며, Transcript의 총 길이는 14,358,675 bp 이었으며, protein의 총길이는 4,775,108 aa 이었다(표 19).

표 19. Annotation 결과

	Number of Genes	Total Length
Predicted Transcripts	10,857	14,358,678 bp
Predicted Prodeins	10,857	4,775,108 aa

Blast 결과, *B. bassiana* 외에도 *Cordyceps, Metarhizium, Isaria, Clavispora, Fusarium*의 유전자가 확인되었으며(표 20), *B. bassiana* train으로 확인된 유전자는 9,346개이었으며, *B. bassiana*를 제외한 다른 종으로 확인된 유전자는 1,405개, no hit으로 확인된 유전자는 437개이었다(표 21).

표 20. Blast 결과 (상위 30개)

No.	Gene		Annotation	species	identity	E-value
	name	length (bp)				
1	Bbassiana00000034-RA protein	167	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like 3	Cordyceps brongniartii RCEF 3172	100	6.00E-121
2	Bbassiana00000054-RA protein	193	hypothetical protein BBO_02065	Cordyceps brongniartii RCEF 3172	100	4.00E-134
3	Bbassiana00000203-RA protein	243	splicing factor 3a subunit 2	Cordyceps brongniartii RCEF 3172	100	0
4	Bbassiana00000210-RA protein	70	Protein translocase SEC61 complex, gamma subunit	Cordyceps brongniartii RCEF 1005	100	1.00E-43
5	Bbassiana00000214-RA protein	391	proteasome regulatory particle subunit Rpt4	Cordyceps brongniartii RCEF 3172	100	0
6	Bbassiana00000270-RA protein	164	Cytochrome c oxidase biogenesis protein	Cordyceps brongniartii RCEF 3172	100	8.00E-119
7	Bbassiana00000281-RA protein	71	DNA repair protein Rex1	Cordyceps brongniartii RCEF 3172	100	2.00E-41
8	Bbassiana00000336-RA protein	337	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 2	Cordyceps brongniartii RCEF 3172	100	0
9	Bbassiana00000369-RA protein	606	sphingosine-1-phosphate lyase	Cordyceps brongniartii RCEF 3172	100	0
10	Bbassiana00000421-RA protein	153	guanine nucleotide-binding protein alpha subunit	Cordyceps brongniartii RCEF 3172	100	1.00E-105
11	Bbassiana00000422-RA protein	186	guanine nucleotide-binding protein alpha subunit	Cordyceps brongniartii RCEF 1005	100	4.00E-136

12	Bbassiana00000540-RA protein	166	ubiquitin-conjugating enzyme	Cordyceps brongniartii RCEF 3172	100	1.00E-120
13	Bbassiana00000600-RA protein	348	DNA repair protein RAD51	Cordyceps brongniartii RCEF 3172	100	0
14	Bbassiana00000626-RA protein	142	RNA polymerase Rpb4 family protein	Cordyceps brongniartii RCEF 3172	100	2.00E-95
15	Bbassiana00000633-RA protein	345	protein arginine N-methyltransferase 1	Cordyceps brongniartii RCEF 3172	100	0
16	Bbassiana00000634-RA protein	254	ribosomal large subunit	Cordyceps brongniartii RCEF 3172	100	0
17	Bbassiana00000830-RA protein	103	Histone H4	Cordyceps confragosa RCEF 1005	100	2.00E-65
18	Bbassiana00000866-RA protein	118	Light chain 3 (LC3)	Cordyceps brongniartii RCEF 3172	100	4.00E-80
19	Bbassiana00000876-RA protein	145	ribosomal protein S28	Cordyceps confragosa RCEF 1005	100	2.00E-99
20	Bbassiana00000904-RA protein	103	Histone H4	Cordyceps confragosa RCEF 1005	100	2.00E-65
21	Bbassiana00000905-RA protein	68	histone H3	Cordyceps confragosa RCEF 1005	100	7.00E-40
22	Bbassiana00000949-RA protein	246	Translation initiation factor IF6	Cordyceps brongniartii RCEF 3172	100	1.00E-177
23	Bbassiana00000954-RA protein	257	cytoplasmic ribosomal protein subunit S3	Cordyceps brongniartii RCEF 3172	100	0
24	Bbassiana00001050-RA protein	183	Small GTPase superfamily, ARF/SAR type	Cordyceps brongniartii RCEF 3172	100	3.00E-133
25	Bbassiana00001054-RA protein	212	mitochondrial enoyl reductase	Cordyceps brongniartii RCEF 3172	100	4.00E-155
26	Bbassiana00001187-RA protein	142	enth /vhs	Cordyceps brongniartii RCEF 3172	100	2.00E-78
27	Bbassiana00001414-RA protein	199	protein hob3	Cordyceps brongniartii RCEF 3172	100	2.00E-143
28	Bbassiana00001702-RA protein	389	26S protease regulatory subunit 8	Cordyceps brongniartii RCEF 3172	100	0
29	Bbassiana00001777-RA protein	102	40S ribosomal protein S5-B	Verticillium alfalfae VaMs.102	100	4.00E-67
30	Bbassiana00001786-RA protein	84	Zinc finger domain-containing protein, DPH-type	Cordyceps brongniartii RCEF 3172	100	1.00E-52

표 21. 균주별 Annotation 결과

분류	species	유전자수
Beauveria sp.		9,346
	Beauveria bassiana	9,346
Metarhizium sp.		47
	Metarhizium majus	3
	Metarhizium acridum	7
	Metarhizium album	2
	Metarhizium anisopliae	15
	Metarhizium brunneum	3
	Metarhizium guizhouense	8
	Metarhizium rileyi	9
Cordyceps sp.		804
	Cordyceps brongniartii	671
	Cordyceps confragosa	82
	Cordyceps militaris	51
Isaria sp.		70
	Isaria farinosa	1
	Isaria fumosorosea	69
Verticillium sp.		3
	Verticillium alfalfae	1
	Verticillium dahliae	1
	Verticillium longisporum	1
Fusarium sp.		23
	Fusarium fujikuroi	5
	Fusarium langsethiae	2
	Fusarium langsethiae	2
	Fusarium oxysporum	11
	Fusarium verticillioides	3
Penicillium sp.		11
	Penicillium camemberti	1
	Penicillium chrysogenum	1
	Penicillium freii	1
	Penicillium griseofulvum	7
	Penicillium nordicum	1
기타 종		163
no hit		437
total		**10,857**

Blast 결과, Identity가 100%인 유전자는 855개이었다(표 22).

표 22. Identity에 따른 blast 결과

identity 범위(%)	유전자 수
100	855
90≤ x <100	8,338
80≤ x <90	654
70≤ x <80	232
60≤ x <70	140
50≤ x <60	93
40≤ x <50	70
30≤ x <40	36
20≤ x <30	2
10≤ x <20	0
0≤ x <10	0
no hit	437
total	**10,857**

5장 총채벌레 살충성 관련 기능성 유전자 분석 및 검증

총채벌레에 병원성이 있는 곤충병원성 진균을 이용하여 병원성과 관련된 유전자군을 분석하고자 RNA-seq 분석을 진행하였다.

1절. 살충활성 관련 유전자군 분석을 위하여 RNA-seq을 이용한 총채벌레 침입 전후의 transcriptome 분석

1. Infected/Non-infected 총채벌레 샘플 확보 및 Total RNA 추출 및 quality check

가. 실험방법

(1) 1차 총채벌레 샘플 확보

B. bassiana JEF-007 균주는 ¼ Sabouraud dextrose agar(Difco) 배지에서 25℃, 10일간 배양되었으며, 배양된 plate에 약 1,200마리의 꽃노랑총채벌레를 노출시켜 25℃, 6일간 추가로 배양되었다. Non-infection 조건 (control)은 다음과 같이 확보되었다. JEF-007 균주를 16일간 배양하여, 배양산물을 멸균된 wood stick으로 긁어낸 뒤 0.03% silwet을 이용하여 균주 현탁액이 제작되었다. 제작된 균주 현탁액은 4℃에서 13,000 rpm으로 10분간 원심분리를 진행한 뒤, 상층액을 제거하였다. 상층액이 제거된 pellet은 -70℃ 초저온냉동고에 보관되었다.

Infected thrips 조건은 다음과 같이 확보되었다. JEF-007 균주에 6일간 감염된 꽃노랑총채벌레는 멸균된 wood stick으로 수거되어, 1 ml 0.03% silwet에 침지되었다. 30회 inverting 후 mesh를 이용(Breeding dish 뚜껑 부분 사용)하여 총채벌레와 포자 현탁액은 분리되었다. 포자 현탁액은 4℃에서 13,000 rpm으로 10분간 원심분리를 진행한 뒤, 상층액을 제거하였다. 상층액이 제거된 pellet은 -70℃ 초저온냉동고에 보관되었다(그림 30).

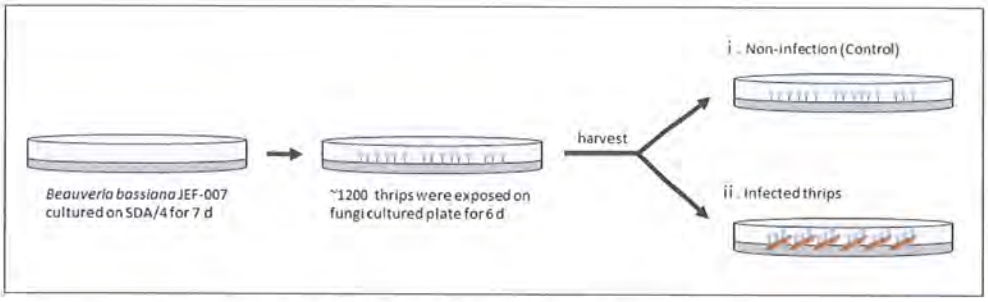


그림 30. 포자 노출법을 이용한 총채벌레 샘플 확보 모식도

(2) 2, 3, 8차 총채벌레 샘플 확보

B. bassiana JEF-007 균주현탁액(1×10^7 conidia/ml)은 ¼ SDA(Difco) 배지에 50 ul spreading 후 25℃, 4일간 배양되었으며(3차 실험의 경우, 1일간 배양되었음), 배양된 plate에 약 1,500마리의 꽃노랑총채벌레를 노출시켜 25℃, 6일간 추가로 배양되었다. JEF-007 균주에 6일간 감염된 꽃노랑총채벌레는 멸균된 wood stick으로 수거되어, 1 ml 0.03% silwet에 침지되었다. 30회 inverting 후 mesh를 이용(Breeding dish 뚜껑 부분 사용)하여 총채벌레와 포자 현탁액은 분리되었다. 포자

현탁액은 4℃에서 13,000 rpm으로 10분간 원심분리를 진행한 뒤, 상층액을 제거하였다. 상층액이 제거된 pellet은 -70℃ 초저온냉동고에 보관되었다(그림 31).

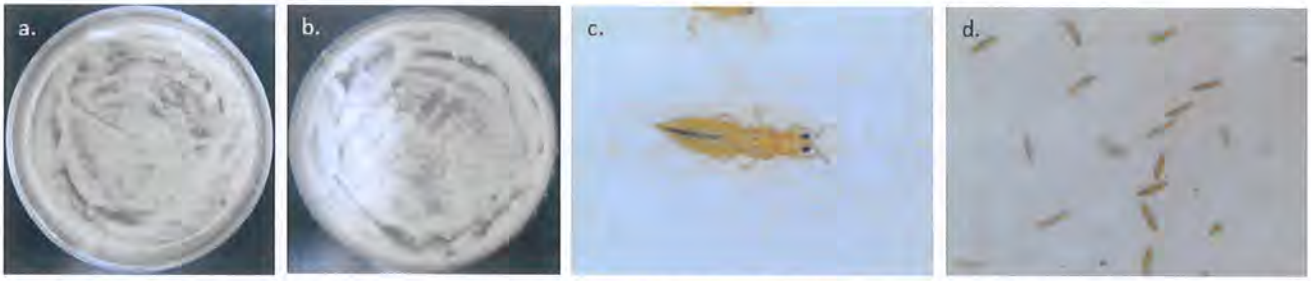


그림 31. (a), 약 300마리의 꽃노랑총채벌레가 접종된 배지; (b), ¼ SDA배지에 25℃, 4일간 배양된 JEF-007; (c) 4일간 배양된 JEF-007 균주에 노출된 꽃노랑총채벌레 (x5); (d), 4일간 배양된 JEF-007 균주에 노출된 꽃노랑총채벌레(x1)

(3) 4차 총채벌레 샘플 확보

B. bassiana JEF-007 균주는 ¼ SDA (Difco) 배지에서 25℃, 7일간 배양되었으며, 배양된 plate를 뒤집어 총채벌레를 처리 후 (200 마리/plate) 총채벌레 표면에 포자가 붙을 수 있도록 plate를 털어주었다. 새로운 petri dish (60×15 mm)에 filter paper를 깔고, D.W. 200 ul 처리 후 표면에 포자가 처리된 총채벌레를 옮겨주었으며, 총채벌레가 치사되면 100 ul를 D.W. 추가로 공급하였다. 균주 처리 5일 후, 감염된 꽃노랑총채벌레는 멸균된 wood stick으로 수거되어, 1 ml 0.03% silwet에 침지되었다. 30회 inverting 후 mesh를 이용(Breeding dish 뚜껑 부분 사용)하여 총채벌레와 포자 현탁액은 분리되었다. 포자 현탁액은 4℃에서 13,000 rpm으로 10분간 원심분리를 진행한 뒤, 상층액을 제거하였다. 상층액이 제거된 pellet은 -70℃ 초저온 냉동고에 보관되었다(그림 32).

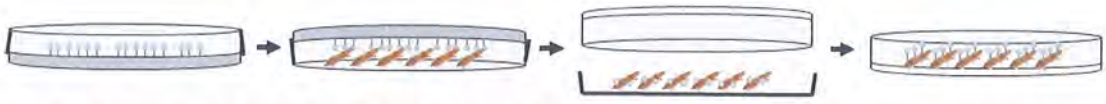


그림 32. 포자 부착법을 이용한 총채벌레 샘플 확보 모식도

B. bassiana JEF-007 균주는 ¼ SDA (Difco) 배지에서 25℃, 7일간 배양되었으며, 제조된 균주현탁액 (1×10^7 conidia/ml)에 punching 된 오이 잎(지름 1.4 cm)은 dipping 되었다. 새로운 petri dish (60×15 mm)에 filter paper를 깔고, 포자현탁액에 dipping 된 오이 잎을 처리 후 꽃노랑총채벌레가 처리(100 마리/plate) 되었다. 수분공급을 위해 200 ul D.W.가 공급되었으며, 처리 5일 후, 감염된 꽃노랑총채벌레는 멸균된 wood stick으로 수거되어, 1 ml 0.03% silwet에 침지되었다. 30회 inverting 후 mesh를 이용(Breeding dish 뚜껑 부분 사용)하여 총채벌레와 포자 현탁액은 분리되었다. 포자 현탁액은 4℃에서 13,000 rpm으로 10분간 원심분리를 진행한 뒤, 상층액을 제거하였다. 상층액이 제거된 pellet은 -70℃ 초저온냉동고에 보관되었다(그림 33).

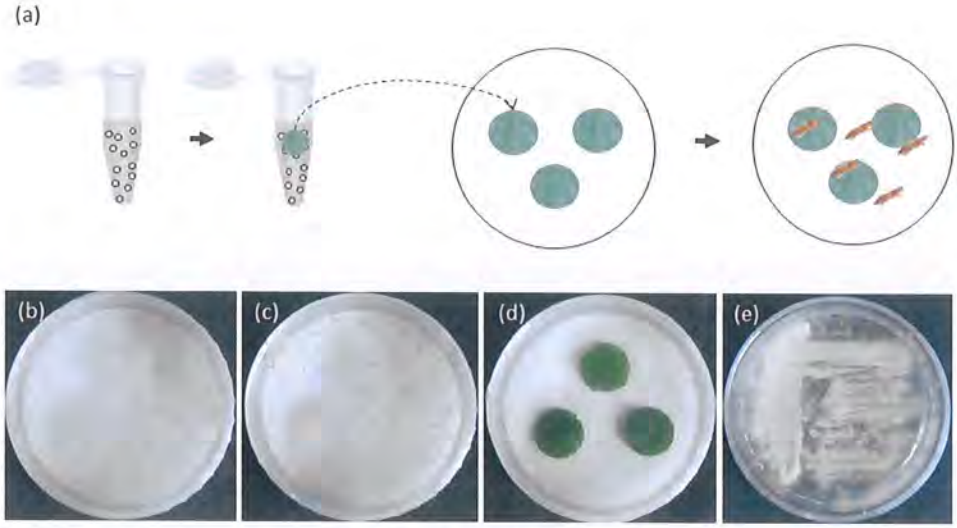


그림 33. (a): Dipping 방법을 이용한 총채벌레 감염샘플 확보 모식도; (b): JEF-007 포자 노출. 200 마리 총채벌레, 10 번 tap하여 JEF-007 포자 처리; (c): JEF-007 포자 노출. 200 마리 총채벌레, 15 번 tap하여 JEF-007 포자 처리; (d): JEF-007 포자현탁액에 오이 잎(지름 1.4 cm) 5초 동안 dipping 후, 총채벌레 100마리 처리; (e): ¼ SDA배지에 25℃, 7일간 배양된 JEF-007

(4) 5-7차 총채벌레 샘플 확보

B. bassiana JEF-007 균주는 ¼ SDA (Difco) 배지에서 25℃, 4일간 배양되었으며, 배양된 고체배양산물은 25 ml Sabouraud dextrose broth (Difco)에 한 조각 (지름 0.5 cm) 접종 후 배양되었다 (25℃, 150 rpm). Non-infection 조건 (control)은 JEF-007 만 배양되었으며, Infected thrips 조건에는 약 200마리의 총채벌레 접종하여, 25℃, 150 rpm 조건에서 1일간 배양되었다. 액체배양산물은 4℃에서 13,000 rpm으로 10분간 원심분리를 진행한 뒤, 상층액을 제거하였다. 상층액이 제거된 pellet은 -70℃ 초저온냉동고에 보관되었다(그림 34).

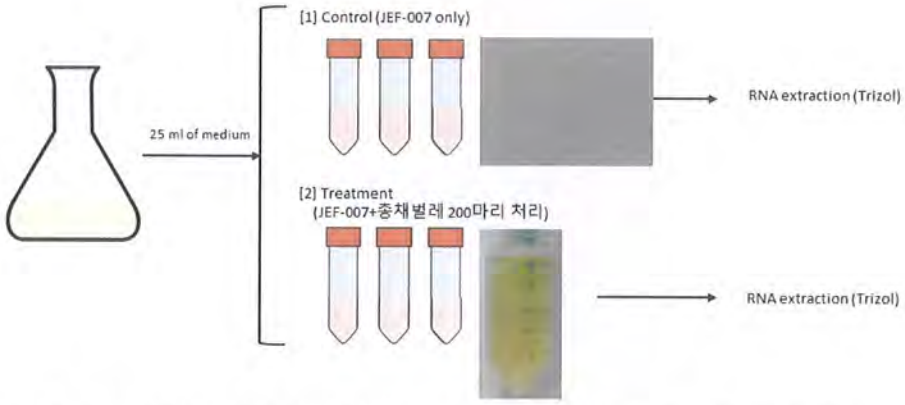


그림 34. 액체배양법을 이용한 총채벌레 감염샘플 확보 모식도

(5) 9차 총채벌레 샘플 확보

B. bassiana JEF-007 균주는 ¼ SDA(Difco) 배지에서 27℃, 3일간 배양되었으며, 배양된 plate에 약 2,000마리의 꽃노랑총채벌레를 노출시켜 27, 3일간 추가로 배양되었다. Non-infection 조건 (control)은 다음과 같이 확보되었다. JEF-007 균주를 6일간 배양하여, 배양산물을 멸균된 wood

stick으로 긁어낸 뒤 0.03% silwet을 이용하여 균주 현탁액이 제작되었다. 제작된 균주 현탁액은 4℃에서 13,000 rpm으로 10분간 원심분리를 진행한 뒤, 상층액을 제거하였다. 상층액이 제거된 pellet은 -70℃ 초저온냉동고에 보관되었다. Infected thrips 조건은 다음과 같이 확보되었다. JEF-007 균주에 3일간 감염된 꽃노랑총채벌레는 멸균된 wood stick으로 수거되어, 1 ml 0.03% silwet에 침지되었다. 30회 inverting 후 mesh를 이용(Breeding dish 뚜껑 부분 사용)하여 총채벌레와 포자 현탁액은 분리되었다. 포자 현탁액은 4℃에서 13,000 rpm으로 10분간 원심분리를 진행한 뒤, 상층액을 제거하였다. 상층액이 제거된 pellet은 -70℃ 초저온냉동고에 보관되었다(그림 35)..

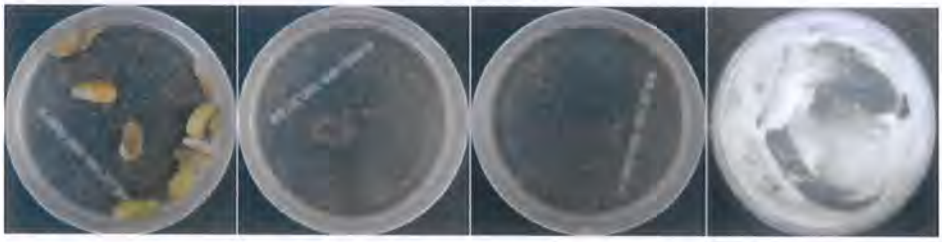


그림 35 포자 노출법을 이용한 총채벌레 샘플 확보.

2. mRNA 분리 및 RNA sequencing

가. 실험방법

(1) mRNA 분리

-70℃ 초저온냉동고에 보관되어있던 균주 샘플에 300 ul Isol-RNA Lysis Reagent (5prime)을 넣고 homogenizer를 이용하여 마쇄되었다. 마쇄액에 700 ul 의 Isol-RNA Lysis Reagent를 추가로 넣고 상온에서 5분간 기다린 후, 200 ul chloroform (99.5%, Daejung)을 넣고 vortexing을 진행하였다. 12,000 rpm으로 15 분간 4℃ 조건에서 원심분리 후, 상층액 500 ul와 Isopropanol (Emsure) 500 ul를 혼합한 다음, 다시 4℃에서 13,000 rpm으로 10분간 원심분리를 진행하였다. 상층액을 버린 tube에 70% ethanol (Absolute, Daejung)을 1 ml 넣었다가 버려주었다. 7,500 rpm, 4℃에서 5분간 원심분리 후 남아있는 70% ethanol은 모두 제거되었다. RNA pellet을 vacuum으로 30℃에서 5분간 말려주었다. 건조된 RNA pellet에 30 ul Dnase/Rnase-Free Distilled Water로 녹여준 뒤, ice에서 10분, 60℃ heating block에서 10분간 처리되었다. 최종적으로 얻어진 RNA 샘플은 7,500 rpm, 4℃에서 5분간 원심분리 후 -70℃에 보관되었다.

(2) mRNA 정량

추출된 mRNA는 spectrophotometer (ACGene, ASP-2680)을 이용해 정량되었다.

