

최 종  
연구보고서

느타리버섯 재배사내 버섯파리류 해충의  
환경친화적 방제제 개발

Development of environmentally-friendly biological  
agent for control of mushroom flies

연구기관

동아대학교

농 립 부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “느타리버섯 재배사내 버섯파리류 해충의 환경친화적 방제제 개발” 과제의 최종 보고서로 제출합니다.

2003년 8월 일

주관 연구 기관명 : 동아대학교

총괄 연구 책임자 : 손 홍 대

제1세부 연구책임자 : 손 홍 대

제2세부 연구책임자 : 진 병 래

연구원 : 김 성 렬

연구원 : 조 은 숙

연구원 : 배 진 식

연구원 : 정 은 화

연구원 : 최 광 호

연구원 : 박 혜 진

연구원 : 이 광 식

연구원 : 한 지 희

# 요 약 문

## I. 제 목

### 느타리버섯 재배사내 버섯파리류 해충의 환경친화적 방제제 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

농가 고소득 작목으로 확고한 위치를 차지하고 있는 느타리버섯은 매년 재배농가와 생산량 및 시장규모가 급증하고 있다. 이러한 느타리버섯 재배에 있어서 큰 문제점으로 대두되고 있는 것 중의 하나는 버섯파리류 해충의 극심한 직·간접적인 피해를 들 수 있다. 우리나라 느타리버섯 재배지에서 발생하는 주요 버섯파리류 해충은 *Lycoriella mali* 및 *Coboldia fuscipes*로, 그 피해정도는 생산량의 약 30% 이상에 달하고 있는 것으로 추정되고 있다. 느타리버섯 재배 시설 특성 상 동일장소에서 연작되며, 재배사의 환경조건이 버섯파리류 해충이 연중 발생할 수 있는 호조건을 제공하기 때문에 그 발생속도가 빠르고 피해가 급증하고 있는 실정이다.

특히 중요한 것은 버섯파리류가 해충으로서 유충의 직접적인 피해뿐만 아니라 성충에 의한 느타리버섯의 주요 병해인 세균성 갈반병 및 푸른곰팡이병 등을 전염시키는 중요한 매개체로 작용하고 있다는 것이다. 버섯파리류 해충 중 *L. mali*는 연중발생하며 유충의 직접적인 피해뿐만 아니라 성충의 경우 비행력이 좋아 병해매개의 확산력이 강하며, 실제 현장에서 *L. mali*가 발생한 부위는 세균성 갈반병 및 푸른곰팡이병 등이 동시에 만연하고 있다. *C. fuscipes*는 특히 많은 산란수로 인해 피해가 크며, 성충의 경우 비행도 하지만 주로 버섯이나 균상 위로 걸어다니기 때문에 병해매개가 심각하고 역시 *C. fuscipes* 발생부위에는 버섯병해가 만연하고 있다.

그러나 버섯재배시 항상 발생하는 버섯파리류 해충에 대한 적절한 방제대책이 없는 게 사실이고, 현재 개발되어 있는 버섯파리류 방제 약제로서는 국내 2개 농약회사 (노바티스의 디밀린과 동부한농의 노몰트) 총체 표피조직의 키틴질 형성을 저해하여 탈피억제로 살충효과를 나타내는 곤충생장조절물질 (Insect growth regulators: IGRs)이 판매되고 있으나, 이들은 버섯에 대한 약해로 인해 북토시까지 또는 발이유기시 1회 이내로 그 사용이 한정되어 있다. 이 시기는 재배농가에서 버섯파리류 해충의 피해가 극히 미약한 시기로 실제 버섯파리류 해충의 극심한 피해시기에는 사용 제한을 받는다는 문제점과 아울러 버섯파리류 해충 중에서도 종의 제한을 받는다는 문제점이 있다. 또 국내·외에서 버섯파리류에 대한 생

물학적인 방제법의 개발에 대한 바램에도 불구하고 생물학적 방제에 관한 연구가 극히 미진하며, 아직 그에 대한 체계적인 방제법이 전혀 확립되어 있지 않다는 것이 큰 문제점이다.

우리나라의 느타리버섯 재배 농가, 생산량 및 시장의 규모 등에 따른 버섯파리류에 의한 피해정도와 발생양상 및 병해 매개 그리고 화학적 방제의 곤란함 등을 고려할 때, 느타리버섯 재배사내 버섯파리류 해충의 유충과 성충 두 시기 각각을 동시에 타겟(target)으로 한 환경친화적인 방제제 개발이 급선무이다. 그 개발코자하는 환경친화적 방제제는 곤충생태·생리적 특성을 이용한 성충 방제용 유인살충 트랩 개발과 곤충병리학적인 측면에서 유충 방제용 곤충병원 미생물 이용 기술 즉 속효성과 강독성인 버섯파리류 특이 Bt의 분리와 제제화가 바람직하게 여겨진다. 이미 환경친화적 미생물살충제로 잘 알려진 기존의 *Bacillus thuringiensis* (Bt) 중 파리목에 독성이 있는 Bt subsp. *israelensis*가 검정파리 (*Calliphora vomitoria*)와 모기 방제에 성공적으로 적용되고 있으나, 버섯파리류 해충에는 병원성을 나타내지 않았고, 아직 버섯파리류 해충 방제용 Bt가 분리 보고되지 않았기 때문에 버섯파리류 방제용 강독성 Bt를 새롭게 분리해야 한다는 것이다.

따라서 본 연구는 성충 방제용 유인살충 트랩 개발에 의한 밀도 감소효과와 주 방제제로서 유충 방제용 곤충병원 미생물 즉 속효성과 강독성인 버섯파리류 특이 Bt의 분리와 제제화로 버섯파리류 해충의 환경친화적 방제제 개발에 그 목적을 두고 있다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 느타리버섯 재배지에서 가장 피해가 큰 버섯파리류 해충의 환경친화적 방제제 개발로 그 연구개발 내용 및 범위는 다음과 같다.

1. 버섯파리류 해충의 유인살충 트랩 개발
2. 버섯파리류 해충방제용 미생물살충제 개발

### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

#### 1. 버섯파리류 해충의 유인살충 트랩 개발

가. 국내 버섯파리류 해충의 분자생태적 특성

국내에 느타리버섯 재배사에서 대발생하는 버섯파리 *L. mali*와 *C. fuscipes*의 유전적 다양성과 지역적인 변이를 조사하기 위하여 미토콘드리아 COI 유전자를 분석하였다. 채집 개체 중 *L. mali* 55개체, *C. fuscipes* 41개체를 선발하여 mtDNA COI 유전자의 일부 (406 bp)의 염기서열을 결정된 결과, *L. mali*의 경우 매우 낮은 염기서열변이 (0.2%)를 나타내었다. 반

면 *C. fuscipes*는 41개체로부터 총 10개의 haplotype (CF1 ~ CF10)으로 최대 1.2%의 유전적 다양성을 보였다. *C. fuscipes*에서 집단 사이의 유전적 거리 ( $F_{ST}$ )는 0.345-0.094, 세대당 이동 암컷 이동율 ( $Nm$ )은 0.947로 나타났다.

#### 나. 버섯파리 유인살충 트랩 제작

유인 트랩 제작을 위한 색상 선발은 최종적으로 실제 느타리버섯 재배사 시험 결과를 토대로 결정하였으며, 버섯파리 유인을 위한 끈끈이 트랩의 색깔은 보라색이 효과적이었다. 버섯파리 유인을 위한 유인물질은 느타리버섯 재배사 발생되는 휘발성 향기 성분 중 약 50% 이상을 차지하고 있는 1-octen-3-ol 과 3-octanone 선발하여, n-hexane에 희석하여 1.5% agar 배지에 넣어 formulation시켜 유인효과를 검증하였다. *L. mali* 암컷 성충에 대한 유인효과는 0.5 mg의 1-octen-3-ol에서 낮으며, *C. fuscipes*에서는 1 mg의 1-octen-3-ol에서 암컷성충에 대한 유인효과가 높았다. 또한 3-octanone의 유인력 시험 결과와 종합하여 분석할 때, 1-octen-3-ol과 3-octanone의 비율이 2:1로 조성된 1 mg의 혼합물을 유인제로 사용하였을 때 버섯파리에 대한 유인효과가 가장 높았다. 이를 기초로 원통형, 삼각형, 고깔형 및 막대형의 여러 형태로 제작하여 실제 유인효과를 검증한 결과, 막대형 트랩에서 유인효과가 높은 것으로 나타났으며, 그 유인 효과는 약 33%정도로 나타났다.

#### 다. 활용 건의

유인살충 트랩은 느타리버섯 재배사 내에서 버섯파리의 밀도 감소에 효과가 인정되어, 특허를 출원할 예정이다. 국내에 서식하는 버섯파리류 해충의 분자 생태적 특성은 국제 SCI 학술잡지 (Appl. Entomol. Zool.)에 게재하였다. 따라서 본 연구의 유인살충 트랩은 지속적인 효율성 제고 연구와 함께 개발 기술은 산업체 이전에 따른 실용화가 가능할 것으로 기대된다.

## 2. 버섯파리류 해충방제용 미생물살충제 개발

### 가. 버섯파리류 해충 방제용 새로운 *Bacillus thuringiensis* 656-3 균주의 분리

국내 느타리버섯 재배사의 토양으로부터 버섯파리류 해충 (*Lycoriella mali* 및 *Coboldia fuscipes*)에 강독성을 보이는 *Bacillus thuringiensis* 656-3 균주를 분리하였다. *B. thuringiensis* 656-3 (Bt 656-3) 균주는 이중피라미드형 독소를 생산하며, *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* (H8a8b)의 H antiserum과 반응하였다. 또한 Bt 656-3의 플라스미드와 단백질 양상은 *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14과 유사하였다. 그러나 독소 유전자 특이 프라이머를 이용한 PCR 분석에 의한 유전자 타입 결정에서 Bt 656-3은 reference 균주인 *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14와 달리 *cry4A*, *cry4B*, *cry10A*, *cry11A* 및 *cry1Ac* 유전자를 함유하고 있었다. 이러한 유전자 타입 결정 결과로 볼 때, Bt 656-3은 새

로운 균주로 판단된다. 아울러 Bt 656-3의 버섯파리류 해충에 대한 독성 검정 결과, Bt 656-3의 LC<sub>50</sub>치는 reference 균주인 *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14에 비해 *C. fuscipes* (73.6 ng · mL<sup>-1</sup>, 24시간 처리 후)에서 약 1.68배, *L. mali* (257.4 ng · mL<sup>-1</sup>, 24시간 처리 후)에서 약 1.95배정도 높게 나타났다.

#### 나. *Bacillus thuringiensis* 656-3 균주의 대량배양 및 제제화

버섯파리 해충 방제용으로 분리 선발된 Bt 656-3의 대량을 위한 배지는 단백질원으로 대두박을 탄소원으로 밀기울을 사용하였다. 대두박과 밀기울의 혼합 비율은 최종 농도가 4%의 범위에서 대두박과 밀기울을 20:20의 비율로 조제하여 대량배양기에서 배양하였을 때, 세포 성장도나 포자 형성 면에서 가장 양호하였다.

제제화는 Bt 656-3의 독소, 포자 및 배지에서 유래된 밀기울과 대두박의 입자를 포함하고 있는 건조 분말화된 배양침전물 40 g과 metamorphic starch 전분 60 g을 혼합하여 제제화하였다. 이러한 조건의 제제에서 2 g의 분말제제를 물 750 ml에 섞어 10 m<sup>2</sup>에 살포할 수 있는 양으로, 이때 Bt 656-3의 최종농도는  $5 \times 10^7$  cfu가 함유되며, 1회 살포시 실제 느타리버섯 재배지에서 최소 90% 이상의 살충력을 가진다. 제제는 살포 후 5일째까지 약 90%의 살충율을 보였다.

#### 다. *Bacillus thuringiensis* 656-3 제제의 느타리버섯 재배사 실증시험

느타리버섯 재배사 포장 실증 시험에서 Bt 656-3 제제 처리구와 무처리구 간의 느타리버섯 수확량을 비교한 결과, 제제 처리구에서 1차 수확시 약 7%, 2주기에서는 약 17%, 3주기는 약 83%, 4주기에서는 약 36%의 수확량이 증대되었다. Bt 656-3 제제 살포와 유인살충 트랩 설치를 느타리버섯 재배사 내에 동시에 처리함으로써 버섯파리 살충율 증대에 따른 느타리버섯 수확량의 조사에서는 제제와 트랩을 동시에 처리하였을 때 Bt 656-3 제제만을 살포하였을 때보다 1주기에 약 1%, 2주기에는 약 4%, 3주기에서는 약 14%, 4주기에서는 약 32%정도 수확량이 증대되었다.

#### 라. 활용 건의

버섯파리류 해충방제용 미생물살충제 개발에 있어서 가장 중요한 관건은 속효성 강독성의 새로운 Bt 균주이다. 따라서 본 연구에서 분리된 Bt 균주는 현재 특허 출원된 상태이다 (명칭: 버섯재배지 토양으로부터 분리된 바실러스 투린지엔시스 656-3 균주 및 이를 함유하는 해충방제용 조성물; 특허 출원번호 10-2003-0003628). 아울러 국제 SCI 학술잡지 (Current Microbiology)에 게재하였다. 따라서 본 연구의 기초적인 대량배양과 제제화에 이은 재배사내 실증 시험 결과, 본 연구에서 분리한 Bt656-3 균주를 이용한 버섯파리류 해충방제용 미생물살충제 개발 기술은 산업체 이전에 따른 실용화가 가능함을 입증하였다.

# SUMMARY

## I. Title

Development of environmentally-friendly biological agent for control of mushroom flies

## II. Objectives and Significance of the Research

Mushrooms have long been consumed as foods and herbs, and recently, consumption has rapidly increased. Accordingly, the number of mushroom farmhouses in Korea, which currently comprises almost 1.3% of all farmhouses, has increased. Moreover, the world market is constantly increasing at the rate of nearly 24% per year, because of the anti-cancer and immune-promoting activities of mushrooms.

Among the marketed mushrooms, *Agaricus bisporus*, *Lentinus edode*, *Philomyces confusa*, and *Pleurotus ostreatus* are predominant in Korea. Of these, the oyster mushroom, *P. ostreatus*, is the most important in respect to the number of farmhouses and the market share. Blight and arthropod infections are the two major problems of mushroom culture by conventional farmhouse operations.

Mushroom flies cause severe damage to mushrooms: larvae feed on the mycelium and fruitbody of mushrooms, and adult flies may transport pathogens such as nematodes, mites, and mold spores. *Lycoriella mali* (Diptera: Sciaridae) is the most abundant mushroom pest, occurring throughout the year in most regions of Korea. This species is distributed in North America, Europe, and Asia. *Coboldia fuscipes* (Diptera: Scatopsidae) is another major pest of oyster mushrooms in Korea.

However, the chemical insecticides for control of mushroom flies are limited. Therefore, biological control of mushroom flies is receiving attention as a desirable control method. The increased attention has been focused on search for *Bacillus thuringiensis* strains from soil samples collected at mushroom houses that have high toxicity against mushroom flies. *B. thuringiensis* is a Gram-positive, rod-shaped, spore-forming soil bacterium widely used for the microbial control agent of insect pests. Many thousands of *B. thuringiensis* variants have been isolated soil samples. Many *B. thuringiensis* isolates are toxic to lepidopteran larvae, and some are toxic to dipteran larvae or coleopteran larvae. In general, bipyramidal inclusions are toxic to Lepidoptera, ovoidal inclusions to Diptera, and rhomboidal inclusions to Coleoptera.

In addition, development of the effective attraction trap for biological control of

mushroom flies is another control method receiving attention. There have, indeed, been reports on the effect of the color and attractant of the traps on the trapping of insects such as the Japanese beetle *Popilla japonica*, the rose chafer *Macrodactylus subspinosus*, the pollen beetle *Meligethes aeneus*, male moths of the tobacco budworm *Heiothis virescens*, moths of the velvet bean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* and of the fall army worm *Spodoptera frugiperda*, and fruit flies. Recently, many reports confirmed the importance of visual stimuli in field trapping of insect pest, but attraction was enhanced by the addition of some chemical lures and plant odors.

In order to control of mushroom flies, therefore, an integrated control method incorporating the use of microbial agent for larvae and attraction trap for adults would be advantageous. However, little is known about environmentally-friendly biological agents for control of mushroom flies.

### III. Contents and Scope of the Research

Thus, the objective of the present work was to develop the environmentally-friendly biological agent for control of mushroom flies. There are two basic strategies of biological control. These are:

- 1) to develop the attraction trap for control of mushroom flies;
- 2) to develop the microbial agent for control of mushroom flies.

### IV. Results of the Research and Suggestion for the Application

#### Part 1. Development of attraction trap for control of mushroom flies

##### 1. Molecular ecological characterization of mushroom flies in Korea

Mitochondrial DNA sequence variation of the mushroom pest flies, *Lycoriella mali* (Diptera: Sciaridae) and *Coboldia fuscipes* (Diptera: Scatopsidae), in Korea was studied. We analyzed a portion of mitochondrial COI gene sequences (406 bp) to investigate the genetic diversity and geographic variation of the mushroom flies. *L. mali* showed minimal sequence divergence (0.2%) in two mtDNA haplotypes, whereas *C. fuscipes*



showed an intermediate level of sequence divergence (1.2% at maximum) compared with other relevant studies. While *L. mali* was fixed with one haplotype except for one population, *C. fuscipes* possessed a total of ten mtDNA haplotypes, and six of these occurred commonly in multiple populations. We ascribed the difference in the level of genetic variation between the two species to a difference in the degree to which they are dependent on cultured mushroom, which is fluctuating food source. In *C. fuscipes*, as in other cosmopolitan insect species, a high rate of female migration ( $Nm=0.947$ -infinite) and little genetic differentiation ( $F_{ST}=0.345$ -0.094) between populations were estimated.

## **2. Development of attraction trap**

For attraction trap to mushroom flies, *L. mali* and *C. fuscipes*, color of trap was selected violet in mushroom house. The 1-octen-3-ol and 3-octanone were tested as attraction materials. The 1-octen-3-ol and 3-octanone were diluted with n-hexane and formulated with 1.5% agar at a rate of 2:1 (1-octen-3-ol:3-octanone). One 1 mg of formulated attraction materials were released at the concentric box of the bottom of traps. The sticky trap was designed as plate type. In oyster mushroom house test, the attraction trap was approximately 36% (*C. fuscipes*) - 38% (*L. mali*) more effective than nontreatment in capturing mushroom flies.

## **3. Suggestion for the application**

The molecular ecological result of mushroom flies in Korea is previously published in SCI Journal (Appl. Entomol. Zool. 2001). In addition, the attraction trap in this study could be more effective for control of mushroom flies. We expect that the attraction trap may be useful in the development of environmentally-friendly biological agent for control of mushroom flies.

## **Part 2. Development of microbial agent for control of mushroom flies**

### **1. Isolation and characterization of a novel strain of *Bacillus thuringiensis* 656-3 for control of mushroom flies**

*Bacillus thuringiensis* 656-3, isolated from a soil sample collected at mushroom houses, showed high toxicity to mushroom flies, *Lycoriella mali* and *Coboldia fuscipes*. *B. thuringiensis* 656-3 produced bipyramidal inclusions and reacted with the H antiserum

of *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* (H8a8b). The plasmid and protein profiles of *B. thuringiensis* 656-3 were similar to those of its reference strain, subsp. *morrisoni* PG-14. However, PCR analysis using *cry* gene primers showed that *B. thuringiensis* 656-3, unlike its reference strain, had *cry4A*, *cry4B*, *cry10A*, *cry11A* and *cry1Ac* genes, suggesting that *B. thuringiensis* 656-3 was a unique strain with respect to gene type. In addition, *B. thuringiensis* 656-3 showed a high level of toxicity against mushroom flies, *L. mali* and *C. fuscipes*. The  $LC_{50}$  values of *B. thuringiensis* 656-3 were higher—approximately 1.68-fold to *C. fuscipes* (73.6 ng · mL<sup>-1</sup> after 24 h) and 1.95-fold to *L. mali* (257.4 ng · mL<sup>-1</sup> after 24 h)—than those of *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14, respectively.

## **2. Mass-culture and Formulation of *B. thuringiensis* 656-3**

For mass-culture of *B. thuringiensis* 656-3, soybean cake and wheat bran were used as medium source. *B. thuringiensis* 656-3 was cultured in the fermenter containing soybean cake (2%) and wheat bran (2%) mixed with 4% of final concentration. In this condition, the growth and spore forming of *B. thuringiensis* 656-3 were most effective.

For formulation of *B. thuringiensis* 656-3, the cultured *B. thuringiensis* 656-3, including toxin, spore, soybean cake and wheat bran particles, was freeze-dried and mixed with metamorphic starch at a rate of 40:60 (dried *B. thuringiensis* 656-3 culture:metamorphic starch). Two grams of *B. thuringiensis* 656-3 formulation, developed as powder formulation, was added to 750 ml of water. Seven hundred fifty milliliters of the formulation suspension containing  $5 \times 10^7$  cfu was sprayed at 10 m<sup>2</sup> of mushroom house, showing that the insecticidal effect of *B. thuringiensis* 656-3 formulation to mushroom flies, *L. mali* and *C. fuscipes*, was maintained over 90% by the fifth day after spraying.

## **3. Insecticidal effect of *B. thuringiensis* 656-3 formulation to mushroom flies in mushroom house**

Insecticidal effect of *B. thuringiensis* 656-3 formulation to mushroom flies in mushroom house was surveyed as the yield of mushroom. The yield of mushroom house with *B. thuringiensis* 656-3 formulation was increased approximately 7% for the first harvest, 17% for the second, 83% for the third, and 36% for the final harvest compared with control. In addition, the yield of mushroom house with *B. thuringiensis* 656-3 formulation and attraction trap was increased approximately 1% for the first harvest, 4% for the second, 14% for the third, and 32% for the final harvest compared with treatment of formulation only.

#### **4. Suggestion for the application**

The result of *Bacillus thuringiensis* 656-3 is previously submitted for patent (Patent title: *Bacillus thuringiensis* 656-3 isolated from the soil of mushroom houses and a composition for the prevention of insects containing the same; Patent submission number 10-2003-0003628) and published in SCI Journal (Current Microbiology, 2003). Accordingly, the novel *B. thuringiensis* 656-3 strain could be more effective for control of mushroom flies. We expect that the novel *B. thuringiensis* 656-3 strain may be useful in the development of environmentally-friendly biological agent for control of mushroom flies.

# CONTENTS

SUMMARY .....	6
CONTENTS .....	11
Chapter 1. Introduction .....	17
Chapter 2. Current situation and problems in domestic and foreign technology .....	20
Chapter 3. Research contents and results .....	23
Section 1. Introduction .....	23
Section 2. Development of attraction trap for control of mushroom flies .....	25
1. Materials and methods .....	25
1) Collection of mushroom flies .....	25
2) Analysis of mtDNA COI gene of mushroom flies .....	25
3) Attraction effect of mushroom flies to color .....	26
4) Attraction effect of mushroom flies to attraction materials .....	26
5) Screening of sex pheromone of mushroom flies .....	27
6) Attraction effect of mushroom flies to trap with various numbers .....	27
7) Attraction effect of mushroom flies to trap with various maintenance periods ....	27
2. Results and discussion .....	27
1) Occurrence of mushroom flies in mushroom house .....	27
2) Attraction effect of mushroom flies to color .....	34
3) Attraction effect of mushroom flies to attraction materials .....	38
4) Attraction trap for capturing of mushroom flies .....	41
5) Attraction effect of trap .....	43
6) Screening of sex pheromone of mushroom flies .....	47
7) Attraction effect of mushroom flies to trap with various numbers .....	49
8) Attraction effect of mushroom flies to trap with various maintenance periods ....	51

Section 3. Development of microbial agent for control of mushroom flies .....	52
1. Materials and Methods .....	52
1) Collection of soil samples .....	52
2) Isolation of <i>Bacillus thuringensis</i> .....	52
3) Microscopy .....	52
4) Toxicity assay .....	52
5) Determination of H-serotype .....	53
6) Isolation of plasmid DNA .....	53
7) PCR .....	53
8) Mass culture .....	53
9) Formulation .....	55
10) Characterization of Bt 656-3 formulation .....	55
11) Bt 656-3 formulation for control of mushroom flies .....	55
12) Yield of mushroom in mushroom house with Bt 656-3 formulation .....	55
13) Yield of mushroom in mushroom house with Bt 656-3 formulation and attraction trap .....	55
2. Results and discussion .....	56
1) Isolation and selection of <i>B. thuringiensis</i> .....	56
2) Biochemical characterization of Bt 656-3 .....	56
3) Mass culture of Bt 656-3 .....	62
a. Selection of medium for mass culture of Bt 656-3 .....	62
b. Mass culture of Bt 656-3 .....	66
4) Formulation and insecticidal effect of Bt 656-3 .....	69
a. Formulation of Bt 656-3 .....	69
b. Insecticidal effect of Bt 656-3 formulation .....	71
c. Optimum concentration of Bt 656-3 formulation .....	75
d. Optimum spraying volume of Bt 656-3 formulation .....	78
e. Spraying period and maintenance effect of Bt 656-3 formulation .....	80
f. Bt 656-3 formulation for control of mushroom flies .....	83
5) Insecticidal effect of Bt 656-3 formulation in mushroom house .....	84
a. Yield of mushroom in mushroom house with Bt 656-3 formulation .....	84
b. Yield of mushroom in mushroom house with Bt 656-3 formulation and attraction trap .....	86
<b>Chapter 4. Accomplishment and contribution .....</b>	<b>88</b>

Chapter 5. Application scheme of the research .....	90
Chapter 6. Information of foreign technology .....	91
Chapter 7. References .....	99

# 목 차

제 1 장 연구개발 과제의 개요 .....	17
제 2 장 국내·외 기술개발 현황 .....	20
제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과 .....	23
제 1 절 서론 .....	23
제 2 절 버섯파리해충의 유인살충 트랩 개발 .....	25
1. 재료 및 방법 .....	25
가. 버섯파리 채집 .....	25
나. 버섯파리류 해충의 mtDNA의 CO I 유전자 분석 .....	25
다. 버섯파리류의 색깔에 따른 유인효과 검정 .....	26
라. 휘발성 향기성분을 이용한 유인효과 검정 .....	26
마. 버섯파리류 해충의 sex pheromone 탐색 .....	27
바. 유인트랩의 개수에 따른 유인 효과 .....	27
사. 유인트랩내의 유인물질의 지속효과 .....	27
2. 결과 및 고찰 .....	27
가. 버섯파리류 해충의 발생양상 .....	27
나. 버섯파리류의 색깔에 따른 유인효과 검정 .....	34
다. 향기성분을 이용한 유인효과 검정 .....	38
라. 버섯파리 유인살충 트랩 제작 .....	41
마. 트랩의 유인살충 효과 검정 .....	43
바. 버섯파리류 해충의 sex pheromone 탐색 .....	47
사. 유인트랩 수에 따른 유인효과 .....	49
아. 유인트랩의 지속효과 .....	51
제 3 절 버섯파리해충 방제용 미생물살충제 개발 .....	52
1. 재료 및 방법 .....	52
가. 토양시료 채집 .....	52

나. <i>Bacillus thuringiensis</i> 의 분리 .....	52
다. 현미경 관찰 .....	52
라. 독성 검정 .....	52
마. H-Serotype 결정 .....	53
바. Plasmid DNA분리 .....	53
사. PCR .....	53
아. 대량배양 .....	53
자. 제제화 .....	55
차. Bt 656-3 제제의 특성 시험 .....	55
카. Bt 656-3 제제의 시제품 제작 .....	55
타. 느타리버섯 재배사에서 Bt 656-3 제제의 처리에 따른 수확량의 조사 .....	55
파. 느타리버섯 재배사에서 Bt 656-3 제제 살포와 유인살충 트랩 설치에 따른 효과 검정 .....	56
2. 결과 및 고찰 .....	56
가. Bt 분리 및 선발 .....	56
나. 선발 강독성 Bt 656-3의 생화학적 특성구명 .....	56
다. Bt 656-3의 대량 생산 .....	62
1) Bt 656-3의 대량 배양을 위한 배지 선발 .....	62
2) Bt 656-3의 대량 배양 .....	66
라. Bt 656-3의 제제화 및 살충력 검정 .....	69
1) Bt 656-3 의 제제화 .....	69
2) Bt 656-3 의 제제의 살충력 검정 .....	71
3) Bt 656-3 제제의 최적 살충농도 .....	75
4) Bt 656-3 제제의 최적 살포량 .....	78
5) Bt 656-3 제제의 지속 효과 및 살포 시기 .....	80
6) Bt 656-3 제제의 시제품 제작 .....	83
마. Bt 656-3의 제제의 느타리버섯 재배사 실증시험 .....	84
1) Bt 656-3 제제 살포에 따른 수확량 .....	84
2) Bt 656-3 제제와 유인살충 트랩 처리 .....	86
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	88
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....	90
제 6 장 연구개발과정 중에 수집한 해외과학 기술정보 .....	91



제 7 장 참고문헌 .....99

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적과 필요성

### 1. 기술적 측면

농가 고소득 작목으로 확고한 위치를 차지하고 있는 느타리버섯은 매년 재배농가와 생산량 및 시장규모가 급증하고 있다. 이러한 느타리버섯 재배에 있어서 큰 문제점으로 대두되고 있는 것 중의 하나는 버섯파리류 해충의 극심한 직·간접적인 피해를 들 수 있다.

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

특히 중요한 것은 버섯파리류가 해충으로서 유충의 직접적인 피해뿐만 아니라 성충에 의한 느타리버섯의 주요 병해인 세균성 갈반병 및 푸른곰팡이병 등을 전염시키는 중요한 매개체로 작용하고 있다는 것이다. 그러나 버섯재배시 항상 발생하는 버섯파리류 해충에 대한 적절한 방제대책이 없는 게 사실이고, 곤충생장조절물질 (Insect growth regulators: IGRs) 조차도 효과적이지 못하며, 약해 문제뿐만 아니라 무공해농산물로 잘 알려진 버섯에 적절한 화학적인 방제대책이 세워지기는 힘든 형편이다. 또 국내·외에서 버섯파리류에 대한 생물학적인 방제법의 개발에 대한 바램에도 불구하고 생물학적 방제에 관한 연구가 극히 미진하며, 아직 그에 대한 체계적인 방제법이 전혀 확립되어 있지 않다는 것이 큰 문제점이다. 또한 국내 버섯 관련 전문연구기관에서도 버섯파리류 해충의 피해가 심각함을 인식하고 있음에도 불구하고 연구력이 부족한 상태이며, 재배 농가현장에서는 거의 무방비 상태이다.

따라서 우리나라의 느타리버섯 재배 농가, 생산량 및 시장의 규모 등에 따른 버섯파리류에 의한 피해정도와 발생양상 및 병해 매개 그리고 화학적 방제의 곤란함 등을 고려할 때, 본 과제에서 수행코자 하는 느타리버섯 재배사내 버섯파리류 해충의 유충과 성충 두 시기 각각을 동시에 타겟(target)으로 한 곤충병리화적인 기술과 곤충생태·생리화적인 기술의 응용 개발에 의한 환경친화적인 방제제 개발이 급선무이다.

### 2. 경제·산업적 측면

기능성 및 무공해농산물로 잘 알려진 버섯은 농산물 개방화에 따른 농가 고소득 작목으로 아울러 수출 유망작목으로 충분한 경쟁력을 갖고 있어 주목받고 있다. 우리나라 버섯생산액은 96년도 말 기준으로 약 4,907억원으로 그 시장규모는 계속 증대되고 있다. 특히 느타리버

섯은 국내 버섯 생산량의 74%를 차지하고 있는 (1998년도 느타리버섯 생산액 3,182억원) 고소득 작목으로서 추천되고 있으며, 매년 증가 추세를 보이고 있다.

이러한 규모로 볼 때, 느타리버섯 재배지에서 생산량의 약 30% 이상으로 추정되고 있는 버섯파리류의 직·간접적인 피해는 실로 커다 하겠으며, 이는 경제·산업적 손실로 환경친화적인 방제제 개발은 당연한 시급과제라 여겨진다. 느타리버섯은 현재까지 전량 내수용으로 발전되어 왔고, 주요 농산물로 확고한 위치를 차지하고 있다. 그러나 느타리버섯은 재배시설 상의 문제로 인해 고품질의 생산이 어렵고 병해충 발생 등 재배 환경요인에 따른 가격의 진폭이 심하고 안정된 생산의 어려움이 문제점으로 지적되고 있으나, 재배시설 및 환경관리의 개선과 버섯파리류 해충 방제 기술 등이 이루어지면 국내 수요는 물론이고 수출품목으로 유망하다고 분석되고 있다.

### 3. 사회·문화적 측면

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

느타리버섯의 시장 규모와 고소득 추천 작목으로 매년 증가 일로로 단지화되고 있는 느타리버섯 재배농가 현장에서 버섯파리류 해충의 피해 호소에 대한 방제 대책의 영농지도책이 절실히 요구되고 있는 실정이다.

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

## 제 2 절 연구개발 내용 및 범위

### 1. 최종 연구 목표

느타리버섯 재배사내 버섯파리류 해충의 환경친화적 방제제 개발

- 버섯파리류 해충의 유인살충 트랩 개발
- 버섯파리류 해충방제용 미생물살충제 개발

## 2. 연차별 연구개발 내용 및 범위

구 분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 ( 2000 )	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 버섯파리류 해충의 유인살충 트랩 개발 (버섯파리류 해충의 유인요인 탐색 및 선발)</li> <li>· 버섯파리류 해충방제용 미생물살충제 개발 (버섯파리류 해충 병원성 Bt 분리 및 살충효과)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 국내 느타리버섯 재배사내 버섯파리류 해충 (<i>Lycoriella mali</i> 및 <i>Coboldia fuscipes</i>)의 발생양상 및 유전분석</li> <li>· 버섯파리류 해충의 유인요인 탐색</li> <li>· 버섯파리류 해충의 유인요인 선발</li> <li>· Bt 분리용 전국 느타리버섯 재배지 토양 채취</li> <li>· 버섯파리류 해충 병원성 Bt 분리 및 독성 검정</li> </ul>
2차 년도 ( 2001 )	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 버섯파리류 해충의 유인살충 트랩 개발 (버섯파리류 해충의 유인요인 이용 트랩형 제작)</li> <li>· 버섯파리류 해충방제용 미생물살충제 개발 (버섯파리류 해충 특이 Bt의 선발 및 특성)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 버섯파리류 해충의 유인요인 이용 트랩형 제작</li> <li>· 유인 효과 검정</li> <li>· 유인살충효과 검정</li> <li>· 버섯파리류 해충 특이 강독성 Bt의 선발 및 살충효과</li> <li>· 선발 강독성 Bt의 생화학적 특성 구명</li> <li>· 선발 강독성 Bt의 대량배양</li> </ul>
3차 년도 ( 2002 )	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 버섯파리류 해충의 유인살충 트랩 개발 (버섯파리류 해충 유인살충 트랩 제작 및 실증시험)</li> <li>· 버섯파리류 해충방제용 미생물살충제 개발 (버섯파리류 해충 특이 Bt의 제제화)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 버섯파리류 해충 유인살충 트랩 개발 (시작품 제작)</li> <li>· 유인살충 트랩의 재배사 실증 시험</li> <li>· 버섯파리류 해충용 유인살충 트랩의 특허 출원</li> <li>· 버섯파리류 해충 특이 Bt의 균주 등록</li> <li>· 버섯파리류 해충 특이 Bt의 대량생산</li> <li>· 버섯파리류 해충 특이 Bt의 제제화 및 실증 시험 (시작품 제작)</li> <li>· 버섯파리류 해충용 Bt 제제의 특허 출원</li> </ul>

## 제 2 장 국내·외 기술 개발 현황

### 제 1 절 국내·외 관련 기술의 현황과 문제점

국내 버섯 관련 최고 연구기관인 농업과학기술원을 중심으로 느타리버섯 관련 형질전환 및 우량품종 육종, 배양 생리, 재배 생력화 및 연중생산 기술, 바이러스 무병균주, 세균성 갈반병 진단 및 방제에 관한 많은 연구가 진행되고 있어 느타리버섯의 중요성과 규모를 보여주고 있다. 또한 농업과학기술원의 일부 버섯파리류 피해 및 화학적 방제 시험에 이어 각도 농업기술원을 중심으로 경기지역 주요버섯의 해충 정밀 조사, 느타리버섯 병원균의 발생 생태 및 방제시험, 경북지역 버섯 주요 병해충 발생생태 및 방제 시험, 버섯파리 생태 및 방제법 연구 등이 주로 '99 신규 경상과제로 조사되고 있는 점으로 미루어 그 피해의 중요성을 시사하고 있다고 여겨진다.

농림기술 개발 사업으로는 느타리버섯 액체종균을 이용한 느타리버섯 생산, 느타리버섯 세균성 갈반병의 종합방제법, 무농약 신재배 기술, 느타리버섯 바이러스병 퇴치를 위한 진단시약 개발 및 바이러스 무병주 선발, 느타리버섯 균상에 발생하는 푸른곰팡이병의 종합방제법 개발, 느타리버섯 배지제조 기계화 및 터널이용법 개발, PCR을 이용한 느타리버섯 주요병의 조기진단 및 병원균 검출 기술 개발 등이 수행 또는 수행 중에 있어, 역시 느타리버섯의 규모와 중요성을 잘 보여 주고 있다. 이런 점으로 미루어 볼 때, 느타리버섯의 생산량과 병해의 매개체로서 주요한 문제요인이 되고 있는 버섯파리류 해충의 환경친화적 방제 기술 개발은 시급히 해결해야 할 분야라고 여겨진다.

현재 개발되어 있는 버섯파리류 방제 약제로서는 국내 2개 농약회사 (노바티스의 디밀린과 동부한농의 노몰트) 층체 표피조직의 키틴질 형성을 저해하여 탈피억제로 살충효과를 나타내는 곤충생장조절물질 (Insect growth regulators: IGRs)이 판매되고 있으나, 이들은 버섯에 대한 약해로 인해 복토시까지 또는 발이유기시 1회 이내로 그 사용이 한정되어 있다. 이 시기는 재배농가에서 버섯파리류 해충의 피해가 극히 미약한 시기로 실제 버섯파리류 해충의 극심한 피해시기에는 사용 제한을 받는다는 문제점과 아울러 버섯파리류 해충 중에서도 중의 제한을 받는다는 문제점이 있다.

본 연구진은 이미 1997년-1999년 동안 농촌진흥청 특정과제 종료로 버섯파리류 해충방제를 위한 기초 연구를 수행하여 다음과 같은 결과를 확보하고 있다. 1997년부터 전국 16곳의 느타리버섯 재배지에서 버섯파리류의 시기별·계절별 발생양상 조사 결과, 국내 느타리버섯 재배지에서 대발생하고 그 피해가 심각한 버섯파리류 해충은 3종 즉 *Lycoriella mali*, *Coboldia fuscipes* 및 *Mycophila* sp.임을 밝혔다. 특히 *L. mali*와 *C. fuscipes*의 학명을 처음으로 밝혔으며, 아울러 *C. fuscipes*를 느타리버섯 가해 파리류 해충으로 처음 보고하였다. 한편, 연중발생하며 가장 문제시되는 *L. mali*와 여름에 대발생하여 심각한 피해를 끼치는 *C. fuscipes*는 실내사육 체계 확립으로 형태적 특성, 발육 특성, 생활사 및 난 발육과 난황

단백질 합성 소장 등의 생태·생리적인 10여편의 연구 결과들을 국내·외에 발표하였다. 또한 유인살충 트랩 개발을 위한 유인물에 대한 생물학적인 방제의 기초 연구를 이미 수행 중에 있다. 그러나 유성생식을 하며 늦가을에 전국적으로 대발생하는 *Mycophila* sp.는 아직 생태·생리적인 연구가 잘 수행되어 있지 않다.

또한 문제점으로 본 연구진의 연구 결과 이미 환경친화적 미생물살충제로 잘 알려진 기존의 *Bacillus thuringiensis* (Bt) 중 파리목에 독성이 있는 Bt subsp. *israelensis*가 검정파리 (*Calliphora vomitoria*)와 모기 방제에 성공적으로 적용되고 있으나, 버섯파리류 해충에는 병원성을 나타내지 않았고, 아직 국내·외를 막론하고 버섯파리류 해충 방제용 Bt가 분리 보고되지 않았기 때문에 버섯파리류 타겟용 강독성 Bt를 새롭게 분리해야 한다는 것이다. 그러나 1997-1999년의 농촌진흥청 특정연구 종료 결과로 본 연구팀에서는 버섯파리류 해충 중 연중 피해를 가하고 있는 *L. mali*에 독성을 보이는 Bt (Bti-3-1)를 분리하였고 그 특성을 조사중에 있다. 이러한 결과로 *L. mali* 뿐만 아니라 *C. fuscipes*와 *Mycophila* sp.에 대한 강독성 Bt 균주 분리와 제제화 및 혼제제 개발이 가능할 것이다.

현재까지 본 연구진에 의해 연구 및 현장 조사된 결과를 종합할 때, 버섯파리류 해충 중 *L. mali*는 연중발생하며 유충의 직접적인 피해뿐만 아니라 성충의 경우 비행력이 좋아 병해매개의 확산력이 강하며, 실제 현장에서 *L. mali*가 발생한 부위는 세균성 갈반병 및 푸른곰팡이병 등이 동시에 만연하고 있다. *C. fuscipes*는 특히 많은 산란수로 인해 피해가 크며, 성충의 경우 비행도 하지만 주로 버섯이나 균상 위로 걸터다니기 때문에 병해매개가 심각하고 역시 *C. fuscipes* 발생부위에는 버섯병해가 만연하고 있다. *Mycophila* sp.는 유태생으로 큰 피해를 가하는데, 특히 이 유충이 균상에 널리 퍼질 경우 아예 버섯균이 성장하지 못하기 때문에 수확을 할 수 없을 정도로 심각한 피해를 끼치고 있다.

따라서 버섯파리류 해충은 생활사가 짧고 연중발생하며, 유충과 성충 모두가 느타리버섯에 피해를 가하기 때문에 유충기와 성충기 각각을 동시에 타겟 (target)으로 하는 방제제 개발이 요구되어진다. 그 개발코자하는 환경친화적 방제제는 곤충생태·생리적 특성을 이용한 성충 방제용 유인살충 트랩 개발과 곤충병리학적인 측면에서 유충 방제용 곤충병원 미생물 이용 기술 즉 속효성과 강독성인 버섯파리류 특이 Bt의 분리와 제제화가 바람직하게 여겨진다.

가장 큰 문제점으로 버섯은 작목 특성 상 화학적 방제가 어려운 실정이다. 게다가 아직 국내·외적으로 버섯파리류 해충의 친환경적 방제 기술이 전혀 수립되어 있지 않기 때문에, 국내 느타리버섯 농가의 경우 버섯 성장과 수확기에 버섯파리류의 피해에도 불구하고 무방비 상태로 수확을 하며 그 손실을 감수할 수밖에 없는 실정이다.

## 제 2 절 앞으로 전망

버섯재배의 경우 소비량의 급증과 함께 대규모화 및 기업농화 추세로 발전되고 있는 실정

이다. 이러한 결과로 대두되는 문제점으로는 연작화와 단지화에 따른 병해충 발생의 심각한 피해를 들 수 있다.

특히 우리나라 버섯생산량의 대부분을 차지하고 있는 느타리버섯의 경우 재배 시설 특성 상 버섯파리류 해충의 직·간접적인 극심한 피해에도 불구하고 작목특성 상 화학적 방제가 어려운 실정이다. 따라서 본 과제의 버섯파리류 해충의 환경친화적 방제제 개발은 안정적인 그리고 고품질의 버섯생산에 따른 국제경쟁력 확보로 수출이 충분히 가능할 것으로 전망된다.

### 제 3 절 기술도입의 타당성

범세계적인 환경농업 또는 환경친화적 지속농업의 추세와 버섯은 작목 특성 상 화학적 방제가 어려운 실정에도 불구하고 아직까지 국내·외적으로 버섯파리류 해충의 생물학적 방제 기술 체계가 수립되어 있지 않다.

따라서 버섯파리류 해충의 환경친화적 방제제 개발은 오히려 일본, 중국, 대만 등 버섯재배 국가에 기술 수출이 충분히 가능할 것으로 기대된다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 서론

우리나라에서 느타리버섯의 재배는 1970년대 초부터 미루나무 등과 같은 활엽수에 원목재배를 하면서 시작되었다. 이 당시의 재배로는 몇몇 버섯 애호가들에 의하여 취미로 재배하여 수확하는 정도로 그 수확량이 아주 적었고, 배양기간이 지나치게 길어 시장형성도 이루어지지 않았었다. 본격적인 느타리 재배 역사는 농촌진흥청 균이과 (현 응용미생물과)의 연구자들에 의하여 우리나라 농가에서 손쉽게 구할 수 있는 볏짚을 이용한 재배 방법이 개발 보급되면서 시작되었고 현재는 전 세계에서 가장 훌륭한 환경 친화적 저비용 다수확 재배법 개발사례로 손꼽히고 있다. 볏짚을 이용한 재배방법이 확립된 이래 우리나라의 버섯산업이 비약적으로 발전하였고 집약화와 대량 생산이 가능하게 되어 생산량으로는 일약 느타리버섯 재배 선진국으로 도약 할 수 있었다. 그러나 1980년대 중반으로 들어가면서 농촌의 인구가 감소하고 노동인구의 고령화로 인한 벼농사의 기계화가 일반화되어 볏짚의 확보가 어려워져 대체 배지 재료의 개발이 시급한 연구과제의 하나로 부상되었다. 이미 국내의 연구진은 볏짚 발효 재배법 개발의 경험이 있었기 때문에 이 경험을 토대로 기존의 재배사에서 그대로 사용할 수 있는 폐쇄 배지를 이용한 재배법을 개발하게 되었다. 배지재료를 대부분의국에서 수입해야하는 어려움은 있지만 비교적 저 비용으로 재배기간이 단축되고 자금회전이 빠른 특징 때문에 1980년대 초부터 본격적으로 보급되기 시작하였고 현재는 느타리버섯재배농가의 79%이상이 폐쇄 배지를 이용하여 재배하고 있는 것으로 추정된다. 1980년대에는 소비자의 생활 수준향상으로 인하여 기호가 다양하게 변화하였고, 국가경제의 호황으로 농가에 대한 정부의 지원이 증가하여 일부 자금력이 있는 농가를 중심으로 하여 일본 등지에서 병재배 버섯의 대표라고 할 수 있는 팽이버섯의 재배 기술과 재배 시설을 도입하였으나 국내 소비자의 외면과 막대하게 투자한 시설비의 회수가 미진하여 많은 팽이 재배가 성공을 거두지 못하였다. 현재는 이들 병재배 시설을 역시 일본에서 도입한 애느타리와 큰느타리 또는 버들송이 등의 병재배로 전환하는 농가가 증가하고 있는 실정이다.

우리나라에서 재배 생산되어 통계 자료를 확보할 수 있는 버섯류는 느타리, 양송이, 표고, 팽이, 영지 등이다. 이 중에서 생산량과 생산농가가 가장 많은 것은 느타리로 전체 버섯 재배 농가 중 약 48.6%를 차지하고 있다.(버섯 영농과 삶 1999,12월호). 농촌진흥청 농업경영관실에서 발행한 98년 농업경영 개선을 위한 농축산물 소득자료집(농업경영보고 제 16 호)에 따르면 전국 느타리버섯 재배 농가는 9,259호이며, 면적은 2,118,431평으로 한 농가 당 228.8평의 균상 면적에서 재배를 실시하고 있으며, 총 생산량은 75,684,000kg으로 평당 35.7kg을 수확하고 있다. 연간 총 생산비는 평당 127,300원으로 이중 재료비가 53.9%를 차지하고 있다. 연 평균 느타리버섯 가격은 kg당 3,100원으로 농가 당 연간 평균 소득은 28,119,520원이다. 연 평균 재배 횟수는 1.9회로 1회 재배에 약 14,700,000원의 소득을 올리는 것으로



조사 되어있다.

국내 대부분 느타리버섯 재배 농가의 재배 시설은 버섯재배에서 가장 중요한 온도, 습도, 환기, 광조건 등의 재배환경을 조절 할 수 있는 자동 시설이 없는 보온 덮개식 간이 시설 혹은 조립식 채널을 이용한 재배시설이 대부분이다. 재배시설은 정확한 통계가 없으나 재래식 보온덮개 간이시설이 약 60%이상 차지하는 것으로 추정되고 있으며, 최근에 극히 일부 농가에서 많은 돈을 투자하여 조립식 패널 재배사에 냉각 장치를 설치한다든지, 풍차식 자동 재배사를 설치하여 재배하고 있는 농가도 있다. 또 재배에서 빼놓을 수 없는 중요한 항목 중의 하나가 배지 재료와 재배 형태라고 할 수 있는데 거의 모든 농가가 폐쇄를 사용하여 균상 재배를 실시하며, 일부에서 벗짚을 이용한다든지 혹은 봉지 재배를 실시하고 있다. 그러나 이렇게 다양한 재배 형태를 가진 모든 농가에서 앞에서 재배한 수준을 올리는 농가는 그다지 많지 않은 것으로 추정된다. 이러한 느타리버섯재배 실패 또는 소득 감소의 원인으로 1) 생산비에서 재료비와 시설투자비의 비중이 과도하게 높고, 2) 가격변동이 심하고 불안정하며, 3) 재배사 구조, 배지재료, 재배시기, 재배품종 등이 일률적이다. 또 4) 신품종의 개발이 미진하여 외국 도입 품종의 특성을 제대로 파악하지 못한 채 재배하는 경우가 많고, 5) 재배사 구조가 병해충에 직접 노출되어 있으며 병해충 피해에 효과적으로 대응하고 있지 못하고 있고 이에 관한 연구 개발도 부진한 점을 들 수 있다. 이외에도 느타리 재배에서 소득을 감소시키는 요인은 여러 가지가 있을 것으로 생각되나 이중에서도 현재와 같은 재배 환경에서 가장 큰 문제가 되는 것은 병해충에 의한 피해라고 할 수 있다.

느타리버섯의 발생과 생육 그리고 품질에 피해를 주는 대표적인 병해충의 피해로 세균성 갈변병, 푸른곰팡이 발생, 버섯파리 등을 들 수가 있는데, 이 중에 버섯파리는 해충으로서 유충의 직접적인 피해뿐만 아니라 병을 매개하는 매개충의 역할을 함으로 그 피해의 주된 원인이 되고 있다. 우리나라 느타리버섯 재배지에서 발생하는 주요 버섯파리류 해충은 *Lycoriella mali* 및 *Coboldia fuscipes*로, 그 피해정도는 생산량의 약 30% 이상에 달하고 있는 것으로 추정되고 있다. *L. mali*는 연중발생하며 유충의 직접적인 피해뿐만 아니라 성충의 경우 비행력이 좋아 병해매개의 확산력이 강하며, 실제 현장에서 *L. mali*가 발생한 부위는 세균성 갈변병 및 푸른곰팡이병 등이 동시에 만연하고 있다. *C. fuscipes*는 특히 많은 산란수로 인해 피해가 크며, 성충의 경우 비행도 하지만 주로 버섯이나 균상 위로 걸터다니기 때문에 병해매개가 심각하고 역시 *C. fuscipes* 발생부위에는 버섯병해가 만연하고 있다.

이들 병해충의 예방과 방제를 위하여 국내외의 많은 연구자들이 다양한 연구를 수행하고 있으나 느타리는 생육특성상 다습한 조건에서 재배가 이루어지고, 재배사의 구조가 개방형인 경우가 많으며 개인에 따라 관행 재배법이 다르고, 버섯균이 병원균과 같은 진균이기 때문에 선택성 약제가 적고, 버섯이 발생한 후의 약제방제는 약해를 입기 쉬우며, 농약의 잔류독성 문제가 심각하기 때문에 약제 개발이 대단히 어려운 실정이다. 현재 개발되어 있는 버섯파리류 방제 약제로서는 국내 2개 농약회사에서 총체 표피조직의 키틴질 형성을 저해하여 탈피억제로 살충효과를 나타내는 곤충생장조절물질 (Insect growth regulators: IGRs)이 판매되고 있으나, 이들은 버섯에 대한 약해로 인해 복토시까지 또는 발이유기시 1회 이내로

그 사용이 한정되어 있다. 이 시기는 재배농가에서 버섯파리류 해충의 피해가 극히 미약한 시기로 실제 버섯파리류 해충의 극심한 피해시기에는 사용 제한을 받는다는 문제점과 아울러 버섯파리류 해충 중에서도 종의 제한을 받는다는 문제점이 있다. 따라서 실제 재배 현장에서 버섯파리류 해충 방제에 실효를 거두지 못하는 경우가 많다.

본 연구진은 국내 느타리 버섯재배지에서 발생하는 버섯파리 해충의 환경친화적 방제제 개발 기술을 목적으로 본 연구를 수행하였다. 본 개발 기술은 버섯파리의 생리·생태적 특성을 이용한 성충 유인 살충 트랩 개발과 곤충병리학적인 측면에서 곤충 병원 미생물 이용 기술 즉 속효성과 강독성인 버섯파리류 특이 *Bacillus thuringensis* (Bt)의 분리와 제제화에 따른 미생물살충제 개발로, 짧고 빠른 생활사에 의해 유충과 성충이 함께 가해하는 느타리 버섯 재배사내에 동시에 투입하여 효과적이고 환경친화적으로 버섯파리류 해충을 방제하고자 하였다.

## 제 2 절 버섯파리류 해충의 유인살충트랩 개발

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 버섯파리 채집

버섯파리류 해충 (*Lycoriella mali*, *Coboldia fuscipes*)의 발생양상 조사: 강원도 영월군, 경상북도 경주시, 경기도 화성군, 부산시, 전라북도 보성군, 경상남도 사천시, 충청북도 춘천시 등 전국 8개 지역의 느타리버섯 재배지에서 *L. mali* 총 55개체와 *C. fuscipes* 41개체를 채집하였다(Fig 1).

#### 나. 버섯파리류 해충의 mtDNA의 CO I 유전자 분석

본 연구에 사용된 버섯파리 *L. mali*와 *C. fuscipes* 는 1999년 6월부터 2000년 7월까지 국내 느타리 버섯재배지에서 흡충관을 사용하여 채집하였다. 버섯파리류 해충의 각 지역별 유전적 변이 및 집단 유전적 구조를 파악하기 위하여 채집된 개체는 mtDNA CO I 유전자의 일부 (406bp) 염기서열을 결정하였다. 냉동보관중인 시료로부터 phenol-chloroform-isoamylalcohol과 Proteinase K를 사용하는 방법으로 total DNA를 추출한 후, mtDNA의 CO I 유전자 406염기 (bp)의 증폭을 위하여 초파리 (*Drosophila yakuba*)의 mtDNA의 염기서열을 이용, primer set를 제작하여 PCR을 실시하였다. 이후 ABI 377 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems)를 이용하여 DNA 염기서열을 분석하였다. 얻어진 각 개체의 염기서열은 IBM MacVector (ver. 6.5)를 이용하여 정렬, 각 개체의 최종 염기서열을 결정하였으며 각 개체로부터 새로운 염기서열을 얻는 대로 haplotype 번호를 부여하였다. *C. fuscipes* 각 집단내의 haplotype 다양도, nucleotide 다양도, 집단간의 유전적 거리 및 암컷 이동률 등을 Arlequin ver. 1.1을 사용하여 구하였다. 집단간의  $F_{ST}$ 수치는 세대당 암컷의 이동률  $Nm$ 을 구하기 위하여 사용되었으며 이를 위한 공식은  $F_{ST}=1/(2Nm+1)$ 이었다.

다. 버섯파리류의 색깔에 따른 유인효과 검정

끈끈이 트랩은 총 8가지 색깔의 색지 (20 × 20 cm)에 쥐노런 본드 (대길 화학)를 도포하여 제작하였다. 실내 시험은 100 × 100 × 1000 cm크기의 아크릴 박스를 제작하여 그 사면에 8가지 색깔의 끈끈이 트랩을 설치한 후 각 100마리의 공시충을 넣어 30분 간격으로 트랩에 유인된 공시충의 수를 조사하여 실시하였다. 실외시험에서는 8가지 색깔의 끈끈이 트랩을 재배상 내에서 30 cm 높이에 설치하였으며, 1일 간격으로 트랩에 유인된 버섯파리의 수를 조사하였다.