(3) RNA sequencing

확보된 RNA는 AccuPower RT premix (Bioneer)를 이용하여 50℃에서 1시간, 95℃에서 5분간 처리되어 cDNA로 합성되었으며, AccuPower PCR premix (Bioneer)를 이용하여 다음과 같은 조건에서 증폭되었다. 94℃에서 5분, 94℃ 30초, primer에 따라 55~61℃ 30초, 72℃ 30초를 30회 실시하였고, 최종적으로 72℃에서 3분간 post maturation 되었다. primer는 18s rRNA-Forward: 5'-TTA CGT CCC TGC CCT TTG TA-3', 18s rRNA-Reverse: 5'-CCA ACG GAG ACC TTG TTA CG-3'

또는 Bb-actin-Forward: 5'-ATG GAG GAA GAA GTT GCT GC-3', Bb-actin-Reverse: 5'-ACA CGG AGC TCG TTG TAG AA-3' 또는 Beta-tubulin-Forward: 5'-GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC-3', Beta-tubulin-Reverse: 5'-ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC-3' 가 사용되었다. PCR산물의 전기영동은 0.8% agarose gel + Ecodye (Biofact)를 사용하여 140 V로 25분 실시한 후 사진촬영이 진행되었다. PCR 산물은 QIAquick PCR purification kit (QIAGEN)를 이용하여 다음과 같은 과정을 따라 purification이 진행 되었다. PB와 PCR 산물을 5:1 volume으로 혼합한 후, QiAquick spin column 에 옮겨, 13,000 rpm으로 1분간 원심분리한 후 상층액을 제거하였다. 그 후 700 ul PE buffer 넣고 5분 기다린 후 13,000 rpm으로 1분간 원심분리를 2회 반복하였다. Spin column 에 남아있는 용액을 1.5 ml E-tube로 옮긴 후 50 ul EB를 넣고 5분 기다린 후 또다시 13,000 rpm으로 1분간 원심분리를 2회 반복하였다. 최종적으로 얻어진 산물은 4℃에 보관되었다 최종적으로 얻어진 purification 산물은 마크로젠(http://dna.macrogen.com/kor/)에 보내 시퀀싱 의뢰를 진행되었다.

나. 실험결과

(1) 1차 실험

추출된 JEF-007, IN-JEF-007 mRNA 정량값은 다음과 같이 측정되었으며 (표 23), 측정이 완료된 산물은 -70℃ 초저온냉동고에 보관되었다.

표 23. 1차 mRNA 추출 정량값

Sample	ID #	Type	Abs260	Abs280	260/280	Concentration (ng/ul)
1-JEF-007-R1	1	RNA	2.581	1.711	1.51	103.2
1-JEF-007-R2	2	RNA	1.303	0.82	1.59	52.1
1-IN-JEF-007-R1	3	RNA	1.002	0.657	1.53	40.1
1-IN-JEF-007-R2	4	RNA	4.008	2.641	1.52	160.3

(2) 2차 실험

추출된 JEF-007, IN-JEF-007 mRNA 정량값은 다음과 같이 측정되었으며(표 24), 측정이 완료된 산물은 -70℃ 초저온냉동고에 보관되었다.

표 24. 2차 mRNA 추출 정량값

Sample	ID #	Type	Abs260	Abs280	260/280	Concentration (ng/ul)
2-JEF-007-R1	1	RNA	0.853	0.542	1.57	34.1
2-JEF-007-R2	2	RNA	1.854	1.276	1.45	74.2
2-JEF-007-R3	3	RNA	1.601	0.957	1.67	64
2-IN-JEF-007-R1	4	RNA	3.439	2.377	1.45	137.6

2-IN-JEF-007-R2	5	RNA	1.248	0.851	1.47	49.9
2-IN-JEF-007-R3	6	RNA	2.397	1.662	1.44	95.9

1차 2차 실험에서 추출된 mRNA는 RT-PCR을 통해 확인되었으며, 확인 결과 target size에서 band가 detection 되었음을 확인하였다(그림 36).

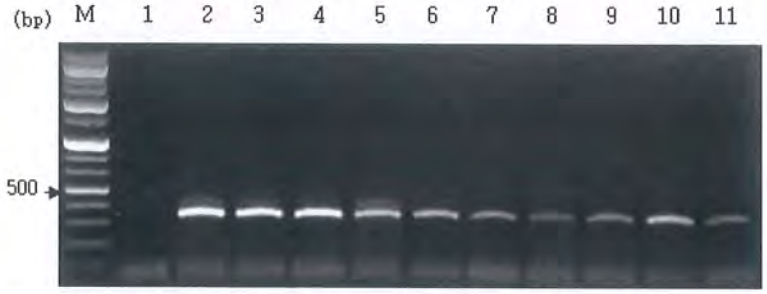


그림 36. RT-PCR을 통해 확인된 1, 2차 mRNA 산물. M, 1 kb(+) marker; 1, negative control; 2, JEF-007-1차-R1; 3, JEF-007-1차-R2; 4, JEF-007-2차-R1; 5, JEF-007-2차-R2; 6, JEF-007-2차-R3; 7, IN-JEF-007-1차-R1; 8, IN-JEF-007-1차-R2; 9, IN-JEF-007-2차-R1; 10, IN-JEF-007-2차-R2 and 11, IN-JEF-007-2차-R3.

(3) 3차 실험

¼ SDA(Difco) 배지에 1일 배양된 JEF-007은 오염되어 실험 사용에 적합하지 않기에 폐기처리 되었다(그림 37).

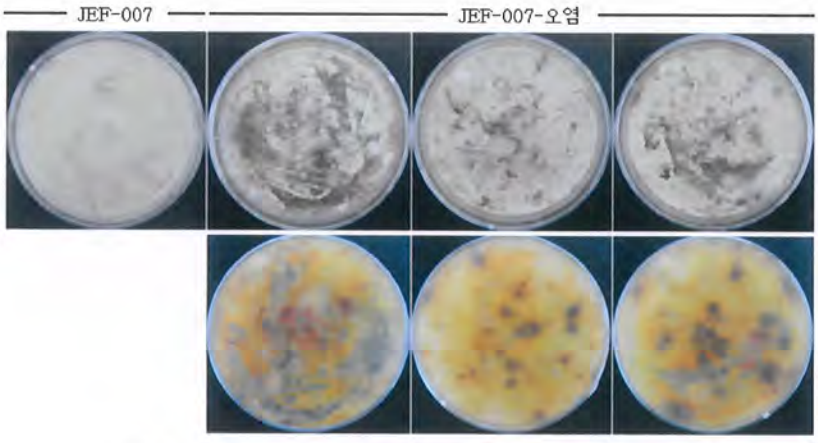


그림 37. 3차 실험 결과 오염된 JEF-007 배지

(4) 4차 실험

B. bassiana JEF-007 포자현탁액에 dipping 된 오이를 공급한 처리구에서는 습도에 의해 꽃노랑총채벌레가 치사되는 것을 확인하였으며, 본 방법은 적합하지 않다고 판단되었다(그림 38).

그림 38. JEF-007 포자노출법과 포자현탁액에 dipping 된 오이잎을 공급하는 방법을 이용한 꽃노랑총채벌레 감염 sample 확보; 처리 당일 해부현미경 관찰(x40)

(5) 5차 실험

3일간 배양된 *B. bassiana* JEF-007 포자현탁액에 접종된 꽃노랑총채벌레를 해부현미경과 광학현미경 하에서 관찰한 결과, 균사가 꽃노랑총채벌레에 충분히 접촉되었다고 판단되어 pellet을 이용하여 RNA를 추출하였다(그림 39).

그림 39. *B. bassiana* JEF-007 배양액을 이용한 꽃노랑총채벌레 감염 샘플 확보

추출된 JEF-007, IN-JEF-007 mRNA 정량값은 다음과 같이 측정되었으며(표 25), 측정이 완료된 산물은 -70℃ 초저온냉동고에 보관되었다.

표 25. 5차 mRNA 추출 정량값

Sample ID	ID #	Sample Type	Abs260	Abs280	260/280	Concentration(ng/ul)
5-IN-JEF-007-R1	1	RNA	14.989	9.977	1.5	599.6
5-IN-JEF-007-R2	2	RNA	15.223	10.485	1.45	608.9
5-IN-JEF-007-R3	3	RNA	26.746	16.805	1.59	1069.9

5-IN-JEF-007-R4	4	RNA	24.52	15.244	1.61	980.8
5-IN-JEF-007-R5	5	RNA	28.097	17.494	1.61	1123.9
5-IN-JEF-007-R6	6	RNA	14.219	9.552	1.49	568.8
5-IN-JEF-007-R7	7	RNA	15.266	9.407	1.62	610.6
5-IN-JEF-007-R8	8	RNA	26.782	16.409	1.63	1071.3
5-IN-JEF-007-R9	9	RNA	14.117	9.049	1.56	564.7
5-IN-JEF-007-R10	10	RNA	8.505	5.024	1.69	340.2
5-JEF-007-R1	11	RNA	9.714	Infinity	0	388.6
5-JEF-007-R2	12	RNA	0.198	0.55	0.36	7.9
5-JEF-007-R3	13	RNA	2.251	1.521	1.48	90
5-JEF-007-R4	14	RNA	0.837	0.498	1.68	33.5
5-JEF-007-R5	15	RNA	0.565	0.394	1.44	22.6
5-JEF-007-R6	16	RNA	0.84	0.546	1.54	33.6

Internal control로써 Bb 18srRNA primer와 Bb actin primer를 이용하여 PCR을 진행한 결과, 18s rRNA primer 조건의 경우 target size에서 모든 cDNA sample이 detection 되었다고 판단되었으나, Bb actin primer의 경우 일부 처리구에서는 band가 detection 되지 않았다(그림 40, 41).

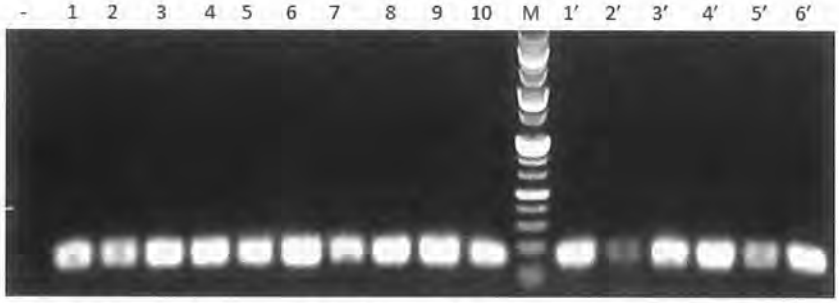


그림 40. RT-PCR을 통해 확인된 5차 mRNA 산물 (Bb 18s rRNA). M, 1 kb(+) marker; -, negative control; 1-10, IN-JEF-007; 1'-6', JEF-007

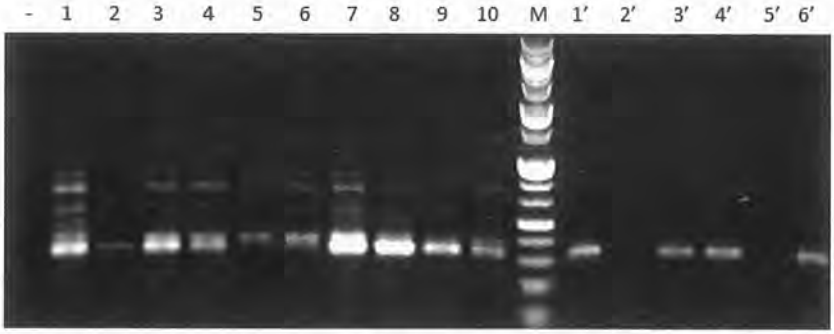


그림 41. RT-PCR을 통해 확인된 1, 2차 mRNA 산물 (Bb actin). M, 1 kb(+) marker; -, negative control; 1-10, IN-JEF-007; 1'-6', JEF-007

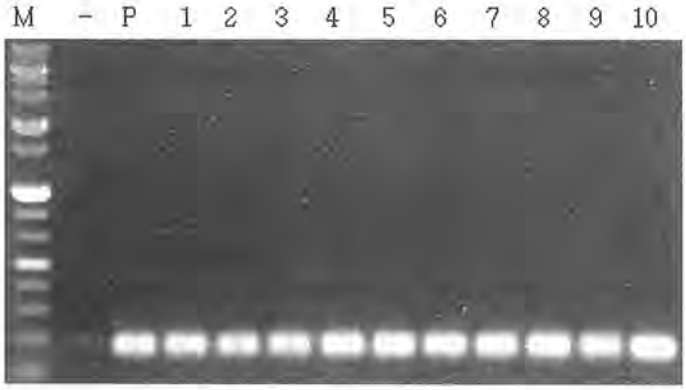
두 primer (Bb 18srRNA와 Bbactin primer)를 이용한 전기영동의 결과가 다르게 나온 이유는

총채벌레 RNA가 일부 들어갔기 때문인 것으로 판단되어졌으며, 구체적으로 배양과정에서 총채벌레 사체가 분해되어 배양액으로 조직 일부가 들어갔기 때문인 것으로 추정되어졌다. JEF-007 처리구의 정량값이 낮게 측정되었기 때문에 추가로 JEF-007 mRNA extraction이 진행되었다. 추출된 JEF-007 mRNA 정량값은 다음과 같이 측정되었다(표 26). 260/280값과 정량값이 비교적 높에 측정된 산물을 파란색으로 표기하였으며, 파란색으로 표기된 산물만이 -70℃ 초저온 냉동고에 보관되었다.

표 26. 5-1, 2, 3, 4차 mRNA 추출 정량값

Sample ID		ID #	Sample Type	Abs260	Abs280	260/280	Concentration(ng/ul)
5-1 차 RNA extraction	JEF007-1R	1	RNA	9.714	Infinity	0	388.6
	JEF007-2R	2	RNA	0.198	0.55	0.36	7.9
	JEF007-3R	3	RNA	2.251	1.521	1.48	90
	JEF007-4R	4	RNA	0.837	0.498	1.68	33.5
	JEF007-5R	5	RNA	0.565	0.394	1.44	22.6
	JEF007-6R	6	RNA	0.84	0.546	1.54	33.6
5-2 차 RNA extraction	JEF007-1R	7	RNA	1.628	0.934	1.74	65.1
	JEF007-2R	8	RNA	1.39	0.801	1.73	55.6
	JEF007-3R	9	RNA	1.293	19.03	0.07	51.7
5-3 차 RNA extraction	JEF007-1R	10	RNA	4.799	3.302	1.45	191.9
	JEF007-2R	11	RNA	4.094	2.635	1.55	163.8
	JEF007-3R	12	RNA	1.825	1.088	1.68	73
5-4 차 RNA extraction	JEF007-1R	13	RNA	2.385	1.534	1.56	95.4
	JEF007-2R	14	RNA	4.831	2.653	1.82	193.2

Bb actin primer를 이용하여 PCR을 진행한 결과, target size에서 모든 cDNA sample이 detection 되었다고 판단되었다(그림 42).



Sample ID	#	Type	Abs260	Abs230	260/230	Content (ng/ul)
JEF007-6R	6	RNA	2.251	1.521	1.48	90
JEF007-4R	4	RNA	0.887	0.493	1.65	66.5
JEF007-6R	6	RNA	0.54	0.546	1.64	66.6
JEF007-1R	7	RNA	1.625	0.954	1.74	65.1
JEF007-2R	8	RNA	1.69	0.801	1.78	55.6
JEF007-1R	10	RNA	4.799	6.602	1.46	191.9
JEF007-2R	11	RNA	4.094	2.655	1.55	163.5
JEF007-8R	12	RNA	1.525	1.053	1.65	75
JEF007-1R	13	RNA	2.656	1.564	1.68	95.4
JEF007-2R	14	RNA	4.581	2.666	1.52	196.2

그림 42. RT-PCR을 통해 확인된 5-1, 2, 3, 4차 mRNA 산물 (Bb actin). M, 1 kb(+) marker; -, negative control; 1-10, IN-JEF-007

RT-PCR을 통해 확인된 샘플 중 일부를 마크로젠(http://dna.macrogen.com/kor/)에 보내 시퀀싱 의뢰가 진행되었으며, 그 결과는 다음과 같다(표 27).

표 27. JEF-007, IN-JEF-007 blast 결과(5차 실험)

ID #	Sample ID	Identification	ident (%)	260/280	Concentration(ng/ul)	비고
0	JEF-007 (control)	*Beauveria* sp. 2BRO-2013 18S rRNA gene partial sequence	100			
1	JEF-007 #1-1			0	388.6	폐기
2	JEF-007 #1-2			0.36	7.9	폐기
3	JEF-007 #1-3	*Fusarium oxysprum* 18S rRNA gene partial sequence	93	1.48	90	
4	JEF-007 #1-4	*Beauveria* sp. 2BRO-2013 18S rRNA gene partial sequence	100	1.68	33.5	
5	JEF-007 #1-5	*Beauveria* sp. 2BRO-2013 18S rRNA gene partial sequence	100	1.44	22.6	
6	JEF-007 #1-6	*Candida carbajalis* DBMY986 18S rRNA gene partial sequence	97	1.54	33.6	
7	JEF-007 #2-1	Fungal sp. MG136M2R5x 18S rRNA gene partial sequence	100	1.74	65.1	
8	JEF-007 #2-2	*Beauveria* strain STH2 28S-18S rRNA intergenic spacer partial sequence	99	1.73	55.6	
		Isaria farinose strain STH3 28S rRNA intergenic spacer partial sequence	99			
9	JEF-007 #2-3	-		0.07	51.7	폐기
10	JEF-007 #3-1	일치결과 없음	-	1.45	191.9	
11	JEF-007 #3-2	*Beauveria* isolate 5A 18S rRNA gene partial sequence	100	1.55	163.8	
		Trichoderma reesei QM6a chromosome VI, complete sequence	100			
12	JEF-007 #3-3	*Beauveria* isolate 5A 18S rRNA gene partial sequence	100	1.68	73	
		Trichoderma reesei QM6a chromosome VI, complete sequence	100			

13 JEF-007 #4-1	*Beauveria* isolate 5A 18S rRNA gene partial sequence	100	1.56	95.4	
14 JEF-007 #4-2	*Beauveria* isolate 5A 18S rRNA gene partial sequence	100	1.82	193.2	
	Trichoderma reesei QM6a chromosome VI, complete sequence	100			
1 IN-JEF-007 #1	*Beauveria* isolate 5A 18S rRNA gene partial sequence	100	1.5	599.6	
	Metarhizium sp. Isolate EMP4 small subunit rRNA gene	100			
2 IN-JEF-007 #2	일치결과 없음	-	1.45	608.9	
3 IN-JEF-007 #3	*Beauveria* isolate 5A 18S rRNA gene partial sequence	100	1.59	1069.9	
	Trichoderma reesei QM6a chromosome VI, complete sequence	100			
4 IN-JEF-007 #4	*Beauveria* isolate 5A 18S rRNA gene partial sequence	100	1.61	980.8	
	Beauveria sp. 2BRO-2013 18S rRNA gene partial sequence	100			
5 IN-JEF-007 #5	*Beauveria* sp. 2BRO-2013 18S rRNA gene partial sequence	100	1.61	1123.9	
6 IN-JEF-007 #6	*Beauveria* isolate 5A 18S rRNA gene partial sequence	100	1.49	568.8	
	Trichoderma reesei QM6a chromosome VI, complete sequence	100			
7 IN-JEF-007 #7	*Beauveria* sp. 2BRO-2013 18S rRNA gene partial sequence	100	1.62	610.6	
8 IN-JEF-007 #8	일치결과 없음	-	1.63	1071.3	폐기
9 IN-JEF-007 #9	*Beauveria* isolate 5A 18S rRNA gene partial sequence	100	1.56	564.7	
10 IN-JEF-007 #10	*Beauveria* isolate 5A 18S rRNA gene partial sequence	100	1.69	340.2	
	Trichoderma reesei QM6a chromosome VI, complete sequence	100			

본 blast 결과를 바탕으로, JEF-007 (Control) 3반복 (control #3-2, 3-3, 4-1 & 4-2 혼합액)과 IN-JEF-007 (Treatment) 3반복 (#1, 3 & 4 혼합액)을 각 2 ug 씩 Macrogen 에 송부하여 RNA-seq 분석을 의뢰하였다. QC 결과, 모든 샘플이 quantity 와 RIN 값의 부족에 의해 부적합 판정을 받았다(그림 43).

General Information

Order Number	1703QHF-0031	Name of Customer	김계수	Date of Order	2017-03-24

Final QC Result of DNA sample(s)

Experiment Date	Sample count	Pass	Fail	Hold
N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

Final QC Result of RNA sample(s)

Experiment Date	Sample count	Pass	Fail	Hold
2017-03-27	6	0	6	0

QC Result of RNA

Experiment Date	2017-03-27	Tested by	LWC	Comment	

#	Sample Name	Conc. (ng/ul)	Volume (ul)	Total Amount (ng)	RIN	Add_Vol	Result*	
1	IN-JEF-007-1	49.818	17	0.847	6.4	20	Fail	Quantity ,RIN
2	IN-007-2	52.564	17	0.894	6.4	20	Fail	Quantity ,RIN
3	IN-007-3	53.627	17	0.912	6.7	20	Fail	Quantity ,RIN
4	JEF-007-1	22.472	17	0.382	8.5	20	Fail	Quantity
5	JEF-007-2	19.504	26	0.507	8.5	20	Fail	Quantity
6	JEF-007-3	19.510	26	0.507	8.4	20	Fail	Quantity

그림 43. JEF-007, IN-JEF-007 QC 결과

(6) 6차 실험

추출된 JEF-007, IN-JEF-007 mRNA 정량값은 다음과 같이 측정되었으며(표 28), 측정이 완료된 산물은 -70℃ 초저온냉동고에 보관되었다.

표 28. 6차 mRNA 추출 정량값

Sample ID	ID #	Sample Type	Abs260	Abs280	260/280	Concentration(ng/ul)
6-JEF-007-R1	1	RNA	0.906	0.555	1.63	36.2
6-JEF-007-R2	2	RNA	0.979	0.664	1.47	39.1
6-JEF-007-R3	3	RNA	1.428	0.974	1.47	57.1
6-JEF-007-R4	4	RNA	1.197	0.711	1.68	47.9
6-JEF-007-R5	5	RNA	1.177	0.713	1.65	47.1
6-JEF-007-R6	6	RNA	3.604	2.388	1.51	144.1
6-JEF-007-R7	7	RNA	1.57	0.989	1.59	62.8
6-JEF-007-R8	8	RNA	3.499	2.29	1.53	140
6-JEF-007-R9	9	RNA	0.995	0.645	1.54	39.8

6차 실험에서 추출된 mRNA는 RT-PCR을 통해 확인되었으며, 확인 결과 target size에서 band가 detection 되었음을 확인하였다(그림 44).

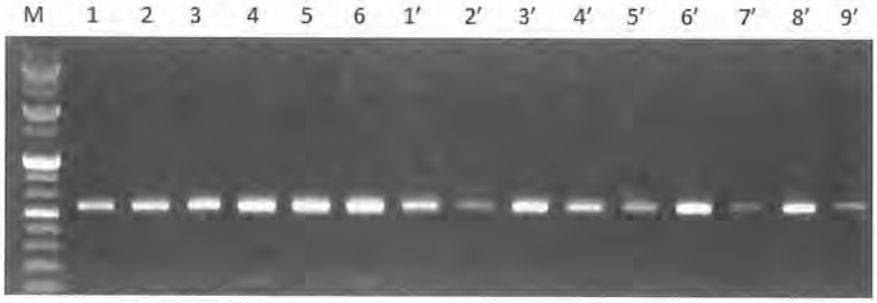


그림 44. RT-PCR을 통해 확인된 6차 mRNA 산물 (Bb actin). M, 1 kb(+) marker; 1-3, JEF-007 (1-5차 샘플); 4-6, IN-JEF-007 (1-5차 샘플); 1'-9', JEF-007 (6차 샘플)

Blast 결과, 대부분의 sample 이 *B. bassiana* JEF-007 ITS 1 partial sequence 로 확인되었다. Control 3-1과 control 3-3은 폐기되었으며, 260/280 값이 낮은 control 1-2, 1-3 sample 을 제외한 나머지 control sample은 합친 후 3반복으로 나누어, 각 2 ug 씩 Macrogen 에 송부하여 RNA-seq 분석을 의뢰하였다(표 29).

표 29. JEF-007, IN-JEF-007 blast 결과 (6차 실험)

ID #	Sample ID	Identification	ident (%)	260/280	Concentration (ng/ul)	비고
1	control 1-1	*Beauveria bassiana* isolate JEF007 internal transcribed spacer 1	100	1.63	36.2	
2	control 1-2	*Beauveria bassiana* isolate JEF007 internal transcribed spacer 1	100	1.47	39.1	
3	control 1-3	*Beauveria bassiana* isolate JEF007 internal transcribed spacer 1	100	1.47	57.1	
4	control 2-1	*Beauveria bassiana* isolate JEF007 internal transcribed spacer 1	100	1.68	47.9	
5	control 2-2	*Beauveria bassiana* isolate JEF007 internal transcribed spacer 1	100	1.65	47.1	
6	control 2-3	*Beauveria bassiana* isolate JEF007 internal transcribed spacer 1	100	1.51	144.1	
7	control 3-1	*Beauveria bassiana* isolate JEF007 internal transcribed spacer 1	99	1.59	62.8	폐기
8	control 3-2	*Beauveria bassiana* isolate JEF007 internal transcribed spacer 1	100	1.53	140	
9	control 3-3	일치결과 없음 .	-	1.54	39.8	폐기

QC 결과, 모든 샘플이 quantity 와 RIN 값의 부족에 의해 부적합 판정을 받았기에 7차 실험은 실험방법을 변경하여 진행되었다.

(7) 7차 실험

추출된 IN-JEF-007 mRNA 정량값은 다음과 같이 측정되었으며(표 21), 측정이 완료된 산물은 -70℃ 초저온냉동고에 보관되었다.

표 30. 7차 mRNA 추출 정량값

Sample	ID #	Type	Abs260	Abs280	260/280	Concentration (ng/ul)
7-IN-JEF-007-R1	1	RNA	1.153	0.783	1.47	46.1
7-IN-JEF-007-R2	2	RNA	8.114	5.125	1.58	324.6
7-IN-JEF-007-R3	3	RNA	2.551	1.664	1.53	102.1
7-IN-JEF-007-R4	4	RNA	4.514	2.874	1.57	180.6
7-IN-JEF-007-R5	5	RNA	11.903	8.309	1.43	476.1
7-IN-JEF-007-R6	6	RNA	0.549	0.347	1.58	22
7-IN-JEF-007-R7	7	RNA	10.303	6.247	1.65	412.1

7차 실험에서 추출된 mRNA는 RT-PCR을 통해 확인되었으며, 확인 결과 target size에서 band가 detection 되었음을 확인하였다(그림 45).

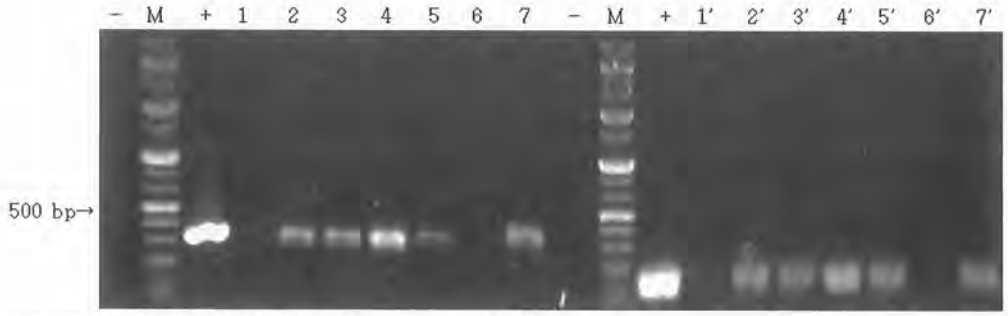


그림 45. RT-PCR을 통해 확인된 6차 mRNA 산물. M, 1 kb(+) marker; -, negative control; 1-7, IN-JEF-007 (Beta tubulin primer); 1'-7', IN-JEF-007 (Bb actin primer)

Blast 결과, 대부분의 sample 이 *B. bassiana* ARSEF 2860 beta tubulin partial mRNA 로 확인되었다. IN-JEF-007-R6은 낮은 정량값으로 인해 폐기되었으며, IN-JEF-007-R7은 blast 일치 결과가 없기에 폐기되었다. 그 외 5개의 샘플은 합친 후 3반복으로 나누어 각 2 ug 씩 Macrogen 에 송부하여 RNA-seq 분석을 의뢰하였다(표 31).

표 31. JEF-007, IN-JEF-007 blast 결과 (7차 실험)

ID #	Sample ID	Identification	ident (%)	260/280	Concentration (ng/ul)	비고
1	IN-JEF-007-R1	*Beauveria bassiana* ARSEF 2860 beta tubulin partial mRNA	99	1.47	46.1	
2	IN-JEF-007-R2	*Beauveria bassiana* ARSEF 2860 beta tubulin partial mRNA	99	1.58	324.6	
3	IN-JEF-007-R3	*Beauveria bassiana* ARSEF 2860 beta tubulin partial mRNA	99	1.53	102.1	
4	IN-JEF-007-R4	*Beauveria bassiana* ARSEF 2860 beta tubulin partial mRNA	98	1.57	180.6	
5	IN-JEF-007-R5	*Beauveria bassiana* ARSEF 2860 beta tubulin partial mRNA	99	1.43	476.1	
6	IN-JEF-007-R6	*Beauveria bassiana* ARSEF 2860 beta tubulin partial mRNA	98	1.58	22	폐기
7	IN-JEF-007-R7	일치결과 없음.	-	1.65	412.1	폐기

QC 결과, 모든 샘플이 quantity 와 RIN 값의 부족에 의해 부적합 판정을 받았기에 8차 실험은 실험방법을 변경하여 진행되었다.

(8) 8차 실험

¼ SDA (Difco) 배지에 배양된 JEF-007에 접종된 꽃노랑총채벌레는 해부현미경하에서 처리 1일, 3일차에 각각 관찰되었으며, mycosis된 개체를 확인할 수 있었다(그림 46).

그림 46. JEF-007 노출법을 이용한 꽃노랑총채벌레 감염 sample 확보; 처리 1일, 3일차 해부현미경 관찰(x40)

추출된 IN-JEF-007 mRNA 정량값은 다음과 같이 측정되었으며(표 32), 측정이 완료된 산물은 -70℃ 초저온냉동고에 보관되었다.

표 32. 8차 mRNA 추출 정량값

Sample ID	ID #	Sample Type	Abs260	Abs280	260/280	Concentration(ng/ul)
8-JEF-007-R1	1	RNA	2.832	1.81	1.56	113.3
8-JEF-007-R2	2	RNA	7.399	4.599	1.61	295.9
8-JEF-007-R3	3	RNA	1.371	0.858	1.6	54.9
8-IN-JEF-007-R1	4	RNA	2.398	1.616	1.48	95.9
8-IN-JEF-007-R2	5	RNA	4.968	3.257	1.53	198.7
8-IN-JEF-007-R 3	6	RNA	3.221	2.098	1.54	128.8
8-IN-JEF-007-R4	7	RNA	3.327	2.178	1.53	133.1
8-IN-JEF-007-R5	8	RNA	4.175	2.691	1.55	167

8차 실험에서 추출된 mRNA는 RT-PCR을 통해 확인되었으며, 확인 결과 Bb 18s rRNA primer 조건은 target size (180-bp)에서 band가 detection 되었다고 판단되었지만, Bb actin primer PCR 결과는 JEF-007 조건에 비해 IN-JEF-007 조건의 band가 희미하다고 판단되어졌다(그림 47).

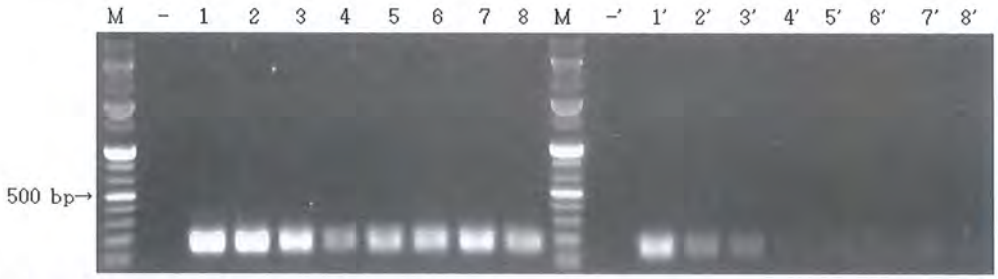


그림 47. RT-PCR을 통해 확인된 6차 mRNA 산물. M, 1 kb(+) marker; -, negative control; 1-8, IN-JEF-007 (Bb 18s rRNA primer); 1'-8', IN-JEF-007 (Bb actin primer)

(9) 9차 실험

¼ SDA (Difco) 배지에 3일간 배양된 JEF-007에 접종된 꽃노랑총채벌레는 다음 사진과 같이 약 2000마리가 접종되었다(그림 48).

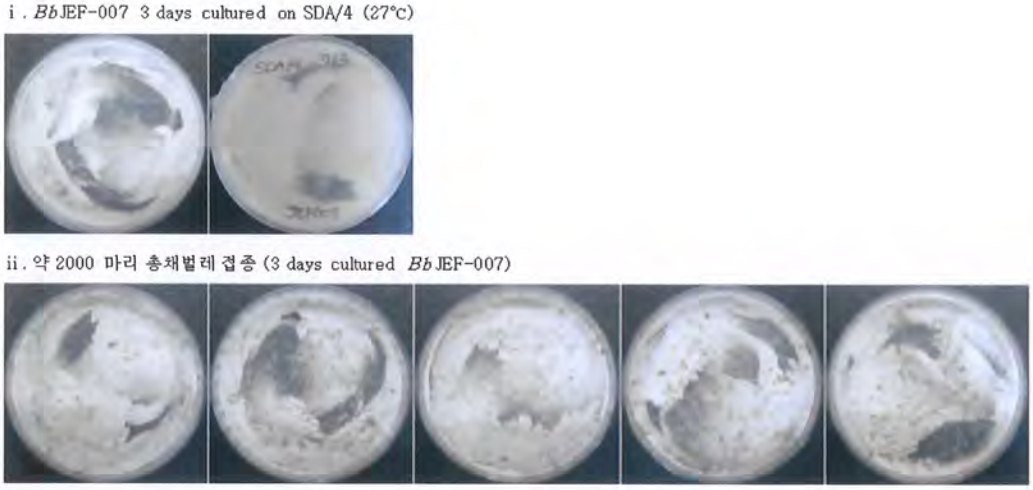


그림 48. JEF-007 노출법을 이용한 꽃노랑총채벌레 감염 sample 확보.

추출된 IN-JEF-007 mRNA 정량값은 다음과 같이 측정되었으며(표 33), 측정이 완료된 산물은 -70℃ 초저온냉동고에 보관되었다.

표 33. 9차 mRNA 추출 정량값

Sample ID	ID #	Sample Type	Abs260	Abs280	260/280	Concentration(ng/ul)
9-JEF-007-R1	1	RNA	3.397	2.238	1.52	135.9
9-JEF-007-R2	2	RNA	4.144	2.735	1.52	165.8
9-JEF-007-R3	3	RNA	2.65	1.798	1.47	106
9-IN-JEF-007-R1	4	RNA	1.453	0.882	1.65	58.1
9-IN-JEF-007-R2	5	RNA	1.563	1.05	1.49	62.5
9-IN-JEF-007-R3	6	RNA	2.524	1.606	1.57	101

9차 실험에서 추출된 mRNA는 RT-PCR을 통해 확인되었으며, 확인 결과 Bb 18s rRNA primer 조건은 target size에서 band가 detection 되었다고 판단되었다(그림 49).

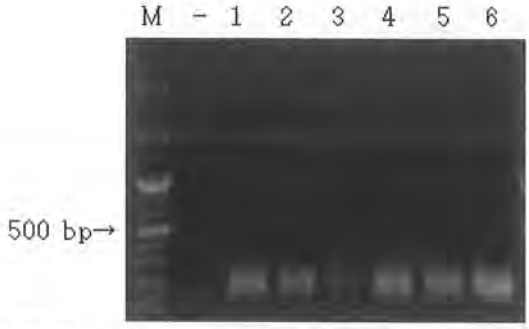


그림 49. RT-PCR을 통해 확인된 9차 mRNA 산물 (Bb 18s rRNA). M, 1 kb(+) marker; -, negative control; 1-3, JEF-007; 4-6, IN-JEF-007

Blast 결과, 모든 sample 이 *Beauveria* sp. 18S rRNA gene, partial sequence 로 확인되었다. 확인된 샘플은 일부를 제외하고 합친 후 Macrogen 에 송부하여 RNA-seq 분석을 의뢰하여 라이브러리제작을 진행하였다(표 34).

표 34. JEF-007, IN-JEF-007 blast 결과 (9차 실험)

ID #	Sample ID	Identification	ident (%)	260/280	Concentration (ng/ul)	비고
1	IN-JEF-007-R1	*Beauveria bassiana* ARSEF 2860 beta tubulin partial mRNA	99	1.47	46.1	
2	IN-JEF-007-R2	*Beauveria bassiana* ARSEF 2860 beta tubulin partial mRNA	99	1.58	324.6	
3	IN-JEF-007-R3	*Beauveria bassiana* ARSEF 2860 beta tubulin partial mRNA	99	1.53	102.1	
4	IN-JEF-007-R4	*Beauveria bassiana* ARSEF 2860 beta tubulin partial mRNA	98	1.57	180.6	
5	IN-JEF-007-R5	*Beauveria bassiana* ARSEF 2860 beta tubulin partial mRNA	99	1.43	476.1	
6	IN-JEF-007-R6	*Beauveria bassiana* ARSEF 2860 beta tubulin partial mRNA	98	1.58	22	폐기
7	IN-JEF-007-R7	일치결과 없음 .	-	1.65	412.1	폐기

3. Mapping/Annotation/DEG/KEEG 분석 수행

가. 실험 방법(cDNA 라이브러리 제작)

mRNA 또는 total RNA 중 DNA를 제거한 RNA fragment RNA 만을 얻기 위해 llumina TruSeq RNA Sample Preparation Kit가 사용되었다. RNA는 RT-PCR을 통해 cDNA로 합성되었으며, 합성된 cDNA의 양 말단에 adaptor가 부착되었다. Adaptor가 부착된 cDNA는 PCR 증폭을 통해 최종적으로 transcriptome을 위한 cDNA 라이브러리 제작이 진행되었다(그림 5).

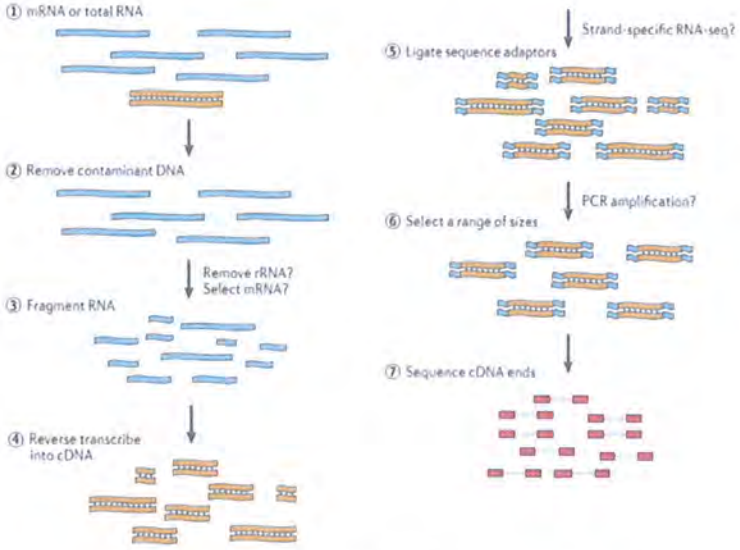


그림 50. cDNA 라이브러리 제작 모식도

나. 실험 결과 - 1 (Data processing)

B. bassiana JEF007, IN-JEF007의 transcriptome을 분석한 결과 확보된 total base는 10기가였으며, 그 중 확보된 read 수는 10메가로 확인되었다(표 35).

표 35. JEF007, IN-JEF007 transcriptome data processing. (a), Raw data; (b) Trimmed data.

(a) Raw data

Sample	Total bases	Read count	GC (%)	Q20 (%)	Q30 (%)
JEF007	10,710,550,858	106,045,058	54.63	98.33	95.21
IN-JEF007	10,796,396,414	106,895,014	53.83	98.47	95.65

(b) Trimmed data

Sample	Total bases	Read count	GC (%)	Q20 (%)	Q30 (%)
JEF007	10,387,049,187	103,840,666	54.67	99.02	96.42
IN-JEF007	10,473,970,743	104,521,974	53.94	99.09	96.74

다. 실험 결과 - 2

B. bassiana JEF007, IN-JEF007을 mapping한 결과, 120,348개의 contig를 확보하였으며, N50은 1,728 bp로 확인되었다(표 36).

표 36. JEF007, IN-JEF007 assembly 결과.

Sample	Merge	
	All transcrip congigs	Only longest isoform per 'gene'
Total trinity genes	120,348	120,348
Total trinity transcripts	141,619	120,348
Percent GC	53.11	53.01
N90	278	251
N80	425	331
N70	698	464
N60	1,131	691
N50	1,728	1,052
N40	2,556	1,575
N30	3,702	2,358
N20	5,128	3,685
N10	7,499	5,804
Maximum contig length	28,797	28,797
Minimum contig length	201	201
Median contig length	351.0	324.0
Average contig length	816.75	644.19
Total assembled bases	115,667,839	77,526,823

라. 실험 결과 - 3

JEF007, IN-JEF007 각 샘플별 Log2 (FPKM+1) 값을 사용하여 샘플간 유사도 정도 (Pearson's coefficient, 피어슨 상관계수)를 살펴봄으로써 반복 샘플의 재현성 여부를 확인한 결과, 상관 계수값이 0.81로 확인되었다(그림 51).

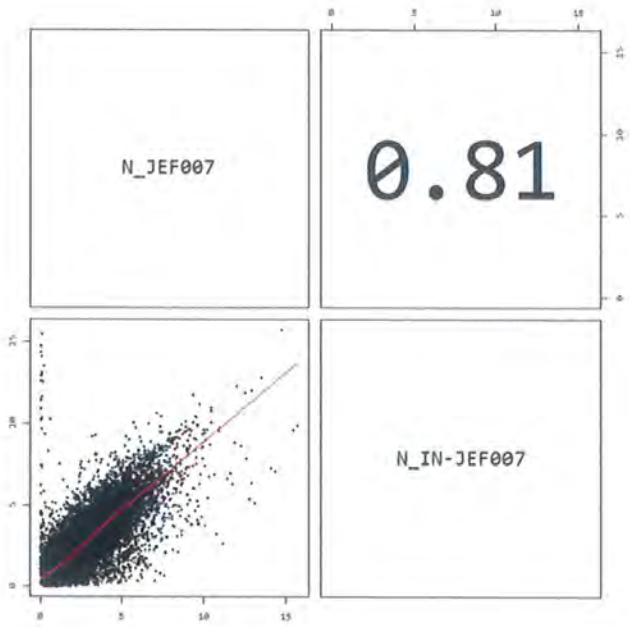


그림 51. JEF007, IN-JEF007 샘플간 유사도 정도 확인

마. 실험 결과 - 4

JEF007, IN-JEF007 각 샘플별 fold change 값을 기준으로 up, down contig의 개수를 비교한 결과, 2,689개의 contig가 upregulated 됨을 확인하였으며, 2,619개의 contig가 down regulated 되었음이 확인되었다 (그림 52).

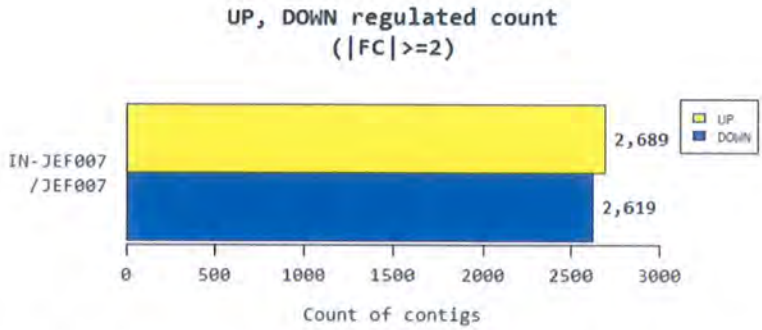


그림 52. JEF007, IN-JEF007 fold change 기준 up, down contig 수 비

바. 실험 결과 - 5

JEF007, IN-JEF007 간 contig 발현 값을 scatter plot으로 나타내면 그림 53과 같이 나타낼 수 있다. X축은 control, Y축은 test group의 nomalized value의 평균값을 나타내고 있다.

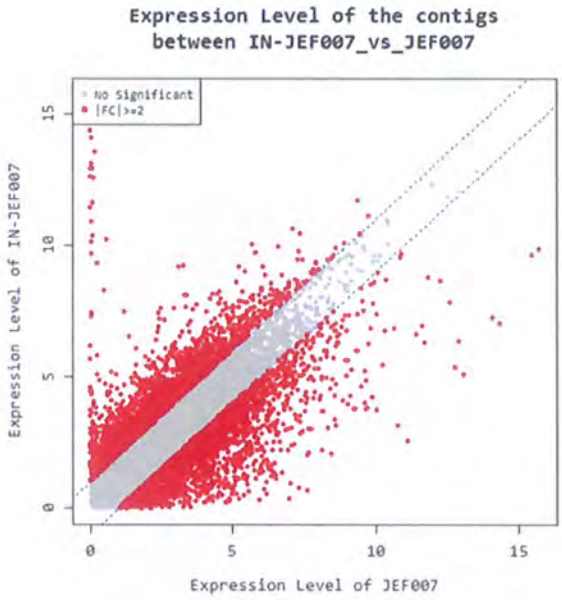


그림 53. JEF007, IN-JEF007 간 contig 발현 값 (Scatter plot)

사. 실험 결과 - 6

유의한 리스트에 대하여 각 샘플 별, contig 별 expression level(normalized value)를 이용하여 발현 정도가 유사한 샘플 및 contig를 Hierarchical Clustering analysis(Euclidean Method, Complete Linkage)를 통하여 그룹화 한 결과, 그림 54와 같이 분석되었다.

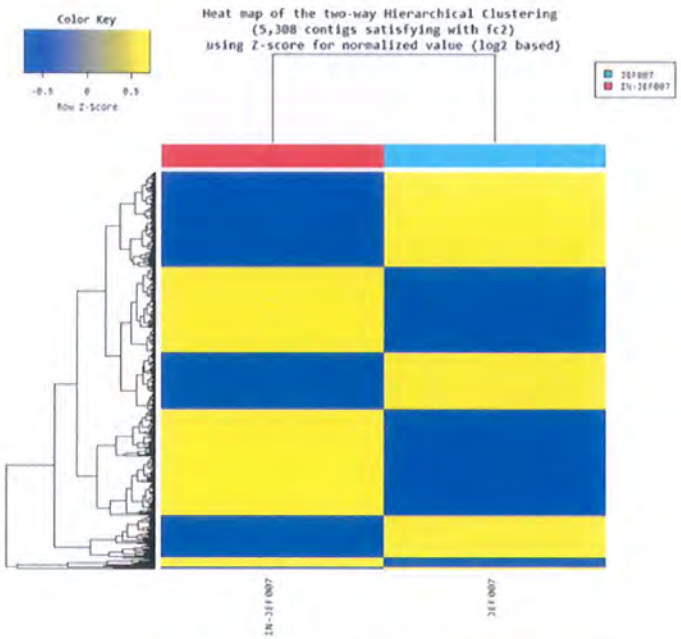


그림 54. JEF007, IN-JEF007 cluster 분석

2절. Comparative transcriptome 분석 및 up and down regulated 유전자군 분석

1. DEG 분석을 통하여 목적하는 유전자 분석 (FC based selection)

가. 실험 결과

Validation을 위한 유전자를 선발하고자, fold change 값이 7 이상인 유전자 리스트 중 병원성과 관련이 있다고 추정되어지는 상위 8개 유전자가 선발되었다(표 37).

표 37. FC>7 유전자 선발 및 validation 선발 유전자 리스트.