라. 휘발성 향기성분을 이용한 유인효과 검정

버섯파리류 해충이 느타리버섯 재배 초기에 발생하는 버섯향기 성분에 의해서 재배상 내로 유입되는 점을 착안하여 느타리버섯 재배시 발생하는 휘발성 향기성분으로는 1-octen-3-ol, 3-octanol, 3-octanone, pentadecanoic acid, hexadecanoic acid, octadecanoic acid, octadecadienoic acid 등 총 54종의 화합물 중 본 실험에서 사용된 유인제는 버섯향기 성분 중 약 50%이상을 차지하는 1-octen-3-ol (TCI-GR ;  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CH}_3$ )과 3-Octnone (TCI-EP ;  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COCH}_2\text{CH}_3$ )을 이용하였다. 먼저, 이 두 성분은 n-hexane에 농도를 0.1 mg, 0.5 mg, 1 mg, 2 mg으로 희석하여 1.5% agar 배지에 넣어 formulation시켜 각각의 유인효과를 검정하였으며, 이들 두 가지 1-octen-3-ol과 3-octenone의 혼합물에 대한 유인효과를 검정하기 위하여 각각 1:1, 2:1, 3:1, 4:1의 조성으로 혼합된 혼합물을 한천배지에 formulation시켜 *L. mali*와 *C. fuscipes*의 암,수컷에 대한 유인효과를 각각 1일 후, 유인된 버섯파리의 수를 조사하였다. 이때 유인된 버섯파리가 다시 도망가지 못하도록 유인되는 구멍을 직경 1 cm이하의 관을 사용하였다.

마. 버섯파리류 해충의 유인요인을 이용한 트랩의 제작

버섯파리류 해충 유인 살충을 위한 끈끈이 트랩을 개발하기 위하여, A형 (원통형), B형 (삼각형), C형 (고깔형), D형 (막대형 또는 평판형)으로 명명한 4종류의 트랩을 제작하여 실제 포장에서 그 효율성을 검정하였다. 이들 트랩은 유인트랩 색상에 따른 유인효과 검정에서 밝힌 바와 같이 유인효과가 가장 우수한 보라색으로 제작하였으며, 겉 표면에 끈끈이를 도포하였다. 여기에 일정한 농도를 유지하는 slow release type의 끈끈이 트랩을 제작하기 위하여 유인 효과가 확인된 버섯향기성분인 1-octen-3-ol과 3-octnone을 2:1 비율로 혼합한 1 mg을 agar에 formulation 하였으며, 방출용기에 주입한 후, 4종류의 트랩에 부착시켰다. 이렇게 제작된 유인 트랩은 트랩 내부에 철사를 이용하여 고정시켰다.

바. 유인트랩의 유인효과 검정

4가지 형태로 디자인 된 유인트랩을 실제 느타리버섯 재배상 내에 설치하여 버섯파리에 대한 유인효과를 검정하기 위하여 4가지 종류의 트랩에 버섯향기의 주성분인 1-octen-3-ol을 유인제로 사용하여 0.5 mg, 1 mg, 2 mg으로 농도를 달리하여 실험하였다. 이후 트랩 내부에 철사를 이용하여 고정시켜 사용하였으며, 이때 유인제를 부착시키지 않은 4가지 트랩도 control로써 같이 실시하여 1일 후 유인된 버섯파리의 개체 수를 조사하였다. 유인효과 검정 결과, D형 트랩이 버섯파리 유인에 가장 우수하여 D형 유인트랩에 버섯향기성분인 1-octen-3-ol (TCI-GR ;  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CH}_3$ )과 3-Octnone (TCI-EP ;  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COCH}_2\text{CH}_3$ )을 agar에 formulation 하였으며, 서서히 휘발되어 공기 중으로 확산

시키기 위하여 방출용기에 주입한 후, D형 트랩에 부착시켰다. 이때 버섯향기의 주성분인 1-octen-3-ol과 3-octnone을 다양한 농도로 혼합한 혼합물을 유인제로 사용하여 0.5 mg, 1 mg, 2 mg으로 농도를 달리하여 실험하였다. 또한 유인 혼합물을 첨가하지 않은 D형 트랩을 같이 실시하여 그 유인효과를 검증하였다.

#### 사. 버섯파리류 해충의 sex pheromone 탐색

우화 후 암, 수컷의 경과시기에 따른 교미율을 조사하기 위해 우화 후 1일, 2일, 3일의 암, 수컷을 각각 교미시켜 관찰하였다. 강력한 유인물질인 sex pheromone을 사용하는 방안으로 먼저, 버섯파리류 해충의 sex pheromone 분비생의 탐색을 위하여 *L. mali*와 *C. fuscipes* 암컷 성충의 몸마디를 각 부위별로 절단하여 수컷의 교미반응을 관찰하였으며, sex-pheromone 추출을 위하여 수컷이 반응을 보이는 부위인 후부체절을 n-hexane으로 세척하고 paper disk에 흡습시켜 이 추출물에 대한 수컷의 교미 반응을 관찰하였다.

#### 아. 느타리버섯 재배사 내에서 유인트랩의 개수에 따른 유인 효과

실제 느타리버섯 재배사 내에서 유인살충 트랩의 개수에 따른 유인 효과를 조사하기 위해, 재배사 10평 (33 m<sup>2</sup>) 당 D형 유인트랩을 1, 2, 3, 4개를 각각 설치하고 버섯파리 성충을 각 처리구당 300두를 처리하여 트랩의 수에 따른 유인효과를 조사하였다.

#### 자. 느타리버섯 재배사 내에서 유인트랩내의 유인물질의 지속효과

실제 느타리버섯 재배사 내에서 유인트랩내의 유인물질의 유인효과 지속시험은 재배사 10평 (33 m<sup>2</sup>)에 D형 유인트랩을 설치 1일, 3일, 5일, 10일 후에 버섯파리 성충300두를 처리하여 성충 유인율을 조사하였다.

## 2. 결과 및 고찰

### 가. 버섯파리류 해충의 발생양상

버섯파리류 해충의 발생 양상 조사와 그 유전적 다양성을 분석하기 위하여, 강원도 영월군, 경기도 화성군, 경북 경주시, 경북 의성군, 경남 사천시, 전남 보성군, 부산시 녹산 등 전국 7개 지역의 느타리버섯 재배지에서 버섯파리류 해충을 채집하였다 (Fig. 1). 그 결과, 조사 버섯재배지에서 *Lycoriella mali*와 *Coboldia fuscipes*가 공히 채집됨으로써 발생빈도나 피해정도에 있어서 두 종은 주요 버섯파리류 해충임을 확인하였다. *L. mali*는 전국에 걸쳐 연중 발생하는 것으로 조사되었고, *C. fuscipes*는 늦은 봄에서 여름 시기에 집중 발생하였다.

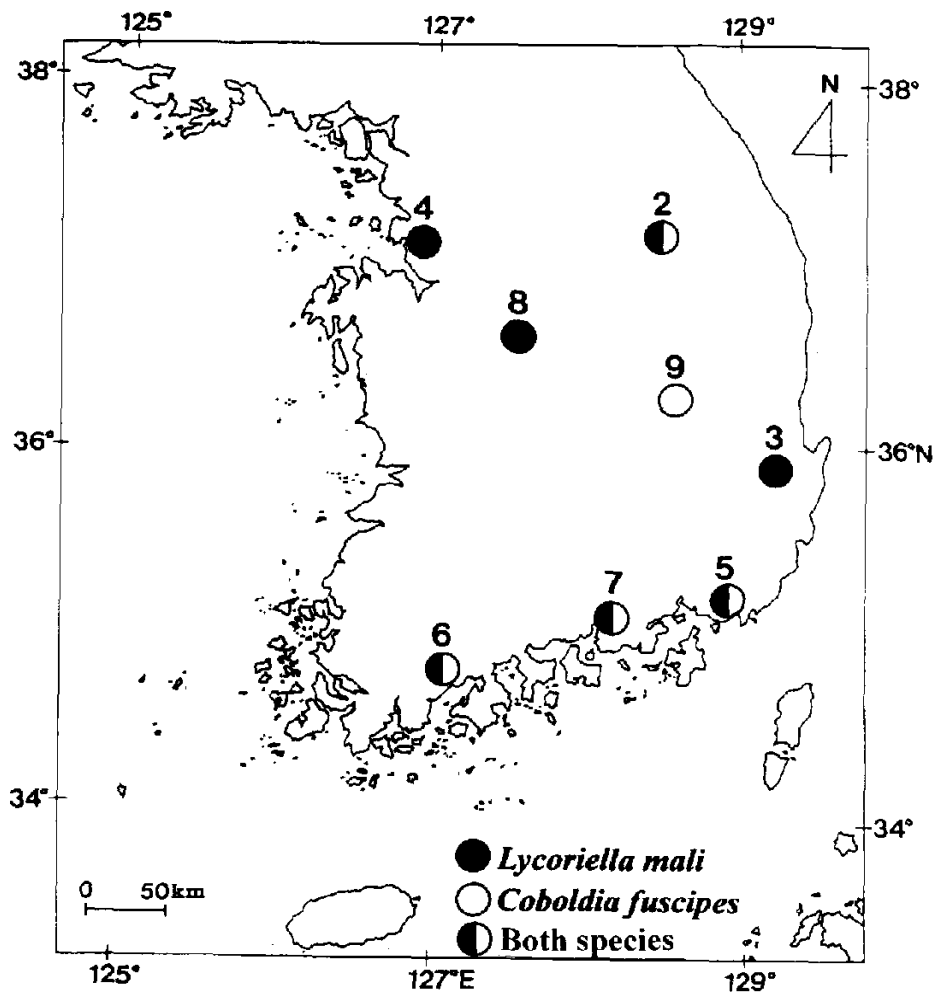


Fig. 1. Collection map of *Lycoriella mali* and *Coboldia fuscipes* in South Korea. 2. Gangwon-do yeongwol-gun, 3. Gyeongbuk-do gyeongju, 4. Gyeonggi-do hwaseong-gun, 5. Busan, 6. Jeonrabuk-do boseong-gun, 7. Gyeongnam-do sacheon, 8. Chungbuk chuncheon, 9. Gyeongbuk-do uisung.

각 지역별 유전적 변이 및 집단 유전적 구조를 파악하기 위하여, 채집 개체 중 *L. mali* 55개체, *C. fuscipes* 41개체를 선발하여 mtDNA COI 유전자의 일부 (406 bp)의 염기서열을 결정하였다. 그 결과, *L. mali*의 경우 매우 낮은 염기서열변이를 나타내었으며 부산지역의 2개체를 제외하고는 모두 동일한 하나의 haplotype으로 고정되어 있었다. 반면 *C. fuscipes*는

41개체로부터 총 10개의 haplotype (CF1 ~ CF10)을 얻었다 (Table 1). Haplotype CF4는 모든 조사지역에서 발견되었으며, CF2는 전라남도 보성군을 제외한 모든 지역에서, CF6은 부산 지역을 제외한 모든 지역에서 발견되었다. 또한 CF1과 CF7은 부산과 사천지역에서만 발견되었고, CF은 영월, 보성, 의성 지역에서 발견되었다. CF5, CF8, CF9 그리고 CF10의 네 개의 haplotype은 단지 한 지역에서만 각각 발견되었으며 이들 haplotype이 전체 조사개체에서 차지하는 비율은 12.2%였다.

이들 *C. fuscipes*의 10개 haplotype에 대한 mtDNA COI 유전자 일부 (406 bp)의 염기서열을 정렬한 결과, 8개의 염기자리에서 치환이 발견되었으며, 이중 7개는 codon 3번째 위치에서 발견되었다. 염기자리 200번 위치의 치환은 codon 첫 번째 위치의 치환으로 인해 haplotype CF9는 비극성의 Valine에서 같은 비극성의 Isoleucine으로 바뀌었다 (Fig 2). 각 집단내의 유전적 다양도 지수는 haplotype diversity (H)와 Nucleotide 다양도 ( $\pi$ )로 나타내었다 (Table 2). 각 집단내의 H와  $\pi$ 는 각각 0.5-0.7과 0.75-0.89로 높게 나타났다.

Table 1. A list of trapping localities, animal numbers, sex, mitochondrial COI haplotypes and GenBank accession numbers of *C. fuscipes*

Collecting locality (no. of individuals)	Collection date	Animal number	Sex	COI Haplotype	GenBank accession number
1. Dong-A Univ., Busan-si (1)	1998. 12. 17	JB3	F	CF1	AF319839
2. Yeongwol-gun, Gangwon-do (8)	1999. 7. 28	C2	F	CF2	AF319840
		C3	F	CF3	AF319841
		C5	F	CF4	AF319842
		C6	M	CF5	AF319843
		C7	M	CF6	AF319844
		C8	M	CF3	AF319845
		C9	M	CF6	AF319846
		C11	F	CF2	AF319847
5. Busan-si (8)	2000. 5. 9	C21	F	CF2	AF319848
		C22	F	CF2	AF319849
		C24	F	CF4	AF319850
		C25	F	CF1	AF319851
		C27	M	CF1	AF319852
		C28	M	CF1	AF319853
		C29	M	CF7	AF319854
		C30	M	CF1	AF319855
6. Boseong-gun, Jeonlanam-do (8)	2000. 5. 12	C33	F	CF4	AF319856
		C34	F	CF8	AF319857
		C35	F	CF6	AF319858
		C36	F	CF8	AF319859
		C38	M	CF4	AF319860
		C39	M	CF4	AF319861
		C41	M	CF3	AF319862
		C42	M	CF9	AF319863
7. Sacheon-si, Gyeongsangnam-do (8)	2000. 5. 12	C47	F	CF1	AF319864
		C48	F	CF6	AF319865
		C49	F	CF2	AF319866
		C50	F	CF4	AF319867
		C51	F	CF1	AF319868
		C59	M	CF7	AF319869
		C60	M	CF1	AF319870
		C61	M	CF4	AF319871
9. Uiseong-gun, Gyeongsangbug-do (8)	2000. 7. 21	C62	F	CF2	AF319872
		C66	M	CF4	AF319873
		C67	M	CF2	AF319874
		C72	M	CF6	AF319875
		C73	M	CF2	AF319876
		C76	M	CF3	AF320759
		C78	M	CF6	AF320760
		C79	M	CF10	AF320761

			30			60
CF1	TCGAATAAAT	AATATAAGTT	TTTGAATATT	ACCACCATCT	CTAACCTTAT	TATTAACAAG
CF2	.....	.....	.....	.....C	.....	.....
CF3	.....	.....	.....	.....C	.....	.....
CF4	.....	.....	.....	..C...C	.....	.....
CF5	.....	.....	.....	.....C	.....	.....
CF6	.....	.....	.....	..G...C	.....	.....
CF7	.....	.....	.....	.....C	.....	.....
CF8	.....	.....	.....	.....C	.....	.....
CF9	.....	.....	.....	..G...C	.....	.....
CF10	.....	.....	.....	..G...C	.....	.....
			90			120
CF1	TAGTATAGTA	GAAAATGGGG	CAGGAACAGG	ATGAACAGTA	TACCCTOCCC	TGTCCTCAGG
CF2	.....	.....	.....	.....G	.....	.....
CF3	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CF4	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CF5	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CF6	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CF7	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CF8	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CF9	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CF10	.....	.....	.....	.....	.....	.....
			150			180
CF1	AATCGCACAT	GCAGGAGCAT	CTGTAGATTT	AGCTATTTTT	TCTTTACATA	TAGCAGGAAT
CF2	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CF3	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CF4	..T.....	.....	.....	.....	.....	.....
CF5	..T.....	.....	.....	.....	.....	.....
CF6	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CF7	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CF8	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CF9	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CF10	.....	.....	.....	.....	.....	.....
			210			240
CF1	TTCCTCAATT	TTAGGAGCAG	TTAATTTTAT	TACAACAGTA	ATTAATATAC	GCTCAACAGG
CF2	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CF3	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CF4	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CF5	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CF6	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CF7	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CF8	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CF9	.....	.....A	.....	.....	.....	.....
CF10	.....	.....	.....	.....	.....	.....

Fig. 2. Sequence alignment of ten mitochondrial haplotypes of *C. fuscipes* obtained from 406-bp COI gene sequences. Only positions that differ from haplotype CF1 are indicated



			30			60
CF1	TCGAATAAAT	AATATAAGTT	TTTGAATATT	ACCACCATCT	CTAACCTTAT	TATTAACAAG
CF2	.....	.....	.....	.....C	.....	.....
CF3	.....	.....	.....	.....C	.....	.....
CF4	.....	.....	.....	..C...C	.....	.....
CF5	.....	.....	.....	.....C	.....	.....
CF6	.....	.....	.....	..G...C	.....	.....
CF7	.....	.....	.....	.....C	.....	.....
CF8	.....	.....	.....	.....C	.....	.....
CF9	.....	.....	.....	..G...C	.....	.....
CF10	.....	.....	.....	..G...C	.....	.....
			90			120
CF1	TAGTATAGTA	GAAAATGGGG	CAGGAACAGG	ATGAACAGTA	TACCCTCCCC	TGTCCTCAGG
CF2	.....	.....	.....	.....G	.....	.....
CF3	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CF4	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CF5	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CF6	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CF7	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CF8	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CF9	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CF10	.....	.....	.....	.....	.....	.....
			150			180
CF1	AATCGCACAT	GCAGGAGCAT	CTGTAGATTT	AGCTATTTTT	TCTTTACATA	TAGCAGGAAT
CF2	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CF3	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CF4	..T.....	.....	.....	.....	.....	.....
CF5	..T.....	.....	.....	.....	.....	.....
CF6	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CF7	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CF8	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CF9	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CF10	.....	.....	.....	.....	.....	.....
			210			240
CF1	TTCCTCAATT	TTAGGAGCAG	TTAATTTTAT	TACAACAGTA	ATTAATATAC	GCTCAACAGG
CF2	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CF3	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CF4	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CF5	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CF6	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CF7	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CF8	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CF9	.....	.....A	.....	.....	.....	.....
CF10	.....	.....	.....	.....	.....	.....

Fig. 2. continued.

Table 2. Within-locality diversity estimates of *C. fuscipes*

Locality	N <sup>a)</sup>	NH <sup>b)</sup>	H <sup>c)</sup>	S <sup>d)</sup>	$\pi$ <sup>e)</sup>
2. Yeongwol	8	5	0.89	5	0.006
5. Busan	8	4	0.75	6	0.005
6. Boseong	8	5	0.86	5	0.006
7. Sacheon	8	5	0.86	6	0.007
9. Uiseong	8	5	0.86	6	0.006

<sup>a)</sup>Sample size.

<sup>b)</sup>Number of haplotypes.

<sup>c)</sup>Haplotype diversity.

<sup>d)</sup>Number of polymorphic sites.

<sup>e)</sup>Nucleotide diversity.

Table 3. *C. fuscipes* mitochondrial COI sequence data of genetic distance ( $F_{ST}$ ) and per-generation female migration rates ( $Nm$ )

	2. Yeongwol	5. Busan	6. Boseong	7. Sachon
5. Busan	$F_{ST}=0.177$ $Nm= 2.327$			
6. Boseong	$F_{ST}=-0.002$ $Nm= infinite$	$F_{ST}=0.345^*$ $Nm= 0.947$		
7. Sacheon	$F_{ST}=-0.003$ $Nm= infinite$	$F_{ST}=-0.056$ $Nm=infinite$	$F_{ST}=0.124$ $Nm= 3.545$	
9. Uiseong	$F_{ST}=-0.094$ $Nm= infinite$	$F_{ST}=0.148$ $Nm= 2.880$	$F_{ST}=0.086$ $Nm= 5.333$	$F_{ST}=0.011$ $Nm=45.538$

\* $p<0.005$ .

집단 사이의 유전적 거리 ( $F_{ST}$ ), 세대당 이동 암컷수 ( $Nm$ )는 Table 3과 같다. 집단 간의 공동조상 계수 (0=동일 공동조상)는 0~0.424로 전반적으로 높은 수치 ( $\geq 1$ )은 나타나지 않았다. 가장 큰 유전적 거리 ( $F_{ST}$ )는 부산과 전남 보성군 사이에서 나타났으며 ( $F_{ST} = 0.345$ ) 유일하게 통계적으로 유의한 정도 ( $p < 0.05\%$ )의 유전적 거리를 나타내었다. 집단 간의 세대당 암컷 이동률의 분석에서는 부산과 보성 사이에서 비교적 낮은 세대당 암컷 이동률 ( $Nm = 0.947$ )을 나타내었으나 이 이외의 집단 사이에서는 높은 유전자 이동률을 나타내었고 명백한 계통지리학적 구조는 발견되지 않았다. 이 중 7개는 염기서열 변이율은 다른 유사연구와 비슷하였고 높은 유전자 이동율을 보이며 각 지역집단 사이의 유사한 유전적 다양도를 나타내었다. 결론적으로 *L. mali*는 매우 낮은 염기서열을 보인 반면, *C. fuscipes*는 지역적으로 1.2%의 염기서열 변이율을 나타내었다. 이러한 차이는 *C. fuscipes*가 *L. mali*에 비해 먹이나 서식지가 보다 광범위한 것이 그 원인이라고 추정된다.

#### 나. 버섯파리류의 색깔에 따른 유인효과 검증

일차 유인 요인으로 끈끈이 트랩의 색깔을 탐색하기 위하여 총 8가지 색깔의 끈끈이 트랩을 제작하여 느타리버섯 재배사 내에서 실시하였다. 실내의 예비시험 성적을 근거로 실재 야외 느타리버섯 재배사에서 버섯파리의 색깔에 따른 유인 효과를 검증 결과 (Fig. 3), *L. mali*의 경우 보라, 투명, 빨강, 노란색에 각각  $133.6 \pm 43.2$ ,  $128 \pm 25.4$ ,  $127 \pm 41.98$ ,  $113.6 \pm 28$ 마리의 버섯파리가 유인되었다 (Fig. 4 및 Table 4). 특히 유인된 *L. mali*의 성비 조사 결과는 수컷 성충이 암컷에 비해 약 6.2배정도 높은 유인효과를 보였다 (Fig. 5 및 Table 5). 따라서 실재 재배사 시험 결과를 토대로 볼 때, 버섯파리 유인을 위한 끈끈이 트랩의 색깔은 보라색이 효과가 있는 것으로 나타났다.

Fig. 3. Attraction effect of mushroom fly to colors at the oyster mushroom house.



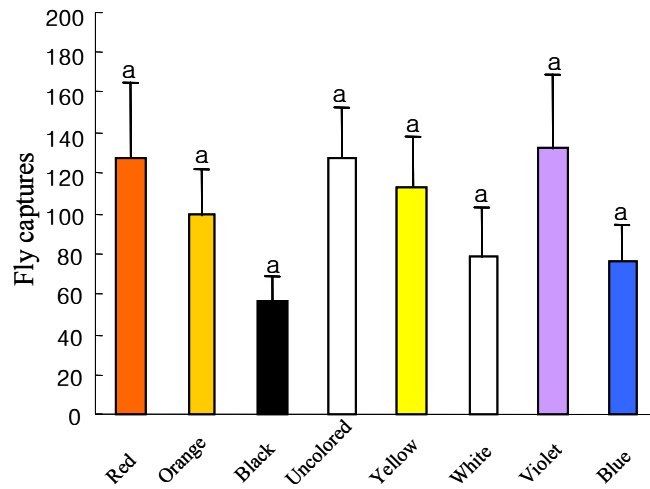


Fig. 4. Mean captures ( $\pm$ SE ; n=8) of *L. mali* adult in colored sticky traps at the oyster mushroom house. Mean followed by the same letters are not significantly different (p=0.05 ; LSD).

Table 4. Mean captures ( $\pm$ SE) of *L. mali* in colored sticky traps at the oyster mushroom house

Sticky trap color	No. of flies/trap (Mean $\pm$ SE)
Red	128.38 $\pm$ 38.55a
Orange	100.13 $\pm$ 17.64a
Black	52.63 $\pm$ 8.50a
Uncolored	128.00 $\pm$ 24.97a
Yellow	113.63 $\pm$ 23.66a
White	77.38 $\pm$ 21.95a
Violet	133.63 $\pm$ 40.76a
Blue	68.5 $\pm$ 17.27a

Mean followed by the same letters are not significantly different (p=0.05 ; LSD).

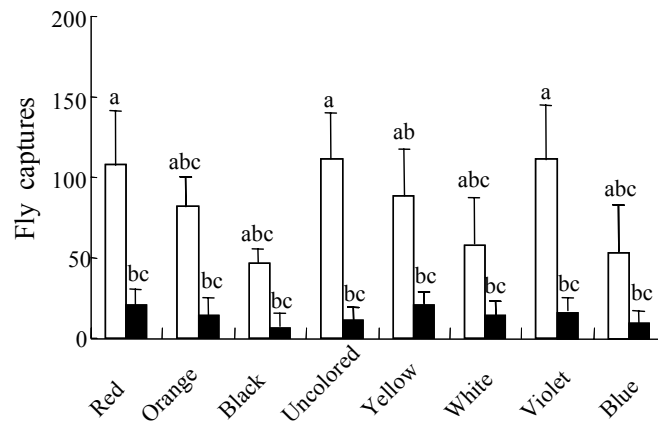


Fig. 5. Mean captures ( $\pm$ SE ; n=8) of female and male of *L. mali* adult in colored sticky traps at the oyster mushroom house. Mean followed by the same letters are not significantly different ( $p=0.05$  ; LSD). Open bar, male; solid bar, female.

Table 5. Mean captures ( $\pm$ SE ; n=8) of *L. mali* adult in colored sticky traps at the oyster mushroom house

Sticky trap color	No. of flies/trap (Mean $\pm$ SE)	
	Males	Females
Red	107.63 $\pm$ 35.13 a	20.75 $\pm$ 6.85 bc
Orange	84.88 $\pm$ 15.17 abc	15.25 $\pm$ 5.07 bc
Black	46.13 $\pm$ 7.72 abc	6.50 $\pm$ 1.50 c
Uncolored	117.25 $\pm$ 22.46 a	10.75 $\pm$ 2.94a bc
Yellow	93.25 $\pm$ 20.46 ab	20.38 $\pm$ 7.62 bc
White	62.50 $\pm$ 17.87 abc	14.88 $\pm$ 4.62 bc
Violet	117.63 $\pm$ 37.72 a	16.00 $\pm$ 5.52 bc
Blue	59.25 $\pm$ 14.48 abc	9.25 $\pm$ 4.17 c

Mean followed by the same letters are not significantly different ( $p=0.05$  ; LSD).

다. 향기성분을 이용한 유인효과 검증

버섯파리류 해충이 느타리버섯 재배 초기에 발생하는 버섯향기 성분에 의해서 재배상내로 유입되는 점을 착안하여 느타리버섯 재배시 발생하는 휘발성 향기 성분으로는 1-octen-3-ol, 3-octanol, 3-octanone, pentadecanoic acid, hexadecanoic acid, octadecanoic acid, octadecadienoic acid 등 총 54종의 화합물 중 1-octen-3-ol 과 3-octanone은 버섯향기 성분 중 약 50%이상을 차지하고 있다. 본 연구에서 사용된 유인제는 버섯재배시 발생하는 휘발성 향기성분 중 약 50%이상을 차지하는 버섯향기성분인 1-octen-3-ol (TCI-GR;  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}(\text{OH})\text{CH}:\text{CH}_2$ )과 3-octnone (TCI-EP;  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COCH}_2\text{CH}_3$ )을 이용하였다. 이 두 성분은 n-Hexane에 희석하여 1.5% agar 배지에 넣어 formulation시켜 유인효과를 검증하였다 (Table 6). 그 결과는 Table 6에 나타나 있는 것처럼, 1-octen-3-ol의 함량에 따른 *L. mali* 암컷 성충에 대한 유인효과는 control로 사용된 한천배지 및 n-hexane보다 1-octen-3-ol 이 함유된 한천배지에서 더 많은 개체가 유인되었다. 또한 농도에 따른 유인효과는 0.5 mg의 1-octen-3-ol이 함유된 한천배지에서 높게 나타났다. 반면에 암수 성충에 대한 유인효과 시험에서는 수컷 성충에 비해 암컷 성충에 대한 유인효과가 다소 높게 나타났다.

Table 6. Responses of *L. mali* adult to 1-octen-3-ol

Amount of 1-octen-3-ol	Sex	Distribution of flies in bioassy choices			Total number of flies used per bioassy
		1-octen-3-ol	n-hexane	agar only	
0.1 mg	male	6	4	2	20
	female	8	4	3	22
0.5 mg	male	7	5	4	20
	female	13	2	1	22
1 mg	male	4	3	5	22
	female	11	0	5	22
2 mg	male	3	4	5	20
	female	4	5	4	20

또한 버섯파리 *L. mali* 암수 성충에 대한 3-octnone의 유인력을 조사하였다 (Table 7). 암수 성에 따른 유인력 시험 결과, 3-octnone의 함량에 따른 *L. mali* 암컷 성충에 대한 유인효과는 control로 사용된 한천배지 및 n-hexane보다 3-octnone이 함유된 한천배지에서 더 많은 개체가 유인되었다. 농도에 따른 유인효과는 1 mg의 3-octnone이 함유된 한천배지에서 높게 나타났다. 3-Octnone의 함량에 따른 암수간의 유인실험에서 1 mg의 3-octnone이 함유된 한천에서 *L. mali* 암컷성충에 대한 유인효과가 높게 나타났다.

Table 7. Responses of *L. mali* adult to 3-octnone

Amount of 3-Octnone	Sex	Distribution of flies in bioassy choices			Total number of flies used per bioassy
		3-Octnone	n-hexane	agar only	
0.1 mg	male	3	3	1	20
	female	7	2	0	21
0.5 mg	male	6	3	2	23
	female	7	2	2	23
1 mg	male	7	1	0	20
	female	11	3	2	24
2 mg	male	4	2	2	22
	female	7	2	3	22

이들 두 가지 버섯향기 성분인 1-octen-3-ol과 3-octnone의 혼합물에 대한 유인효과를 검정하기 위하여, 각각 1:1, 2:1, 3:1, 4:1의 조성으로 혼합된 혼합물을 한천배지에 formulation 시켜 *L. mali* 암·수컷 성충에 대한 유인효과 실험을 수행하였다 (Table 8). 그 결과, 1-octen-3-ol과 3-octnone의 3:1 비율로 조성된 혼합물에서 암컷성충에 대한 유인효과가 가장 높았다. 반면에 *L. mali* 수컷성충에 대한 유인효과는 미미하였다. 이상의 결과를 종합해 볼 때, 오히려 1-octen-3-ol이 0.5 mg 함유된 한천배지가 3-octnone과 이들 두 가지의 혼합 성분비가 3:1로 조성된 혼합물보다 *L. mali* 암컷성충에 대한 유인효과가 더 높은 것으로 확인되었다.

Table 8. Responses of *L. mali* adult to mixture with 1-octen-3-ol and 3-octnone

Ratio of compound (1-octen-3-ol :3-Octnone)	Sex	Distribution of flies in bioassy choices			Total number of flies used per bioassy
		1-octen-3-ol :3-Octnone	n-hexane	ager only	
1:1	male	2	5	4	21
	female	9	1	4	22
2:1	male	5	2	2	22
	female	9	1	3	23
3:1	male	3	4	7	22
	female	12	4	1	21
4:1	male	4	2	6	20
	female	8	4	3	22



버섯파리 해충의 다른 종인 *C. fuscipes* 암·수컷 성충에 대한 1-octen-3-ol의 유인력을 검정하였다 (Table 9). 그 결과 대체적으로 암컷과 수컷 성충 모두에게 그 유인력은 낮게 나타났지만, 1-octen-3-ol의 함량에 따른 유인실험에서 1 mg의 1-octen-3-ol이 함유된 한천에서 *C. fuscipes* 암컷성충에 대한 유인효과가 가장 높았다.

또한 버섯파리해충인 *C. fuscipes* 암·수컷 성충에 대한 3-octnone의 유인력을 조사하였다 (Table 10). 그 결과는 암컷과 수컷 성충 모두에게 그 유인력이 매우 낮으나, 0.5 mg의 3-octnone이 함유된 한천에서 *C. fuscipes* 암컷성충에 대한 유인효과가 다소 높게 나타났다.

이들 두 가지 버섯향기 성분인 1-octen-3-ol과 3-octnone의 혼합물에 대한 유인효과를 검정하기 위하여 각각 1:1, 2:1, 3:1, 4:1의 조성으로 혼합된 혼합물을 한천배지에 formulation시켜 *C. fuscipes* 암·수컷 성충에 대한 유인효과 실험을 수행하였다. Table 11에서와 같이 1-octen-3-ol과 3-octnone의 2:1 비율로 조성된 혼합물에서 암컷성충에 대한 유인효과가 가장 높게 나타났다. 반면에 *C. fuscipes* 수컷성충에 대한 유인효과는 다소 낮게 나타났다. 이상의 결과로 1-octen-3-ol이 1 mg 함유된 한천배지가 3-octnone과 이들 두 가지의 혼합성분비가 2:1로 조성된 혼합물보다 *C. fuscipes* 암컷성충에 대한 유인효과가 더 높은 것으로 확인되었다.

Table 9. Responses of *C. fuscipes* adult to 1-octen-3-ol

Amount of 1-octen-3-ol	Sex	Distribution of flies in bioassay choices			Total number of flies used per bioassay
		1-octen-3-ol	n-hexane	ager only	
0.1mg	male	2	5	4	21
	female	9	1	4	22
0.5mg	male	5	2	2	22
	female	9	1	3	23
1mg	male	3	4	7	22
	female	12	4	1	21
2mg	male	4	2	6	20
	female	8	4	3	22

Table 10. Responses of *C. fuscipes* adult to 3-octnone

Amount of 3-Octnone	Sex	Distribution of flies in bioassy choices			Total number of flies used per bioassy
		3-Octnone	n-hexane	ager only	
0.1 mg	male	4	3	3	22
	female	6	4	5	21
0.5 mg	male	3	3	5	23
	female	8	1	5	20
1 mg	male	3	3	4	21
	female	1	4	3	22
2 mg	male	4	5	1	24
	female	4	5	2	23

Table 11. Responses of *C. fuscipes* adult to mixture with 1-octen-3-ol and 3-octnone

Ratio of compound (1-octen-3-ol :3-Octnone)	Sex	Distribution of flies in bioassy choices			Total number of flies used per bioassy
		1-octen-3-ol :3-Octnone	n-hexane	ager only	
1:1	male	3	2	2	23
	female	5	3	3	23
2:1	male	3	3	1	23
	female	11	2	2	23
3:1	male	5	0	1	22
	female	9	2	3	22
4:1	male	2	1	1	21
	female	7	3	2	23

#### 라. 버섯파리 유인살충 트랩 제작

버섯파리류 해충의 유인살충을 위한 끈끈이 트랩을 개발하기 위해서, A형 (원통형), B형 (삼각형), C형 (고깔형), D형 (막대형)으로 명명한 4종류의 트랩을 제작하여 실제 포장에서 그 효율성을 검정하였다 (Fig 6). 이들 트랩은 유인트랩 색상에 따른 유인효과 검정 결과에서 유인효과가 가장 우수한 보라색으로 제작하였으며, 겉 표면에 끈끈이를 도포하였다. 버섯파리 해충의 유인제로 사용된 버섯파리 유인 향기성분인 1-octen-3-ol과 3-octnone을 2:1의 비율로 혼합하여 1 mg을 휘발성이 강하므로 천천히 지속적으로 방출시키기 위해서 agar에 formulation 하였으며, 서서히 휘발되어 공기 중으로 확산시키기 위하여 방출용기에 주입하였다. 이후 트랩 내부에 철사를 이용하여 고정시켜 사용하였다.



(A)



(B)



(C)



(D)

Fig. 6. Attraction traps for capture of mushroom flies.

#### 마. 트랩의 유인살충 효과 검증

4가지 모양으로 디자인 된 유인살충 트랩에 0.5 mg의 1-octen-3-ol을 주입한 후 버섯파리에 대한 유인효과를 검증한 결과, Fig. 7 에서 보는 바와 같이 D형 트랩에서 그 유인효과가 가장 우수하였다. 대조구로 사용된 유인제를 주입하지 않은 D형 트랩에서도 다른 종류의 유인 트랩보다 유인효과가 매우 높았다. 또한 D형 트랩에서 1-octen-3-ol이 주입된 트랩들의 버섯파리 유인율은 대조구와 비교했을 때 그 유인 효과는 약 33% ~ 17%로 나타났다.

일정한 비율로 조정된 1-octen-3-ol과 3-octnone의 혼합물이 주입된 유인제를 4가지 형태의 유인트랩 중 버섯파리에 유인효과가 높은 D형 트랩에 도입하여 유인효과를 검증하였다 (Fig. 8). 1-octen-3-ol과 3-octnone의 비율이 2:1로 조성된 1mg의 혼합물을 유인제로 사용하였을 때 버섯파리에 대한 유인효과가 가장 높았다.

이상의 결과 4가지 형태로 제작된 버섯파리 유인트랩 중 D형 트랩이 버섯파리 유인에 가장 우수하였으며, 또한 *L. mali* 암·수컷 성충과 *C. fuscipes* 암·수컷 성충에서 각각 0.5 mg 과 1mg의 1-octen-3-ol을 유인제로 사용한 D형 트랩이 다른 트랩들보다 유인효과가 높은 것으로 나타났다.

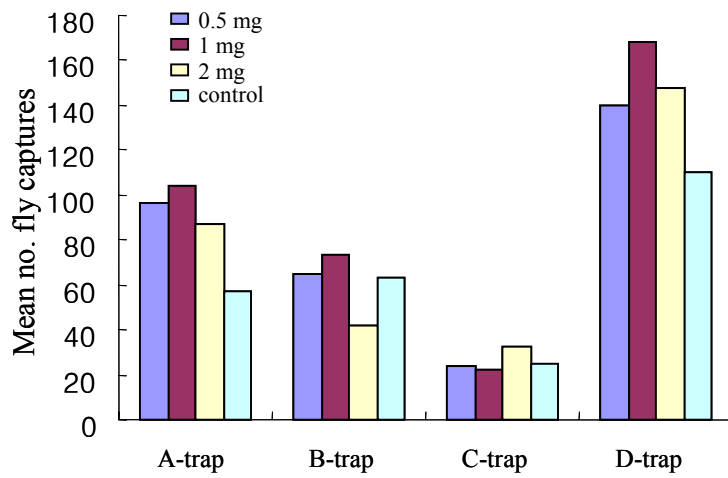


Fig. 7. Attraction effect of mushroom fly to traps with 1-octen-3-ol. A-trap, cylindrical type; B-trap, triangular type; C-trap, peaked hood type; D-trap, stick type.

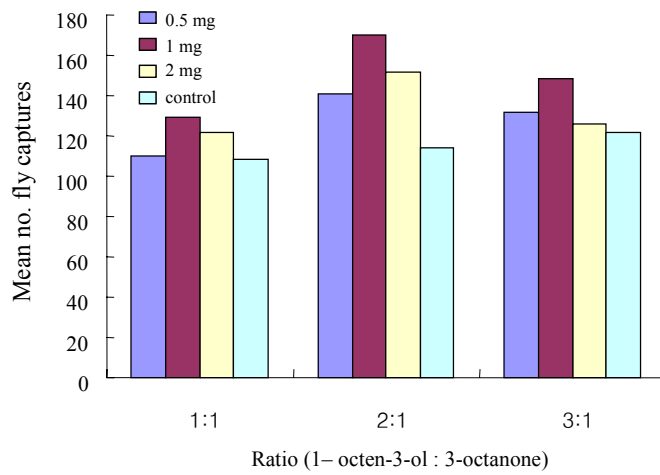


Fig. 8. Attraction effect of mushroom fly to D-type trap with mixture of 1-octen-3-ol and 3-octanone.

이상의 실험 결과를 바탕으로 최종적으로 D형인 막대형 trap을 선발하였다 (Fig 9). 그리고 D형 trap의 결과들로 볼 때, 자연비행에 의한 포획효과가 인정되어 trap의 표면적을 넓히고, 방출용기를 trap의 아랫부분에 설치함으로써 trap 면쪽의 공기 중으로 더 많은 양의 유인물질이 방출되도록 개량된 형태의 trap을 제작하였다. 아울러 두 trap 간의 유인살충 정도를 비교하였다 (Fig 10). 그 결과, 현저한 차이는 없으나 개량된 유인trap의 유인효과가 다소 높은 것으로 관찰되어 계속된 실험에서는 개량된 유인trap을 사용하였다.

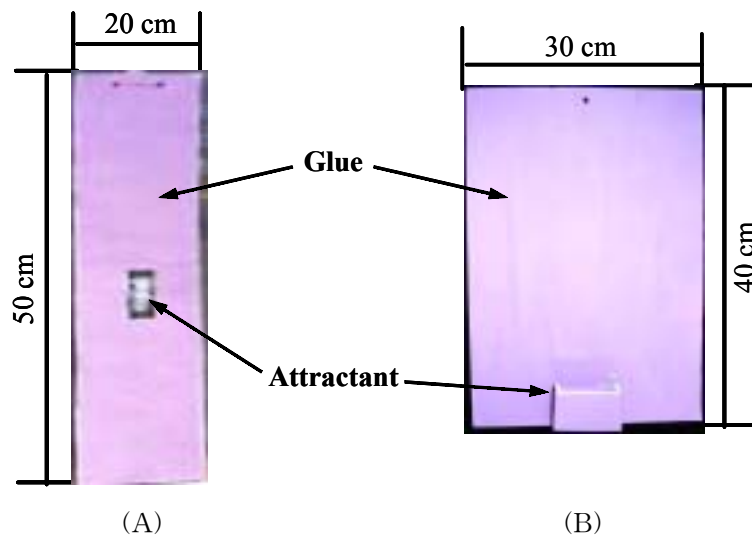


Fig. 9. Modification of D-type trap. (A), D-type (stick) trap (20 × 50 cm); (B). modified D-type (plate) trap (30 × 40 cm).

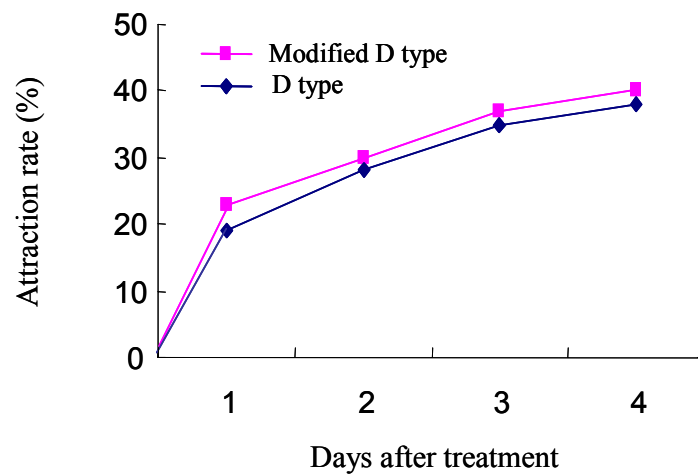


Fig. 10. Attraction effect of mushroom fly to modified D-type trap.

마. 버섯파리류 해충의 sex pheromone 탐색

강력한 유인물질인 sex pheromone의 응용을 위한 기초 연구로 버섯파리류 해충인 *L. mali*와 *C. fuscipes*의 sex pheromone 분비샘 탐색 및 교미반응에 관한 일련의 연구를 수행하였다. 버섯파리 해충의 sex pheromone 분비샘 탐색을 위하여 암컷 성충의 몸마디를 각 부위별로 절단하여 수컷의 교미반응을 관찰하였다 (Table 12).

Table 12. Male response of mushroom flies to dissected female body

	% Male response		n
	<i>L. mali</i>	<i>C. fuscipes</i>	
Head	100	0	30
Thorax	100	0	30
Abdomen	100	100	30
Wings	100	10	30
Legs	100	0	30

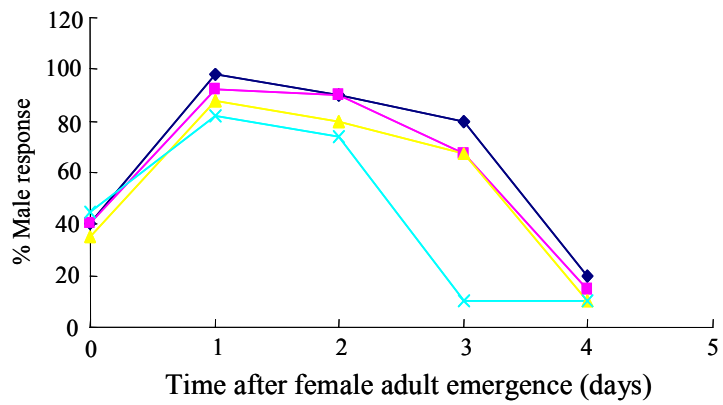
*L. mali*의 경우에는 암컷의 몸마디 부위 (머리, 가슴, 다리, 날개) 전체에서 교미반응을 나타내었지만, *C. fuscipes*는 암컷의 배 (6-7 체절)에서만 수컷이 교미 반응을 나타내었다 (Table 13).

Table 13. Response of *C. fuscipes* male to dissected female abdomen

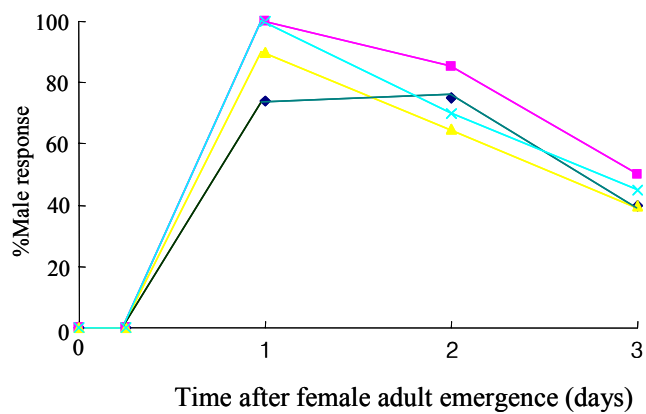
	% Male response	n
preabdomen (1-2 segment)	0	30
midabdomen (3-5 segment)	0	30
postabdomen (6-7 segment)	100	30

우화 후 암, 수컷의 경과시기에 따른 교미율을 조사한 결과, *L. mali*와 *C. fuscipes*는 우화 후 1일 경과한 암, 수컷에서 가장 높은 교미율을 나타내었다 (Fig 11). 또한 *L. mali*와 *C. fuscipes*의 수컷은 양쪽 더듬이로 sex pheromone를 탐지하며, 양쪽 더듬이 중 한쪽이라도 손상되었을 시 교미 반응을 나타내지 못하였다.





(A)



(B)

Fig. 11. Mating rate of *L. mali* (A) and *C. fuscipes* (B) with the passage of time after emergence. -◆-, male adult of the first day after emergence; -■-, male adult of the second day after emergence; -×-, male adult of the third day after emergence; -▲-, male adult of the fourth day after emergence.

버섯파리해충 *L. mali* 와 *C. fuscipes* 의 sex pheromone에 대한 기초실험으로 n-hexane 을 이용하여 이들 sex pheromone 혼합물을 추출하였으며, 추출물에 대한 수컷성충들의 교미 반응율을 조사하였다 (Table 14). N-hexane으로 채 표면을 세척한 암컷 성충에 대하여 수컷성충들은 전혀 교미 반응을 보이지 않은 반면 n-hexane 추출물에서는 100%의 교미반응을 보였다. 따라서 n-hexane에 버섯파리해충의 sex pheromone이 추출되어진 것으로 사료된다.

Table 14. Male response of mushroom flies to extract treated with n-hexane

	% Male response		n
	<i>L. mali</i>	<i>C. fuscipes</i>	
Unmated female	100	100	30
Female rinsed with n-hexane	0	0	30
Female crude extract or Postabdomen extract	100	100	30
Control	0	0	30

Postabdomen extract was dissolved in n-hexane and applied to a paper disk.

Control; paper disk only.

사. 느타리버섯 재배사에서 유인트랩 수에 따른 유인효과

본 연구에서 선발한 버섯파리 유인살충 트랩 (D형 plate type)을 실제 느타리버섯 재배사에서 단위 면적 당 트랩의 수에 따른 유인효과를 실제 재배지에서 검정하였다 (Fig 12). 유인 트랩은 실증시험에서 10평 (33 m<sup>3</sup>) 당 trap의 수를 각각 1개, 2개, 3개, 4개의 트랩을 설치하고 버섯파리 성충을 각 처리구 당 300두를 처리하여 트랩의 수에 따른 유인효과를 측정하였다 (Fig. 13). *L. mali* 의 경우에 1개의 유인트랩을 설치하였을 때 23%, 2개를 설치하였을 때는 34%, 3개와 4개를 설치하였을 때는 각각 36%와 38%로 나타났다. 한편, *C. fuscipes*의 경우에는 1개의 유인트랩을 설치하였을 때 19%, 2개를 설치하였을 때는 26%, 3개와 4개를 설치하였을 때는 각각 33%와 36%로 나타났다. 결과적으로 단위 면적 당 트랩 수의 증가는 유인살충효과의 증대와 상관관계를 보이는 것으로 나타났다. 버섯파리에 있어서 *L. mali*가 *C. fuscipes*보다 높은 유인 살충력을 보이는 것으로 결과되어졌다. 이러한 결과는 버섯파리의 생태적 특성상 *L. mali*가 *C. fuscipes*보다 비행성이 우수하기 때문에 트랩에 유인되는 효율이 높은 것은 것으로 사료된다. 또한 단위 면적 당 트랩 수의 증가는 자연적인 비행에 따른 트랩에의 포획 확률도 높다고 사료된다.



Fig. 12. The oyster mushroom house with attraction trap.

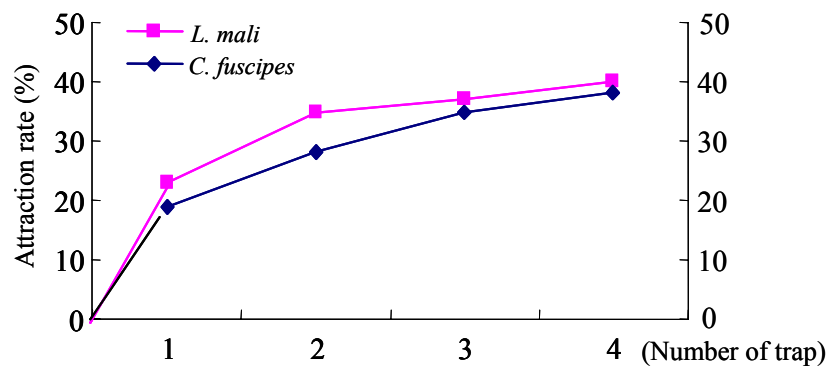


Fig. 13. Attraction effect of *L. mali* and *C. fuscipes* to number of traps at the oyster mushroom house.

아. 느타리버섯 재배사에서 유인트랩의 지속효과

느타리버섯 재배사 내에서 유인트랩 내의 유인물질의 지속효과를 조사하기 위하여 버섯파리 유인살충 트랩 (D형 plate type)을 설치 후에 1일, 3일, 5일, 10일 간격으로 버섯파리 성충을 추가적으로 투입하여 성충 유인율을 조사하였다 (Fig 14). 그 결과, *L. mali*와 *C. fuscipes*의 트랩에 유인되는 효과는 설치 1일째가 가장 높게 나타났고, 유인 트랩을 설치 후 시간이 경과함에 따라 유인율이 감소하는 경향을 보였으나 약 5일까지 약 20%정도 유지되었다. 본 지속성 조사 역시 *L. mali*에서 유인효과가 높게 나타났다.

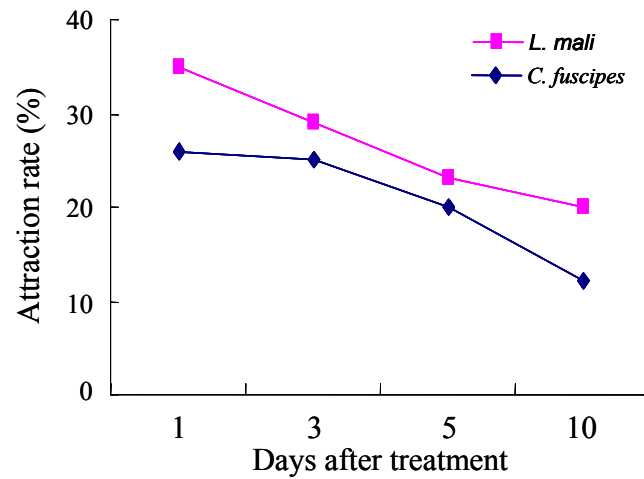


Fig. 14. Attraction effect of *L. mali* and *C. fuscipes* to trap with maintenance periods at the oyster mushroom house.

## 제 3절 버섯파리류 해충 방제용 미생물살충제 개발

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 토양시료 채집

느타리버섯 재배지의 토양으로부터 버섯파리 강독성 *Bacillus thuringensis* 균주를 분리하기 위하여 전국 느타리버섯 재배지 23개 지역에서 토양 328 sample을 채취하였다. 채집한 모든 토양시료는 4℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

#### 나. *Bacillus thuringensis*의 분리

표토로부터 2-5 cm 깊이에서 수집된 토양과 재배지 내의 균상에서 *Bacillus thuringensis* (Bt)를 분리하기 위한 기본 배지는 nutrient agar (NA, Difco, Bacto<sup>R</sup>) 배지를 이용하였다. 분리방법은 버섯 재배지의 토양시료 1 g씩을 임의로 취하여 이를 9 ml의 멸균수가 들어있는 시험관에 넣고 10분간 교반한 후 기타 미생물의 생장을 억제하기 위하여 80℃에서 10분간 열처리하고 희석평판배양법으로 희석한 후 NA agar plate에 도말하였다. 그리고 30℃ 항온기에서 4~5일간 배양함으로써 형성된 colony를 위상차 현미경 (×1000)으로 관찰하여 포자와 내독소 단백질을 형성하는 균주를 선발하였으며, 선발된 Bt 균주는 단일 콜로니로 순수 분리하였다.

#### 다. 현미경 관찰

위상차 현미경을 이용하여 내독소단백질을 관찰하기 위하여 colony를 멸균된 증류수로 현탁하여 슬라이드 글라스에 떨어뜨린 후, 커버글라스를 덮어서 1,000배 배율로 관찰하였다. 내독소 단백질의 외부형태는 정제된 시료를 알루미늄 원반 시료대 위에서 동결 건조 시킨 후, 탄소와 금으로 코팅 한 후, 주사전자현미경 (Philips SEM515)으로 관찰하였다. 투과전자현미경 관찰은 시료 침전물을 3% glutaraldehyde로 1차 고정하고 0.5% sodium cacodylate 완충액으로 충분히 세척한 후, 1% OsO<sub>4</sub>를 함유한 동완충액에서 2차 고정하였다. 그 후 50, 70, 90, 100% 에탄올 및 100% 아세톤으로 탈수하고 EPON 수지 (EPON812)에 포매한 뒤, Sorvall MT-5000으로 초박절편을 만들어 투과전자현미경 (Hitachi H-600)으로 관찰하였다.

#### 라. 독성 검정

선발된 Bt 균주들은 colony counting으로 농도를 측정된 후 살충력 검정에 이용하였다. 살충력 검정은 두가지 형태로 3반복으로 수행하였다. 첫 번째는 Colony counting으로 측정된 농도를 이용하여 살충력 검정시 Bt 농도를 10<sup>4</sup>/ml ~ 10<sup>10</sup>/ml 단계별로 설정하고, 먹이균사 농도별 Bt 희석액에 5초간 침지하였다가 실온에서 10시간 건조시켜서 각 처리구당 *L. mali* 와 *C. fuscipes*의 3령기 유충 10마리씩 선발하여 1일간 섭식을 중단시킨 후 사용하였다. 두

번째 방법으로는 내독소 단백질을 원심분리하여 회수한 후, 살충력 검정시에 Bt 농도를 1 ng/ml ~ 1,000 ng/ml 단계별로 설정하여 사용하였다.

#### 마. H-Serotype 결정

33개 Bt 기준 균주 (reference strains)에 대한 H 항혈청 (H1-H27)은 Ohba와 Aizawa의 방법 (1978)에 따라 준비하였다. H 항혈청과 응집반응은 96-well plate를 이용하여 Laurent 등의 방법 (1996)에 따라 수행하였다.

#### 바. Plasmid DNA분리

Bt 균주의 플라스미드 DNA분리를 위해 50 ml LB배지에 접종하고, 30°C에서 12시간 동안 배양하였다. 배양액을 100 ml SPY배지[(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ; 0.2%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; 1.4%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 0.6%, Sodium citrate ; 0.1%, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O ; 0.02%, Yeast extract ; 0.1%, Glucose ; 0.1%]에 다시 접종한 다음, 30°C에서 OD<sub>600</sub>=0.7될 때까지 배양하였다. 이것을 Quiagen plasmid mini kit를 이용하여 분리하였다.

#### 사. PCR

PCR을 통해 Bt균주가 가지는 내독소 단백질 유전자에 대한 유전자형을 조사하기 위해 현재까지 보고된 *cry* 유전자내의 보존영역을 특이적으로 증폭시키는 특이적인 PCR primer를 제작하여 사용하였다. PCR은 Pre-Mix (Bioneer 사 구입, 한국 소재)에 Bt plasmid 시료와 각 primer 0.1-0.5 μM을 넣은 다음 DNA Thermal Cycler (Bioneer 사)로 94°C에서 1분, 55°C에서 1분 그리고 72°C에서 1분씩 35회 반복조건을 설정하여 수행하였으며 그 primer의 염기서열은 Table 1과 같다.