No.	Name	Fold change	IN-JEF007_FPKM	JEF007_FPKM	Annotation	Accession	E-Value	Identity (%)
*1	c130952_g1_i1	77.816523	175.67	1.88	hypothetical protein BBAD15_g6433	KGQ08242.1	0	97
*2	c157854_g1_i1	65.291349	647.76	10.38	LCCL domain-containing protein	XP_008598494.1	2E-124	98
3	c84209_g6_i1	60.64449	684.93	11.53	hypothetical protein BBAD15_g5426	KGQ09230.1	2E-63	96
*4	c131178_g1_i1	36.291989	84.26	2.28	hypothetical protein BBAD15_g5427	KGQ09231.1	0	97
5	c67443_g1_i2	34.578243	196.36	6.42	Acyl-CoA N-acyltransferase	XP_008601537.1	1E-139	97
6	c67443_g1_i1	32.073723	169.94	6.18	Acyl-CoA N-acyltransferase	XP_008601537.1	2E-132	97
7	c108621_g1_i1	28.002162	28.61	0.32	putative scytalone dehydratase	KGQ03476.1	1E-110	98
8	c71598_g2_i1	27.386912	286.46	11.78	Protein SNQ2	KGQ10332.1	0	99
*9	c71598_g1_i1	27.077396	140.95	6.24	ABC transporter	XP_008594422.1	0	98
*10	c88278_g3_i1	26.090197	288.16	12.47	Leptomycin B resistance protein pmd1	KGQ04521.1	0	98
*11	c84209_g2_i1	24.979816	196.39	9.09	ABC-2 type transporter	XP_008595100.1	0	99
12	c81694_g1_i1	22.735441	132.79	7.22	hypothetical protein BBA_04963	XP_008598282.1	2E-36	92
*13	c118131_g1_i1	22.218564	109.66	6.08	Cytochrome c peroxidase	KGQ05036.1	0	99
14	c81694_g1_i2	21.678719	60.27	3.07	hypothetical protein BBAD15_g7964	KGQ06714.1	4E-32	93
15	c133837_g1_i1	21.542704	17.21	0.01	hypothetical protein BBA_09835	XP_008603154.1	0	91
16	c84632_g1_i1	21.292592	17.7	0.07	hypothetical protein BBA_09687	XP_008603006.1	2E-64	72
17	c104432_g1_i1	21.180081	30.42	1	Transmembrane protein	KGQ06544.1	0	99

18	c157554_g1_i1	20.451801	1085.61	58.38	C-8 sterol isomerase	KGQ03820.1	4E-129	91
19	c28427_g1_i2	20.051106	93.73	5.83	protein phosphatase 2C	XP_008598543.1	0	95
*20	c20166_g1_i1	19.850449	16.02	0.04	chitinase-like protein	XP_008602924.1	9E-118	99
21	c158584_g1_i1	19.261284	205.96	12.36	Peroxisomal primary amine oxidase	KGQ09497.1	0	99
22	c88866_g9_i1	18.411239	21.87	0.64	Helix-loop-helix DNA-binding domain-containing protein	XP_008599550.1	0.000000002	96

2. 기존 연구내용 분석을 통한 선정 유전자의 특성 파악

가. 실험 결과

GO분석 결과 Molecular function과 관련된 유전자는 28.03%, Biological process와 관련된 유전자는 27.28%, Cellular component와 관련된 유전자는 18.15%, No hit 26.55%로 확인되었다. 기능적으로 분류하였을 때, Molecular function에서는 catalytic activity(34.73%)가, Cellular component에서는 unclassified(45.89%) 다음으로 cell part(24.88%)가, Biological process에서는 metabolic process(29.28%)와 관련된 유전자가 많이 발현되었음을 확인되었다(그림 55).

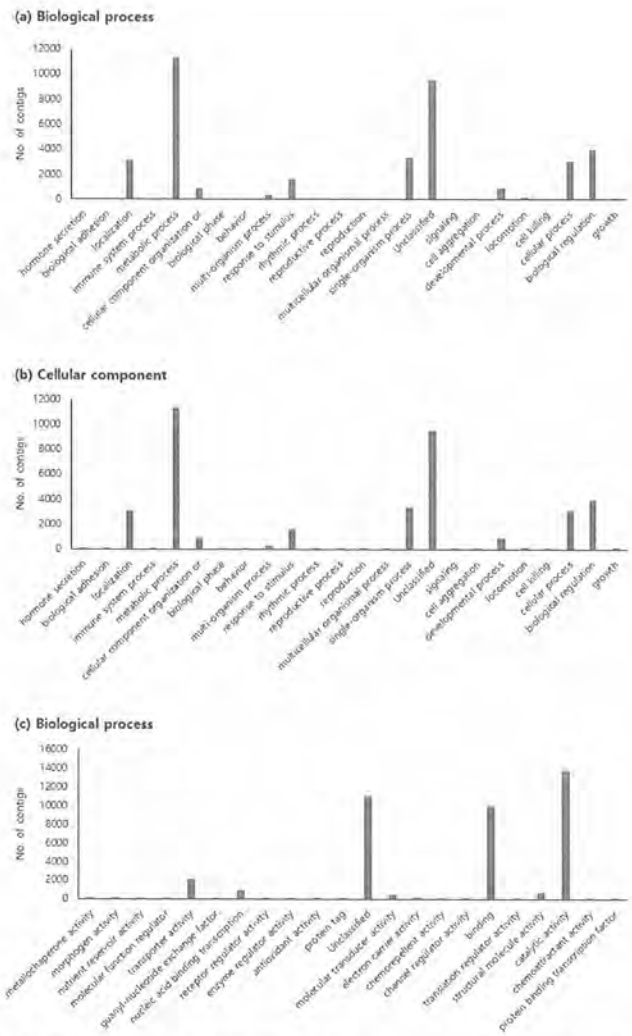


그림 55. JEF007, IN-JEF007 transcriptome GO 분석

3절. Validation을 통한 살충활성 기능성 유전자 분석 및 검증

1. RT-PCR/qRT-PCR을 위한 primer 검증

가. 실험 방법

qRT-PCR 진행을 위한 primer 제작은 snap dragon(http://www.flynai.org/snapdragon) 사이트를 이용하여 제작되었다.

나. 실험 결과

FC 7 이상인 유전자 중 병원성과 관련이 있다고 추정되어지는 8개의 유전자를 선발하여 qRT-PCR을 위한 primer 를 제작하였다(표 38).

표 38. 제작된 qRT-PCR용 primer 정보

Name	Primer (5'-3')		Product Size (-bp)
	Left	Right	
1- c130952_g1_i1	TGGTCTTGTGCTTGACGAAG	TTCTCTTCCCGTGGTCATTC	284
2- c157854_g1_i1	ATATCGAGCAGGATGTTGCC	TCATCAGTCGCACGCTTTAC	261
4- c131178_g1_i1	GAAGACGGATACCCCCAAAT	ACTGGCGACTAGAAGTCGGA	131
9- c71598_g1_i1	TGAACACCGAGGAGGAAATC	GGAATTGTCCCAGCAAAAGA	287
10- c88278_g3_i1	AACAAGACGGGTTCCTGTTG	CGACTAGACCCGACACCATT	235
11- c84209_g2_i1	GCTCACAGTTTCGCCTTTTC	CCGGCAAGATAGGTGTTTGT	234
13- c118131_g1_i1	CTCGGCTACTGGTTCTACCG	TTTCCTTGTCATAGGTGCCC	193
20- c20166_g1_i1	CTTTTCCTTCACGGCTCTTG	CTGCTAGCCCTGGAGTTGTC	184

2. RT-PCR/qRT-PCR을 통한 유전자의 발현 검증

제작된 primer를 이용하여 RT-PCR을 진행하여 target 유전자에 detection 되는지 여부를 확인하였다.

가. 실험 결과

RT-PCR 결과로 detection 된 다음의 primer가 선발되었으며(그림 56 , 표 39), 선발된 primer를 이용하여 qRT-PCR이 진행되었다.

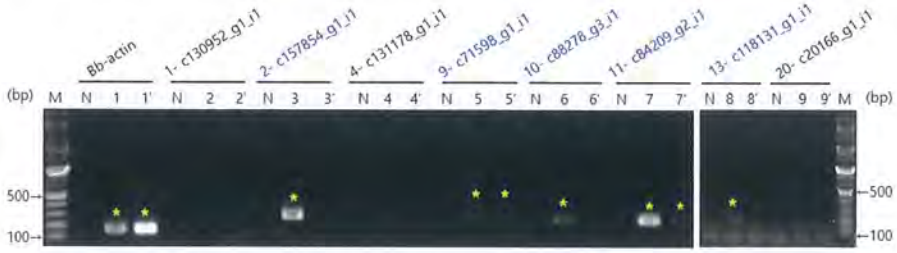


그림 56. 선발된 16개의 유전자에 대한 RT-PCR

표 39. 최종 선발된 qRT-PCR용 primer 정보

Name	Primer (5'-3')		Product Size (-bp)
	Left	Right	
2- c157854_g1_i1	ATATCGAGCAGGATGTTGCC	TCATCAGTCGCACGCTTTAC	261
9- c71598_g1_i1	TGAACACCGAGGAGGAAATC	GGAATTGTCCCAGCAAAAGA	287
10- c88278_g3_i1	AACAAGACGGGTTCCTGTTG	CGACTAGACCCGACACCATT	235
11- c84209_g2_i1	GCTCACAGTTTCGCCTTTTC	CCGGCAAGATAGGTGTTTGT	234
13- c118131_g1_i1	CTCGGCTACTGGTTCTACCG	TTTCCTTGTCATAGGTGCCC	193

다. RNA-seq 결과와 validation 결과의 비교 분석 (10개 내외의 유전자 분석)

가. 실험 방법

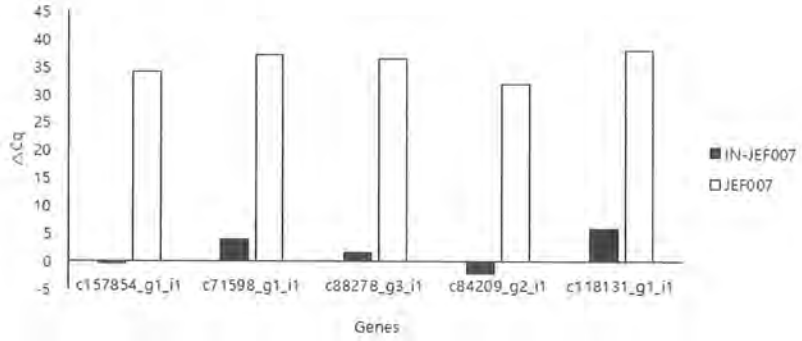
RT-PCR을 통해 band가 확인된 총 5개의 유전자를 이용하여 qRT-PCR 을 진행하였으며, 반응 조건은 다음과 같이 진행되었다(표 40). 본 실험은 3반복으로 진행되었다.

표 40. qRT-PCR 조건

초기변성	Cycle 수 : 39		융해곡선
95 ℃, 2 분	변성 : 95 ℃, 5 초	60 ℃, 15 초	Start: 65 ℃ End: 95 ℃ 0.5 ℃/5 초

나. 실험 결과

qRT-PCR 결과, 선발된 5개의 유전자들은 모두 JEF007 보다 IN-JEF007 에서 높은 발현을 나타내는 것으로 확인되었으며, 그 중에서 가장 높은 차이가 보이는 유전자는 c84209_g2_i1 (ABC-2 type transporter)으로 확인되었다(그림 57).



Genes	NR	IN-JEF007/JEF007.fc	IN-JEF007/JEF007.volume	N_JEF007	N_IN-JEF007	JEF007_FPKM	IN-JEF007_FPKM
c157854_g1_i1	LCCL domain-containing protein	65.291349	5.39961861	3.169646	9.19846598	10.38	647.76
c71598_g1_i1	ABC transporter	27.077396	4.2275783	2.471726	7.23074335	6.24	140.95
c88278_g3_i1	Leptomycin B resistance protein pmd1	26.090197	5.27661195	3.424644	8.13008028	12.47	288.16
c84209_g2_i1	ABC-2 type transporter	24.979816	4.76875641	2.982397	7.62508779	9.09	196.39
c118131_g1_i1	Cytochrome c peroxidase	22.218564	4.10346968	2.43669	6.91038375	6.08	109.66

그림 57. qRT-PCR을 이용한 JEF007, IN-JEF007에 대한 5가지 유전자 발현량 분석

4절. 총채벌레 살충성 진균의 작용기작 분석

1. 실험 방법

KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 분석은 KAAS - KEGG Automatic Annotation Server(http://www.genome.jp/tools/kaas/) 사이트를 이용하여, BBH(bi-directional best hit) 방법으로 제작되었다.

2. 실험 결과

KEGG 분석 결과 up regulated 된 유전자는 Matabolic pathway에서 172개의 유전자로 가장 많이 확인되었으며, down regulated 된 유전자 역시 Matabolic pathway에서 36개의 유전자로 가장 많이 확인되었다(그림 58).

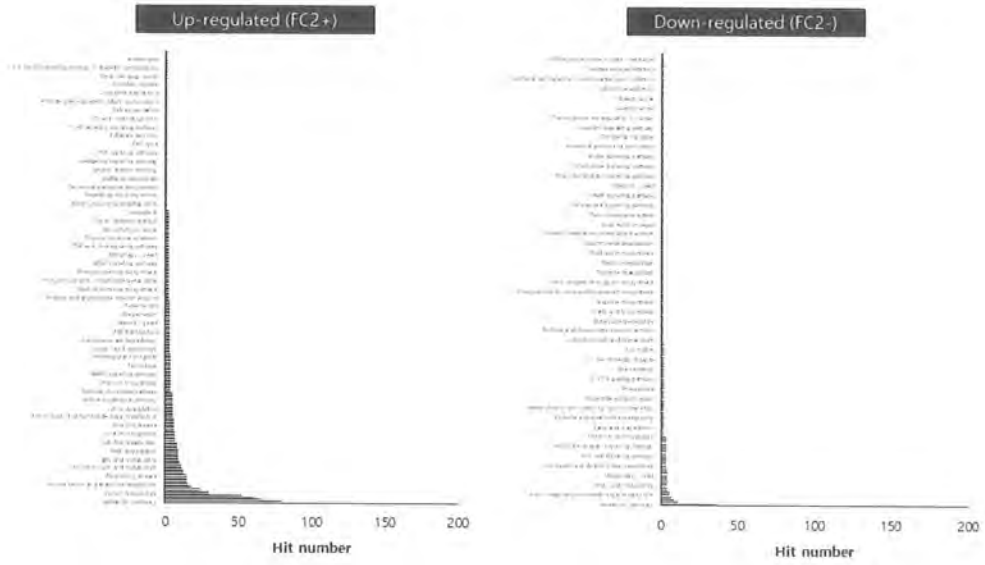


그림 58. JEF007, IN-JEF007 KEGG 분석

5절. *Beauveria bassiana* JEF-007 Whole genome sequencing 분석

1. Identity 분석결과에 따른 실험 유전자 선발

가. 실험 결과

Identity 분석 결과를 바탕으로 총 75개의 유전자를 선발하였으며, 선발 기준은 다음 표와 같이 진행되었다(표 41, 42).

표 41. Identity에 따라 선발된 유전자 수

identity 범위(%)	유전자 수
100	11
90≤ x <100	11
80≤ x <90	11
70≤ x <80	11
60≤ x <70	10
50≤ x <60	6
40≤ x <50	4
30≤ x <40	0
20≤ x <30	0
10≤ x <20	0

	0≤ x <10	0
	no hit	11
	total	**75**

표 42. Identity에 따라 선발된 유전자 정보

No.	Name	Length	Description	Identify (%)
1	B. bassiana00009843-RA protein	203	cytochrome c oxidase polypeptide IV	100
2	Bbassiana00008123-RA protein	782	Dynamin, GTPase domain-containing protein	100
3	Bbassiana00008353-RA protein	163	succinate dehydrogenase cytochrome b subunit	100
4	Bbassiana00000758-RA protein	101	G-protein coupled receptor	100
5	Bbassiana00002242-RA protein	250	malate dehydrogenase	100
6	Bbassiana00007415-RA protein	203	ATP synthase H chain	100
7	Bbassiana00005431-RA protein	577	aminopeptidase I zinc metalloprotease	100
8	Bbassiana00006603-RA protein	209	NADPH-dependent FMN reductase family protein	100
9	Bbassiana00009437-RA protein	584	NADH dehydrogenase	100
10	Bbassiana00003787-RA protein	197	heat shock protein 30	100
11	Bbassiana00004365-RA protein	289	superoxide dismutase	100
12	Bbassiana00004502-RA protein	231	glutathione S-transferase II	94
13	Bbassiana00010095-RA protein	446	malate dehydrogenase, putative	93
14	Bbassiana00006175-RA protein	303	NADH-cytochrome b-5 reductase	93
15	Bbassiana00001287-RA protein	745	hormone-sensitive lipase	92
16	Bbassiana00010590-RA protein	252	Hsp70 family chaperone	92
17	Bbassiana00006462-RA protein	350	FAD binding domain protein	92
18	Bbassiana00005233-RA protein	598	C6 transcription factor	92
19	Bbassiana00006769-RA protein	194	nitrogen assimilation transcription factor nirA	92
20	Bbassiana00003877-RA protein	1202	peptidase family M1	92
21	Bbassiana00004476-RA protein	553	RNA recognition domain-containing protein	92
22	Bbassiana00004590-RA protein	500	MAK1-like monooxygenase	91
23	Bbassiana00005217-RA protein	482	lipase/esterase	88
24	Bbassiana00000569-RA protein	640	dipeptidyl peptidase III	87
25	Bbassiana00005786-RA protein	292	trypsin-like protein	86
26	Bbassiana00010570-RA protein	403	galactonate dehydratase	86
27	Bbassiana00005539-RA protein	252	carbohydrate esterase family 3	86

28 Bbassiana00005635-RA protein	532	glucuronyl hydrolase	86
29 Bbassiana00005653-RA protein	186	protein kinase	84
30 Bbassiana00001250-RA protein	105	trypsin-like protease	83
31 Bbassiana00000010-RA protein	181	GTP-binding protein	83
32 Bbassiana00005341-RA protein	572	carbon-nitrogen hydrolase	81
33 Bbassiana00009748-RA protein	233	metalloprotease-like protein	80
34 Bbassiana00008713-RA protein	823	subtilase-like protein	79
35 Bbassiana00003400-RA protein	190	Trypsin-related protease	79
36 Bbassiana00008331-RA protein	62	serine proteinase-like protein	78
37 Bbassiana00001490-RA protein	357	chymotrypsin-like protein	76
38 Bbassiana00008961-RA protein	175	chitinase-like protein	75
39 Bbassiana00006066-RA protein	339	deuterolysin metalloprotease	74
40 Bbassiana00010539-RA protein	391	eukaryotic aspartyl protease	73
41 Bbassiana00008515-RA protein	233	vegetative incompatibility protein HET-E-1	73
42 Bbassiana00010498-RA protein	451	aminotransferase class-III	72
43 Bbassiana00009583-RA protein	211	alpha-galactosidase C	72
44 Bbassiana00008590-RA protein	601	metalloprotease 1	72
45 Bbassiana00000331-RA protein	605	NADP(+) coupled glycerol dehydrogenase	69
46 Bbassiana00005983-RA protein	88	UTP-ammonia ligase	68
47 Bbassiana00006070-RA protein	923	LysM domain-containing protein	68
48 Bbassiana00010533-RA protein	1251	sex-determining protein fem-1	66
49 Bbassiana00010814-RA protein	202	cholera enterotoxin subunit A2	66
50 Bbassiana00003263-RA protein	359	F-box and WD domain-containing protein	64
51 Bbassiana00001733-RA protein	279	efflux pump antibiotic resistance protein	63
52 Bbassiana00006109-RA protein	289	signal sequence receptor alpha subunit	63
53 Bbassiana00006798-RA protein	275	metalloproteinase, putative	63
54 Bbassiana00008978-RA protein	435	kynurenine 3-monooxygenase	62
55 Bbassiana00008518-RA protein	1136	sex-determining protein fem-1	59
56 Bbassiana00005082-RA protein	291	peptidase C14	55
57 Bbassiana00010246-RA protein	278	metalloprotease-like protein	54
58 Bbassiana00010582-RA protein	291	MFS gliotoxin efflux transporter GliA	53
59 Bbassiana00008980-RA protein	689	basic proline-rich protein	52
60 Bbassiana00009760-RA protein	117	oxidoreductase-like protein	51

61	Bbassiana00008492-RA protein	185	ATP synthase F0	48
62	Bbassiana00001328-RA protein	109	zinc finger protein	46
63	Bbassiana00009288-RA protein	98	siderophore iron transporter mirA	44
64	Bbassiana00005681-RA protein	323	metalloprotease-like protein	41
65	Bbassiana00000014-RA protein	435	No hit	
66	Bbassiana00000352-RA protein	276	No hit	
67	Bbassiana00000683-RA protein	402	No hit	
68	Bbassiana00001201-RA protein	687	No hit	
69	Bbassiana00004442-RA protein	318	No hit	
70	Bbassiana00005147-RA protein	577	No hit	
71	Bbassiana00006342-RA protein	249	No hit	
72	Bbassiana00007702-RA protein	366	No hit	
73	Bbassiana00009260-RA protein	220	No hit	
74	Bbassiana00010029-RA protein	592	No hit	
75	B.bassiana00010854-RA protein	318	No hit	

2. 선발된 유전자를 이용한 JEF-007 과 ARSEF2860 간 유전자 서열 비교(DNA/RNA)

가 JEF-007과 ARSEF2860 간 유전자 서열 비교를 위한 primer 제작

(1) 실험 결과

선발된 75개의 유전자 sequence 정보를 바탕으로 primer를 제작하였으며, 그 정보는 다음과 같다(표 43).