#### 아. 대량배양

선발된 Bt656-3의 대량 생산을 위한 배양배지는 농업 부산물인 대두박 (soybean cake)과 밀기울 (Wheat bran)을 최종농도가 4%로 하여 대두박과 밀기울을 각각 0:40, 53:5, 10:30, 15:25, 20:20, 25:15, 30:10, 35:5, 40:0의 비율로 배지를 조제하여 기존의 Bt 배양을 목적으로 사용되는 배지인 GYS (Glucose ; 0.1%, Yeast extract ; 0.2%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; 0.05%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ; 0.2%, MgSO<sub>4</sub> ; 0.002%, MnSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O ; 0.005%, CaCl<sub>2</sub> ; 0.008%) 배지와 Bt의 성장을 colony counting을 통해 비교하여 선발하였다.

선발된 대두박과 밀기울 배지 5 ℓ 조제하고 7 ℓ의 배양기에서 Bt 656-3과 Bt subsp. *morrisoni* PG-14 균주를 접종하여 배양하였다. 대량배양 중 pH와 용존 산소량의 변화를 조사하였으며, 일정한 시간 간격으로 시료를 채취하여 Bt의 세포수와 포자수를 조사함으로써 성장도를 조사하였다.

Table 1. Profile of gene-specific primers

<b><i>cry</i> gene type</b>	<b>primer</b>	<b>PCR product size (bp)</b>
<i>cry1Aa</i>	5'GAGCCAAGCGACTGGAGCAGTTTACACC	782
<i>cry1Ab</i>	5'TCGAATTGAATTTGTTCC	238
<i>cry1Ac</i>	5'TCACTTCCCATCGACATCTACC	487
<i>cry1B</i>	5'GTCCAACCTTATGAGTCACCTGGGCTTC	902
<i>cry1C</i>	5'CAACCCTATTTGGTGCAGGTTTC	288
<i>cry1D</i>	5'GGTACATTTAGATGTTTCACAGCCAC	465
<i>cry1E</i>	5'CTTAGGGATAAATGTAAGTACAG	961
<i>cry1F</i>	5'CCGGTGACCCATTAACATTCCAATC	383
<i>cry13'</i>	5'ATCACTGAGTCGCTTCGCATCTTTGACTTTCTC	-
<i>cry1G5'</i>	5'ATATGGAGTGAATAGGGGG	235
<i>cry1G3'</i>	5'TGAACGGCGATTACATGC	
<i>cry25'</i>		
<i>cry23'</i>	5'CAGATACCCTTGCTGGTGTA	1073
<i>cry3AB</i>	5'ATAGGCCCGTGCTCCACCAGG	
<i>D5'</i>	5'CCGAACAATCGAAGTGAA	-
<i>cry3A3'</i>	5'ATAGATGGTCCTACT	1964
<i>cry3B3'</i>	5'ATTGTTGAACGGCAACAA	1359
<i>cry3D3'</i>	5'ATTGTTGACGGCAACAA	1135
<i>cry3C5'</i>	5'CCTGAAAATTGCAGGCC	1074
<i>cry3uni3'</i>	5'AATTGATCAATAGAATC	
<i>cry4A5'</i>	5'CGAGGTGAATTTGCTCC	1032
<i>cry4A3'</i>	5'ATGGCTTGTTTCGCTACATC	
<i>cry4B5'</i>	5'GGTGCTTCCTATTCTTTGGC	2610
<i>cry4B3'</i>	5'TGACCAGGTCCCTTGATTAC	
<i>cry4B5'</i>	5'GGTGCTTCCTATTCTTTGGC	1393
<i>cry4B3'</i>	5'TGACCAGGTCCCTTGATTAC	
<i>cry4C5'</i>	5'ATGAATCCATATCAAAATAAG	2040
<i>cry4C3'</i>	5'AAGAACTTTGTTTTAATTAAC	
<i>cry4D5'</i>	5'ATGGAGATAGTTCTTTAGAT	1932
<i>cry4D3'</i>	5'CTACTTTAGTAACGGATT	
<i>cry55'</i>	5'ATGAAACTAAAGAATCAA	2174
<i>cry53'</i>	5'GGTAGATTTTAATTCTAC	

#### 자. 제제화

대량배양된 Bt 656-3은 원심분리를 통하여 Bt 656-3의 독소, 포자 및 멸균 후에도 용해되지 않는 밀기울과 대두박 입자가 포함되어있는 배양침전물을 수거하였다. 독소를 포함하고 있는 배양침전물은 외부의 물리적 작용을 최소화하기 위해서 진공건조 방식으로 건조하였으며, 공기압축기를 사용하여 배양침전물을 분말화 하였다. 분말화 된 Bt 656-3의 독소를 포함하고 있는 배양침전물 40 g과 (주)삼양제넥스사의 metamorphic starch 전분 60 g을 혼합하여 제제화하였다. 제제의 최적농도는 2 g의 분말제제를 물 750 ml에 섞어 10 m<sup>2</sup>에 살포할 수 있는 양으로, 이때 Bt 656-3은  $5 \times 10^7$  cfu가 함유되며, 1회 살포시 실재 버섯재배지에서 최소 90% 이상의 살충력으로 하였다.

#### 차. Bt 656-3 제제의 특성 시험

Bt 656-3 제제의 최적 살충농도, 살포량, 살포시기 및 살충력 지속효과 등의 Bt 656-3 제제의 특성은 실내 간이 느타리버섯 재배상을 아크릴로 제작하여 배양실에서 조사하였다. 간이 균상의 크기는 66 cm × 33 cm × 33 cm으로 하였다. 공시충은 본 실험실에서 인공사육 중인 2종의 버섯파리 *L. mali*와 *C. fuscipes* 3령 유충을 사용하였다.

Bt 656-3 제제의 최적 살충농도 결정을 위한 *L. mali*에 대한 살충력 검정은 Bt 656-3의 농도를  $5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^8$  CFU로 하였으며, *C. fuscipes*에 대해서는  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  CFU로 수행하였다. Bt 656-3 제제의 최적 살포량은 *L. mali*와 *C. fuscipes*에 대해 Bt 656-3의 농도를 각각  $5 \times 10^7$  및  $1 \times 10^7$  CFU하고 물 양을 1 m<sup>2</sup> 당 25 ml, 50 ml, 75 ml로 하여 조사하였다. Bt 656-3 제제의 버섯 성장에 따른 살포시기와 살충력 지속 효과 검정은 *L. mali*와 *C. fuscipes*에 대해 Bt 656-3의 농도를 각각  $5 \times 10^7$  및  $1 \times 10^7$  CFU하고 물 양을 1 m<sup>2</sup> 당 75 ml로 하여 버섯 발이 시와 발이 후로 구분하여 살포하고, 살포 후 1일, 3일, 5일 및 7일째에 각각의 버섯파리를 집중하여 조사하였다.

#### 카. Bt 656-3 제제의 시제품 제작

Bt 656-3 제제의 시제품은 Bt 656-3의 독소, 포자 및 배지에서 유래된 밀기울과 대두박의 입자를 포함하고 있는 건조 분말화된 배양침전물 40 g과 metamorphic starch 전분 60 g이 혼합된 분말형하였다. 실재 사용은 수화제로 2 g의 분말제제를 물 750 ml에 섞어 10 m<sup>2</sup>에 살포할 경우 Bt 656-3의 최종농도는  $5 \times 10^7$  CFU이며, 1회 살포시 실재 버섯재배지에서 최소 90% 이상의 살충력이 되도록 하였다.

#### 타. 느타리버섯 재배사에서 Bt 656-3 제제의 처리에 따른 수확량의 조사

Bt 656-3의 제제를 실재 느타리버섯 재배 포장에서 Bt 656-3 제제를 살포한 처리구와 무처리구로 구분하여 느타리버섯 수확량의 차이를 조사하였다. Bt 656-3 제제는 발이시부터 느타리버섯 최종 수확 시까지 45일 동안 3일 간격으로 10회 살포하였다. 느타리버섯 수확량은 버섯 수확 4주기 동안 60평 (198 m<sup>2</sup>)에서 조사하였다.



과. 느타리버섯 재배사에서 Bt 656-3 제제 살포와 유인살충 트랩 설치에 따른 효과 검증

Bt 656-3 제제 살포와 유인살충 트랩을 동시에 설치한 처리구와 Bt 656-3 제제만 살포한 처리구에서의 느타리버섯 수확량의 차이를 조사하였다. Bt 656-3 제제는 발이시부터 느타리버섯 최종 수확 시까지 45일 동안 3일 간격으로 10회 살포하였다. 유인살충 트랩은 10평 (10 m<sup>2</sup>) 당 4개씩 설치하였다. 느타리버섯 수확량은 버섯 수확 4주기 동안 60평 (198 m<sup>2</sup>)에서 조사하였다.

## 2. 결과 및 고찰

### 가. Bt 분리 및 선발

버섯파리에 강독성을 띠는 Bt를 분리하기 위하여, 김해 녹산 느타리버섯 재배지를 포함하여 전국 23개 지역에서 토양 328 sample을 채집하였다. 채집된 328개의 토양 샘플로부터 753개의 Bt를 분리하였다. 분리된 Bt는 각각 2종의 버섯파리 *Lycoriella mali* 및 *Coboldia fuscipes*에 대해 독성을 검증하였다. 독성 검증 결과 *L. mali*에 독성을 보이는 10개의 Bt 균주와 *C. fuscipes*에 독성을 보이는 20개의 Bt 균주 그리고 두 종 모두에 독성을 보이는 9개의 Bt 균주를 1차 분리하였다. 이중 두 종 모두에 독성을 보이며, 살충력이 가장 높게 나타난 Bt 균주 656-3을 최종 선발하였다.

### 나. 선발 강독성 Bt 656-3의 생화학적 특성구명

독성과 살충 범위 면에서 가장 효과적인 Bt 656-3의 특성을 조사하였다. 우선 항혈청타입에 따른 동정 결과 Bt 656-3 균주는 기준균주인 Bt subsp. *morisoni* PG-14과 같은 8a8b항혈청 타입이었다 (Table 2).

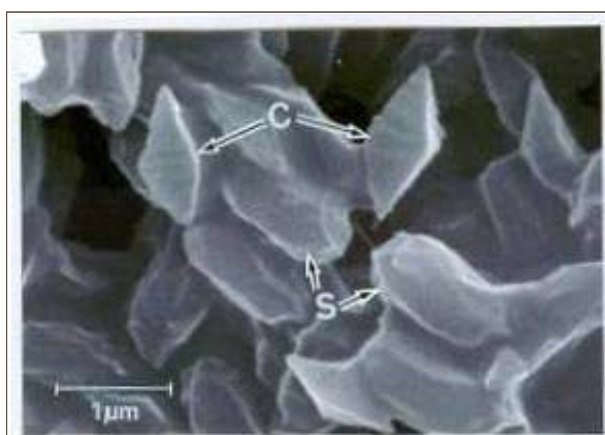
Bt 656-3균주의 내독소 단백질의 형태를 전자현미경으로 관찰하였다 (Fig. 1). 동일 항혈청 타입의 기준 균주인 Bt subsp. *morisoni* PG-14은 ovoidal 형태를 나타낸 반면 Bt 656-3 균주는 bipyramidal 형태의 내독소 단백질을 가지고 있는 것으로 관찰되었다.

Bt 656-3 균주의 plasmid DNA와 단백질 패턴을 동일 항혈청 타입인 기존의 Bt *morisoni* PG-14과 비교하였다 (Fig. 2). 그 결과 Bt 656-3 균주의 plasmid DNA와 단백질 패턴은 Bt *morisoni* PG-14와 유사하였다. 단백질 패턴에서 Bt 656-3 균주는 Bt subsp. *morisoni* PG-14와 마찬가지로 약 130 kDa (Cry4A, Cry4B 및 Cry10A), 68 kDa (Cry11A) 및 28 kDa (Cyt1A)의 내독소 단백질을 보였다.

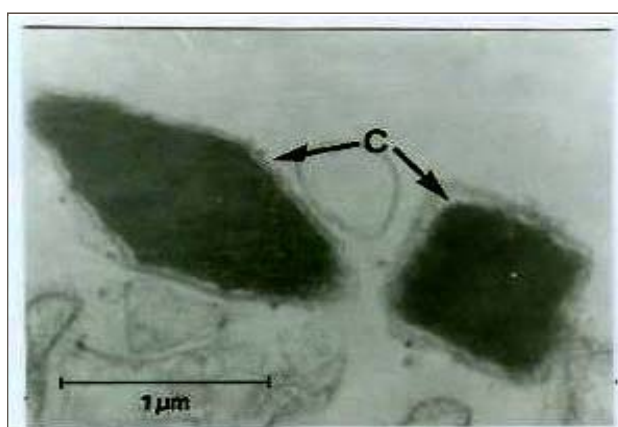
Bt 656-3 균주의 내독소유전자 타입을 PCR에 의해 분석하였다 (Fig. 3). Bt 656-3은 기준 균주인 Bt subsp. *morisoni* PG-14이 가지고 있는 *cry4A*, *cry4B*, *cry10A* 및 *cry11A* 외에 *cry1Ac* 내독소 유전자를 추가로 가지고 있었다. 아직까지 *cry1Ac* 내독소유전자를 가지고 있는 Bt subsp. *morisoni* PG-14은 보고되지 않았다. 이는 Bt 656-3 균주는 기존에 알려

Table 2. H agglutination test of *B. thuringensis* 656-3

H serotype	Serovar	Agglutination
1	<i>thuringiensis</i>	-
2	<i>finitimus</i>	-
3a, 3c	<i>alesti</i>	-
3a, 3b, 3c	<i>kurstaki</i>	-
3a, 3d	<i>sumiyoshiensis</i>	-
3a, 3d, 3e	<i>fukuokaensis</i>	-
-4a, 4b	<i>sotto</i>	-
-4a, 4c	<i>kenyae</i>	-
5a, 5b	<i>galleriae</i>	-
6	<i>entomocidus</i>	-
7	<i>aizawai</i>	-
8a, 8b	<i>morrisoni</i>	+
8a, 8c	<i>ostrinae</i>	-
8b, 8d	<i>nigeriensis</i>	-
9	<i>tolworthi</i>	-
10a, 10b	<i>darmstadiensis</i>	-
11a, 11b	<i>toumpsoni</i>	-
11a, 11c	<i>kyushuensis</i>	-
12	<i>thompsoni</i>	-
13	<i>pakistani</i>	-
14	<i>israelensis</i>	-
15	<i>dakota</i>	-
16	<i>indiana</i>	-
17	<i>tohokuensis</i>	-
18a, 18b	<i>kumamotoensis</i>	-
19	<i>tochiensis</i>	-
20a, 20b	<i>yunnanensis</i>	-
20a, 20c	<i>pondicheriensis</i>	-
21	<i>colmeri</i>	-
22	<i>shangdongiensis</i>	-
23	<i>japonensis</i>	-
24a, 24b	<i>neoleonensis</i>	-
25	<i>coreanensis</i>	-
26	<i>silo</i>	-
27	<i>mexicanensis</i>	-



(A)



(B)

Fig. 1. Electron micrographs of spore and crystal of *B. thuringiensis* 656-3. (A) Scanning electron micrograph of the spore-crystal complex after autolysis. (B) Transmission electron micrograph of crystals. The spore and crystal are represented as S and C, respectively.

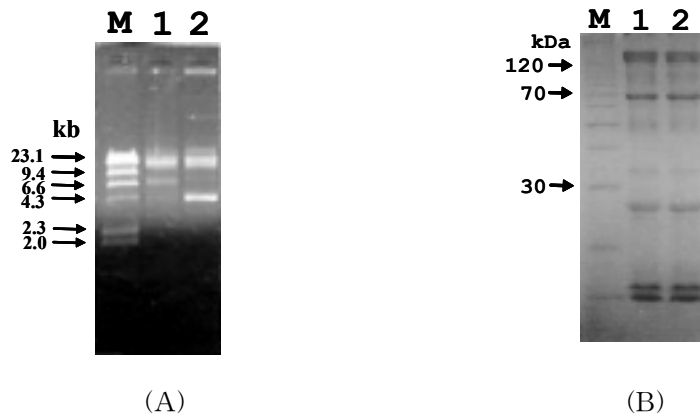


Fig. 2. The plasmid (A) and protein profiles of *B. thuringiensis* 656-3 and reference strain. Lane 1, *B. thuringiensis* PG-14; lane 2, *B. thuringiensis* 656-3; lane 3, size markers.

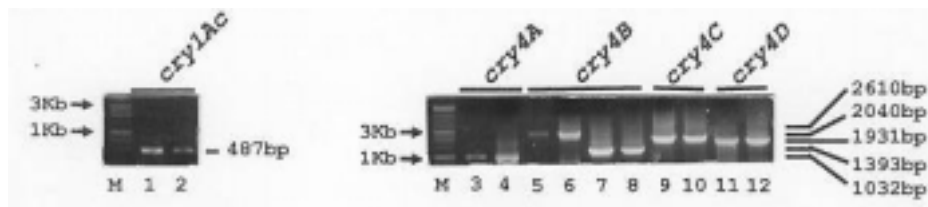


Fig. 3. Detection of *cry* genes of *B. thuringiensis* 656-3 by PCR. The PCR products of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 (lane 1), *B. thuringiensis* 656-3 (lanes 2, 4, 6, 8, 10, and 12) and *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14 (lanes 3, 5, 7, 9, and 11) were analyzed by agarose gel electrophoresis. M indicates 1 kb DNA ladder.

지지 않은 새로운 균주라고 것을 나타낸다. Bt 656-3 균주가 함유하고 있는 *cry1Ac* 내독소 유전자는 Bt subsp. *kurstaki*에서 이미 잘 알려져 있는 내독소유전자이다. 따라서 Bt 656-3 균주의 *cry1Ac* 내독소유전자의 보존영역 염기서열이 Bt subsp. *kurstaki*의 유전자와 동일 여부를 분석하기 위하여, 그 염기서열을 결정하였다 (Fig. 4). 일반적으로 *cry1Ac* 유전자에서 잘 보존되어 있는 보존영역의 일부분 염기서열 (487 bp)을 비교한 결과, Bt 656-3이 가지고 있는 *cry1Ac* 내독소유전자 보존영역 487 bp의 염기서열은 1551번째부터 2037번째까지 1596번째 염기 1개만을 제외하고는 Bt subsp. *kurstaki* HD-1의 염기서열과 동일하였다. 그러나 아미노산 변환은 일어나지 않았다. 따라서 이러한 결과는 Bt 656-3 균주는 Bt subsp. *morrisoni* PG-14에 *cry1Ac* 독소유전자가 추가된 새로운 균주임을 최종 확인하였다.

버섯파리 *L. mali*와 *C. fuscipes*에 대한 Bt 656-3의 독성을 검정하였다 (Table 3). 대조구로 기준 균주인 Bt subsp. *morrisoni* PG14와 Bt subsp. *kurstaki*를 사용하였다. 그 결과, Bt 656-3의 독성은 *L. mali*에서 LC<sub>50</sub>값이 257.4 ng/ml로, *C. fuscipes*에 대하여는 LC<sub>50</sub>값이 73.6 ng/ml을 보였다. 반면, 이미 모기에 강독성을 보이는 것으로 알려진 기준 균주인 Bt subsp. *morrisoni* PG14의 경우에 *L. mali*에 대하여 LC<sub>50</sub>값이 501 ng/ml, *C. fuscipes*에 대하여는 LC<sub>50</sub>값이 123.7ng/ml으로 나타났다. 이 결과는 Bt 656-3의 독성이 기준 균주인 Bt subsp. *morrisoni* PG14에 비해 *L. mali*에서 LC<sub>50</sub>값이 약 1.95배정도, *C. fuscipes*에 대하여는 약 1.68배 높다는 것을 나타내고 있다.

이상의 결과들을 종합해 볼 때, Bt 656-3 균주는 H8a8b 항혈청 타입으로 plasmid 및 단백질 패턴은 기준 균주인 Bt subsp. *morrisoni* PG14와 유사하나, 다른 내독소단백질의 형태를 가지고 있으며, 내독소단백질 유전자 타입 결정에서도 Bt subsp. *morrisoni* PG-14이 가지고 있는 *cry4A*, *cry4B*, *cry10A* 및 *cry11A* 외에 *cry1Ac* 내독소 유전자를 추가로 가지고 있었으며, 그 독성면에서도 버섯파리 *L. mali*와 *C. fuscipes*에서 훨씬 높게 나타나 기존에 보고되지 않은 새로운 균주임을 확인하였다. 이러한 결과를 바탕으로 Bt 656-3 균주와 이의 이용 방법은 이미 특허를 출원 (출원번호 10-2003-0003628)하였고, SCI 전문 학술지인 *Current Microbiology*에 게재하였다.

	1551	1561	1571	1581	1591	1601
<b>subsp. <i>kurstaki</i> HD-1</b>	<b><u>TCACTTCC</u></b>	<b><u>TCGACATC</u></b>	<b><u>CCAGATAT</u></b>	AGTTCGTG	CGGTATGC	CTGTAACC
<b><i>B. thuringiensis</i> 656-3</b>	.....	.....	.....	.....	.....C..	.....
	1611	1621	1631	1641	1651	1661
<b>subsp. <i>kurstaki</i> HD-1</b>	GATTCACC	AACGTTAA	GGGGTAAT	ATCCATTT	TCCAATAC	TACCAGCT
<b><i>B. thuringiensis</i> 656-3</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	1671	1681	1691	1701	1711	1721
<b>subsp. <i>kurstaki</i> HD-1</b>	AGCTACGT	TTAGATAA	TACAATCA	TGATTTTG	TATTTTGA	GTGCCAAT
<b><i>B. thuringiensis</i> 656-3</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	1731	1741	1751	1761	1771	1781
<b>subsp. <i>kurstaki</i> HD-1</b>	TTTTACAT	TCATTAGG	ATATAGTA	TGTTAGAA	TTTAGTGG	CTGCAGGA
<b><i>B. thuringiensis</i> 656-3</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	1791	1801	1811	1821	1831	1841
<b>subsp. <i>kurstaki</i> HD-1</b>	GATAATAG	AGATTTGA	TTATTCCA	TACTGCAA	CTCGAGGC	AATATAAT
<b><i>B. thuringiensis</i> 656-3</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	1851	1861	1871	1881	1891	1901
<b>subsp. <i>kurstaki</i> HD-1</b>	GGAAAGAG	CAGAAGGC	TGAATGCG	GTTTACGT	ACAAACCA	TAGGGCTA
<b><i>B. thuringiensis</i> 656-3</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	1911	1921	1931	1941	1951	1961
<b>subsp. <i>kurstaki</i> HD-1</b>	AACAAATG	ACGGATTA	ATATTGAT	AGTGTCCA	TTAGTTAC	ATTTATCG
<b><i>B. thuringiensis</i> 656-3</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	1971	1981	1991	2001	2011	2021
<b>subsp. <i>kurstaki</i> HD-1</b>	TGAATTTT	CTGGATGA	AGCGAGAA	<b><u>GTCCGAGA</u></b>	<b><u>GTCAAACA</u></b>	<b><u>CGAAGCGA</u></b>
<b><i>B. thuringiensis</i> 656-3</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	2037					
<b>subsp. <i>kurstaki</i> HD-1</b>	<b><u>CAGTGAT</u></b>					
<b><i>B. thuringiensis</i> 656-3</b>	.....					

Fig. 4. The nucleotide sequence of the *cry1Ac* PCR product of *B. thuringiensis* 656-3 and the reference strain *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1. Dots represent identical nucleotide sequence to those of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1. The regions corresponding to PCR primers used for the amplification of a portion of the *cry1Ac* gene are underlined and bolded. Numbers of the nucleotides represent the position in the *cry1Ac* gene (GenBank Accession No. M11068)

Table 3. Insecticidal activities of *B. thuringiensis* crystal protein

<i>B. thuringiensis</i> strains	LC <sub>50</sub> in ng/ml after 24 hr	
	<i>Coboldia fuscifex</i>	<i>Lycoriella mali</i>
subsp. <i>morrisoni</i> PG-14	123.7 (Limits: 78.6 ~ 203.9)	501 (Limits: NDa)
656-3	73.6 (Limits: 44.5 ~ 122.6)	257.4 (Limits: 56.8 ~ 1025.6)
subsp. <i>kurstaki</i> HD-1	NDb	NDb

a: not determined.

b: LC50 was not determined until the protein concentration reached 10,000ng/ml.

다. Bt 656-3의 대량 생산

1) Bt 656-3의 대량 배양을 위한 배지 선발

버섯파리 해충 병원성 Bt 656-3의 대량 배양체계 시험에서 그 배양 배지로 농업부산물인 대두박 (soybean cake)을 단백질원으로 밀겨울 (wheat bran)을 탄소원으로 이용하였다. 이는 Bt는 토양세균으로 많은 Bt 균주들이 대두박과 밀겨울 조합의 배지에서 그 성장이 양호하다고 이미 알려져 있다 (김 등, 1998). 또 농업부산물인 밀겨울과 대두박은 비용면에서 상당히 경제적이다.

Bt 656-3의 대량 배양용 배지 선발을 위하여, 500 ml 플라스크에서 원활한 산소 공급을 위해 배양액 100 ml로 하여 Bt 656-3과 Bt *morrisoni* PG-14 균주를 농업 부산물인 대두박 (S)과 밀기울(W)을 조합하여 배양하면서 일반적인 Bt 배양배지인 GYS 배지와 세포수 및 포자 형성 정도를 비교하였다 (Fig. 5). 그 결과 Fig X에서 보는 바와 같이 Bt 656-3은 대두박과 밀기울을 조합했을 때 최종 농도가 4%의 범위에서 대두박과 밀기울을 20:20의 비율로 조제하였을 때, 세포 성장도나 포자 형성 면에서 가장 양호하였다. 이는 rich 배지인 GYS 배지와 비교하였을 때 유사한 성장도로 Bt 656-3의 대량배양용 배지로 밀기울과 대두박이 충분함을 나타내는 결과이다. 한편 기준 균주인 Bt subsp. *morrisoni* PG-14의 경우는 대두박:밀기울을 30:10의 비율로 조합하였을 때 가장 높은 결과를 보였다.

대두박과 밀기울을 다양한 비율로 조합한 배지에서 Bt 성장에 따른 배지의 pH 변화를 조사하였다 (Table 4). 각 배양배지 조건에서 배지의 최초 pH와 Bt 성장에 따른 최종 pH의 변화 정도 조사 결과, Bt 656-3의 성장도가 가장 우수한 밀기울과 대두박을 20:20으로 조합한 배지에서 최종 pH는 7.96으로 GYS 배지에 비해 훨씬 안정적이었다.

이러한 결과들로 볼 때, Bt 656-3의 대량 배양을 위한 배지로 대두박과 밀기울은 세포수나 포자 형성면에서 우수하였으며, 조합 최적비는 최종 농도를 4%로 하여 대두박과 밀기울을 20:20의 비율인 것으로 나타났다.