표 43. JEF-007과 ARSEF2860 간 유전자 서열 비교를 위한 primer 정보

No	Name	primer name	Primer	
			F	R
			sequence (5'-3')	sequence (5'-3')
1	B.bassiana0000984 3-RA protein	WGS-JEF00 7-9843	TGTTCATGCAACGTACAGTCA	TCATCGGTAGCGGTACTCG
2	B.bassiana0000812 3-RA protein	WGS-JEF00 7-8123	GAGGACCTGCTCATCACAGT	AGCACCTCGCCAATTATCTT
3	B.bassiana0000835 3-RA protein	WGS-JEF00 7-8353	GCATTTCTACTACGCAAGCTC	CAAAGGCGAGGTAGAGAGTG
4	B.bassiana0000075 8-RA protein	WGS-JEF00 7-758	GTCAACGATGGCTCTGATCT	TCCACTCGAATATAAAGGCTTG
5	B.bassiana0000224 2-RA protein	WGS-JEF00 7-2242	TGCTTTCCAAGTCCTTCATC	AAACCAGTACGTGGCAGTGT
6	B.bassiana0000741 5-RA protein	WGS-JEF00 7-7415	GCAGACGAGGAGCTTCATT	CGGCGTCCTCCTCCTC

7	B.bassiana0000543 1-RA protein	WGS-JEF00 7-5431	TCCTTCACCAGCTTCACCTA	CCACTCATTGTCCACCTTCTC
8	B.bassiana0000660 3-RA protein	WGS-JEF00 7-6603	GAAAGACCATTGCCCTCATC	CTATTTGGTCGCGGGCT
9	B.bassiana0000943 7-RA protein	WGS-JEF00 7-9437	GTTGCCAGGACCTTTTCC	CAGTCGAGGATAACCAGAACACG
10	B.bassiana0000378 7-RA protein	WGS-JEF00 7-3787	CCATCGTCCTTTTCACCTTT	TTAGTTGATAGCAATGCGTCG
11	B.bassiana0000436 5-RA protein	WGS-JEF00 7-4365	ATGTTTCGCTCCCGGTTA	TATTGGGCATCCTTGAGGG
12	B.bassiana0000450 2-RA protein	WGS-JEF00 7-4502	GTCTCTTCAGCCCATTACCA	TTACAGGCCATAAGTCTTCTTGAC
13	B.bassiana0001009 5-RA protein	WGS-JEF00 7-10095	TGCCTACAGAGAAGCAATCC	CCACTTGCCAATGTCATATCT
14	B.bassiana0000617 5-RA protein	WGS-JEF00 7-6175	GACGAAGTTGCGACATTTAGA	ACTTTACACACGCAGCATCA
15	B.bassiana0000128 7-RA protein	WGS-JEF00 7-1287	CCTCTGGAGCGTCTACCTG	CAGCAAGTCATCTGTGCTCT
16	B.bassiana0001059 0-RA protein	WGS-JEF00 7-10590	ATGGGCGATTCATCCGTT	CTATGAGCTTGCGTCAGTAGACTC
17	B.bassiana0000646 2-RA protein	WGS-JEF00 7-6462	GACGCAAGCTACGATGAGAT	CTGTTCCAAGCAAACCAAAC
18	B.bassiana0000523 3-RA protein	WGS-JEF00 7-5233	ATGGATCGGGGTGAGGTG	GCAAAAGTCCCCTAAACACA
19	B.bassiana0000676 9-RA protein	WGS-JEF00 7-6769	GTTATTCAGGCCATTCATCCG	GACACCTGCCTCATTTCATC
20	B.bassiana0000387 7-RA protein	WGS-JEF00 7-3877	TAAGGGTAATTCTGTCTGCCAT	GACTTTTCCCTCTTCCTCCA
21	B.bassiana0000447 6-RA protein	WGS-JEF00 7-4476	TTCATTGTTAGCCTCTTCCAA	TCATTTGCCTGATTTTTTCTTCC
22	B.bassiana0000459 0-RA protein	WGS-JEF00 7-4590	GCTTACACGTCCTCATCGTC	GGTAGATGCAACCTTTCTGC
23	B.bassiana0000521 7-RA protein	WGS-JEF00 7-5217	ATGGCGTCGATACTGAGCA	TCAAGAGATGTGCAAATTTATCC
24	B.bassiana0000056 9-RA protein	WGS-JEF00 7-569	ACGAGTTATGCTCCTGCACTT	CTAAATGTTCCTTTCGGCCC
25	B.bassiana0000578 6-RA protein	WGS-JEF00 7-5786	GCTCTCAAGGCTGCTGTTAC	CGTTGGAAGCAGAACCAATA
26	B.bassiana0001057 0-RA protein	WGS-JEF00 7-10570	GCAAAATCACCGACATCAA	GATGAAGCCTGGAGACACC
27	B.bassiana0000553 9-RA protein	WGS-JEF00 7-5539	CCTCGGTACTTCATCTGCAA	TCAGTCCCGGGTCAACTGA
28	B.bassiana0000563 5-RA protein	WGS-JEF00 7-5635	ACAGTGCCGACTACTGCTTC	ATAGCCAAACTGCAGCAATC
29	B.bassiana0000565 3-RA protein	WGS-JEF00 7-5653	ATGCCTAAGGATTTGGGAAC	TTTCAACTGCCGGACAATCC

30	B.bassiana0000125 0-RA protein	WGS-JEF00 7-1250	ATGGTGCCCAAAGCTAGTC	CCCTCACGACCCTACTTTTA
31	B.bassiana0000001 0-RA protein	WGS-JEF00 7-10	GAGGATCGAAAAATGTCCAG	TGACACATTTGCTCTCCTCA
32	B.bassiana0000534 1-RA protein	WGS-JEF00 7-5341	GGAGGTCGAAACCAATATGA	GATGAAGCAGCCCATGAC
33	B.bassiana0000974 8-RA protein	WGS-JEF00 7-9748	TCCAACGGATTAAGGGACTA	AAATGCGCCGTATGGAGT
34	B.bassiana0000871 3-RA protein	WGS-JEF00 7-8713	GTCGACTTTGGTCCTAGCTG	GCCCACTTGCACTCTTCG
35	B.bassiana0000340 0-RA protein	WGS-JEF00 7-3400	AGGCTGCTATTTCCCTCACT	AAAGAAACCGCCTCCACTAT
36	B.bassiana0000833 1-RA protein	WGS-JEF00 7-8331	TCCGCCGCGCTCTC	CTATACCTTGAAATTGGCGGCC
37	B.bassiana0000149 0-RA protein	WGS-JEF00 7-1490	TGTTGCACTTGCGTCTGTAT	TTCTTTATCTTTTCATCGGCG
38	B.bassiana0000896 1-RA protein	WGS-JEF00 7-8961	GCCATTGAGACTGTTGCTCT	ATTATACGGCTCTCCGCTTG
39	B.bassiana0000606 6-RA protein	WGS-JEF00 7-6066	TGCCGCTACTATTCCTGCTA	TCAAAGCTCAAAGCCAAATC
40	B.bassiana0001053 9-RA protein	WGS-JEF00 7-10539	GTTTCTGCGACCTTTCTCTG	GGAGGAGGACGTACCAGATT
41	B.bassiana0000851 5-RA protein	WGS-JEF00 7-8515	GAGCGAATGGAGTAAGCACT	TCATCCCTGTCGGTCCTC
42	B.bassiana0001049 8-RA protein	WGS-JEF00 7-10498	ATGAAACCGGCTCACAGC	TCACTTGGAAGCTCTCTGATT
43	B.bassiana0000958 3-RA protein	WGS-JEF00 7-9583	GATTTCCAGTGACAGCATGA	TCAACATGCATAATAGGTGCC
44	B.bassiana0000859 0-RA protein	WGS-JEF00 7-8590	AATCCTACCCTTCCTCGTCT	GTGAACCAACTTGGGCTCGT
45	B.bassiana0000033 1-RA protein	WGS-JEF00 7-331	GTCCAAGATTTCGGTCAGTG	CAGGACTTGCTGGACTGTCT
46	B.bassiana0000598 3-RA protein	WGS-JEF00 7-5983	TGCCTCGTTTCAGCCGA	GCTTCTTCTTCTCTTCGCTGT
47	B.bassiana0000607 0-RA protein	WGS-JEF00 7-6070	ATACAGACGCCATCCAAAAG	GAGGTTGAGAGTCATGGCG
48	B.bassiana0001053 3-RA protein	WGS-JEF00 7-10533	GTCGGCCAAAGACTGTTTTC	TCATTTATTTTATTTTCGTGTCG
49	B.bassiana0001081 4-RA protein	WGS-JEF00 7-10814	GACTTGAATGACTCTGGATTCAG	CTCTGTGACATTGATTCTTATCCAG
50	B.bassiana0000326 3-RA protein	WGS-JEF00 7-3263	CTGGCTTTTTTGGCACTGC	TCACACGGTGCGTTTACTT
51	B.bassiana0000173 3-RA protein	WGS-JEF00 7-1733	CCAGGTGACGGCTACACTAC	CTGAGAATTAGCGACGAGGA
52	B.bassiana0000610 9-RA protein	WGS-JEF00 7-6109	ATGGTTCTGTGGCGATTACA	CCTATCGCTTTCCATCAGAA

53	B.bassiana0000679 8-RA protein	WGS-JEF00 7-6798	ATGGGCAAGGGTATTACGC	GCGTTGTTTCTCGACTTTACCG
54	B.bassiana0000897 8-RA protein	WGS-JEF00 7-8978	ATGACGCGGCCACAGAAA	ACAGCCCCGCATAACTTT
55	B.bassiana0000851 8-RA protein	WGS-JEF00 7-8518	CATCGTTATTCTCGCGTCTT	AGGGTTCGAGTAGCAGCTTA
56	B.bassiana0000508 2-RA protein	WGS-JEF00 7-5082	ACGCTCTTTTCGCCTTTATGAAT	TTTAACCGCTCTCCACTCAC
57	B.bassiana0001024 6-RA protein	WGS-JEF00 7-10246	TGTCGCTGTGCTGGCTG	TGTGGTCCATGTAGTTCGTG
58	B.bassiana0001058 2-RA protein	WGS-JEF00 7-10582	GCATGGAACTCGTCTCAAGT	CCTCTGGAGCTCGTTTTGTA
59	B.bassiana0000898 0-RA protein	WGS-JEF00 7-8980	GCCTGCTATTCCTCAACACA	CTATCCGTTAGCCAGTTCCA
60	B.bassiana0000976 0-RA protein	WGS-JEF00 7-9760	CGAAATCTTTGTCTCCGAGT	TACGACGAAACCTCTTTTCATA
61	B.bassiana0000849 2-RA protein	WGS-JEF00 7-8492	ATGACCAGCCTCTCCGTC	CCCCACACAACCCAGCATA
62	B.bassiana0000132 8-RA protein	WGS-JEF00 7-1328	TATGACACCGAAAGGCTCAT	TTACGTCTCCTTGCCTTGAG
63	B.bassiana0000928 8-RA protein	WGS-JEF00 7-9288	CTAATCGGCACCGTGATG	CTCTTCTCCTTGCTCCTTCC
64	B.bassiana0000568 1-RA protein	WGS-JEF00 7-5681	ATGTACTATAGCGGCTGCGG	CTACTGCATCCCCATTATGTCAT
65	B.bassiana0000001 4-RA protein	WGS-JEF00 7-14	GAAGCTCGAGTCCAGCAC	ATACAGCGTGCCCTTCATCT
66	B.bassiana0000035 2-RA protein	WGS-JEF00 7-352	ATGCTCAACCATTCTCTACCAG	TCATTTGAGCTGCCGGG
67	B.bassiana0000068 3-RA protein	WGS-JEF00 7-683	CTCGTCGTCTAGTGCCTGTAG	GCGAGGAAGAGTTTGAAGAG
68	B.bassiana0000120 1-RA protein	WGS-JEF00 7-1201	CTCTCCCTCCTCCTCCTCTA	CGTGACTACACCAGCAACAC
69	B.bassiana0000444 2-RA protein	WGS-JEF00 7-4442	ATTCGCGAGCGACAAAATA	TCACCTTCCTTGCCCTTT
70	B.bassiana0000514 7-RA protein	WGS-JEF00 7-5147	TCATACGACCTGCCTCCCT	ACCGATCTGCGATATTGAAA
71	B.bassiana0000634 2-RA protein	WGS-JEF00 7-6342	CACCGCTGGTTCTGGTAG	CCGATCCATCCATCCTCT
72	B.bassiana0000770 2-RA protein	WGS-JEF00 7-7702	CGTTTACTTGATCTCGAGCAG	GGCATCTCTGGTCCTGTTTA
73	B.bassiana0000926 0-RA protein	WGS-JEF00 7-9260	GCCAGGCACGTCACAATA	CTACACCACCGCGTGCC
74	B.bassiana0001002 9-RA protein	WGS-JEF00 7-10029	AAACAGCCACGGAACGG	TCATCGGTAGCGGTACTCG
75	B.bassiana0001085 4-RA protein	WGS-JEF00 7-10854	ATTCGCGAGCGACAAAATA	TCACCTTCCTTGCCCTTT

나. Genomic DNA 추출

(1) 실험 방법

B. bassiana JEF-007, ARSEF2860 균주는 ¼ SDA (Difco) 배지에서 27℃, 7일간 배양되었으며, 배양된 배지에서 균사가 많은 부분을 1x1 cm 로 긁어내 1.5 ml tube에 extraction buffer (1 M KCl, 100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA) 400 μℓ와 함께 넣고 30초씩 3회 반복하여 마쇄되었다. 마쇄액은 4℃에서 10,000 rpm으로 6 분간 원심분리 후, 상층액 350 ul와 isopropanol 300 ul를 혼합한 다음, 다시 4℃에서 13,000 rpm으로 10분간 원심분리를 진행하여, DNA를 침전시켰다. 침전물을 70% 에탄올로 세척하고 건조한 후 50 ul EB buffer에 용해되었다.

다. PCR 검정

(1) 실험 방법

PCR기기를 사용하여 다음과 같은 조건에서 증폭하였다. 처음에 94℃에서 3분, 94℃ 30초, 61℃ 30초, 74℃ 30초를 30회 실시하였고, 최종적으로 74℃에서 3분간 post maturation 시켰다. Internal control로써 Bb 18srRNA-forward primer의 염기서열은 5' -TTA CGT CCC TGC CCT TTG TA- 3'이고, 18srRNA-reverse primer의 염기서열은 5`-CCA ACG GAG ACC TTG TTA CG-3`가 사용되었다. 앞선 표 3에서 제작된 primer를 통해 75개의 유전자는 증폭되었다. PCR산물의 전기영동은 0.8% agarose gel + Ecodye (Biofact)를 사용하여 140 V로 25분 실시한 후 사진 촬영이 진행되었다.

(2) 실험 결과

Internal control로써 Bb 18srRNA primer를 이용하여 PCR을 진행한 결과, target size에서 모든 gDNA sample이 detection 되었다고 판단되었다(그림 59).

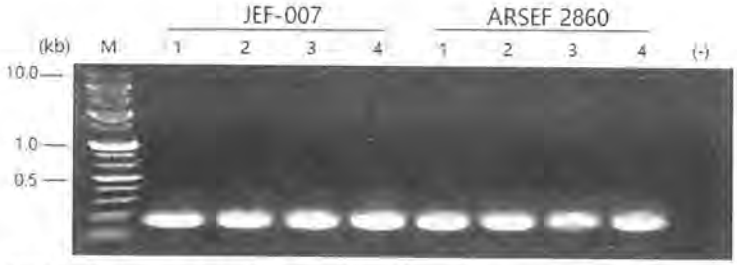


그림 59. *B. bassiana* JEF-007과 ARSEF2860 균주의 gDNA를 Bb 18s rRNA primer를 이용하여 PCR 검정

75개의 유전자를 target하는 primer를 통해 PCR 검정한 결과, JEF-007 과 ARSEF2960에서 모두 증폭되는 primer는 39개로 확인되었으며(그림 60), 이를 리스트화 하면 다음 표와 같다(표 44)

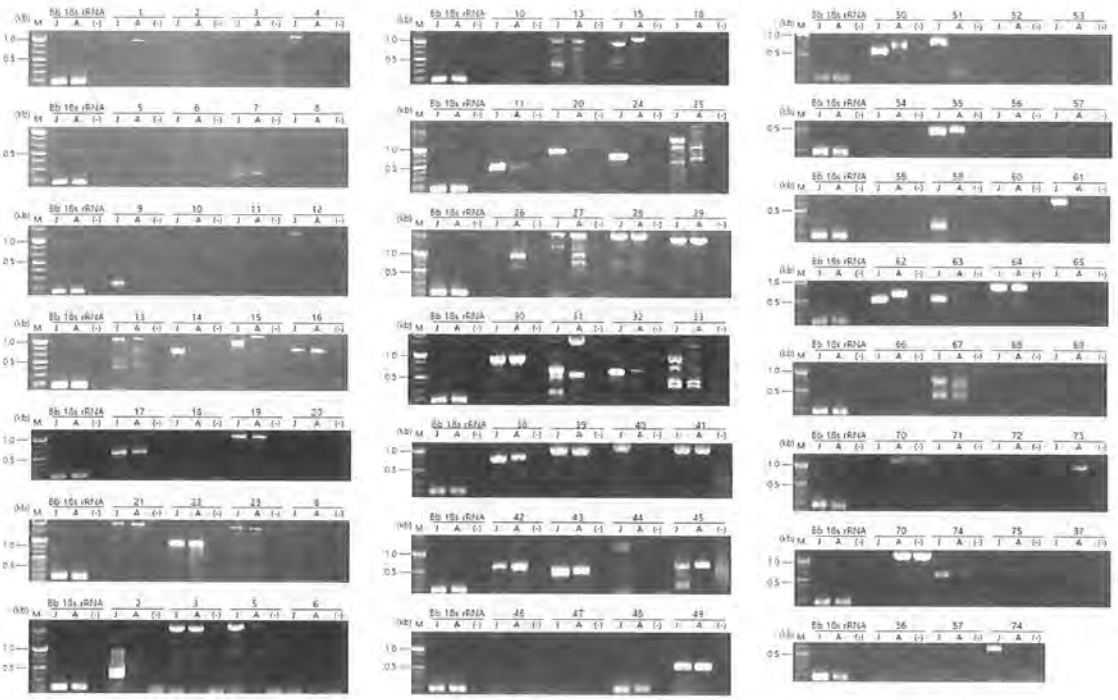


그림 60. 75개 primer를 이용한 JEF-007, ARSEF2860 PCR 검정

표 44. PCR 검정을 통해 선발된 39개의 유전자 리스트

No.	Name	primer name	Tm (℃)	size	Identity (%)
1	B.bassiana00000010-RA protein	10	55	525	83
3	B.bassiana00000331-RA protein	331	58	1720	69
5	B.bassiana00000569-RA protein	569	58	1914	87
7	B.bassiana00000758-RA protein	758	57	271	100
11	B.bassiana00001328-RA protein	1328	58	294	46
13	B.bassiana00001733-RA protein	1733	58	774	63
15	B.bassiana00003263-RA protein	3263	58	1052	64
16	B.bassiana00003400-RA protein	3400	58	527	79
17	B.bassiana00003787-RA protein	3787	57	558	100
19	B.bassiana00004365-RA protein	4365	57	867	100
21	B.bassiana00004476-RA protein	4476	57	1648	92
22	B.bassiana00004502-RA protein	4502	57	694	94
23	B.bassiana00004590-RA protein	4590	57	1481	91
25	B.bassiana00005147-RA protein	5147	57	1702	No hit
27	B.bassiana00005233-RA protein	5233	58	1768	92
28	B.bassiana00005341-RA protein	5341	57	1677	81
29	B.bassiana00005431-RA protein	5431	57	1647	100
30	B.bassiana00005539-RA protein	5539	58	709	86
31	B.bassiana00005635-RA protein	5635	58	1566	86
32	B.bassiana00005653-RA protein	5653	58	555	84
33	B.bassiana00005681-RA protein	5681	58	972	41
34	B.bassiana00005786-RA protein	5786	58	857	86
36	B.bassiana00006066-RA protein	6066	58	985	74
38	B.bassiana00006109-RA protein	6109	57	751	63
39	B.bassiana00006175-RA protein	6175	57	881	93

41	B.bassiana00006462-RA protein	6462	58	1036	92
42	B.bassiana00006603-RA protein	6603	58	617	100
43	B.bassiana00006769-RA protein	6769	57	501	92
44	B.bassiana00006798-RA protein	6798	58	798	63
45	B.bassiana00007415-RA protein	7415	57	575	100
48	B.bassiana00008331-RA protein	8331	60	170	78
49	B.bassiana00008353-RA protein	8353	57	459	100
50	B.bassiana00008492-RA protein	8492	57	553	48
62	B.bassiana00009748-RA protein	9748	57	643	80
63	B.bassiana00009760-RA protein	9760	57	302	51
64	B.bassiana00009843-RA protein	9843	58	611	100
67	B.bassiana00010246-RA protein	10246	57	824	54
70	B.bassiana00010539-RA protein	10539	57	1146	73
73	B.bassiana00010590-RA protein	10590	58	759	92

라. Sequencing을 통한 확인

(1) 실험 방법

PCR 산물은 QIAquick PCR purification kit (QIAGEN)를 이용하여 다음과 같은 과정을 따라 purification이 진행 되었다. PB와 PCR 산물을 5:1 volume으로 혼합한 후, QiAquick spin column에 옮겨, 13,000 rpm으로 1분간 원심분리한 후 상층액을 제거하였다. 그 후 700 ul PE buffer 넣고 5분 기다린 후 13,000 rpm으로 1분간 원심분리를 2회 반복하였다. Spin column 에 남아있는 용액을 1.5 ml E-tube로 옮긴 후 50 ul EB를 넣고 5분 기다린 후 또다시 13,000 rpm으로 1분간 원심분리를 2회 반복하였다. 최종적으로 얻어진 산물은 4℃에 보관되었다. 최종적으로 얻어진 purification 산물은 마크로젠(http://dna.macrogen.com/kor/)에 보내 시퀀싱 의뢰를 진행되었다.

3. JEF-007과 ARSEF2860에서 100% Identity를 갖는 유전자 선발 및 qRT-PCR primer 제작

가. 높은 identity를 갖는 유전자 선발

(1) 실험 결과

Sequence 분석 결과를 바탕으로 JEF-007 WGS 염기서열과 JEF-007 PCR 염기서열, 그리고 ARSEF2860 PCR 염기서열의 DNA sequence를 비교하였으며, qRT-PCR 진행을 위해 identity가 높은 유전자 16개를 선발하였다(표 45).

표 45. JEF-007, ARSEF2860의 유전자 sequencing 결과

Name	Length	Description	Identity (%)
B.bassiana00003787	197	heat shock protein 30	100
B.bassiana00006603	209	NADPH-dependent FMN reductase family protein	100
B.bassiana00008353	163	succinate dehydrogenase cytochrome b subunit	100
B.bassiana00009843	203	cytochrome c oxidase polypeptide IV	100
B.bassiana00004502	231	glutathione S-transferase II	94
B.bassiana00006175	303	NADH-cytochrome b-5 reductase	93
B.bassiana00006462	350	FAD binding domain protein	92

B.bassiana00006769	194	nitrogen assimilation transcription factor nirA	92
B.bassiana00010590	252	Hsp70 family chaperone	92
B.bassiana00005786	292	trypsin-like protein	86
B.bassiana00000010	181	GTP-binding protein	83
B.bassiana00008331	62	serine proteinase-like protein	78
B.bassiana00008961	175	chitinase -like protein	75
B.bassiana00006066	339	deuterolysin metalloprotease	74
B.bassiana00010539	391	eukaryotic aspartyl protease	73
B.bassiana00006109	289	signal sequence receptor alpha subunit	63

나. mRNA 추출

(1) 실험 방법

B. bassiana JEF-007, ARSEF2860 균주 샘플에 300 ul Isol-RNA Lysis Reagent (5prime)을 넣고 homogenizer를 이용하여 마쇄되었다. 마쇄액에 700 ul 의 Isol-RNA Lysis Reagent를 추가로 넣고 상온에서 5분간 기다린 후, 200 ul chloroform (99.5%, Daejung)을 넣고 vortexing을 진행하였다. 12,000 rpm으로 15 분간 4℃ 조건에서 원심분리 후, 상층액 500 ul와 Isopropanol (Emsure) 500 ul를 혼합한 다음, 다시 4℃에서 13,000 rpm으로 10분간 원심분리를 진행하였다. 상층액을 버린 tube에 70% ethanol(Absolute, Daejung)을 1 ml 넣었다가 버려주었다. 7,500 rpm, 4℃에서 5분간 원심분리 후 남아있는 70% ethanol은 모두 제거되었다. RNA pellet을 vacuum으로 30℃에서 5분간 말려주었다. 건조된 RNA pellet에 30 ul Dnase/Rnase-Free Distilled Water로 녹여준 뒤, ice에서 10분, 60℃ heating block에서 10분간 처리되었다. 최종적으로 얻어진 RNA 샘플은 7,500 rpm, 4℃에서 5분간 원심분리 후 −70℃에 보관되었다.

다. mRNA 정량

(1) 실험 방법

추출된 mRNA는 spectrophotometer (ACGene, ASP-2680)을 이용해 정량되었다.

(2) 실험 결과

추출된 JEF-007, ARSEF2860 mRNA 정량값은 다음과 같이 측정되었다(표 46).

표 46. JEF-007, ARSEF2860 mRNA 정량값

Sample ID	ID#	Sample Type	Abs260	Abs280	260/280	Concentration (ng/ul)
JEF-007-1	1	RNA	2.188	1.279	1.71	87.5
JEF-007-2	2	RNA	5.7	3.586	1.59	228
ARSEF 2860-1	3	RNA	1.594	0.933	1.71	63.8
ARSEF 2860-2	4	RNA	2.024	1.113	1.82	81

라. cDNA 합성

(1) 실험 방법

확보된 RNA는 DNaseI이 처리된 후, AccuPower RT premix(Bioneer)를 이용하여 50℃에서 1시간, 95℃에서 5분간 처리되어 cDNA로 합성되었다.

마. PCR 검정

(1) 실험 방법

합성된 cDNA는 PCR기기를 사용하여 다음과 같은 조건에서 증폭되었다. 처음에 94℃에서 3분, 94℃ 30초, 61℃ 30초, 74℃ 30초를 30회 실시하였고, 최종적으로 74℃에서 3분간 post maturation 시켰다. Internal control로써 Bb 18srRNA-forward primer의 염기서열은 5' -TTA CGT CCC TGC CCT TTG TA- 3'이고, 18srRNA-reverse primer의 염기서열은 5`-CCA ACG GAG ACC TTG TTA CG-3`가 사용되었다. PCR산물의 전기영동은 0.8% agarose gel + Ecodye (Biofact)를 사용하여 140 V로 25분 실시한 후 사진촬영이 진행되었다.

(2) 실험 결과

Internal control로써 Bb 18srRNA primer를 이용하여 PCR을 진행한 결과, target size에서 두 균주의(JEF-007 & ARSEF2860) cDNA sample이 detection 되었다고 판단되었다(그림 61).

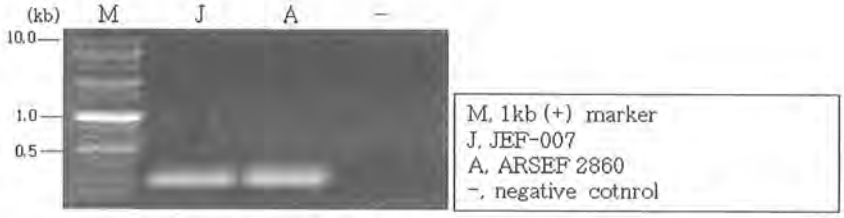


그림 61. *B. bassiana* JEF-007과 ARSEF2860 균주의 cDNA를 Bb 18s rRNA primer를 이용하여 PCR 검정

바. qRT-PCR primer 제작

(1) 실험 방법

qRT-PCR 진행을 위해 snap dragon (http://www.flynai.org/snapdragon)을 이용하여, 앞서 선발된 16개의 유전자에 대한 primer를 제작하였다(표 47).

표 47. qRT-PCR primer 정보

Name	Primer (5'-3')		Product Size
	Left	Right	
B.bassiana00000010	GGTAGACAGCAAGGATTCGC	ACATTTGCTCTCCTCACGCT	358
B.bassiana00003787	GAAGATGTTTCGGACAAGCC	GGGACCGAAACCGAGAGTAT	227
B.bassiana00004502	TTCTTCAAGTTCCACAGCGA	CAAGCCCAGTAGTTGGGGTA	242
B.bassiana00005786	AAAGACGGTGGGCATAACTG	TCAAATTCCTCACCCTGGAG	230

B.bassiana00006066	CTTGCCGCTACTATTCCTGC	TAATTTTCCCGTATGCTGGC	289
B.bassiana00006109	GTGGCGATTACAGACCCATT	GTGCTTCTTGAGCCACCTTC	472
B.bassiana00006175	GCCACGCGAGAAGAACTTAC	ACTCTTGCCCCAATATGTCG	338
B.bassiana00006462	ATACGTTCCGGCATACAAGC	GTCGGTGGTAGCTCTTCAGC	336
B.bassiana00006603	GCGCTCTTTTACGAGTGGTC	CGACTATCTCGCCCAGTAGG	262
B.bassiana00006769	GTGCTATGCGCAGCTTTACA	CGAGCCTGTCGTAAGTGTCA	314
B.bassiana00008331	CCAATCCACGGTTCATTACC	TATACCTTGAAATTGGCGGC	115
B.bassiana00008353	CTACTACGCAAGCTCGTCCC	CTAGGCTCTGGGACTCAACG	252
B.bassiana00008961	TGCCATTGAGACTGTTGCTC	GACCGTGACAATGACCCTCT	277
B.bassiana00009843	AGTCGACTGGTCTTGAGCGT	AAGTCTGAGGCTCCGGGTAT	318
B.bassiana00010539	CATTTGGTGGCTATGACACG	GAGGACGTACCAGATTCCGA	439
B.bassiana00010590	AATACGAATGGGGAACCCTC	CAATAACATCGCCTGGTGTG	372

제작된 primer를 이용하여 RT-PCR을 진행하여 target 유전자에 detection 되는지 여부를 확인하였다.

(2) 실험 결과

RT-PCR 결과로 detection 된 다음의 primer가 선발되었으며(그림 62, 표 48), 이를 이용하여 qRT-PCR이 진행되었다.

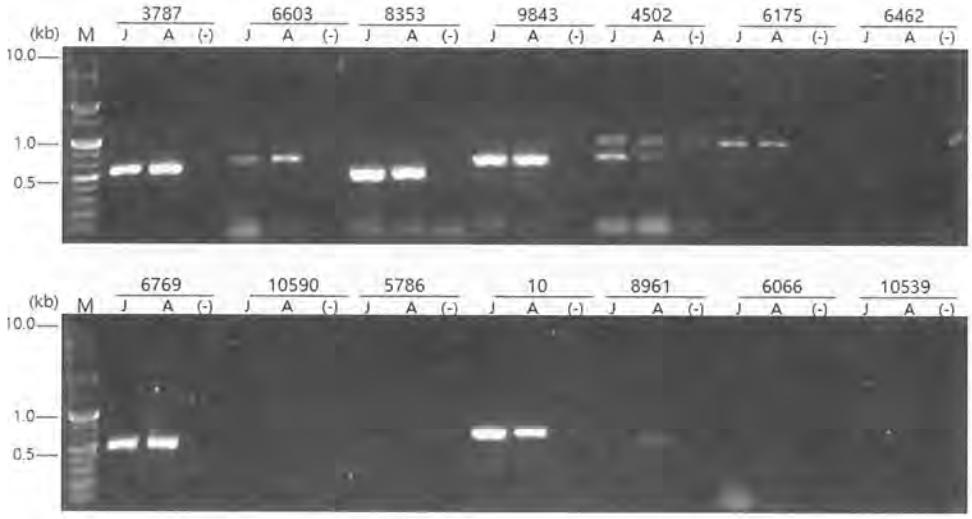


그림 62. 선발된 16개의 유전자에 대한 RT-PCR

표 48. 최종 선발된 qRT-PCR용 primer 정보

Name	Primer (5'-3')		Product Size
	Left	Right	
B.bassiana00000010	GGTAGACAGCAAGGATTCGC	ACATTTGCTCTCCTCACGCT	358
B.bassiana00003787	GAAGATGTTTCGGACAAGCC	GGGACCGAAACCGAGAGTAT	227
B.bassiana00006066	CTTGCCGCTACTATTCCTGC	TAATTTTCCCGTATGCTGGC	289
B.bassiana00006175	GCCACGCGAGAAGAACTTAC	ACTCTTGCCCCAATATGTCG	338
B.bassiana00006769	GTGCTATGCGCAGCTTTACA	CGAGCCTGTCGTAAGTGTCA	314
B.bassiana00008353	CTACTACGCAAGCTCGTCCC	CTAGGCTCTGGGACTCAACG	252
B.bassiana00009843	AGTCGACTGGTCTTGAGCGT	AAGTCTGAGGCTCCGGGTAT	318

4. qRT-PCR을 통해 JEF-007 과 ARSEF2860의 유전자 발현량 비교

가. 실험 방법

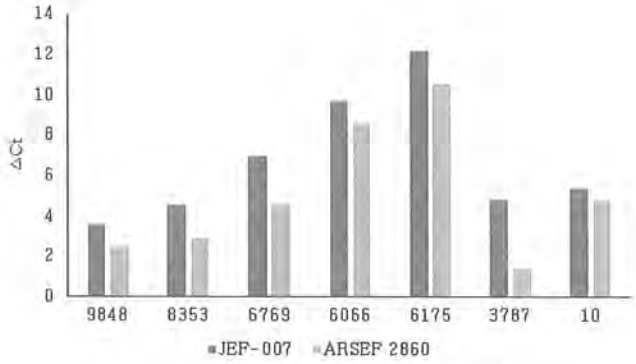
RT-PCR을 통해 band가 확인된 총 7개의 유전자를 이용하여 real-time PCR 을 진행하였으며, 반응 조건은 다음과 같이 진행되었다(표 49). 본 실험은 단반복으로 진행되었다.

표 49. qRT-PCR 조건

초기변성	Cycle 수 : 39		융해곡선
95 ℃, 2 분	변성 : 95 ℃, 5 초	60 ℃, 15 초	Start: 65 ℃ End: 95 ℃ 0.5 ℃/5 초

나. 실험 결과

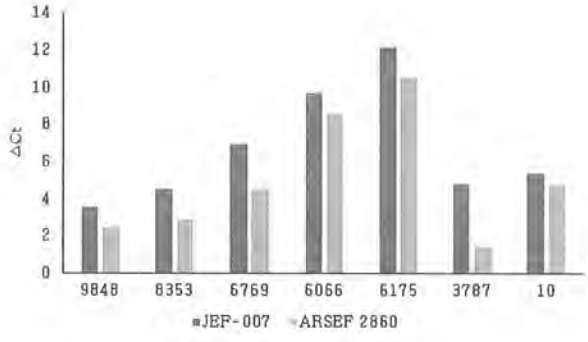
qRT-PCR 결과, 7개의 유전자들은 모두 JEF-007 보다 ARSEF 2860에서 높은 발현을 나타내는 것으로 확인되었으며, 그 중에서 가장 높은 차이가 보이는 유전자는 B. bassiana00003787 (heat shock protein 30)으로 확인되었다(그림 63).



Name	Description
Bbassiana00003787	heat shock protein 30
Bbassiana00008353	succinate dehydrogenase cytochrome b subunit
Bbassiana00006175	NADH-cytochrome b-5 reductase
Bbassiana00006769	nitrogen assimilation transcription factor nirA
Bbassiana00000010	GTP-binding protein
Bbassiana00006066	deuterolysin metalloprotease
Bbassiana00006603	NADPH-dependent FMN reductase family protein

그림 63. JEF-007 과 ARSEF2860의 유전자 발현량 비교를 위한 qRT-PCR 결과(단반복)

전기영동으로 qRT-PCR 산물을 확인한 결과, B.bassiana00006066 유전자에서는 band 가 확인되지 않았기 때문에, 3반복 처리에서는 본 유전자를 제외하고 진행되었다. 3반복으로 진행된 qRT-PCR 결과, 6개의 유전자들은 모두 JEF-007 보다 ARSEF 2860에서 높은 발현을 나타내는 것으로 확인되었으며, 단반복 qRT-PCR 결과와 유사하게 가장 높은 차이가 보이는 유전자는 B.bassiana00003787 (heat shock protein 30)으로 확인되었다(그림 64).



Name	Description
Bbassiana00003787	heat shock protein 30
Bbassiana00008353	succinate dehydrogenase cytochrome b subunit
Bbassiana00006175	NADH-cytochrome b-5 reductase
Bbassiana00006769	nitrogen assimilation transcription factor nirA
Bbassiana00000010	GTP-binding protein
Bbassiana00006066	deuterolysin metalloprotease
Bbassiana00006603	NADPH-dependent FMN reductase family protein

그림 64. JEF-007 과 ARSEF2860의 유전자 발현량 비교를 위한 qRT-PCR 결과(3 반복)

또한, qRT-PCR 산물의 전기영동은 0.8% agarose gel + Ecodye (Biofact)를 사용하여 140 V로 25분 실시한 후 사진촬영이 진행되었다. 전기영동으로 확인한 결과 6개 유전자와 internal

control인 Bb actin 조건에서는 모두 negative control에서 band가 detection 되지 않고 JEF-007과 ARSEF2860에서만 detection 되는 것을 확인하였다(그림 65).

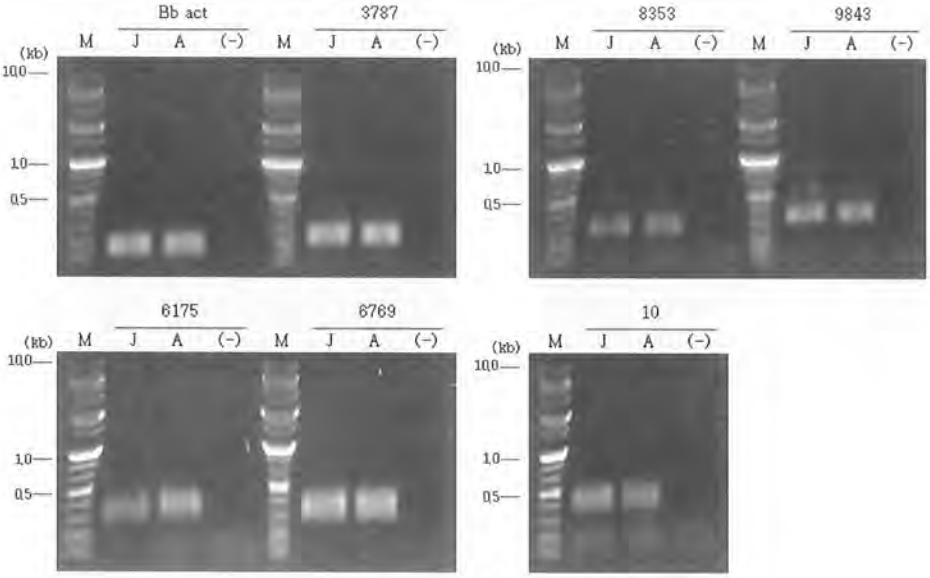


그림 65. qRT-PCR 산물 전기영동 결과

5. JEF-007 과 ARSEF2860에서 낮은 identity를 보인 유전자 선발

가. 실험 방법

JEF-007 과 ARSEF2860에서 낮은 identity를 보인 유전자 선발하고자, 실험실에 보유중인 *B. bassiana* 균주 19종이 선발되었으며 목록은 다음과 같다(표 50).

표 50. 실험에 사용된 *B. bassiana* 균주 목록

No.	JEF No.	Identification		Original Code	Virulence	Year	Conidia Color
		Genus	Species				
1	006	*Beauveria*	*bassiana*	횡성 -01-06	High	2013	White
2	007	*Beauveria*	*bassiana*	횡성 -01-07	High	2013	White
3	013	*Beauveria*	*bassiana*	동부세레스 -1	High	2014	White
4	105	*Beauveria*	*bassiana*	전북대 -01-02	Medium	2013	Yellow
7	133	*Beauveria*	*bassiana*	전북대 -12-3-A	High	2013	White
8	148	*Beauveria*	*bassiana*	울릉도 -12-05	High	2013	White
9	158	*Beauveria*	*bassiana*	울릉도 -25-01	High	2013	White
10	162	*Beauveria*	*bassiana*	남원하이츠 1-1	High	2014	White
11	163	*Beauveria*	*bassiana*	남원하이츠 1-2	High	2014	White
12	164	*Beauveria*	*bassiana*	남원하이츠 1-3	High	2014	White
13	165	*Beauveria*	*bassiana*	남원하이츠 1-4	High	2014	White

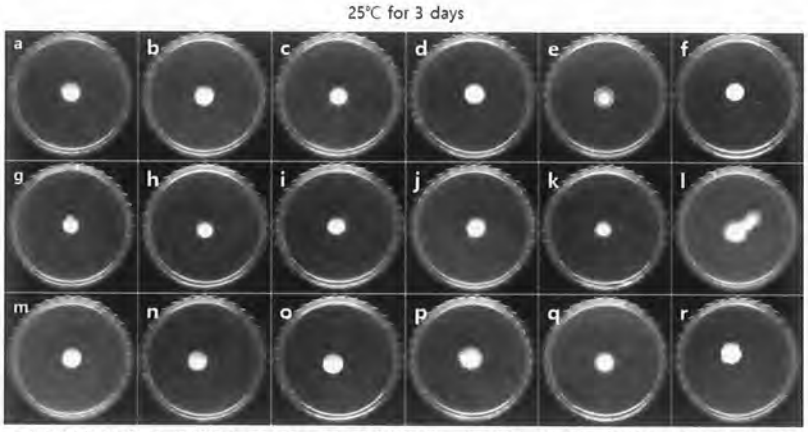
14	167	*Beauveria*	*bassiana*	완산칠봉 1-18	High	2014	White
15	168	*Beauveria*	*bassiana*	완산칠봉 2-01	High	2014	White
17	199	*Beauveria*	*bassiana*	모악산 2-19	High	2014	White
18	201	*Beauveria*	*bassiana*	모악산 2-21	High	2014	White
19		*Beauveria*	*bassiana*	ERL-836			
20		*Beauveria*	*bassiana*	GHA			

6. 실험실에서 보유중인 *Beauveria bassiana* isolates 중 JEF-007과 배양, 형태, 병원성 차이를 보이는 균주 선발

가. 실험 방법

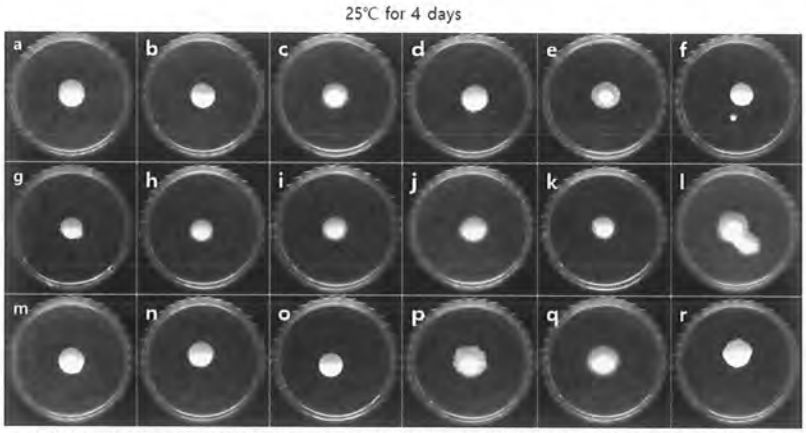
실험실에 보유중인 17종의 *B. bassiana*와 GHA 균주의 배양형태를 비교하고자 ¼SDA 배지 중앙에 cork borer를 이용하여 agar block을 치상하고 3, 4, 5, 6일차 배양양상이 비교되었다 (그림 66~69).

나. 실험 결과



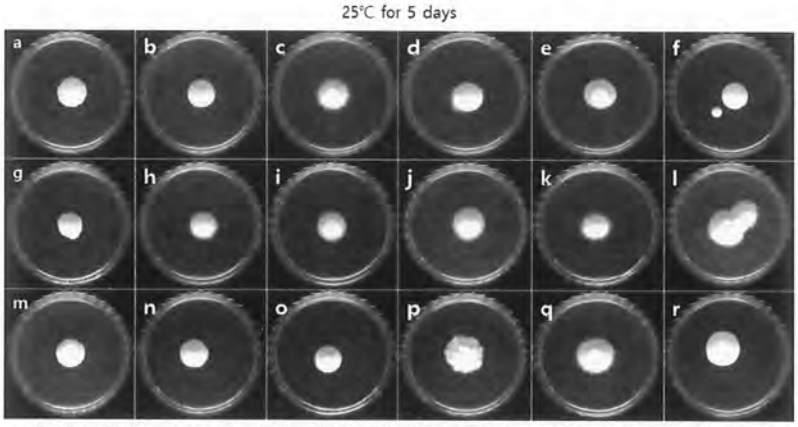
a, JEF-006; b, JEF-007; c, JEF-013; d, JEF-105; e, JEF-133; f, JEF-148; g, JEF-158; h, JEF-162; i, JEF-163; j, JEF-164; k, JEF-165; l, JEF-167; m, JEF-168; n, JEF-199; o, JEF-201; p, ARSEF 2860; q, ERL 836; r, GHA

그림 66. *B. bassiana* 균주 18종 ¼SDA 배양 3일차



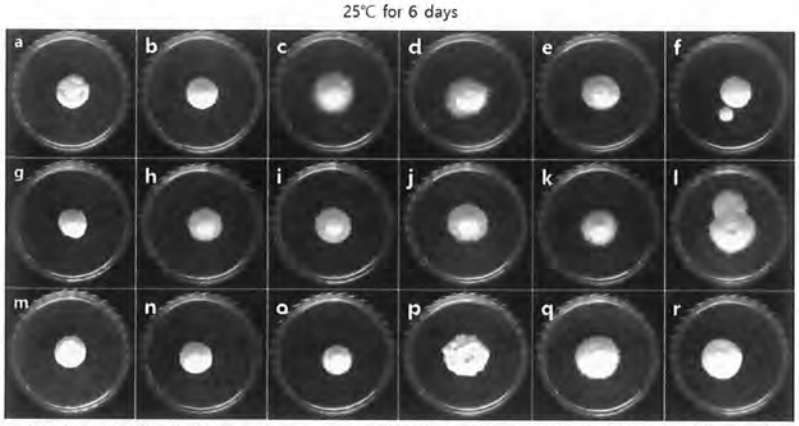
a, JEF-006; b, JEF-007; c, JEF-013; d, JEF-105; e, JEF-133; f, JEF-148; g, JEF-158; h, JEF-162; i, JEF-163; j, JEF-164; k, JEF-165; l, JEF-167; m, JEF-168; n, JEF-199; o, JEF-201; p, ARSEF 2860; q, ERL 836; r, GHA

그림 67. *B. bassiana* 균주 18종 ¼SDA 배양 4일차



a, JEF-006; b, JEF-007; c, JEF-013; d, JEF-105; e, JEF-133; f, JEF-148; g, JEF-158; h, JEF-162; i, JEF-163; j, JEF-164; k, JEF-165; l, JEF-167; m, JEF-168; n, JEF-199; o, JEF-201; p, ARSEF 2860; q, ERL 836; r, GHA

그림 68. *B. bassiana* 균주 18종 ¼SDA 배양 5일차



a, JEF-006; b, JEF-007; c, JEF-013; d, JEF-105; e, JEF-133; f, JEF-148; g, JEF-158; h, JEF-162; i, JEF-163; j, JEF-164; k, JEF-165; l, JEF-167; m, JEF-168; n, JEF-199; o, JEF-201; p, ARSEF 2860; q, ERL 836; r, GHA

그림 69. *B. bassiana* 균주 18종 ¼SDA 배양 6일차

3. 선발된 균주 중 낮은 identity를 보인 유전자 염기서열 비교 분석

가. 실험 방법 - 1

B. bassiana 균주 17종은 ¼ SDA (Difco) 배지에서 27℃, 7일간 배양되었으며, 배양된 배지에서 균사가 많은 부분을 1x1 cm 로 긁어내 1.5 ml tube에 extraction buffer(1 M KCl, 100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA) 400 ㎕와 함께 넣고 30초씩 3회 반복하여 마쇄되었다. 마쇄액은 4℃에서 10,000 rpm으로 6 분간 원심분리 후, 상층액 350 ul와 isopropanol 300 ul를 혼합한 다음, 다시 4℃에서 13,000 rpm으로 10분간 원심분리를 진행하여, DNA를 침전시켰다. 침전물을 70% 에탄올로 세척하고 건조한 후 50 ul EB buffer에 용해되었다. 추출된 gDNA는 spectrophotometer (ACGene, ASP-2680)을 이용해 정량되었다.

나. 실험 결과 - 1

추출된 17종의 *B. bassiana*의 gDNA 정량값은 다음과 같이 측정되었다(표 51).

표 51. 17종의 *B. bassiana*의 gDNA 정량값

Sample ID	ID#	Sample Type	Abs260	Abs280	260/280	Concentration (ng/ul)
JEF-006	1	dsDNA	2.345	1.631	1.44	117.3
JEF-007	2	dsDNA	2.472	1.765	1.4	123.6
JEF-013	3	dsDNA	4.527	3.152	1.44	226.3
JEF-105	4	dsDNA	1.493	0.936	1.6	74.7
JEF-133	5	dsDNA	2.214	1.598	1.39	110.7
JEF-148	6	dsDNA	3.548	2.276	1.56	177.4
JEF-158	7	dsDNA	2.273	1.574	1.44	113.7
JEF-162	8	dsDNA	1.507	1.08	1.4	75.3
JEF-163	9	dsDNA	2.289	1.512	1.51	114.5
JEF-164	10	dsDNA	3.008	1.965	1.53	150.4
JEF-165	11	dsDNA	2.522	1.728	1.46	126.1
JEF-167	12	dsDNA	1.68	1.239	1.36	84
JEF-168	13	dsDNA	2.875	1.818	1.58	143.7
JEF-201	14	dsDNA	2.985	2.073	1.44	149.2
ARS2860	15	dsDNA	0.866	0.608	1.42	43.3
ERL836	16	dsDNA	1.986	1.314	1.51	99.3
GHA	17	dsDNA	1.919	1.497	1.28	96

다. 실험 방법 - 2

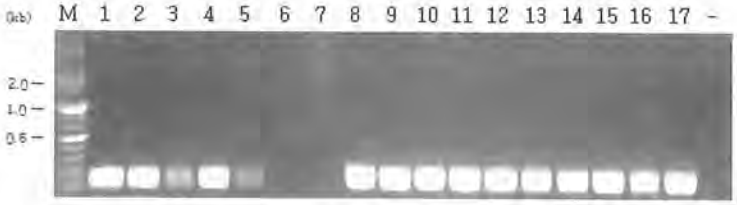
Bb 18s rRNA-F(5'-TTA CGT CCC TGC CCT TTG TA-3'), Bb 18s rRNA-R(5'-CCA ACG GAG ACC TTG TTA CG-3')이용하여 PCR을 진행하여 target 유전자에 detection 되는지 여부를

확인하였다. PCR산물의 전기영동은 0.8% agarose gel + Ecodye (Biofact)를 사용하여 140 V로 25분 실시한 후 사진촬영이 진행되었다.