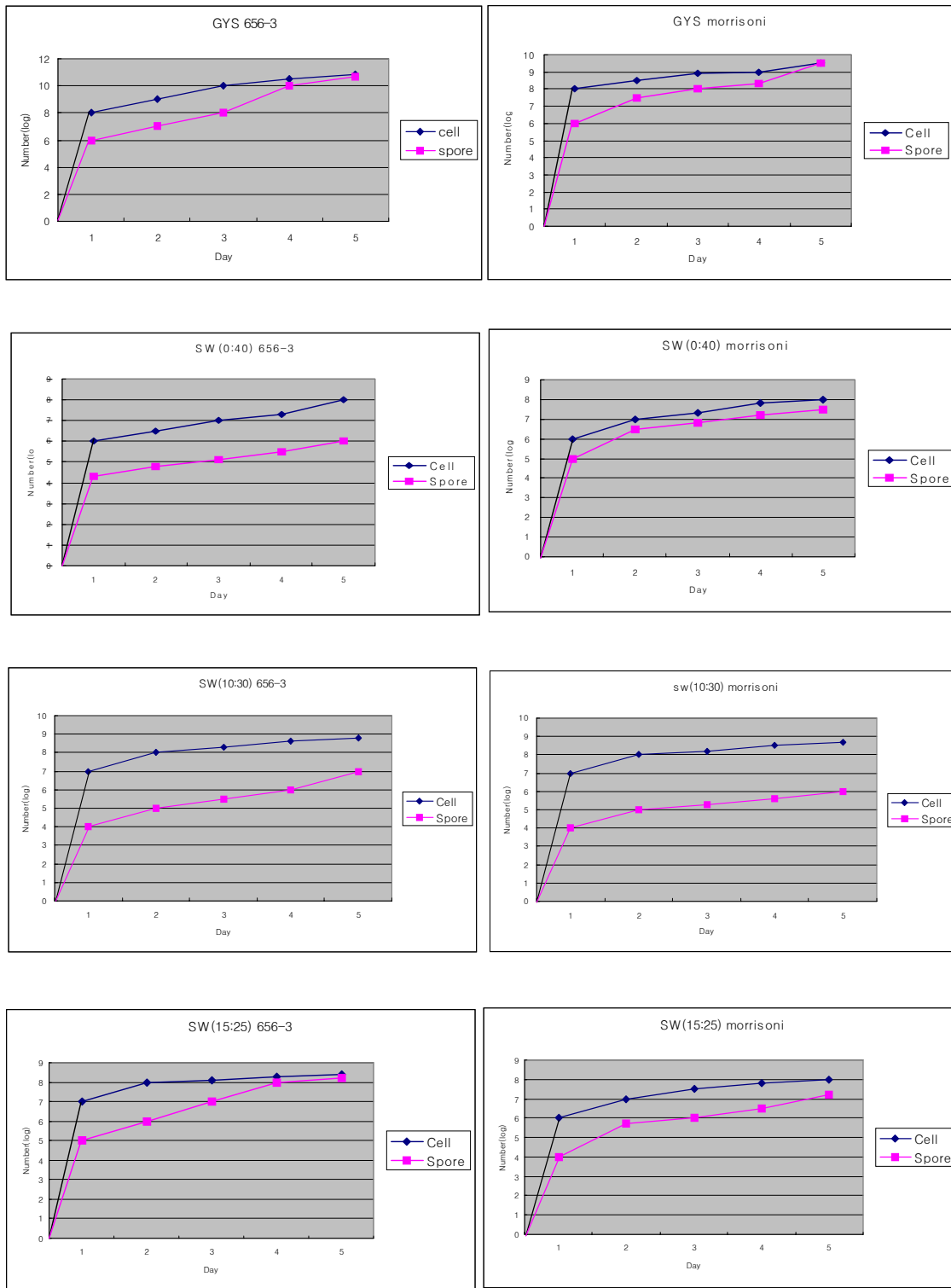


Fig. 5. Comparison of growth and sporulation of *B. thuringiensis* 656-3 in SW medium with various rate of soybean cake and wheat bran.



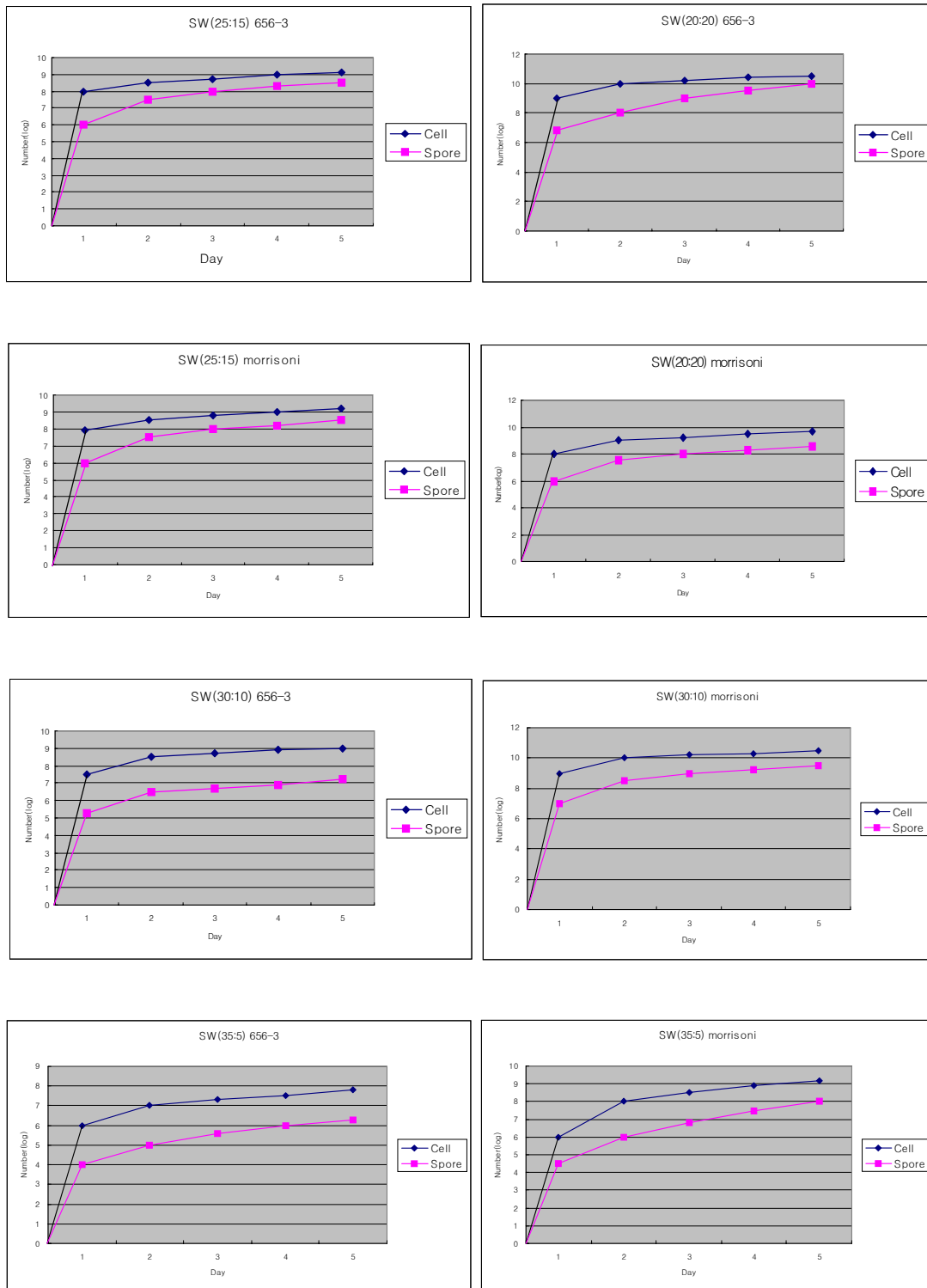


Fig. 5. Continued.

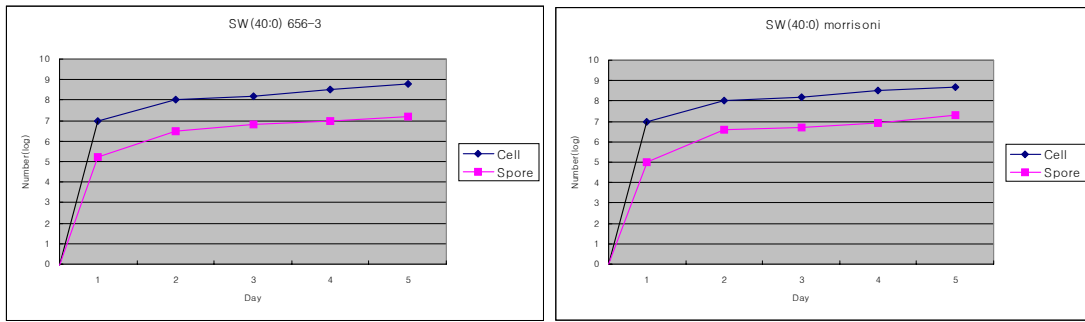


Fig. 5. Continued.

Table 4. pH change of SW and GYS media by *B. thuringiensis* culture

Medium	<i>B. thuringiensis</i>			
	656-3		<i>morrisoni</i> PG14	
	Initial pH <sup>a</sup>	Final pH	Initial	Final pH
GYS	7.0	8.45	7.0	8.4
SW(0:40)	7.0	7.0	7.0	6.87
SW(5:35)	7.0	6.6	7.0	8.02
SW(10:30)	7.0	7.71	7.0	7.50
SW(15:25)	7.0	7.90	7.0	8.24
SW(20:20)	7.0	7.96	7.0	7.48
SW(25:15)	7.0	8.17	7.0	8.03
SW(30:10)	7.0	8.07	7.0	7.72
SW(35:5)	7.0	7.55	7.0	8.05
SW(40:0)	7.0	8.0	7.0	8.08

<sup>a</sup> pH was adjusted to 7.0 with 2 N NaOH before autoclaving

## 2) Bt 656-3의 대량 배양

Bt 656-3의 대량 배양을 위한 배지로 대두박과 밀기울은 세포수나 포자 형성 면에서 우수하였으며, 대두박과 밀기울의 최종 농도가 4%에서 조합 최적비는 20:20의 비율로 나타났다. 이러한 대량배양을 위한 기초 실험에서 구명된 배지의 조성, 함량 그리고 pH 등을 고려하여 대량배양조건을 설계하였다. 대량생산을 위한 조건으로 호기성 미생물임을 고려한 산소의 원활한 공급과 적절한 교반 속도, pH의 변화 등을 고려하여 배양조건을 설계하였다 (Table 5). Table 5에 나타나 있는 것처럼, 대량 배양조건으로 7 ℓ 배양기에서 5 ℓ 배양을 설계하였으며, 균주로는 Bt 656-3 균주와 Bt subsp. *morrisoni* PG-14 균주 각각 비교하고, 배지는 대두박과 밀기울 최종 농도가 4%에서 20:20의 조합 비율로 하였다. 배양 과정 중의 pH의 변화와 용존산소의 변화는 Fig 6와 같이 배지 내에 지속적으로 5 ℓ의 산소가 보충되어 지는데 단시간에 그 산소를 모두 소비하는 것을 관찰 할 수 있으며 이는 이 균주들이 절대 호기성 균주임을 보여준다.

이러한 대량배양체계 하에서 Bt 656-3 성장을 확인하기 위해서 배양 중에 시료를 추출하여 세포수와 포자수를 조사하였다 (Fig. 7). 그 결과, 배양 4일째에 세포수와 포자수가 거의 일치하며 최대치를 보였다. 이는 배지 선발을 위한 기초 배양실험에서의 결과와 유사한 결과이다. 최종적으로 생산된 대량배양 산물은 colony forming unit (CFU)로 확인하였다 (Fig. 8).

또한 대량배양된 Bt 656-3은 2종의 버섯파리 *L. mali*와 *C. fuscipes*에 대해 살충력을 검정하였다 (Table 6). LC<sub>50</sub> 값을 CFU 조사한 결과 *C. fuscipes*에서는 약  $0.12 \times 10^7$ , *L. mali*에서는  $0.49 \times 10^7$ 으로 나타났다.

Table 5. Condition for optimum fermentation of *B. thuringiensis* 656-3 with 7-liter fermentor

Condition	7-liter
Volume of medium <sup>c</sup>	5-liter
Aeration	1vvm <sup>a</sup>
No. of impellers	2
Agitation	100rpm
Incubation temperature	30
Starting pH	7.0
Final pH	7.75
End of log-phase of growth	48-60hr
End of sporulation phase	72-96hrs
Completion of lysis	4Days
Age at harvest	4Days
Usual spore count <sup>d</sup>	1-1.5×10 <sup>10</sup> CFU <sup>b</sup> /ml

<sup>a</sup>pO<sub>2</sub>/volume of medium(5-liter air/5-liter medium).

<sup>b</sup>Colony form unit.

<sup>c</sup>Soybean cake of 20g+wheat bran of 20g/liter.

<sup>d</sup>Number of viable spores (capable of germination and outgrowth, measured on nutrient agar plates).

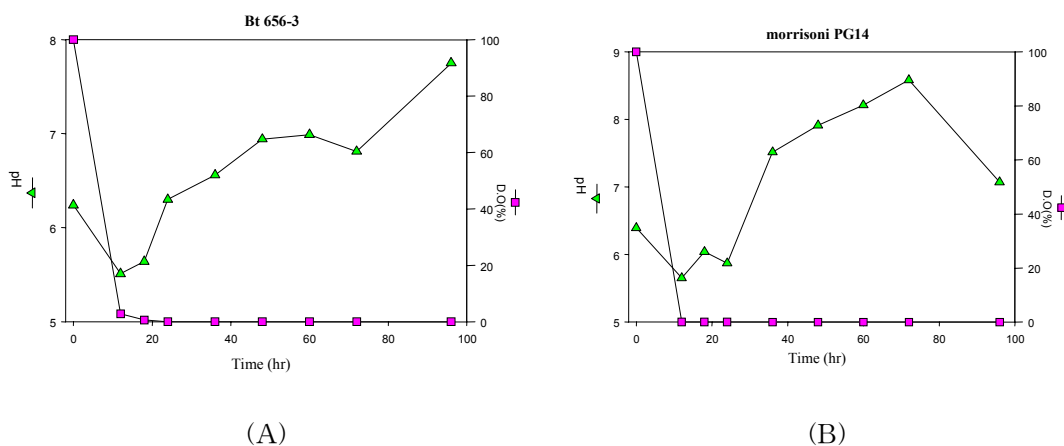


Fig. 6. Change in pH and D.O(%) during growth of *B. thuringiensis* 656-3 (A) and subsp. *morrisoni* PG14 (B).

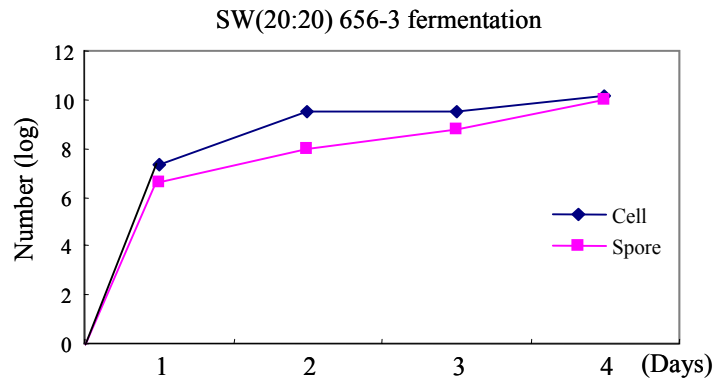
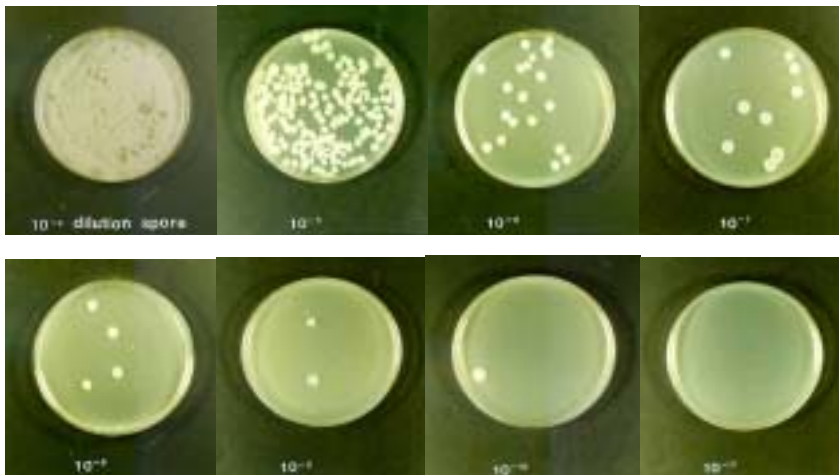


Fig. 7. Growth curve of *B. thuringiensis* 656-3 through fermentation.

(A)



(B)

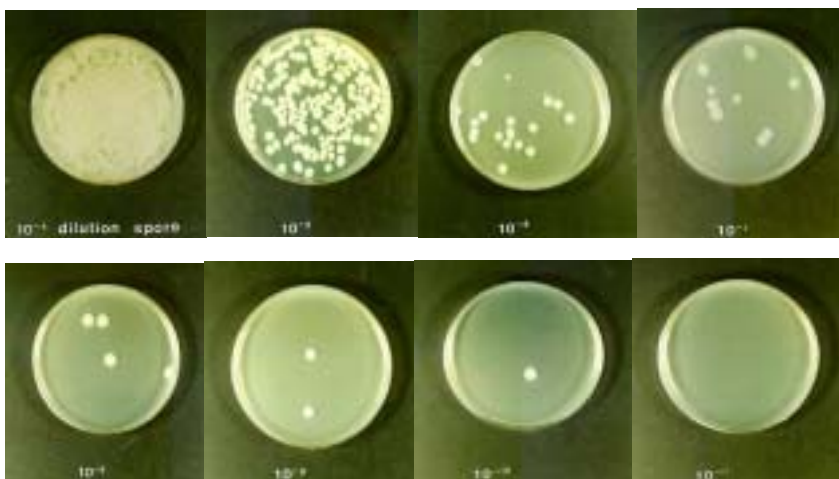


Fig. 8. Comparison of colony forming units of *Bt* 656-3 (A) and *morrisoni* PG14 (B) mass-cultured through fermentation.

Table 6. Insecticidal activity of *B. thuringiensis* 656-3 from fermentation

strain	<i>Coboldia fuscipes</i>		<i>Lycoriella mali</i>	
	Toxicity (LC <sub>50</sub> ) <sup>a</sup>	Limits <sup>b</sup>	Toxicity (LC <sub>50</sub> ) <sup>a</sup>	Limits <sup>b</sup>
<i>B. thuringiensis</i> 656-3	0.12	0.063~0.19	0.49	0.25~1.26

<sup>a</sup> 50% lethal concentration ( 10<sup>7</sup>/ml ).

<sup>b</sup> Confidence limit.

라. Bt 656-3의 제제화 및 살충력 검증

1) Bt 656-3 의 제제화

Bt 656-3의 대량배양과 대량배양된 Bt 656-3의 제제화는 Fig. 9에서와 같은 공정으로 수행하였다. 먼저 배양된 배양침전물을 원심분리를 통하여 수거하였다. 이 배양 침전물에는 Bt 656-3의 독소, 포자 및 멸균 후에도 용해되지 않는 밀기울과 대두박 입자가 포함되어있다. 독소를 포함하고 있는 배양침전물은 내독소단백질의 활성 유지 면에서 외부의 물리적 작용을 최소화하기 위해서 진공건조 방식으로 건조하였으며, 제제화 과정 중 열에 의한 성분의 유실이나 변성을 방지하기 위해서 공기압축기를 사용하여 배양침전물을 분말화 하였다. 본 연구에서는 배양침전물에서 Bt 656-3의 독소를 별도로 분리하지 않고 배지에서 유래된 밀기울과 대두박의 입자를 포함하여 제제화하기로 하였다. 그 이유는 공정의 추가에 따른 비용 증가 측면과 아울러 배지 유래의 밀기울과 대두박은 버섯 성장과 독소의 활성에 전혀 문제가 없으며, 오히려 혼재가 그런 면으로 볼 때 유리하다고 판단되었기 때문이다.

분말화 된 Bt 656-3의 독소를 포함하고 있는 배양침전물의 제제화는 우선적으로 느타리버섯의 재배와 그 특성을 고려하여 단순화하였다. 느타리버섯의 재배는 차단된 실내에서 이루어지기 때문에 미생물농약 제제화에 있어서 가장 중요한 요소로 작용하는 자외선차단제가 불필요하다는 장점을 가지고 있다. 아울러 느타리버섯의 재배 환경조건 특성 상 열에 의한 독소활성의 손실 면에서도 상당히 유리하다. 또한 기존 작물을 대상으로 하는 경우 일반적으로 엽면에 효율적인 미생물농약의 부착을 위하여 계면활성제가 첨가되는 데 이러한 면에서도 버섯을 대상으로 할 경우 불필요하여 유리하다. 또 버섯의 생물학적 특성에 따른 버섯의 성장과 약해 그리고 식용으로서의 특성 상 가능한 화학제품의 첨가제 또는 부가제의 첨가가 적을수록 안전하다고 볼 수 있다.

따라서 본 연구에서는 이러한 특성들을 고려하여 느타리버섯 재배지의 버섯파리 방제를 위한 Bt 656-3의 제제화를 위한 제제의 주 조성물로 천연소재인 metamorphic starch 전분을 선발하였다. Metamorphic starch는 점성과 부착성으로 인해 Bt 656-3의 내독소단백질의

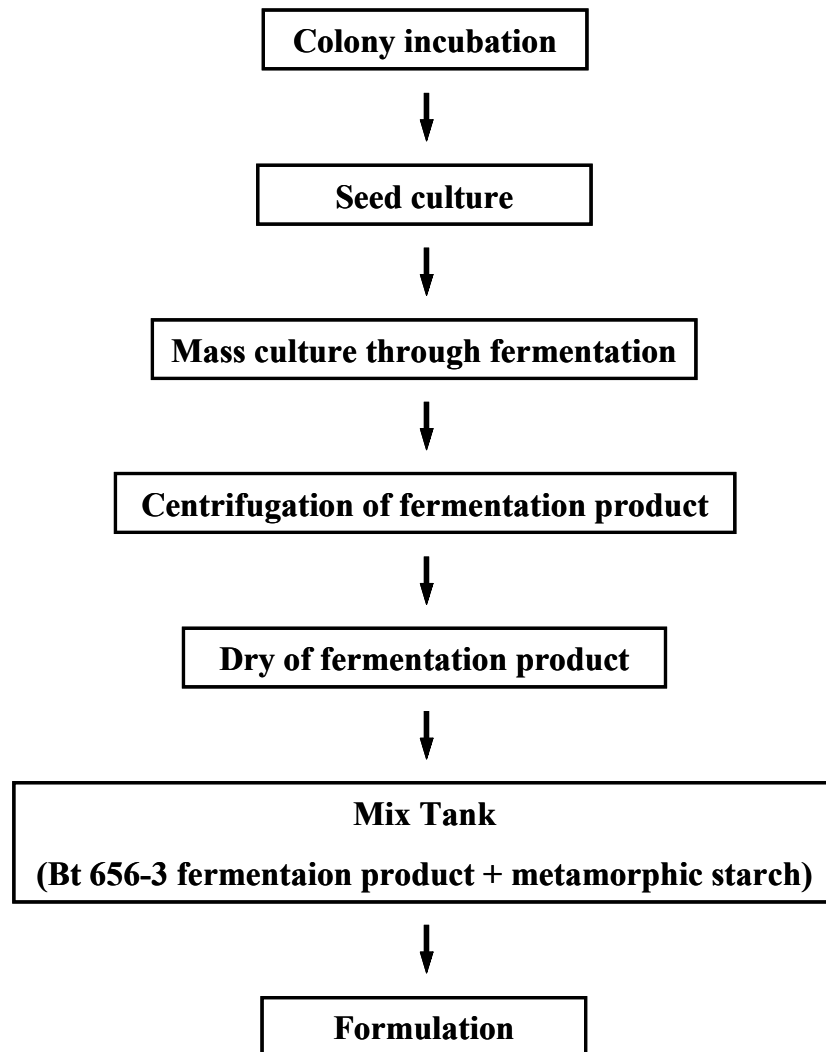


Fig. 9. Processing of mass-production and formulation of *B. thuringiensis* 656-3.

코팅면에서 유리하고 아울러 제제로 느타리버섯 균상에 살포되었을 시 부착효과를 기대할 수 있다. 또한 제제로 살포되어 균상에 방치되었을 경우 역시 버섯의 영양분으로 이용될 수 있다는 여러 장점이 있다.

제제화는 Bt 656-3의 독소, 포자 및 배지에서 유래된 밀기울과 대두박의 입자를 포함하고 있는 건조 분말화된 배양침전물 40 g과 metamorphic starch 전분 60 g을 혼합하여 제제화하였다 (Table 7). 이러한 조건의 제제에서 2 g의 분말제제를 물 750 ml에 섞어 10 m<sup>2</sup>에 살포할 수 있는 양으로, 이때 Bt 656-3의 최종농도는 5 × 10<sup>7</sup> cfu가 함유되며, 1회 살포시 실제 버섯재배지에서 최소 90% 이상의 살충력을 가진다.

Table 7. Formulation of Bt 656-3

Component	Composition(%)		
	20%	30%	40%
<i>B. thuringensis</i> (656-3)	20	30	40
Metamorphic starch	80	70	60
Total	100	100	100

## 2) Bt 656-3 의 제제의 살충력 검정

간이 느타리버섯 재배상에서 Bt 656-3 제제의 버섯파리해충에 대한 살충효과를 검정하였다. Fig. 10에서 보는 바와 같이 66 cm × 33 cm × 33 cm 크기의 간이 재배 상을 제작한 후, 느타리버섯을 재배하면서 버섯파리에 의한 피해정도와 Bt 656-3의 살충력을 검증하였다.





(A)



(B)



(C)



(D)

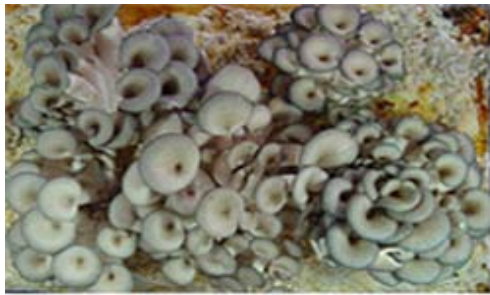
Fig. 10. Design of mushroom culture chamber for assay of Bt 656-3 formulation.

간이 느타리버섯 균상에서 상기의 제제를 각각 *L. mali*, *C. fuscipes* 및 *C. fuscipes* + *L. mali*에 처리하여 2종의 버섯파리에 대한 각각의 살충율과 버섯성장을 조사하였다. 그 결과, 실내 간이 느타리버섯 재배상에서 Bt 656-3의 제제는 버섯파리 2종 모두에서 99% 이상의 매우 높은 살충율을 보였다 (Table 8). 버섯 성장은 Bt 656-3 제제 처리구에서는 버섯파리에 의한 피해가 거의 나타나지 않았으나, Bt 656-3 제제를 처리하지 않은 대조구에서는 *C. fuscipes*와 *L. mali*가 왕성하게 번식하여 버섯이 전혀 성장하지 않은 것을 관찰 할 수 있었다 (Fig. 11).

Table 8. Insecticidal effect of Bt 656-3 formulation against mushroom flies in mushroom culture chamber

Treatment <sup>a)</sup>	Mushroom fly	Number of 3rd instar larvae	Number of dead larvae	Mortality (%)
Bt 656-3 formulation	<i>L. mali</i>	450	437	99.97
Bt 656-3 formulation	<i>C. fuscipes</i>	450	443	99.98
Bt 656-3 formulation	<i>C. fuscipes</i> + <i>L. mali</i>	225:225	219:222	99.97:99.98
Control	<i>C. fuscipes</i> + <i>L. mali</i>	225:225	13:22	0.05:0.09

<sup>a</sup> CFU of Bt 656-3 is  $0.3 \times 10^{10}$ .



(A)



(B)



(C)



(D)



(E)

Fig. 11. Growth of mushroom *Pleurotus ostreatus* in culture chamber treated with Bt 656-3 formulation. A, control; B, *C. fuscipes* + Bt 656-3 formulation; C, *L. mali* + Bt 656-3 formulation; D, *C. fuscipes* + *L. mali* + Bt 656-3 formulation; E, *C. fuscipes* + *L. mali*.

### 3) Bt 656-3 제제의 최적 살충농도

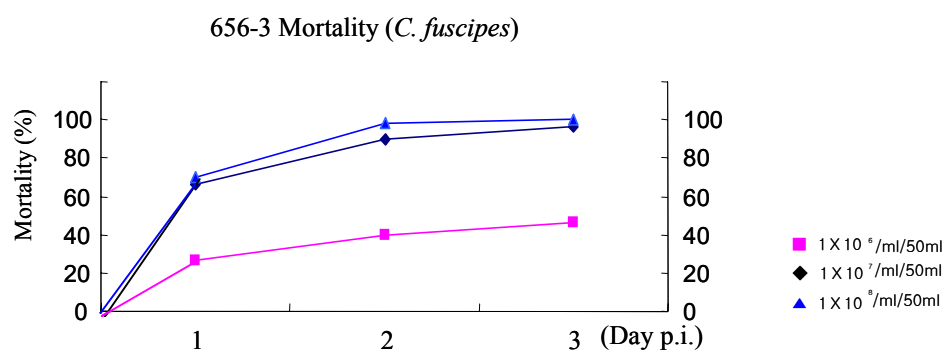
Bt 656-3 제제의 최적 살충농도는 대량배양 후 2종의 버섯파리에 대한 살충력 검정의 결과인  $0.12 \times 10^7$  CFU (*C. fuscipes*)와  $0.49 \times 10^7$  CFU (*L. mali*)를 기초로 Bt 656-3 제제의 최적 농도를 조사하였다.