라. 실험 결과 - 2

추출된 gDNA는 PCR을 통해 확인되었으며, 확인 결과 Bb 18s rRNA primers 조건은 target size(180-bp)에서 band가 detection 되었다고 판단되었다(그림 70).

primer	sequence	Target size
Bb 18s rRNA-F	5'-TTACGTCCCTGCCCTTTGTA-3'	180 bp
Bb 18s rRNA-F	5'-CCAACGGAGACCTTGTTACG-3'	180 bp



1, JEF-006; 2, JEF-007; 3, JEF-013; 4, JEF-105; 5, JEF-133; 6, JEF-148; 7, JEF-158; 8, JEF-162; 9, JEF-163; 10, JEF-164; 11, JEF-165; 12, JEF-167 13, JEF-168; 14, JEF-201; 15, GHA; 16, ARSEF 2860; 17, ERL 836; -, negative control

그림 70. PCR을 통해 확인된 17종 *Beauveria bassiana* 균주의 gDNA 산물. M, 1 kb(+) marker; 1-7, *B. bassiana* gDNA (Bb 18s rRNA primer); -, negative control

마. 실험 방법 - 3

B. bassiana JEF-007 whole genome sequence에서 identity가 낮은 유전자는 Bowtie2 프로그램을 통해 분석되었으며, 유전자 sequence를 포함하는 primer는 Primer3Plus (http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi) 사이트를 통해 디자인되었다.

바. 실험 결과 - 3

선발된 6개의 유전자 sequence 정보를 바탕으로 primer를 제작하였으며(표 52). 제작된 primer를 이용하여 PCR 검정을 진행하였다(그림 71).

표 52. Validation을 위한 primer 정보

Gene		sequence	Tm	Length	GC%	size
B.bassiana00009748	F	5'-GCGATCTACGTGCTGAAATG-3'	59.4	20	50	1213-bp
	R	5'-TGACAGACGGCATTACTCCA-3'	60.0	20	50	
B.bassiana000010539	F	5'-ATCATCCGGGTCAAATAGCA-3'	60.0	20	45	1501-bp
	R	5'-CCATCATTTGCGCTTCTTCT-3'	60.0	20	45	

B.bassiana00008961	F	5'-GCTCTGGGCAGTACAAACGTA-3'	58.85	21	52	946-bp
	R	5'-CAATGCTCATCACCGCTAGA-3'	58.41	20	50	
B.bassiana00001250	F	5'-GGCACCCATCTCTCCAGTAT-3'	57.43	20	50	558-bp
	R	5'-ACGCAGGATTCTGTGCTTTC-3'	58.88	20	50	

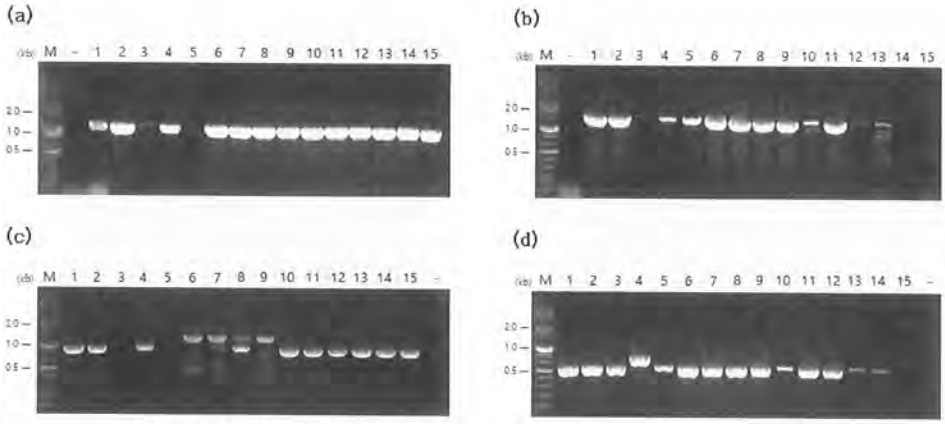


그림 71. 4개 primer를 이용한 15종 *B. bassiana* validation. (a), B.bassiana00009748; (b), B.bassiana000010539; (c), B.bassiana00008961; (d), B.bassiana00001250; M, 1 kb(+) marker; 1, JEF-006; 2, JEF-007; 3, JEF-013; 4, JEF-105; 5, JEF-133; 6, JEF-162; 7, JEF-163; 8, JEF-164; 9, JEF-165; 10, JEF-167; 11, JEF-168; 12, JEF-201; 13, ARSEF 2860; 14, ERL836; 15, GHA; -, negative control

Sequencing 된 B.bassiana00009748(metalloprotease-like protein), B.bassiana000010539 (eukaryotic aspartyl protease), B.bassiana00008961(chitinase-like protein), B.bassiana00001250 (trypsin-like protease) 는 앞선 실험에서 선발된 *B. bassiana*와 align되었다. DNA sequence를 비교한 결과는 그림 72와 같이 정리할 수 있었으며, 분석 결과, 대부분의 *B. bassiana* 균주가 높은 identity를 보이는 것이 확인되었다.

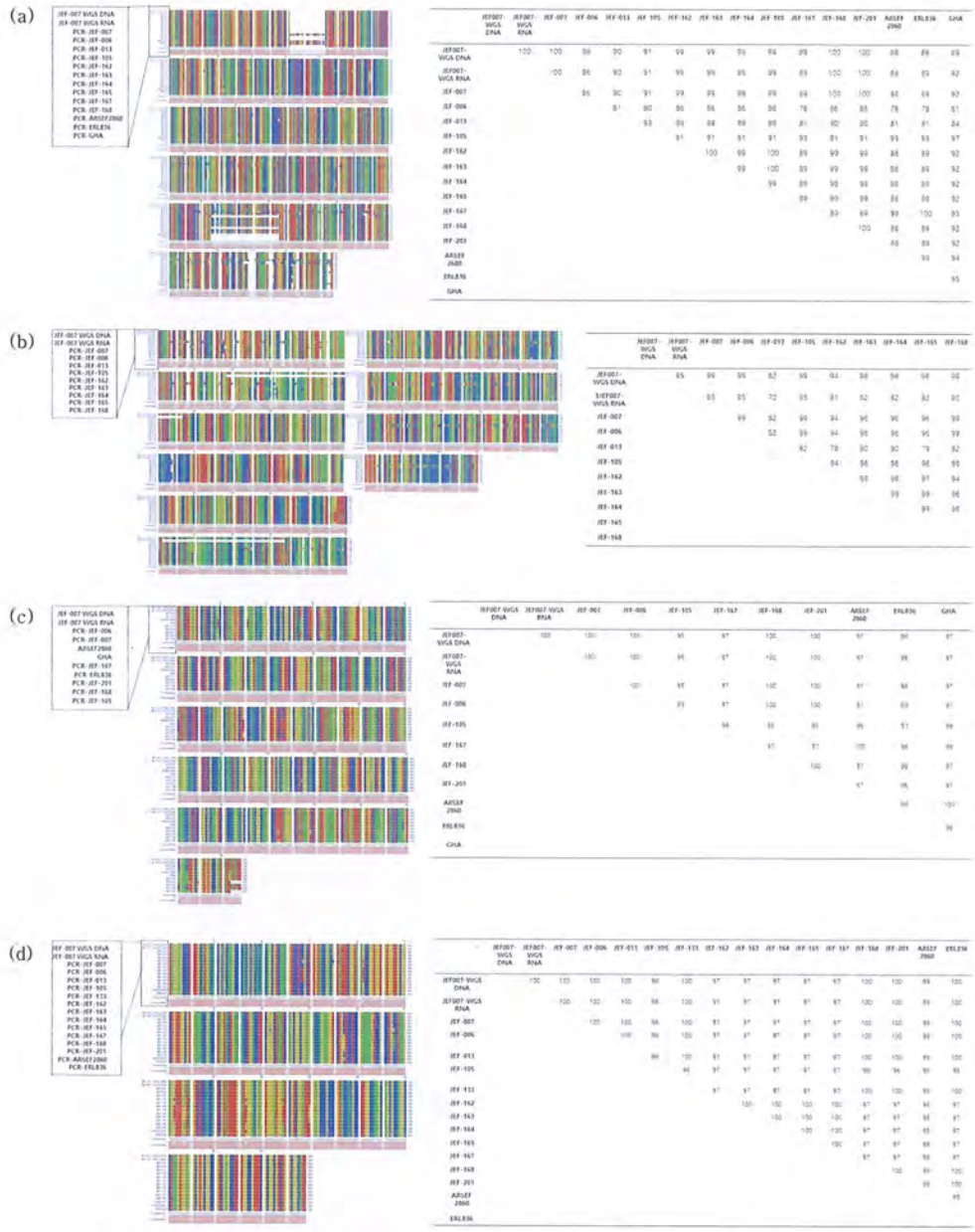


그림 72. B.bassiana00009748 (metalloprotease-like protein), B.bassiana000010539(eukaryotic aspartyl protease), B.bassiana00008961 (chitinase-like protein), B.bassiana00001250(trypsin-like protease) 유전자에 대한 다양한 *B. bassiana* DNA sequence 비교

6절. *Beauveria bassiana* ERL836 whole genome sequencing 분석

1. Whole genome sequencing을 위한 균주 배양 및 샘플 preparation

가. 실험 방법

B. bassiana ERL836 균주의 유전체 서열 해독 및 정보 분석을 위해 먼저 *B. bassiana* ERL836을 ¼SDA 배지에 25℃ 조건으로 7일 배양한 후, genomic DNA extraction 진행을 위해 마크로젠에 배양된 균주를 송부하였다.

2. Sequencing 및 염기서열 분석

가. 실험 방법

확보된 DNA는 PacBio RS II를 이용하여 sequencing 되었으며, De novo assembly는 Falcon (v0.2.1) 프로그램을 통해 분석되었다.

나. 실험 결과

B. bassiana ERL836 의 평균 read 길이와 N50은 8,083 bp와 12,149 bp 이었으며, total base 및 total read 수는 각 각 3,834,801,443 bp와 474,404 이었다(표 53). Assembly를 통해 15개의 contig를 확보하였으며, 총 길이는 35,488,442 bp 이었다. 또한, N50은 3,988,868 bp이었으며, 평균 contig의 길이는 2,365,896 bp이었다(표 54). 또한 각 contig의 길이, GC(%), depth는 표 55와 같았다.

표 53. *B. bassiana* ERL836 WGS의 raw data

Mean Subread length	Total Number of Bases	N50	Number of Reads
8,083	3,834,801,443	12,149	474,404

표 54. *B. bassiana* ERL836 WGS assembly 결과

Number of contigs	Total Length	N50	Max Length	Min Length	Avg Length
15	3,988,868	3,988,868	6,378,951	5,773	2,365,896

표 55. *B. bassiana* ERL836 균주의 15개 Contig 정보

Contig Name	Length (bp)	GC %	Depth
contig1	6,378,951	48.3	80
contig2	6,291,768	49.4	79
contig3	4,840,633	49.5	79
contig4	3,988,868	48.8	80
contig5	3,742,282	50.6	82
contig6	3,708,924	51.6	78
contig7	2,509,591	50.9	91
contig8	2,432,845	44.8	82
contig9	1,458,486	51.3	79
contig10	38,942	27.0	1666
contig11	38,806	21.3	22
contig12	22,558	52.3	19
contig13	21,869	51.3	51
contig14	8,146	50.2	4
contig15	5,773	56.0	15
Total	**35,488,442**	**49.33**	**82**

3. Data filtering/Mapping/Annotation

가. 실험 방법

Annotation은 Blast+ (v2.4.0)을 이용하여 분석되었으며, Gene prediction 은 Maker(v2.31.8) 프로그램을 이용하여 분석되었다.

나. 실험 결과

Annotation을 통해 10,631개의 유전자가 확인되었으며, Transcript의 총 길이는 18,937,816 bp였으며, protein의 총 길이는 4,869,111 aa 이었다(표 56). last 결과, *B. bassiana* 외에도 *Cordyceps, Metarhizium, Isaria, Penicillium, Fusarium* 등의 유전자가 확인되었으며, *B. bassiana* strain으로 확인된 유전자는 9,326개이었으며, *B. bassiana*를 제외한 다른 종으로 확인된 유전자는 922개, no hit으로 확인된 유전자는 383개이었다(표 57). Blast 결과, Identity가 100%인 유전자는 2,388개이었다(표 58).

표 56. Annotation 결과

	Number of Genes	Total Length
Predicted Transcripts	10,631	18,937,816 bp
Predicted Proteins	10,631	4,869,111 aa

표 57. Blast 결과

Strain	Species	Number of genes
Beauveria sp.		9,326
	Beauveria bassiana	
Metarhizium sp.		46
	Metarhizium majus	10
	Metarhizium acridum	1
	Metarhizium rileyi	4
	Metarhizium anisopliae	13
	Metarhizium brunneum	4
	Metarhizium guizhouense	5
	Metarhizium robertsii	9
Cordyceps sp.		637
	Cordyceps brongniartii	505
	Cordyceps confragosa	81
	Cordyceps militaris	51
Isaria sp.		62
	Isaria fumosorosea	60
	Isaria tenuipes	1

	Isaria farinose	1
Fusarium sp.		14
	Fusarium fujikuroi	1
	Fusarium graminerarum	2
	Fusarium langsethiae	3
	Fusarium oxysporum	6
	Fusarium verticillioides	2
Penicillium sp.		14
	Penicillium oxalicum	1
	Penicillium roqueforti	3
	Penicillium griseofulvum	9
	Penicillium nordicum	1
The others		149
no hit		3
total		**10,631**

표 58. Identity에 따른 blast 결과

identity 범위(%)	유전자 수
100	2,388
90≤ x <100	6,856
80≤ x <90	486
70≤ x <80	208
60≤ x <70	116
50≤ x <60	83
40≤ x <50	52
30≤ x <40	45
20≤ x <30	14
10≤ x <20	0
0≤ x <10	0
no hit	383
total	**10,631**

○ 사업화성과 및 매출실적

▷ 사업화 성과

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	9 억원
			향후 3년간 매출	30 억원
		관련제품	개발후 현재까지	관련제품 없음
			향후 3년간 매출	관련제품 없음
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 토양해충 시장: 약 2%
			향후 3년간 매출	국내 토양해충 시장: 20% 이상 국외 : 2020년 출시 계획
		관련제품	개발후 현재까지	국내외 개발 동향 없음.
			향후 3년간 매출	-
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		1 위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		1 위

▷ 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목		성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)		3		
	소요예산(백만원)		1,000		
	예상 매출규모 (억원)		현재까지	3년후	5년후
			9	30	100
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	100	80	50
		국외	-	-	10
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		spray 및 drench 형 액상 제품 개발 중임.		
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)		현재	3년후	5년후
	수입대체(내수)		-	-	-
	수 출		-	-	-

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호	D-06

1. 목표달성도

○ 총채벌레 살충성 진균의 제품화 연구

1) ERL 균주의 토양처리 최적제형 개발: *Beauveria bassiana* ERL836 5% GR 제조 처방 확립 1건, (달성도 100%)
2) ERL836의 총채벌레 약효/약해 시험 완료(약효 70% 이상, 약해 없음), 6종 독성 시험 등 등록 시험 완료(달성도 100%)
3) 최적 배양 조건 확립(물리/화학 조건) 및 대량 최적배양 공정개발 1건(달성도 100%)

○ 총채벌레 살충성 진균 *B. bassiana* ERL 균주의 산업화

1) 총채싹(유효균주: ERL836) 대량생산 공정도 확보 1건(달성도 100%)
2) 총채싹의 오이 총채벌레 포장약효 시험 3건 완료(달성도 100%)
3) 유기농업자재 등록 1건(제품명: 총채싹), (달성도 100%)

○ 선정 균주의 유전체 서열 해독 및 정보 분석

1) 살충성 진균 라이브러리를 활용한 총채벌레 방제활성 평가 완료(달성도: 100%)
2) 총채벌레 방제 활성이 높은 *B. bassiana* ERL(또는 JEF) 균주의 Whole Genome Sequencing 및 염기서열 분석 완료 (달성도: 100%)
3) 병원성(pathogenesis)과 관련된 유전자군 분석 완료(달성도: 100%)

○ 효능 관련 기능성 유전자 분석 및 검증

1) 살충활성 관련 유전자군 분석을 위하여 RNA-seq을 이용한 총채벌레 침입 전후의 transcriptome 분석 완료(달성도: 100%)
   - Mapping/Annotation/DEG/KEEG 분석 수행
2) Comparative transcriptome 분석 및 up and down regulated 유전자군 분석 완료(달성도: 100%)
3) Validation을 통한 살충활성 기능성 유전자 분석 및 검증 완료(달성도: 100%)
4) 총채벌레 살충성 진균의 작용기작 분석 완료(달성도: 100%)

2. 관련분야 기여도

○ 기술적 측면

- 난방제 해충 방제용 미생물농약(유기농업자재)를 개발함으로써 작물보호제 시장에서 글로벌 경쟁력 확보
- 경제작물의 주요 난방제 해충에 대한 친환경 방제기술 개발을 통한 환경과 생태 독성이 없거나 낮은 총채벌레 친환경 방제 및 경제작물 생산에서의 글로벌 경쟁력 강화.
- 원예 및 화훼작물에서 극심한 문제가 되고 있는 총채벌레류의 피해를 감소시키며 총채벌레 충해에 대한 경쟁력 확보
- 총채벌레 방제용 미생물인 *B. bassiana* ERL/JEF 균주의 대량배양 및 대량생산 공정기술 개발을 통하여 농업분야에 생물공정기술 도입 및 고효율, 작물보호제 개발 기틀을 마련할 수 있음.
- 살충성 미생물의 대량생산과 제형화와 관련된 산업화 기술을 구축할 수 있음.
- 글로벌 경쟁력을 갖는 작물보호제 원천기술 확보 및 농업분야의 신사업 창출에 활용하고자 함.

○ 산업적 측면

- 저항성 총채벌레 방제를 위한 신규 살충제에 대한 산업계의 수요를 충족시킬 수 있으며 글로벌 제품 개발의 교두보를 선점할 수 있음.
- 총채벌레류를 방제에서 화학농약 사용으로 발생하는 안정성 문제 및 관련 검사 비용을 절감할 수 있음(수출 상품의 브랜드 이미지 강화).
- 원예 및 화훼작물 생산 농가들의 수입 증대 및 고용 확대를 기대할 수 있음.
- 작물 및 토양 잔류 문제가 없기 때문에 친환경 및 관행농업에 적용 가능한 수출 품목으로 육성이 가능하며 글로벌 시장의 경쟁제품과 품질 및 약효에서 우위를 확보하여 시장 점유율을 확대할 수 있음.
- 개발한 제품 단독이나 기존 합성 살균제와의 교호살포를 통한 효과가 우수할 경우 제품을 중국, 일본 및 유럽에 수출이 가능하며, 수출시 그 파급효과는 매우 클 것으로 판단됨. 국내 매출 10억원 내지 50억원 및 수출 500억원 내지 1,000억원 기대됨.
- 경제작물과 토양의 화학농약 잔류에 대한 민감성이 높은 관행농업에서는 화학농약과의 교호살포를 통한 과실의 안전성 해결이 가능하며, 농약사용 저감 효과가 있음.

5. 연구결과의 활용계획

코드번호	D-07

○ 친환경농업 뿐만 아니라 관행농업의 잔류 문제를 해결할 수 있는 자재로 개발하고 화학농약과의 체계처리를 통하여 시너지 효과를 나타낼 수 있는 방법을 개발하고자 함.

○ 약제저항성 총채벌레 개체군을 대상으로한 방제효율 검토를 통하여 기개발된 화학농약 유효성분의 사용 존속기간을 연장시킬 수 있는 관리방법을 개발하고자 함.

○ 총채벌레류 외의 다양한 해충에 대한 적용확대 시험을 통하여 국내를 포함한 글로벌 광범위성 미생물농약 살충제 제품으로 개발하고자 함.

○ 유전체 연구를 통하여, 총채벌레 방제용 미생물 살충제의 추가 제품 연구를 위한 플랫폼으로 활용 예정임.

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

코드번호	D-08

○ Genbank 에 등록된 *Beauveria bassiana* whole genome sequencing 리스트 확보

Organism	Strain	Biosample	Size (Mb)	GC%	Scaffolds	Release Date
Beauveria bassiana	ARSEF 2860	SAMN02981247	33.6978	51.50	237	14.08.11
	D1-5	SAMN03160332	36.6923	52.20	1745	14.11.03
	ARSEF 8028	SAMN03066967	35.0216	48.70	12	16.07.10
	ARSEF 1520	SAMN03175166	36.9717	49.60	251	16.07.12
	ARSEF 2597	SAMN03175167	38.8285	49.10	351	16.07.12
	ARSEF 5078	SAMN03175169	34.4485	51.10	3365	16.07.12
	ARSEF 4305	SAMN03175168	34.7687	49.50	1694	16.07.12
	IMV 00265	SAMN06076681	35.1901	51.70	735	17.02.15
	BCC 2660	SAMN06480073	34.5603	49.00	35	17.07.24
	JEF-007	SAMN06006479	36.5384	48.00	39	18.01.10

○ 유전체 분석 관련 주요 논문

1. Gao, Q., Jin, K., Ying, S. H., Zhang, Y., Xiao, G., Shang, Y., Duan, Z., Hu, X., Xie, X. Q., Zhou, G., Peng, G., Luo, Z., Huang, W., Wang, B., Fang, W., Wang, S., Zhong, Y., Ma L. J., RSt Leger, R. J., Zhao, G. P., Pei, Y., Feng, M. G., Xia, Y., & Wang, C. (2011). Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. PLoS genetics, 7(1), e1001264.
2. Lai, Y., Chen, H., Wei, G., Wang, G., Li, F., & Wang, S. (2017). The Entomopathogenic Fungi *Isaria fumosorosea* Plays a Vital Role in Suppressing the Immune System of *Plutella xylostella*: RNA-Seq and DGE Analysis of Immunity-Related Genes. 60(8), 839-851.
3. Wang, J. J., Bai, W. W., Zhou, W., Liu, J., Chen, J., Liu, X. Y., Wang, W. H., Zhang, B. L., & Wan, Y. J. (2017). Transcriptomic analysis of two *Beauveria bassiana* strains grown on cuticle extracts of the silkworm uncovers their different metabolic response at early infection stage. Journal of invertebrate pathology, 145, 45-54.
4. Xiao, G., Ying, S. H., Zheng, P., Wang, Z. L., Zhang, S., Xie, X. Q., Shang, Y., St Leger, R. J., Zhao, G. P., Wang, C., & Feng, M. G. (2012). Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. Scientific reports, 2, 483.

7. 연구개발결과의 보안등급

	코드번호	D-09
○보안등급분류 : 일반		
○결정사유 : 「국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제24조의 4에 해당하지 않음		

8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비 현황

	코드번호	D-10
○ 해당사항 없음.		