*C. fuscipes*에 대한 Bt 656-3 제제의 최적 살충농도는  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  및  $1 \times 10^8$  CFU에서 조사하였다 (Fig. 12).  $1 \times 10^7$  CFU 처리구의 경우에 접종 2일째 약 93.99%의 살충력을 보이고, 3일째에 약 98%의 살충력을 보였다.  $1 \times 10^8$  CFU의 처리구에서는 2일째에 96%의 살충력을 보였으며 3일째에 100%의 살충력을 보였다. 반면  $1 \times 10^6$  CFU 처리구에서는 3일째에 약 52%의 낮은 살충력을 보였다. 이러한 결과로 볼 때, *C. fuscipes*에 대한 Bt 656-3 제제의 최적 살충농도는  $1 \times 10^7$  CFU 이상으로 나타났다.

*L. mali*에 대한 Bt 656-3 제제의 최적 살충농도는  $5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^7$  및  $5 \times 10^8$  CFU에서 조사하였다 (Fig. 13).  $5 \times 10^7$  CFU의 처리구에서는 접종 2일째에 98%의 살충력을 보였고, 3일째에 100%의 살충력을 보였다.  $5 \times 10^8$  CFU의 처리구에서는 2일째에 100%의 살충력을 보였다. 반면,  $5 \times 10^6$  CFU 처리구에서는 3일째에 약 47.9%의 살충력을 보였다. 이러한 결과로 볼 때, *L. mali*에 대한 Bt 656-3 제제의 최적 살충농도는  $5 \times 10^7$  CFU 이상으로 나타났다.

이상의 결과들과 일반적으로 느타리버섯 재배사에서 연중발생하며 가장 문제시되는 *L. mali*와 여름에 대발생하여 심각한 피해를 끼치는 *C. fuscipes*의 생태적 특성 등을 종합해 볼 때, 버섯파리 방제를 위한 Bt 656-3 제제의 최적 살충농도는 *L. mali*에 대한 살충농도를 근거로  $5 \times 10^7$  CFU로 사료된다.

(A)



(B)

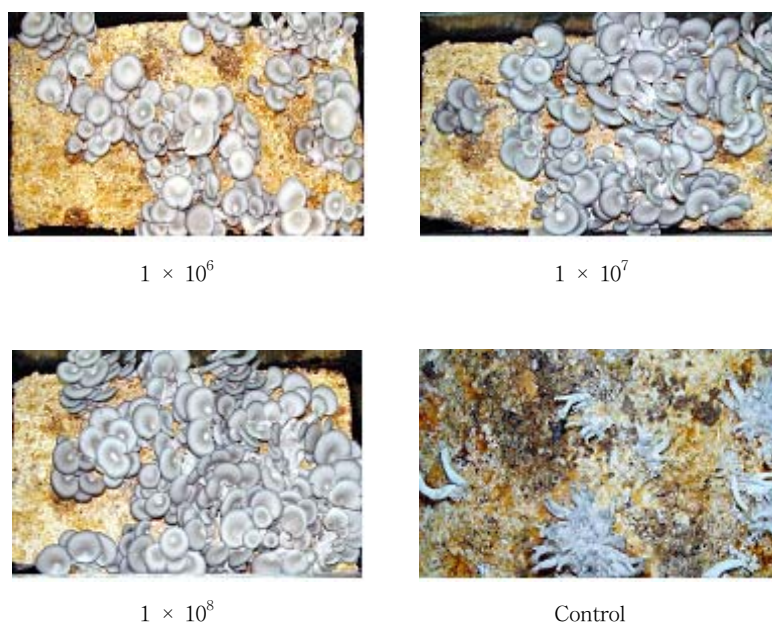
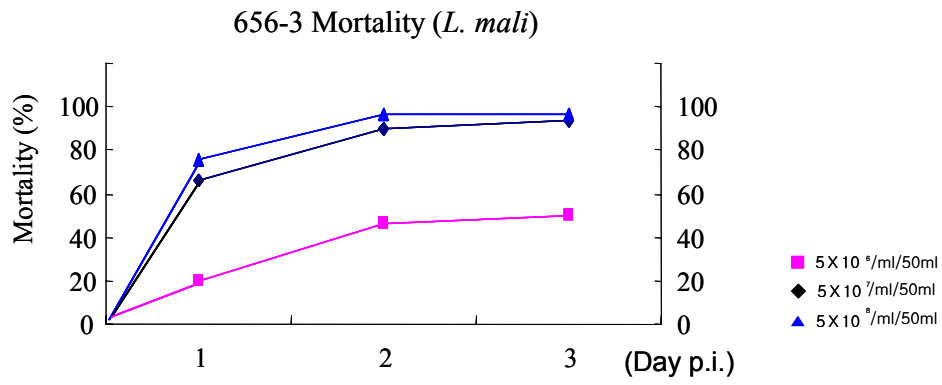


Fig. 12. Insecticidal effect of Bt 656-3 formulation with various concentrations. Mortality of Bt 656-3 formulation was assayed against 3rd instar larvae of *C. fuscipes* (A). Growth of oyster mushroom was photographed (B).

(A)



(B)

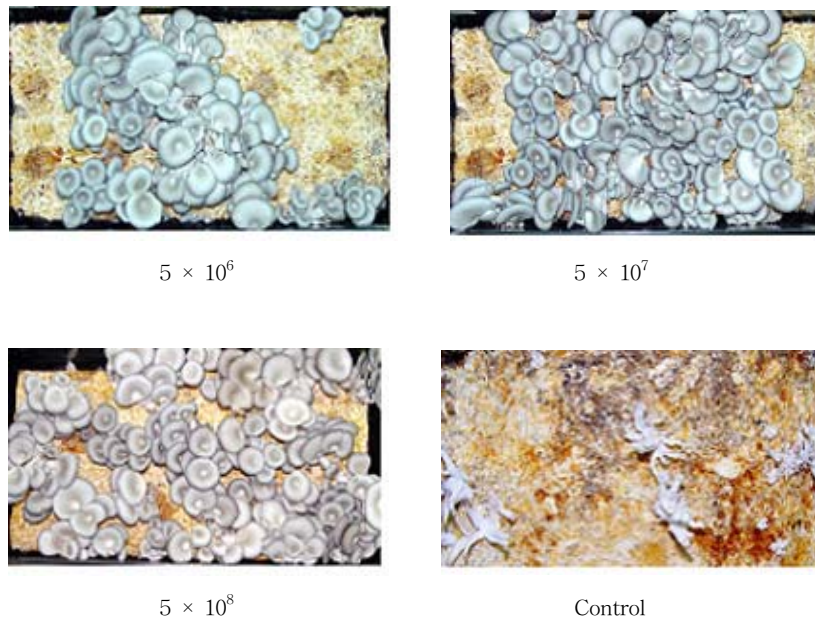


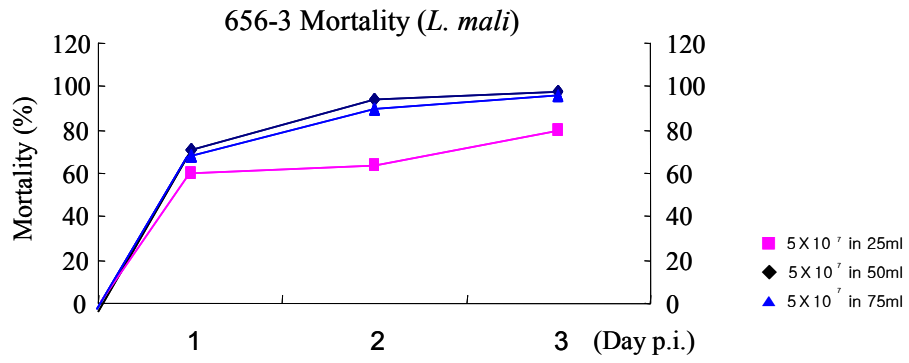
Fig. 13. Insecticidal effect of Bt 656-3 formulation with various concentrations. Mortality of Bt 656-3 formulation was assayed against 3rd instar larvae of *L. mali* (A). Growth of oyster mushroom was photographed (B).

#### 4) Bt 656-3 제제의 최적 살포량

Bt 656-3 제제의 최적 살포량 조사는 역시 *L. mali*와 *C. fuscipes*를 구분하여 조사하였다. *L. mali*에 대한 Bt 656-3 제제의 최적 살포량 조사는 이미 결정된 최적 살충농도  $5 \times 10^7$  CFU를 근거로 하였으며, 단지 희석 물양을 조절하여 살포량을  $1 \text{ m}^2$  당 25 ml, 50 ml 및 75 ml로 분무살포하여 조사하였다 (Fig. 14). 그 결과, 25 ml의 살포량에서는 살포 2일째에 84%, 3일째에 92%의 살충력을 보였고, 50 ml의 살포량에서는 2일째에 98%, 3일째에 98%의 살충력을 보였으며, 75 ml의 살포량에서는 2일째에 96%, 3일째에 98%의 살충력을 보였다. 이상의 결과로 Bt 656-3 제제는 *L. mali* 방제를 위해  $1 \text{ m}^2$  당 50 ml 및 75 ml의 살포량으로 살포하는 것이 가장 효과적인 것으로 나타났다. 그러나 75 ml 이상을 살포할 경우는 균상 밖으로 제제의 유실로 인해 적합하지 않은 것으로 나타났다.



(A)



(B)



5 × 10<sup>7</sup> / 25 ml



5 × 10<sup>7</sup> / 50 ml



5 × 10<sup>7</sup> / 75 ml

Fig. 14. Insecticidal effect of Bt 656-3 formulation with various spraying volume. Mortality of Bt 656-3 formulation was assayed against 3rd instar larvae of *L. mali* (A). Growth of oyster mushroom was photographed (B).



*C. fuscipes*에 대한 Bt 656-3 제제의 최적 살포량 조사는 역시 이미 결정된 최적 살충농도  $1 \times 10^7$  CFU를 근거로 하였으며, 단지 희석 물양을 조절하여 살포량을  $1 \text{ m}^2$  당 25 ml, 50 ml 및 75 ml로 분무살포하여 조사하였다 (Fig. 15). 그 결과, 25 ml의 살포량에서는 살포 2일째에 64%, 3일째에 80%의 살충력을 보였고, 50 ml의 살포량에서는 2일째에 94%, 3일째에 98%의 살충력을 보였으며, 75 ml의 살포량에서는 2일째에 90%, 3일째에 96%의 살충력을 보였다. 이상의 결과로 Bt 656-3 제제는 *C. fuscipes* 방제를 위해  $1 \text{ m}^2$  당 50 ml 이상이 효과적인 것으로 판단되었다.

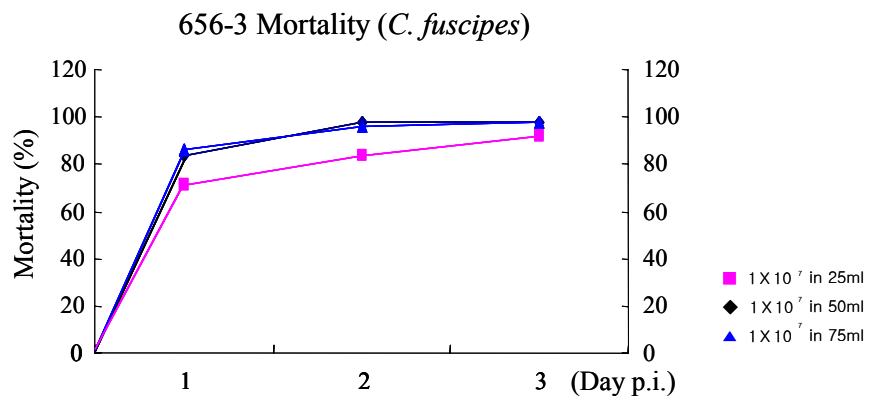
이상의 결과로 2종의 벼싹파리 방제를 위한 Bt 656-3 제제의 살포량은  $1 \text{ m}^2$  당 50 - 75 ml 정도로 나타났다.

#### 5) Bt 656-3 제제의 지속 효과 및 살포 시기

이미 결정된 Bt 656-3 제제의 최적 살충농도와 살포량으로 제제의 지속 효과와 살포시기를 조사하였다. Bt 656-3 제제의 살충력 지속효과와 살포시기를 동시에 결정하기 위하여 느타리버섯 발이 시와 발이 후에 제제를 구분하여 살포하고 제제 살포 후 1일, 3일, 5일, 7일째에 각각 벼싹파리 *L. mali*와 *C. fuscipes* 유충을 처리하여 그 살충력으로 조사하였다 (Fig. 16). Bt 656-3 제제는 *L. mali*와 *C. fuscipes* 유충에 공히 살포 후 5일까지는 약 90%의 높은 살충율을 보인 반면 7일째는 약 70%의 살충력을 나타냈다. 이는 느타리버섯 성장에 있어서 중요한 시점인 발이 시나 발이 후에 제제를 살포했을 때 유사한 살충력과 지속효과를 나타내었다.

이러한 결과로 볼 때, Bt 656-3 제제의 살충력이 살포 후 7일째에 약 70%정도로 나타나 제제의 재살포 시기는 발이 시나 발이 후에 관계없이 3일~5일이 높은 살충율의 지속성 면에서 유리하다고 판단된다.

(A)



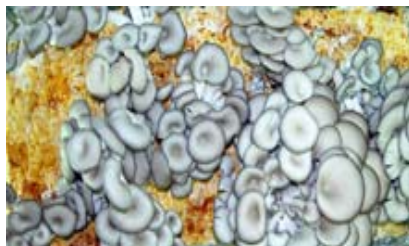
(B)



1 × 10<sup>7</sup> / 25 ml



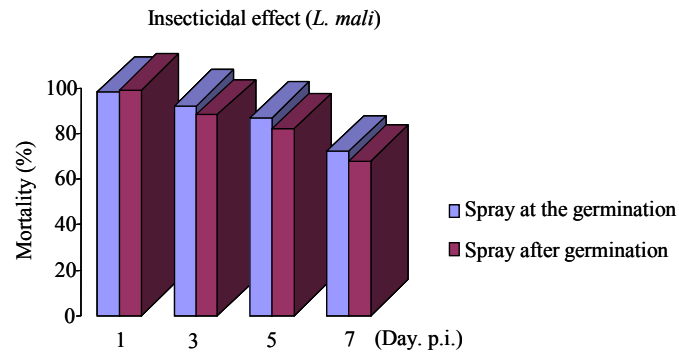
1 × 10<sup>7</sup> / 50 ml



1 × 10<sup>7</sup> / 25 ml

Fig. 15. Insecticidal effect of Bt 656-3 formulation with various spraying volume. Mortality of Bt 656-3 formulation was assayed against 3rd instar larvae of *C. fuscipes* (A). Growth of oyster mushroom was photographed (B).

(A)



(B)

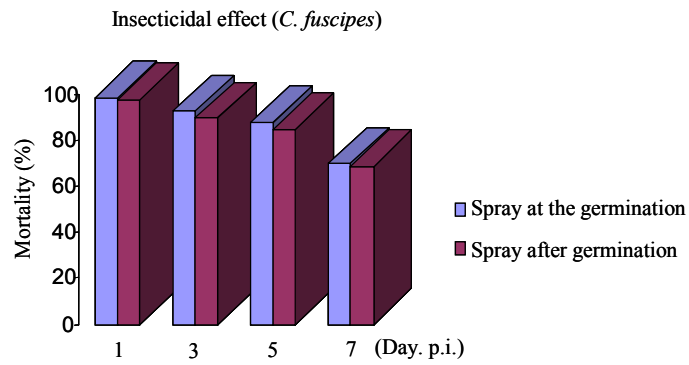


Fig. 16. Insecticidal effect of Bt 656-3 formulation according to period after spraying and mushroom growth. Mortality of B.t 656-3 formulation was assayed against 3rd instar larvae of *L. mali* (A) and *C. fuscipes* (B).

6) Bt 656-3 제제의 시제품 제작

상기의 결과들을 종합하여 Bt 656-3 제제의 시제품을 제작하였다 (Fig. 17). 제제는 Bt 656-3의 독소, 포자 및 배지에서 유래된 밀기울과 대두박의 입자를 포함하고 있는 건조 분말화된 배양침전물 40 g과 metamorphic starch 전분 60 g이 혼합된 분말형으로, 2 g의 분말제제를 물 750 ml에 섞어 10 m<sup>2</sup>에 살포할 경우 Bt 656-3의 최종농도는  $5 \times 10^7$  CFU이며, 1회 살포시 실재 버섯재배지에서 최소 90% 이상의 살충력을 가진다.

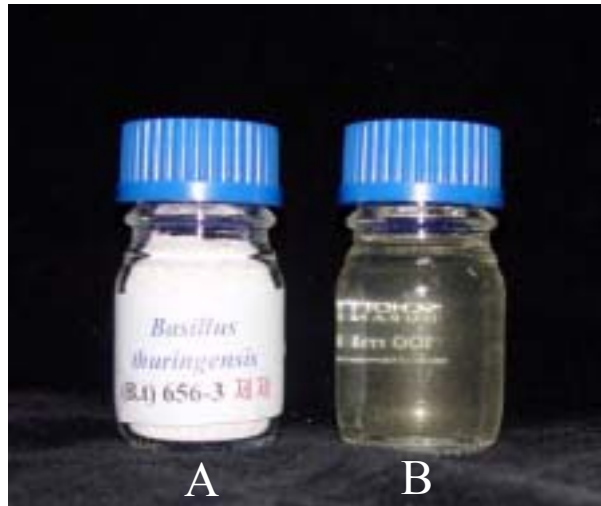


Fig. 17. Bt 656-3 formulation. A, Powder type of Bt 656-3 formulation; B, Bt 656-3 formulation suspended in water.

마. Bt 656-3의 제제의 느타리버섯 재배사 실증시험

1) Bt 656-3 제제 살포에 따른 수확량

느타리버섯 재배사 포장 (Fig. 18)에서의 실증 시험으로 Bt 656-3 제제 처리구와 무처리구 간의 느타리버섯 수확량을 비교하였다(Fig. 19). Bt 656-3 제제를 처리한 재배상의 경우 1차 수확시의 수확량은 전체 면적 60평 (198 m<sup>2</sup>)를 기준으로 약 850 kg이었고, 무처리구의 1주기 수확량은 약 820 kg이었다. 이는 첫 주기의 다 수확성 때문에 그 차이를 비교하기 어려웠으나, 2주기 수확부터 그 수확량에 차이가 났다. 제제를 3~5일 간격으로 살포한 재배상의 2차 수확량은 약 700 kg이었고, 무처리구는 약 600 kg이었다. 처리구에서 3주기 수확량은 약 420 kg이었고, 무처리구는 약 230 kg이었으며, 4주기 수확량은 처리구에서 약 280 kg이었고, 무처리구에서는 약 100 kg이었다. 이러한 결과는 무처리구의 경우 지속적인 버섯파리 유충에 의한 종균의 손상과 버섯파리에 의해 매개되는 각종 세균이나 곰팡이의 오염에 따라 수확량이 감소하였다.



(A)



(B)



(C)

Fig. 18. Mushroom growth in mushroom house with (B) or without (C) Bt 656-3 formulation. Bt 656-3 formulation was sprayed at the oyster mushroom house with interval of three days (A).

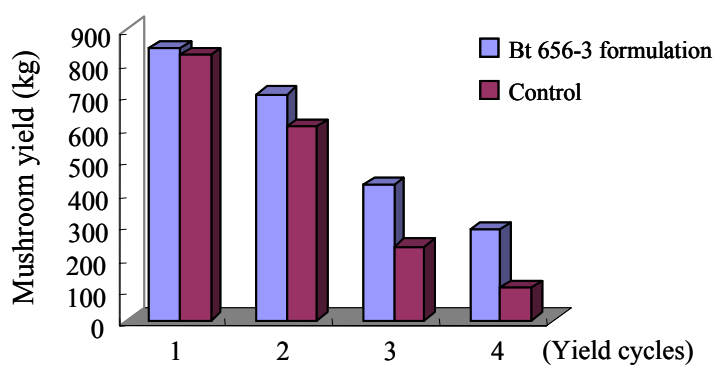


Fig. 19. Comparison of the mushroom yield in mushroom house with or without Bt 656-3 formulation.

## 2) Bt 656-3 제제와 유인살충 트랩 처리

Bt 656-3 제제 살포와 유인살충 트랩 설치를 느타리버섯 재배사 내에 동시에 처리함으로써 버섯파리 살충율 증대에 따른 느타리버섯 수확량의 차이를 조사하였다 (Fig 20). Bt 656-3 제제만을 살포하였을 때 1주기에 약 850 kg의 수확량을 보였고 유인살충 트랩 설치와 함께 복합적으로 처리된 경우에는 약 860 kg으로 별다른 차이를 보이지 않았으나 2주기에서는 Bt 656-3 제제만을 처리하였을 경우에는 700 kg인 것에 비하여 복합적으로 처리한 것의 경우에는 730 kg으로 상승효과를 관찰 할 수 있었고, 3주기에는 Bt 656-3 제제만을 처리하였을 경우 수확량이 420 kg이었던 반면에 복합적으로 처리한 것의 경우에는 480 kg이었다. 4주기에는 Bt 656-3 제제만을 처리하였을 경우에는 280 kg이었고, 복합적으로 처리한 것의 경우에는 370 kg이었다.

이상에서와 같이 복합적으로 처리하였을 경우에는 1주기에서는 수확량의 차이를 확인하기 힘들지만 버섯주기가 반복됨에 따라 그 수확량의 차이가 나타났다. 이는 Bt 656-3 제제의 경우에는 버섯파리 유충에 대해서는 매우 높은 살충력을 보이나 성충 유입은 막을 수 없다는 단점이 있다. 따라서 성충 유입에 따른 가해와 산란에 따른 다음 세대의 유충 등에 의한 피해는 상품화율 저하의 중요한 원인이 된다. 그러나 Bt 656-3 제제와 유인살충 트랩의 복합적인 처리로 방제 효과를 증대시키고 버섯파리에 의해 버섯주기가 반복됨에 따른 수확량의 감소를 최소화 할 수 있을 것으로 기대 된다.

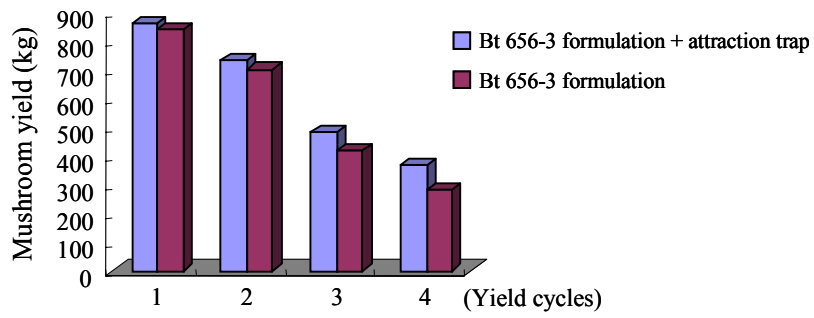


Fig. 20. Comparison of the mushroom yield in mushroom house with Bt 656-3 formulation only or both Bt 656-3 formulation and attraction trap.



## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 연구개발목표의 달성도

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척 도 (점수)
1차년도( 2000 )	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 버섯파리류 해충의 생태·생리적 특성</li> <li>○ 버섯파리류 해충의 유인요인 탐색 및 선발</li> <li>○ 느타리버섯 재배지 토양 채취 및 버섯파리류 해충 병원성 Bt 분리 및 독성 검정</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 생태·생리적 특성 (20점)</li> <li>○ 버섯파리류 해충의 유인요인 선발 (40점)</li> <li>○ 버섯파리류 해충 병원성 Bt 분리 및 독성 검정 (40점)</li> </ul>
2차년도( 2001 )	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 버섯파리류 해충의 유인요인 이용 트랩형 제작</li> <li>○ 유인 및 살충 효과 검정</li> <li>○ 버섯파리류 해충 특이 강독성 Bt의 선발 및 생화학적 특성</li> <li>○ 선발 Bt의 대량생산</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 유인요인 이용 트랩형 제작 (25점)</li> <li>○ 유인 및 살충 효과 (25점)</li> <li>○ 강독성 Bt 선발 및 특성 구명 (25점)</li> <li>○ 선발 Bt의 대량생산(25점)</li> </ul>
3차년도( 2002 )	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 버섯파리류 해충의 유인살충 트랩 제작</li> <li>○ 버섯파리류 해충 특이 Bt의 제제화 및 안정성 시험</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 유인살충 트랩 시제품 제작과 실증시험 (50점)</li> <li>○ 선발 Bt 제제의 시제품 제작 및 실증시험 (50점)</li> </ul>
최종평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 버섯파리류 해충의 유인살충 트랩 개발</li> <li>○ 버섯파리류 해충 방제용 미생물 살충제 개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 유인살충 트랩 개발 및 특허 출원 (50점)</li> <li>○ Bt 제제 개발 및 특허 출원 (50점)</li> </ul>

### 제 2 절 관련분야의 기술발전예의 기여도 및 기대효과

#### 1. 기술적 측면

가. 화학적 방제가 곤란한 느타리버섯에 피해가 극심한 버섯파리류 해충의 환경친화적 방제제 최초 개발

- 버섯파리류 해충의 유인살충 트랩 개발
- 버섯파리류 해충 방제용 Bt 제제 개발

나. 버섯파리류 해충의 환경친화적 방제 기술은 타 해충 (호집란 파리류 해충 및 잎굴파리 등) 방제 기술 제고

다. 병해 매개로 그 피해를 가중시키는 버섯파리류 해충의 환경친화적 방제제 개발은 병해 감소와 그에 따른 병 방제 기술의 효율성 제고

라. 느타리버섯의 버섯파리류 해충의 환경친화적 방제제 개발은 느타리버섯의 고품질·안정적 재배 기술 확립에 기여뿐만 아니라 생물농약 기술 발전에 기여

## 2. 경제·산업적 측면

가. 우리 나라 버섯생산량의 74%를 차지하고 있는 (1998년 느타리버섯 생산액 3,182억원) 느타리버섯의 생산량에 약 30% 이상으로 추정되고 있음에도 화학적 방제가 곤란한 버섯파리류 해충의 피해를 환경친화적 방제제 개발에 의해 줄임으로서 생산성 향상과 안정적 재배로 재배농가의 소득 증대에 기여

나. 버섯파리류 해충의 환경친화적 방제제 개발은 버섯파리류 해충의 직접적인 피해뿐만 아니라 병해 감소에 따른 비용절감과 아울러 느타리버섯의 연중재배와 단지화가 가능하여 지속적인 농가 고소득 작목으로 농가 소득 증대

다. 버섯파리류 해충의 환경친화적 방제제 개발은 안정적인 그리고 고품질의 버섯생산에 따른 경쟁력 확보로 수출 촉진과 아울러 수출 전략작목으로 육성이 가능할 것으로 전망됨

라. 버섯파리류 해충의 환경친화적 방제제 개발 기술은 생물농약 기술 발전에 기여함으로써 국내 생물농약 산업의 경쟁력 확보가 가능하고 아울러 국내·외에 등록과 함께 수출이 가능함

## 제 5 장 연구 개발결과의 활용계획

버섯파리류 해충방제용 미생물살충제 개발에 있어서 가장 중요한 관건은 속효성 강독성의 새로운 Bt 균주이다. 따라서 본 연구에서 분리된 Bt 균주는 현재 특허 출원된 상태이다 (명칭: 버섯재배지 토양으로부터 분리된 바실러스 투린지엔시스 656-3 균주 및 이를 함유하는 해충방제용 조성물; 특허 출원번호 10-2003-0003628). 아울러 국제 SCI 학술잡지 (Current Microbiology)에 게재하였다. 따라서 본 연구의 기초적인 대량배양과 제제화에 이은 재배사내 실증 시험 결과,본 연구에서 분리한 Bt656-3 균주를 이용한 버섯파리류 해충방제용 미생물살충제 개발 기술은 산업체 이전에 따른 실용화가 가능함을 입증하였다.

유인살충 트랩 개발 기술은 지속적인 추가 연구 개발에 의한 효율성 제고와 타 파리류 해충 등에 적용성 확대 여부 검증 등과 함께 국내 관련 회사에 기술이전함으로써 산업화를 추진하고자 한다.

선발된 버섯파리류 해충 방제용 곤충병원 미생물인 Bt와 그 제제는 화학적 방제제에 비해 적은 연구개발비와 비교적 간단한 등록 규정으로 단시간에 개발이 가능하기 때문에 국내 관련 농약회사에 균주와 기술을 이전함으로써 추가 연구개발과 함께 산업화를 추진하고자 한다.