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

코드번호	D-11

○ 기술적 위험요소 분석 및 안전조치 실시

구분		실시시기	관련근거
업무분류	세부내용		
안전점검	일일안전점검	매일	㈜팜한농 안전보건환경 경영 매뉴얼
	정기안전점검	매월	

○ 실시안전관리대책 마련 및 교육 실시

구분		실시시기	관련근거
업무분류	세부내용		
안전교육	사내교육	정기	㈜팜한농 환경교육규정

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

						코드번호		D-12	
번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/ 특허명/ 기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록 국가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인용 횟수 등)
1	논문	A novel picorna-like virus, *Riptortus pedestris* virus-1 (RiPV-1), found in the bean bug, *R. pedestris*, after fungal infection	전북 대학교	제1/ 교신 저자	Journal of Invertebrate Pathology	2.379 (2017)	2016. 11.17	단독 사사	SCI
2	논문	*Tenebrio molitor* Gram-negative-binding protein 3 (TmGNBP3) is essential for inducing downstream antifungal Tenecin 1 gene expression against infection with *Beauveria bassiana* JEF-007	전북 대학교	제1/ 교신 저자	Insect Science	2.026 (2017)	현재 인쇄중	단독 사사	SCI
3	특허	ERL836을 이용한 총채벌레 방제 특허 출원	(주) 팜한농, 전북 대학교 산학 협력단		10-2017-0051334 (PCT/KR2017/004264)		2017. 04.21	단독 사사	
4	특허	JEF-314를 이용한 토양해충 방제 특허 출원	전북 대학교 산학 협력단		10-2017-0018944		2017. 02.10	단독 사사	

11. 기타사항

	코드번호	D-13
○ 해당사항 없음.		

12. 참고문헌

코드번호	D-14

○ Aguilar, R., Jedlicka, A. E., Mintz, M., Mahairaki, V., Scott, A. L., & Dimopoulos, G. (2005). Global gene expression analysis of Anopheles gambiae responses to microbial challenge. Insect biochemistry and molecular biology, 35(7), 709-719.

○ Gao, Q., Jin, K., Ying, S. H., Zhang, Y., Xiao, G., Shang, Y., Duan, Z., Hu, X., Xie, X. Q., Zhou, G., Peng, G., Luo, Z., Huang, W., Wang, B., Fang, W., Wang, S., Zhong, Y., Ma L. J., St Leger, R. J., Zhao, G. P., Pei, Y., Feng, M. G., Xia, Y., & Wang, C. (2011). Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. PLoS genetics, 7(1), e1001264.

○ Jackson, M. A., & Jaronski, T. (2009). Production of microsclerotia of the fungal entomopathogen Metarhizium anisopliae and their potential for use as a biocontrol agent for soil-inhabiting insects. Mycological research. 113: 842-850.

○ Lai, Y., Chen, H., Wei, G., Wang, G., Li, F., & Wang, S. (2017). The Entomopathogenic Fungi *Isaria fumosorosea* Plays a Vital Role in Suppressing the Immune System of *Plutella xylostella*: RNA-Seq and DGE Analysis of Immunity-Related Genes. 60(8), 839-851.

○ Vestergaard, S., Gillespie, A. T., Butt, T. M., Schreiter, G., & Eilenberg, J. (1995). Pathogenicity of the hyphomycete fungi *Verticillium lecanii* and *Metarhizium anisopliae* to the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. Biocontrol Science and Technology. 5, 185-192.

○ Wang, J. J., Bai, W. W., Zhou, W., Liu, J., Chen, J., Liu, X. Y., Wang, W. H., Zhang, B. L., & Wan, Y. J. (2017). Transcriptomic analysis of two *Beauveria bassiana* strains grown on cuticle extracts of the silkworm uncovers their different metabolic response at early infection stage. Journal of invertebrate pathology, 145, 45-54.

○ Xiao, G., Ying, S. H., Zheng, P., Wang, Z. L., Zhang, S., Xie, X. Q., Shang, Y., St Leger, R. J., Zhao, G. P., Wang, C., & Feng, M. G. (2012). Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. Scientific reports, 2, 483.

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

<table>
<tr><td rowspan="2">과 제 명</td><td colspan="5">(국문) 미생물 유전체 정보 활용 경제작물 미생물농약 개발</td></tr>
<tr><td colspan="5">(영문) Development of genomics-based microbial pesticides for pest management in highly valued crops</td></tr>
<tr><td>주관연구기관</td><td colspan="2">㈜팜한농</td><td rowspan="2">주 관 연 구
책 임 자</td><td colspan="2">(소속) ㈜팜한농 작물보호연구센터</td></tr>
<tr><td>참 여 기 업</td><td colspan="2">-</td><td colspan="2">(성명) 신택수</td></tr>
<tr><td rowspan="4">총연구개발비

(600,000천원)</td><td>계</td><td>600,000</td><td>총 연 구 기 간</td><td colspan="2">2016. 2. 29 ~ 2018. 2. 28 (2년)</td></tr>
<tr><td>정부출연
연구개발비</td><td>300,000</td><td rowspan="3">총 참 여
연 구 원 수</td><td>총 인 원</td><td>14명</td></tr>
<tr><td>기업부담금</td><td>300,000</td><td>내부인원</td><td>14명</td></tr>
<tr><td>연구기관부담금</td><td>-</td><td>외부인원</td><td>-</td></tr>
</table>

1. 연구개발 목표 및 성과

가) 연구개발 목표

1) 총채벌레 살충성 진균 *Beauveria bassiana* 균주의 산업화
2) 곤충병원성 곰팡이의 NGS 기반 유전체 분석을 통한 기능성 검증 및 작용기작 분석

나) 연구개발 성과

1) *B. bassiana* ERL836의 대량배양 및 생산 제조공정도 확립
2) *B. bassiana* ERL836의 미생물농약(유기농업자재) 등록을 통한 산업화
3) 저항성 총채벌레 개체군에 대한 *B. bassiana* ERL836의 약효검증
4) *B. bassiana* ERL836의 유전체 분석
5) 총채벌레 살충성 관련 기능성 유전자 분석 및 검증

2. 연구내용 및 결과

1) *B. bassiana* ERL836의 대량생산 제조공정도 개발 및 안전성 확보
2) *B. bassiana* ERL836의 미생물농약(유기농업자재)등록
   - 포장 약효시험 및 안전성(독성)시험 검증
   - 농촌진흥청 유기농업자재 공시(유기농업자재 충해관리용자재 : 공시2-5-149)
3) *B. bassiana* ERL836의 현장적용 기술개발
   - 총채벌레류 발육단계별 총채싹의 약효 및 잔효성 평가
   - 저항성 총채벌레 개체군에 대한 총채싹 약효 평가
4) 총채벌레 살충성 진균 *B. bassiana* 균주의 유전체 분석 연구
5) 총채벌레 살충성 관련 기능성 유전자 분석 및 검증
   - 살충활성 관련 유전자군 분석을 위한 RNA-seq을 이용, 총채벌레 침입 전후의 transcriptome 분석
   - Comparative transcriptome 및 up and down regulated 유전자군 분석

- Validation을 통한 살충활성 기능성 유전자 분석 및 검증
- 총채벌레 살충성 진균의 작용기작 분석
- *B. bassiana* JEF-007 Whole genome sequencing 분석
- *B. bassiana* ERL836 whole genome sequencing

3. 연구성과 활용실적 및 계획

1) 친환경농업 뿐만 아니라 관행농업의 잔류 문제를 해결할 수 있는 자재로 개발하고 화학농약과의 체계처리를 통하여 시너지 효과를 나타낼 수 있는 방법을 개발하고자 함.
2) 약제저항성 총채벌레 개체군을 대상으로한 방제효율 검토를 통하여 기개발된 화학농약 유효성분의 사용 존속기간을 연장시킬 수 있는 관리방법을 개발하고자 함.
3) 총채벌레류 외의 다양한 해충에 대한 적용확대 시험을 통하여 국내를 포함한 글로벌 광범위성 미생물농약 살충제 제품으로 개발하고자 함.
4) 유전체 연구를 통하여, 총채벌레 방제용 미생물 살충제의 추가 제품 연구를 위한 플랫폼으로 활용 예정임.

[**별첨** 2]

자체평가의견서

1. 과제현황

				코드번호	D-15
		과제번호		916003-2	
사업구분	포스트게놈 다부처 유전체사업				
연구분야	농 업			과제구분	단위
사 업 명	포스트게놈 다부처 유전체사업				주관
총괄과제	-			총괄책임자	-
과 제 명	미생물 유전체 정보 활용 경제작물 미생물농약 개발			과제유형	개발
연구기관	㈜팜한농			연구책임자	신택수
연구기간 연 구 비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	'16.2~'17.2	150,000	150,000	300,000
	2차년도	'17.2~'18.2	150,000	150,000	300,000
	계	'16.2~'18.2	300,000	300,000	600,000
참여기업	-				
상 대 국	-		상대국연구기관	-	

2. 평가일 : 2018년 3월

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
㈜팜한농	책임	신택수

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확 약	

Ⅰ. 연구개발실적

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수)

○ 새로운 방제컨셉의 총채벌레 방제제 개발
· 저항성 발현이 없이 입제처리를 통한 토양내 총채벌레 번데기 방제 가능
○ 총채벌레 살충성 진균의 대량생산 목적의 제조공정도 개발
· 토양처리 최적제형 개발· 및 대량배양, 생산 공정개발 완료
○ 총채벌레 살충성 진균의 산업화
· 미생물농약(유기농업자재) 등록 완료
· 저항성 총채벌레 개체군 대상 방제효과 검증
○ 선정 균주의 유전체 서열 해독 및 정보 분석
· 균주의 WGS 및 염기서열 분석 완료, 병원성(pathogenesis)과 관련된 전자군 분석 완료
○ 효능 관련 기능성 유전자 분석 및 검증
· 총채벌레 침입 전후의 transcriptome 분석 완료
· 살충활성 기능성 유전자 분석 및 검증 완료

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수)

○ 연구개발 결과로 17년 출시한 총채벌레 살충성 진균 제품(제품명: 총채싹)의 성공적인 런칭으로 목표 대비의 350% 매출 달성(매출액: 약 9억)

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수)

○ 난방제 해충 방제용 미생물농약(유기농업자재)를 개발함으로써 작물보호제 시장에서 경쟁력을 확보함
○ 경제작물과 토양의 화학농약 잔류에 대한 민감성이 높은 관행농업에서는 화학농약과의 교호살포를 통한 과실의 안전성 해결이 가능하며, 농약사용 저감 효과가 있음.
○ 저항성 발현이 없는 총채벌레 방제관리가 가능하며 글로벌 시장 진출의 교두보를 선점할 수 있음.
○ 총채싹 단독 또는 기존 화학살충제와의 혼용을 통한 약효 증진이 가능하기 때문에 총채벌레가 문제시되는 주요 농업 선진국(미국, 호주, 유럽 등)에 시장성이 높을 것으로 판단됨

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수)

○ 총채벌레 살충성 진균의 산업화 추진

1) *B. bassiana* ERL836의 최적 배양 조건 확립(물리/화학 조건)(달성도 100%)
2) 대량 최적 배양 및 생산공정 개발(달성도 100%)
3) *B. bassiana* ERL836의 토양처리 최적제형 개발(달성도 100%)
4) *B. bassiana* ERL836의 총채벌레 약효/약해 시험 완료(달성도 100%)
5) *B. bassiana* ERL836의 독성시험 6항목 평가 완료 (달성도 100%)
6) *B. bassiana* ERL836의 유기농업자재(제품명: 총채싹) 공시 완료(달성도 100%)

○ 선정 균주의 유전체 서열 해독 및 정보 분석

1) 살충성 진균 라이브러리를 활용한 총채벌레 방제활성 평가 완료(달성도: 100%)
2) 총채벌레 방제용 고활성 *B. bassiana* ERL(또는 JEF) 균주의 Whole Genome Sequencing Sequencing 및 염기서열 분석 완료(달성도: 100%)
3) 병원성(pathogenesis)과 관련된 유전자군 분석 완료(달성도: 100%)

○ 효능 관련 기능성 유전자 분석 및 검증

1) 살충활성 관련 유전자군 분석을 위하여 RNA-seq을 이용한 총채벌레 침입 전후의 transcriptome 분석 완료(달성도: 100%)
2) Mapping/Annotation/DEG/KEEG 분석 수행(달성도: 100%)
3) Comparative transcriptome 분석 및 up and down regulated 유전자군 분석 완료(달성도: 100%)
4) Validation을 통한 살충활성 기능성 유전자 분석 및 검증 완료(달성도: 100%)
5) 총채벌레 살충성 진균의 작용기작 분석 완료(달성도: 100%)

5. 공개발표된 연구개발성과

■ 등급 : (아주우수)

·사업화·실용화: 1건(목표 1건)
·기술실시(이전): 1건(목표 1건)
·사업화(매출액): 약 9억(추가 성과)
·전략 미생물 해독: 2건(목표 1건, 초과 달성)
·유용 유전자 확보: 4건(목표 4건)
·NABIC 등록: 5건(추가 성과)
·특허출원: 2건(목표 2건),
·특허등록: 종료 1차년도 1건(예정)
·논문(SCI): 2건(목표 2건)
·학술발표: 17건(목표 2건, 초과 달성)

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
최적제형 선발(제형 1건 이상)	20	100	·*B. bassiana* ERL836 5% GR 제조 처방 확립 ·원제의 저장안정성 확보
약효약해(약효 >60%, 약해 <1) 제품 등록 시험 완료	10	100	·총채벌레 약효/약해 시험 완료 (약효 70% 이상, 약해 없음) 6종 독성시험 등 등록시험 완료
대량배양 공정도 확보	30	100	·총채싹(유효균주: *B. bassiana* ERL836) 최적 배양 조건 확립 및 공정도 확보
대량생산 공정도 확보 및 시제품 제작 1건 이상	5	100	·총채싹(유효균주: *B. bassiana* ERL836) 대량 생산 공정도 확보
약효약해 농가 포장시험 (전시포) 포장시험 2건 이상	10	100	·총채싹의 오이 총채벌레 포장약효 시험 3건 완료
제품등록 신청 1건 이상	5	100	·유기농업자재 등록(제품명: 총채싹)
선정 균주의 유전체 서열 해독 및 정보 분석	10	100	·살충성 진균 라이브러리를 활용 총채벌레 방제활성 평가 완료 ·총채벌레 방제 활성이 높은 *B. bassiana* (또는 JEF) 균주의 Whole Genome Sequencing 및 염기서열 분석 완료 ·병원성(pathogenesis)과 관련된 전자군 분석 완료
효능 관련 기능성 유전자 분석 및 검증	10	100	·살충활성 관련 유전자군 분석을 위하여 RNA-seq을 이용한 총채벌레 침입 전후의 transcriptome 분석 완료 ·Comparative transcriptome 분석 및 up and down regulated 유전자군 분석 완료 ·Validation을 통한 살충활성 기능성 유전자 분석 및 검증 완료 ·총채벌레 살충성 진균의 작용기작 분석 완료
합계	**100**		

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

○ 선행연구를 통하여 선발된 곤충병원성 진균의 NGS 기반 유전체 분석기술을 활용하여 난방제 해충인 총채벌레를 효과적으로 방제하는 미생물농약(유기농업자재, 제품명: 총채싹)의 개발 및 산업화를 조기 창출하였음.

○ 특히 본 연구로 출시한 총채싹(유효균주:*B. bassiana* ERL836)은 17년 2월 성공적으로 런칭하였을 뿐만 아니라, 정확한 작용기작 구명을 통한 약효 발현으로 농업 현장에서 높은 평가를 받고 있음.

○ 곤충병원성 진균의 Whole Genome Sequencing 및 염기서열 분석을 통해 병원성(pathogenesis)과 관련된 유전자군의 확인과 더불어 RNA-seq를 이용한 살충활성 관련 유전자군 분석을 수행하였으며 이를 이용한 총채벌레 침입 전후의 transcriptome을 분석, 살충성 진균의 과학적인 작용기작을 구명하였음.

○ 결론적으로 저항성 총채벌레 방제를 위한 신규 살충제에 대한 산업계의 수요를 충족시킬 수 있었으며, 글로벌 경쟁력을 갖춘 작물보호제 원천기술 확보하여 글로벌 시장에 진출할 수 있는 기반을 마련하였음.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

○ 본 과제의 가장 큰 목적은 기선발된 곤충병원성 진균을 미생물농약(유기농업자재)으로 산업화하는 것으로써 곤충병원성 곰팡이를 NGS 기반 유전체 분석기술을 활용하여 미생물농약(유기농업자재, 제품명: 총채싹)으로 산업화 하는데 성공하였으며 RFP 상 정량적 목표를 초과적으로 달성하였음. 조기성과창출로 제품을 2017년도에 출시하여 매출 발생함. 2018년도 매출 계획은 출시 1차년도 대비 약 300% 향상함. 2019년도 이후 해외에 제품을 등록하여 년 매출 100억이상 달성 계획임.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

○ 토양 내 총채벌레 번데기 방제를 위한 토양입제처리제를 전세계 최초 개발하여 글로벌 시장 선점에 우위를 차지하고 있음

○ 친환경농업 뿐만 아니라 관행농업의 잔류 문제를 해결할 수 있는 자재로 개발하고 화학농약과의 체계처리를 통하여 시너지 효과를 나타낼 수 있는 방법을 개발하고자 함.

○ 약제저항성 총채벌레 개체군을 대상으로한 방제효율 검토를 통하여 기개발된 화학농약 유효성분의 사용 존속기간을 연장시킬 수 있는 관리방법을 개발하고자 함.

○ 총채벌레류 외의 다양한 해충에 대한 적용확대 시험을 통하여 국내를 포함한 글로벌 광범위성 미생물농약 살충제 제품으로 개발하고자 함.

○ 유전체 연구를 통하여, 총채벌레 방제용 미생물 살충제의 추가 제품 연구를 위한 플랫폼으로 활용 예정임.

IV. 보안성 검토

○ 일반과제에 해당함.

[**별첨** 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	□자유응모과제 ■지정공모과제	분 야	농업
연 구 과 제 명	미생물 유전체 정보 활용 경제작물 미생물농약 개발		
주관연구기관	㈜팜한농	주관연구책임자	신택수
연 구 개 발 비	정부출연 연구개발비 / 기업부담금 / 연구기관부담금 / 총연구개발비		
	300,000,000 원 / 300,000,000 원 / - / 600,000,000 원		
연구개발기간	2016. 2. 29 ~ 2018. 2. 28		
주요활용유형	□산업체이전 □교육 및 지도 □정책자료 ■기타(자체사업화) □미활용 (사유:)		

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
▶ 총채벌레 살충성 진균의 제품화 연구 1) 최적제형 선발(제형 1건 이상) 2) 약효약해(약효 >60%, 약해 <1) 제품 등록 시험 완료 3) 대량배양 공정도 확보	▶ 총채벌레 살충성 진균의 제품화 연구 1) 최적제형 선발 ① *B. bassiana* ERL836 균주의 토양처리 최적 제형 개발: 5% GR 제조처방 확립 1건 ② 시제품의 제제 안정성 시험: 원제의 저장안정성 시험 확보 1건 2) *B. bassiana* ERL836의 총채벌레 약효/약해 시험 완료 (약효 70% 이상, 약해 없음) 완료, 6종 독성 시험 등 등록시험 완료 3) 최적 배양 조건 확립(물리/화학 조건) 및 대량 최적배양 공정개발 1건
▶ 총채벌레 살충성 진균인 *B. bassiana* ERL836 균주의 산업화 1) 대량생산 공정도 확보 및 시제품 제작 1건 이상 2) 약효약해 농가 포장시험(전시포) 포장시험 2건 이상 3) 제품등록 신청 1건 이상	▶ 총채벌레 살충성 진균인 *B. bassiana* ERL836 균주의 산업화 1) 총채싹(유효균주: *B. bassiana* ERL836) 대량 생산 공정도 확보 1건 2) 총채싹의 오이 총채벌레 포장약효 시험 3건 완료 3) 유기농업자재 등록 1건(제품명: 총채싹)

▶ 선정 균주의 유전체 서열 해독 및 정보 분석 1) 살충성 진균 라이브러리를 활용한 총채벌레 방제활성 평가 2) 총채벌레 방제 활성이 높은 *B. bassiana* ERL (또는 JEF) 균주의 Whole Genome Sequencing 및 염기서열 분석 3) 병원성(pathogenesis)과 관련된 유전자군 분석	▶ 선정 균주의 유전체 서열 해독 및 정보 분석 1) 살충성 진균 라이브러리를 활용한 총채벌레 방제활성 평가 완료 2) 총채벌레 방제 활성이 높은 *B. bassiana* ERL (또는 JEF) 균주의 Whole Genome Sequencing 및 염기서열 분석 완료 3) 병원성(pathogenesis)과 관련된 유전자군 분석 완료
▶ 효능 관련 기능성 유전자 분석 및 검증 1) 살충활성 관련 유전자군 분석을 위하여 RNA-seq을 이용한 총채벌레 침입 전후의 transcrip-tome 분석 2) Comparative transcriptome 분석 및 up and down regulated 유전자군 분석 3) Validation을 통한 살충활성 기능성 유전자 분석 및 검증 4) 총채벌레 살충성 진균의 작용기작 분석	▶ 효능 관련 기능성 유전자 분석 및 검증 1) 살충활성 관련 유전자군 분석을 위하여 RNA-seq을 이용한 총채벌레 침입 전후의 transcrip-tome 분석 완료 2) Comparative transcriptome 분석 및 up and down regulated 유전자군 분석 완료 3) Validation을 통한 살충활성 기능성 유전자 분석 및 검증 완료 4) 총채벌레 살충성 진균의 작용기작 분석 완료

3. 연구목표 대비 성과

성과목표	전략 미생물 해독	유용 유전자 원 확보	사업화 · 실용화	표준 유전체 해독	메타지놈 분석	유전체 분석기술개발	NABIC 등록	병원성 미생물 진단마커개발	병원성 미생물 정보 완성	미생물 병발생 기작 규명
최종목표	1	4	1							
연구기간 내 달성실적	1	4	1				5			
달성율 (%)	100	100	100				추가 성과			

성과 목표	사업화지표											연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과				교육지도	인력양성	정책 활용홍보		기타 (타연구활용 등)
												논문								
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		SCI	비SCI	논문평균IF	학술발표			정책활용	홍보전시	
단위	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건		건		명	건	건	
가중치												\	\							
최종목표	2			1			900					2			2					
연구기간 내 달성실적	2			1								2			17					
달성율 (%)	100			100			추가성과					100			850					

4. 핵심기술

구분	핵 심 기 술 명
①	살충성 진균의 토양처리 최적제형 기술
②	살충성 진균의 대량배양 및 대량생산 공정도 확보 기술
③	선정 균주의 유전체 서열 해독 및 정보 분석 1) 살충성 진균 라이브러리를 활용한 총채벌레 방제활성 평가 2) 총채벌레 방제 활성이 높은 *B. bassiana* ERL(또는 JEF) 균주의 Whole Genome Sequencing 및 염기서열 분석 3) 병원성(pathogenesis)과 관련된 유전자군 분석
④	효능 관련 기능성 유전자 분석 및 검증 1) 살충활성 관련 유전자군 분석을 위하여 RNA-seq을 이용한 총채벌레 침입 전후의 transcriptome 분석 2) Comparative transcriptome 분석 및 up and down regulated 유전자군 분석 3) Validation을 통한 살충활성 기능성 유전자 분석 및 검증 4) 총채벌레 살충성 진균의 작용기작 분석

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소화흡수	외국기술 개선개량	특허 출원	산업체이전 (산업화)	현장애로 해 결	정책 자료	기타
①의 기술	v									
②의 기술		v								
③의 기술		v					v			
④의 기술		v					v			

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	제품 적용을 통한 매출 증대
②의 기술	제품 적용을 통한 매출 증대
③의 기술	제품 품질향상 및 기술자료 적용 / 매출 증대
④의 기술	제품 품질향상 및 기술자료 적용 / 매출 증대

7. 연구종료 후 성과창출 계획

○ 해당사항 없음.

8. 연구결과의 기술이전조건

핵심기술명[1]	기술이전 계약서		
이전형태	□무상 ■유상	기술료 예정액	기업 기밀보안으로 비공개
이전방식[2]	□소유권이전 ■전용실시권 □통상실시권 □협의결정 □기타( )		
이전소요기간	-	실용화예상시기[3]	17년 2월 제품출시
기술이전시 선행조건[4]	선행조건 없음		

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 포스트게놈 다부처 유전체사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 포스트게놈 다부처 유전체사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.