## 제 6 장 연구개발 과정 중에 수집된 해외과학 기술 정보

### 제 1 절 생물농약의 개발 현황

생물농약은 농작물의 해충, 병원미생물 및 잡초를 방제하기 위하여 자연환경에서 분리된 병원균, 기주 저항성 미생물, 천연물 농약 및 천적을 제품화한 것으로 그 역사는 1888년 California의 감귤 이세리아각지벌레를 호주산 베다리아 무당벌레 (Vedalia beetle)로 방사하여 방제에 성공한 이후, 1920년대 영국에서 토마토 온실가루이를 온실가루이좀벌로 방제하였고, 19609년대에는 European spruce sawfly (잎벌레)를 virus로, 나방류는 *Bacillus thuringiensis*로 방제에 성공하였다. 1991년도에는 식물저항성 유도미생물로 미생물 종자처리제를 개발하여 저항성이 유도된 식물스스로 병 발생을 억제하도록 하였다. 현재 세계적으로 상품화되어 보고된 생물농약은 크게 미생물농약, 페로몬을 포함한 생화학 농약, 식물농약, 천적 및 기타로 구분하여 145종이 보고되고 있다 (Table 1). 이 중에는 대부분이 살충성 생물농약으로 119개 품목이 있고 다음으로 살균성, 살선충성이며 세균, 곰팡이, 바이러스 등으로 구성된 미생물농약이 주종을 이루고 있다. 그 외 페로몬과 천적이 45-45개 품목이 보고된 것으로 보아 이 분야의 발전도 기대되고 있다.

국내는 1930년대 사과면충을 사과면충좀벌을 이용하여 방제에 성공한 이후 1976년도에 제주도 감귤에 발생하는 루비각지벌레를 일본에서 도입한 루비붉은강충좀벌로 방제시킨 예가 있다.

Table 1. 최근 개발된 신규 생물농약 수 및 개발 제품

(Biopesticide Manual, 1998)

구분		살균	살충	살선충	제초	계
미생물	세균	10	9	(2)	1	20
	곰팡이	11	6	1	2	20
	선충	-	7	1	-	8
	원생동물	-	1	-	-	1
	바이러스	-	11	-	-	11
페로몬		-	45	-	-	45
천적		-	40	-	-	40
계		21	119	2	3	145

최근에는 미생물 제제라고 하여 살충·살균효과가 있다고 알려져 있는 제품들이 34개회사로부터 72품목이 시장에 소개되어 있는데 국내에 정식으로 등록된 토양미생물 제제는 1999년 현재 총 57개 품목이었으며 살충제 6품목, 살균제 27품목, 그 외에는 효소제나 유용미생물 제제로 되어있다. 우리나라는 2000년도 6월에 미생물 농약의 등록 기준과 방법이 고시되어 토양미생물 제제들 중에서 살균 및 살충 효과가 인정되는 제품들도 미생물농약의 범주에 들어오도록 제도적 뒷받침이 마련되면서 본격적인 생물 농약 시대에 접어들었다. 천적은 1996년부터 본격적으로 연구를 시작하여 아직 상업화하기에 미진한 점이 있으나 벤처기업을 중심으로 꾸준히 개발하고 있어 곧 천적에 의한 방제 사례도 많이 발생하게 될 것이다.

## 제 2 절 현재 생물농약의 시장 규모

영국의 CPL사에서 조사한 세계 생물농약 시장은 2000년도에 약 1억5천불 정도로 예상되고 있고 그 중에서 BT가 1억 천불로 대부분을 차지하고있으며 미생물 농약은 4천만불로 보고되고 있다. 이 시장은 전체 농약시장의 약 0.5%로 미비하지만 현재 개발 중인 미생물 농약, 생화학 농약 및 천적 등과 환경친화형 농업으로 전환 추세에 있다는 것을 볼 때 조만간 시장이 확대될 것으로 예상된다 (Table 2).

Table 2. 세계 생물농약 시장

(단위 : 백만달러)

연도	계	BT계	미생물제
1996-1997	85-90	70	15-20
1998	120	90	30
1999	130-135	100	30-35
2000	150	110	40

Biopesticide 5th Edition, CPL Sci., 1999

일본농약요람에서 조사한 생물농약 시장을 보면 2000년 현재 12억엔으로 살충성 생물농약이 약 10.9억엔으로 85%를 차지하며 그 중 BT 계가 7.6억엔이며 살균성 생물농약은 1.3억엔에 불과하며, BT를 제외한 생물농약은 5.6억엔 규모로서 일본전체 농약시장의 0.34%로 세계 농약시장보다 미약한 실정이다. 일본에서 판매중인 생물농약은 총 22개 품목으로 살충제 17품목, 살균제 4품목, 제초제 1품목으로 구성도 아직 취약한 실정이다 (Table 3).

Table 3. 일본의 생물농약시장

(단위 : 백만엔)

연도	계	살충제			살균제	제초제
		BT계	기타제	소계		
1998	1,075	799	221	1,020	5.2	49.8
1999	1,174	844	252	1,096	5.4	72.6
2000	1,272	756	332	1,088	118.0	65.7

2000농약요람(일본식물방역협회)

국내 미생물 농약시장을 보면 세계 시장과 마찬가지로 BT제가 주이며, 2000년에는 판매액이 33억원 정도였고 살충, 살균 효과가 있다고 주장되는 토양미생물 제제의 판매액을 추정할 금액을 더하면 77억원 정도이며 그 중 BT를 제외한 살충제가 약 13억원, 살균제는 31억원 정도로 추정되며 전체농약 시장의 0.31%에 해당되는 극히 미약한 시장을 형성하고 있다. 이 구성은 현재의 세계시장에서 생물농약이 차지하는 비율보다도 낮은 수준이지만 우리나라는 국토가 좁고 다양한 작물이 재배되고 있는 만큼 다양한 병해충 및 잡초도 많이 발생하고 있어 국내의 시장 잠재력은 크다고 하겠다 (Table 4).

Table 4. 국내 생물농약 시장현황

(단위 : 백만원)

연도	계	BT제*	통상미생물제제(추정치)**			천적 등
			살충제	살균제	제초제	
1995	4,359	4,359	-	-	-	-
1998	3,723	2,324	300	1,000	-	-
1999	6,933	3,133	800	3,000	-	-
2000	7,682	3,282	1,300	3,100	-	-

\* 농약연보

\*\* 토양미생물제제 중 살균, 살충효과가 있다고 주장하는 제품의 판매액 추정량

### 제 3 절 국내의 생물농약 시장 추정

생물농약의 판매가능 시장을 추정해보기 위하여 화학농약의 최근 3년 평균 판매 금액을 적용 대상별로 구분하여 정리해본 결과 침투할 수 있을 것으로 예상되는 시장은 약 33310억원으로 추정되며 그 중 살균제는 958억원, 살충제는 2353억원으로 살충제 시장이 클 것으로

예상되며 제초제 시장은 불확실할 것으로 예상된다.

생물농약의 시장은 친환경재배지의 경우 천적은 약 5%, 살균제, 살충제는 각각 20%정도 사용될 것으로 가정되었고, 시설재배지에서는 친환경재배와 겹치는 면적을 제외하고 천적이 0.5%, 살균제는 1%, 살충제는 2% 사용될 것으로 예상하여 농약사용정도가 다른 재배형태별로 2010년도 생물농약의 시장을 추정하여 본 결과 BT, 천적을 포함하여 821억원으로 예상되었고 그 중에서 BT류가 약 50억원, BT를 제외한 살충제가 319억원, 살균제가 186억원, 천적이 258억원, 제초제는 약 7억원 정도로 생물농약이 전체 농약 시장의 6.2%정도 차지할 것으로 예상된다 (Table 5).

Table 5. 생물농약 시장 추정 (2010년)

구분		계	친환경재배	시설재배	노지재배	
재배면적(ha)		1,000,000	104,000	117,500	1,778,500	
생물농약 (백만원)	살충제	BT	5,000	500	1,500	3,000
		그외	31,950	8,320	9,400	14,230
	살균제	18,630	6,240	7,050	5,340	
	제초제	700	500	-	200	
	천 적	25,800	5,200	11,750	8,850	
	소 계	82,080	20,760	29,700	31,620	
화학농약 (백만원)	1999년	932,700	1,000	235,200	696,500	
	2010년	1,242,200	26,500	196,500	1,019,200	
총계		1,324,280	47,260	226,200	1,050,820	

천적:(친환경재배×0.05+시설재배×0.1+노지재배×0.005)×100만원/ha =258억, 살균제:(친환경재배×0.2+시설재배×0.2+노지재배×0.01)×30만원/ha = 186억, 살충제:(친환경재배×0.2+시설재배×0.2+노지재배×0.02)×40만원/ha =319억, \*노지재배 농약비에는 골프장이 포함됨

Table 6. 생물농약의 판매 가능 및 어려운 시장 추정

생물농약 판매 가능시장			생물농약 판매 어려운 시장	
종 류	판매액('98-00평균)	종 류	판매액('98-00평균)	
살균제	잔디 살균제	4,554	종합살균제	95,297
	모잘록병	6,268	종자소독약	4,397
	역병, 노균병	25,172	기타살균	3,473
	흰가루병	841	과수혼합살균제	5,737
	EBI	35,742	동제	6,694
	EBI기타	4,470	도열병약	62,936
	잿빛곰팡이병	10,822	흰잎마름약	478
	항생제(무름병)	6,873	수도 기타 살균제	3,256
	부란병	1,012	알타나리아제	15,422
	소 계	95,754	문고병약	29,877
살충제	토양해충	20,648	벼멸구	38,838
	각지벌레	18,207	달팽이	295
	배추좀나방	5,637	초기해충	83,347
	원예나방	52,709	기타(저곡해충)	4,504
	응애	37,458	이화, 흑명나방약	35,161
	응애, 기타	10,871	과수원제초제	88,007
	진딧물	45,630	소도용제초제	115,272
	진딧물, 기타	37,626	원예용제초제	45,220
	기타해충(기계류)	6,476	잔디용제초제	5,914
	소 계	235,262	전착제	5,152
		PGR	16,521	
생물농약 침투가능 시장 계	331,016	소 계	665,798	
		('98-00평균)	996,814	

\* 위 판매액은 1998, 1999, 2000년도의 화학농약 판매금액의 평균값임.

#### 제 4 절 시장확대 가능성

생물농약은 생산비가 높고 수율이 낮고, 약효발현이 늦고, 효과발현기구가 명확하지 않으며 경엽처리에서는 생물요인 (포자발아)과 비생물요인 (UV, 살균제 등)에 의해 영향을 쉽게 받는 단점이 있다. 특히, 토양처리에는 토양물리성에 의해 영향을 크게 받으며, 효과에 비해 가격이 다소 고가이고 생물체 자체로 방제하므로 저장기간이 짧고 기주 특이적이라 대상 방제 범위가 좁다. 그러나 생물농약 시장의 확대를 가능케 하는 특징으로는 천연 생물 또는 천연물질이므로 부수적 피해가 없고 환경친화적이며, 먹이사슬에 축적되지 않아 수확기까지



사용될 수 있으며, 특히, 강, 호수에 오염 없이 병해충을 방제할 수 있어 저항성 병해충 방제에도 매우 효과적이다.

*Bacillus thuringiensis* (Bt)는 살충 특이성을 갖는 단백질을 생산하여 광범위한 곤충에 대한 살충 활성을 지니는 미생물 살충제로 널리 알려져 있는데 주로 Bt를 이용한 살충 조성물과 다양한 살충 활성을 지닌 새로운 Bt 균주의 발견 및 생산에 관한 기술이 출원되고 있고 국내에서는 Bt에 관한 기술이 많지 않고 내국인 출원은 미비한 것으로 나타나있다.

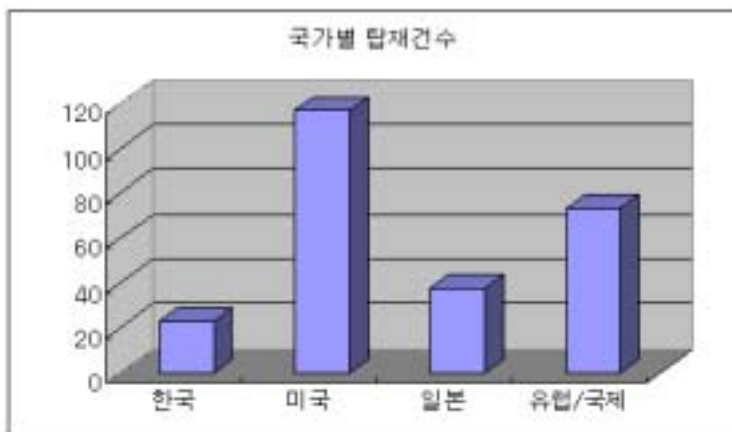


Fig 1. *Bacillus thuringiensis*에 관한 기술의 특허출원 현황.

미국 캔자스대학교 곤충학과의 Fangneng Huang 연구팀은 곤충병원세균 *Bacillus thuringiensis*의 상용 제제인 Dipel 저항성 및 감수성 유럽조명나방 *Ostrinia nubilalis* 계통의 유충섭식행동에 미치는 *B. thuringiensis*의 영향을 조사하기 위한 사료선택시험을 수행하였다. 무처리와 표준사료와 상이한 농도의 Dipel과 혼합된 3가지 사료를 유충(1-4령충)에게 공급하였다. Dipel이 처리된 사료와 비교할 때 무처리 사료에서 유의하게 높은 비율의 감수성 및 저항성 유충이 발견되었다. 무처리 사료에서 1령충과 2령충의 수는 방사한지 72시간 후까지 끊임없이 증가하였으며 이때 유충의 43-75%가 무처리 사료에서 발견되었다. 또한 무처리 사료에서 3령충과 4령충의 비율은 처음에 증가하다가 12-24시간 후에 균형이 이루어졌는데 이때 30-40%의 유충이 무처리 사료에서 발견되었다. 저항성 및 감수성 계통은 Dipel이 처리된 사료를 회피하는 것으로 보이며 상이한 Dipel 농도에 대하여 유사한 반응을 나타내었다. Dipel 저항성 계통은 감수성 계통보다 처리된 사료를 회피하는 능력이 보다 뛰어났다. 곤충병원체에서 유래한 미생물살충제는 일반적인 유기 또는 합성 살충제에 대한 대안으로 개발되어왔다. 포자를 형성하는 동안 어떤 단백질성 결정체를 만드는 세균인 *B. thuringiensis*의 여러 가지 계통에서 유래한 미생물살충제가 가장 흔하다. 이 미생물살충제의 가장 중요한 장점 가운데 한 가지는 어떤 곤충해충에 고도로 특이적이며 일반적으로 인간과 다른 비표적생물에 해가 없다는 것이다. *B. thuringiensis*에서 유래한 미생물살충제는 1920년대 이후 유럽조명나방과 같은 여러 가지 나비목 해충을 방제하는데 이용되어왔다. 유

유럽조명나방은 옥수수 *Zea mays*의 가장 중요한 해충 가운데 하나이다. 북미에서 유럽조명나방은 연간 10억달러 이상의 손실은 초래한다. 이 곤충은 유럽 중부 및 남부, 시베리아, 인도 북부, 중국 서부에 걸쳐 폭넓게 분포한다. 지난 수년동안 여러 가지 유럽조명나방 콜로니가 *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki*의 상용제제인 Dipel에 노출되어왔다. 이 조사들은 *B. thuringiensis*에 대한 저항성이 실내조건 하에서 발달하는지와 얼마나 빠르게 발달하는지를 결정하기 위한 것이었다. 이 가운데 여러 가지 콜로니에서 6-14세대 선발후 반수치사농도 (LC<sub>50</sub>)가 25-73배까지 증가하는 것으로 나타났다. 연구팀은 Dipel을 포함하는 사료에 이들 저항성 곤충이 노출되었을 때 그 섭식행동에 변화가 있는지를 평가하기 위하여 선택시험을 이용하였다.

현재, 환경친화형 미생물살충제의 개발은 범세계적인 추세이다. 특히, 최근 세계적인 농약 회사들이 화학분야에서 생물분야로의 전환 및 미생물살충제 시장진출 전략 강화 등의 움직임으로 볼 때, 우리나라의 경우도 이러한 흐름에 적극 대응할 수 있는 국내 자생의 곤충병원성 미생물을 이용한 미생물살충제의 개발이 시급한 실정이다. 미생물살충제는 해충의 천적미생물인 곤충병원성 세균, 진균, 바이러스, 선충 등을 이용하는 것으로, 사람이나 가축, 식물에는 해가 없으면서 대상 해충을 효과적으로 방제할 수 있어 미국을 비롯한 선진국에서는 비교적 오래전부터 자국 환경에 적합한 곤충병원미생물을 분리, 대량생산 및 제제화하여 실용화하고 있다. 대표적인 Bt 살충제는 대부분 나비목 유충을 대상으로 하고 있으며 가장 많이 보급되고 있는 제품군이며 많은 연구가 이루어지고 있다. 이를테면 비티 유전자를 유전자 조작에 의해 식물체에 유입시킨 transgenic plant가 개발되기도 하였으며 살충성과 살균성을 동시에 보유한 새로운 비티 균주도 보고되고 있다. 그러나 작물에 피해를 끼치는 해충은 나비목 유충만이 있는 것이 아니며 따라서 다른 해충을 대상으로 한 제품의 연구개발이 활발하다. 주로 살아 움직이는 해충을 방제하기 위하여 해충에 선택적으로 작용하는 독소를 생산하는 균주를 이용하거나 해충과의 접촉 기생에 의해 방제가 이루어지는 경우가 많다. *Paecilomyces fumosoroseus*, *Verticillium lecanii*, *Beauveria bassiana* 등의 기생성 곰팡이를 이용하여 진딧물, 온실가루이, 총채벌레 등을 방제할 수 있는 제품이 세계적으로 보급되고 있다. 또한 방선균이 생산하는 avermectin을 이용하여 진딧물과 응애를 방제하기도 한다. 한편, 곤충을 숙주로 하는 바이러스를 이용한 제품도 상당수 존재하는데 이들은 특정 나비목 유충을 방제 대상으로 하고 있는 경우가 많다. 각 유충에 선택적으로 작용하는 GV (Granulosis virus) 및 NPV (Nuclear polyhedral virus)를 이용한 제품으로서 자외선을 잘 차단시킬 경우 상당히 효과적으로 작용하는 것으로 알려져 있다.

이처럼 생물농약은 화학농약과는 다른 특성을 가지고 있으므로 이를 개발, 보급, 유통, 판매, 사용하기 위해서는 전 분야에서 새로운 관점으로 접근해야 한다. 따라서 초기 시장 접근이 쉬운 제품을 개발해야 하는데 화학농약과 직접 경쟁되지 않는 분야에서 효과가 우수하고, 약효 발현기간이 빠르며, 사용하기 편리하고, 저장성이 우수한 제품의 개발이 필요하고 호기심으로 사용한 소비자들이 계속 사용하도록 유도해야 한다. 생물농약 시장은 적은 면적 작물, 특이한 병해충, 토양병해충, 저항성 병해충, 농약 잔류문제로 생겨나는 시장에 적용될

수 있는 제품들이 우선 개발되는 것이 좋으며, 이렇게 개발된 제품들은 시장에 정착되기 위해서 정밀한 사용 방법이 개발·보급되어야 한다. 결론적으로 화학농약을 배제한 작물보호가 아니라 화학농약을 합리적으로 적게 사용하면서 생물농약과 교호 살포하여 화학농약 수준의 방제효과를 보여주는 환경친화적이고 저농약 재배법 보급이 생물농약 시장의 확대에 중요한 역할을 할 것으로 많은 연구자들에 의해 보고되고 있다.

## 제 8 장 참고문헌

- Adang M. J., Staver M. J., Rocheleau T. A., Leighton J., Barker R. F., Thompson D. V. (1985) Characterized full-length and truncated plasmid clones of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 and their toxicity to *Manduca sexta*. *Gene* 36: 289-300.
- Bae J. S., Kim I., Kim S. R., Jin B. R., Sohn H. D. (2001) Mitochondrial DNA sequence variation of the mushroom pest flies, *Lycoriella mali* (Diptera: Sciaridae) and *Coboldia fuscipes* (Diptera: Scatopsidae), in Korea. *Appl Entomol Zool* 36: 451-457.
- BCPC (1998) The biopesticide manual. 1st edition.
- 부경생 (2000) 한국의 생물농약기술. 과학과 기술.
- Cantwell, G. E. and W. W. Cantello (1984) Effectiveness of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in controlling a Sciarid fly, *Lycoriella mali*, in mushroom compost. *J. Econ. Entomol.* 77: 473 - 475.
- 차동열 (1998) 버섯재배기술 및 출하요령 - 버섯 재배상의 문제점과 대책. 농협 중앙회 농협버섯전국협의회. 17 - 50.
- 차동열 (1998) 버섯 병해충 - 느타리버섯 재배 환경과 안전생산. 농민저널 월간 버섯. 39 - 55.
- Chang J. H., Je Y. H., Roh J. Y., Park H. W., Jin B. R., Lee D. W., Kim S. H., Yang Z. W., Kang S. K. (1999) Isolation and characterization of a strain of *Bacillus thuringiensis* serovar *kenyae* encoding only  $\delta$ -endotoxin Cry1E. *Appl Entomol Zool* 34: 379-382.
- Chang J. H., Roh J. Y., Je Y. H., Park H. W., Jin B. R., Woo S. D., Kang S. K. (1998) Isolation of a strain of *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* HD-1 encoding  $\delta$ -endotoxin Cry1E. *Lett Appl Microbiol* 26: 387-390.
- Choi K. H., Kim S. R., Cho E. S., Yang W. J., Jin B. R., Takeda M., Sohn H. D. (2000) Developmental and life history characteristics of the oyster mushroom fly, *Coboldia fuscipes* (Diptera: Scatopsidae). *Appl Entomol Zool* 35: 495-498.
- Choi K. H., Park H. C., Kang P. D., Kang S. K., Sohn H. D. (1997) Development characteristics and life cycle of a sciarid fly (*Lycoriella* sp.) in indoor rearing. *Korean J Appl Entomol* 36: 77-82.
- 전창성 (1998) 버섯 병해충 - 느타리버섯 세균성갈반병과 푸른곰팡이병. 농민 저널 월간버섯. 56 - 61.
- Clancy G. (1981) Observations of mites associated with the low yielding crops of cultivated *Agaricus bisporus* in Australia. *Mushroom Sci* XI: 233-244.
- Clift A. D. (1979) The identity, economic importance and control of insect pests of

- mushroom in New South Wales of Australia. Mushroom Sci X: 367-383.
- CPL Sci. Inf. Ser. Ltd. (1999) Biopesticides 5th Edition. CPL Sci. Inf. Ser. Ltd Report number 991.
- De Barjac H., Frachon E. (1990) Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. Entomophaga 35: 233-240.
- Goldberg L. J., Margalit J. (1977) A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles segentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univitattus*, *Aedes aegypti*, and *Culex pipiens*. Mosquito News 37: 355-358.
- Hall, F. R and J. J. Menn (1999) Biopesticides use and delivery. 628pp.
- Höfte H., Whiteley H. R. (1989) Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol Rev 53: 242-255.
- Ibarra J. E., Federici B. A. (1986) Parasporal bodies of *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* (PG-14) and *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* are similar in protein composition and toxicity. FEMS Microbiol Lett 34: 79-84.
- 한용식, 신관철, 김광포 (1997) 버섯파리류 *Mycophila* sp. 유충에 의한 양송이 자실체 오염 방지에 관한 실험. 농시논문집 19: 21-26.
- Jones K. A., Burges H. D. (1998) Technology of formulation and application. in Formulation of microbial biopesticides: Beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments. H. D. Burges (Ed.), Kluwer Academic Publishers.
- Jung S. T., Hong J. S. (1991) Changes of volatile components of *Pleurotus sajor-caju* during storage. Kor. J. Mycol. 19, 292-298.
- Jung S. T., Hong J. S. (1991) Volatile components of oyster mushrooms (*Pleurotus* sp.) cultivated in Korea. Kor. J. Mycol. 19, 299-305.
- Kalman S., Kiehne K. L., Libs J. L., Yamamoto T. (1993) Cloning of a novel *cryIC*-type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae*. Appl Environ Microbiol 59: 1131-1137.
- 김광포 (1990) 버섯 해충의 생태 및 방제. 최신원예 4: 43 - 47.
- 김호산 (1998) 새로운 균주 *Bacillus thuringiensis* NT0423의 특성 및 제제화. 서울대학교 박사학위논문.
- Krieg A., Huger A. M., Langenbruch G. A., Schnetter W. (1983) *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* : ein neuer, gegenüber larven von coleopteren wirksamer pathotyp. J Appl Entomol 96: 500-508.
- Krieg A., Schnetter W., Huger A. M., Langenbruch G. A. (1987) *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*, strain B1256-82: a third pathotype within the H-serotype 8a8b. System Appl Microbiol 9: 138-141.
- Kronstad J. W., Schnepf H. E., Whiteley H. R. (1983) Diversity of locations for *Bacillus*

- thuringiensis* crystal protein genes. J Bacteriol 154: 419-428.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
- Laurent P., Ripouteau H., Dumanoir V. C., Frachon E., Lecadet M. M. (1996) A micromethod for serotyping *Bacillus thuringiensis*. Lett Appl Microbiol 22: 259-261.
- 이흥수 (1998) 버섯 병해충 - 버섯재배에 피해를 일으키는 해충류에 관한 고찰 (느타리 버섯을 중심으로). 농민저널 월간버섯. 89 - 101.
- 이흥수 (1999) 식용버섯의 배지제조와 재배기술 - 느타리 버섯파리 예방과 방 제. 한국버섯연구회 버섯 3(2): 141 - 149.
- 이상범 (2000) 미생물농약의 개발현황 및 전망. 농약과학소식 4(2): 9-18.
- 이순원 등 (1999) 병해충종합관리(IPM)에서 과실종합생산(IFP)으로의 발전방향. 원예과학기술지 17(3): 400-406.
- Lee H. S., Kim K. C., Park C. G., Shin W. K. (1999) Description of fungus gnat, *Lycoriella mali* Fitch (Diptera: Sciaridae) from Korea. Korean J Appl Entomol 38: 209-212.
- MacIntosh S. C., Stone T. B., Sims S. R., Hunst P. L., Greenplate J. T., Marrone P. G., Perlak F. J., Fischhoff D. A., Fuchs R. L. (1990) Specificity and efficacy of purified *Bacillus thuringiensis* proteins against agronomically important insects. J Invertebr Pathol 56: 258-266.
- Martin P. A. W., Travers R. S. (1989) Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. Appl Environ Microbiol 55: 2437-2442.
- Mazumdar-Shaw K., Suryanarayan S. (2003) Commercialization of a novel fermentation concept. Adv Biochem Engin/Biotechnol 85: 29-42.
- Nickerson K. W., St. Julian G., Bulla L. A. Jr. (1974) Physiology of spore forming bacteria associated with insects: radiorespirometric survey of carbohydrate metabolism in the 12 serotypes of *Bacillus thuringiensis*. Appl Microbiol 28: 129-132.
- 농약공업협회 (2000) 농약사용지침서. 823 pp.
- Norris J. R. (1964) The classification of *Bacillus thuringiensis*. J Appl Bacteriol 27: 439-447.
- Ohba M., Aizawa K. (1978) Serological identification of *Bacillus thuringiensis* and related bacteria isolated in Japan. J Invertebr Pathol 32: 303-309.
- Padua L. E., Ohba M., Aizawa K. (1984) isolation of a *Bacillus thuringiensis* strain (serotype 8a:8b) highly and selectively toxic against mosquito larvae. J Invertebr Pathol 44: 12-17.
- Park H. W., Roh J. Y., Je Y. H., Jin B. R., Oh H. W., Park H. Y., Kang S. K. (1998) Isolation of a non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* strain belonging to serotype

- H8a8b. Lett Appl Microbiol 27: 62-66.
- Roh J. Y., Park H. W., Jin B. R., Kim H. S., Yu Y. M., Kang S. K. (1996) Characterization of novel non-toxic *Bacillus thuringiensis* isolates from Korea. Lett Appl Microbiol 23: 249-252.
- Russell R. M., Robertson J. L., Sauvin S. E. (1977) POLO: A new computer program for probit analysis. Bull Entomol Soc Am 23: 209-213.
- 유승현 (1999) 식용버섯의 배지제조와 재배기술 - 느타리버섯 주요 병해의 원인 과 방제대책 (세균성 갈반병과 푸른곰팡이병을 중심으로). 한국버섯연구회 버섯 3(2): 131 - 139.
- Vidhyasekaran P., Sethuranman K., Rajappan K., Vasumathi K. (1997) Powder formulations of *Pseudomonas fluorescens* to control pigeonpea wilt. Biological Control 8: 166-171.
- Wetzel H. A. (1981) Integrated pest management. Mushroom News 29: 29-33.
- Yamamoto T., Powell G. K. (1993) *Bacillus thuringiensis* crystal protein : recent advances in understanding its insecticidal activity. In: Kim L (ed) *Advanced Engineered Pesticides*. NY: Marcel Dekker, pp 3-42.