

*Bacillus thuringiensis*를 이용한 버섯 파리(*Lycoriella* sp.)의 생물적 방제에 관한 연구

최광호 · 박현철 · 박현우* · 진병래* · 강석권* · 손흥대†

동아대학교 농생물학과
*서울대학교 농생물학과 및 농업 생물 신소재 연구 센터

A study on The Biological Control of Sciarid Fly(*Lycoriella* sp.) Using *Bacillus thuringiensis*

Kwang-Ho Choi, Hyeon-Cheal Park, Hyun-Woo Park*, Byung-Rae Jin*,
Seok-Kwon Kang* and Hung-Dae Sohn†

Department of Agricultural Biology, Dong-A University, Pusan, Korea

*Department of Agricultural Biology and Research Center for New Bio-Materials in
Agriculture, Seoul National University, Suwon, Korea

Abstract

Thirteen subspecies of *Bacillus thuringiensis* including *B. t. israelensis*, *B. t. morrisoni* PG-14 and *B. t. darmstadiensis* known to be toxic to dipteran insects were treated on the mushroom (*Flammulina velutipes*) compost to estimate the biological control effect of a sciarid fly, *Lycoriella* sp. According to the results, it was found that there were no significant effects of the tested strains of *B. thuringiensis* on the control of *Lycoriella* sp. For further confirmation, larval gut juice of *Lycoriella* sp. and trypsin were respectively treated into the parasporal crystal proteins of three subspecies of *B. t. israelensis*, *B. t. morrisoni* PG-14, and *B. t. darmstadiensis*. The proteins were separated by SDS-PAGE. According to the results, the major parasporal crystal proteins were respectively produced by *B. t. morrisoni* as the amount of 52 kd, *B. t. israelensis* as 37kd and *B. t. darmstadiensis* as 39kd, but the activity of these proteins could not be unfortunately confirmed in this study.

Key words : Biological control, *Bacillus thuringiensis*, *Lycoriella* sp., parasporal crystal proteins

서 론

국내 버섯 재배지에서는 각종 해충에 의한 피해가 날로 증가하고 있는 추세이며, 이들 버섯 재배지에서의 주된 피

해는 대부분이 버섯 파리류에 의한 것이다. 이러한 버섯 파리류의 방제를 위해 대부분의 농가에서는 유기 합성 살충제를 사용하고 있으나, 이들 살충제의 지속적인 사용으로 인해 버섯 파리류의 저항성이 증가하고 있는 실정이다. 선

† Corresponding author

진외국의 경우, 오래 전부터 여러가지 부작용이 수반되는 화학적 방제법을 대신한 생물적 방제법에 대한 연구가 활발히 진행되어져 오고 있으나, 국내에서는 이에 관한 연구가 전무한 실정에 있다.

버섯 파리류에 의한 피해 상태는 그 종류에 따라, 복토층의 균사 절삭에 의한 버섯 수량의 감소와 버섯 조직을 가해함으로써 일어나는 자실체 오염 및 상품의 가치 저하로 대별할 수 있다. 버섯 재배지에 피해를 주는 버섯 파리류는 Sciarid(Lycoriidae), Cecid(Ceoidomyide), Phorid(Phoridae)형의 3가지로 나눌 수 있는데, 우리 나라에서는 주로 Sciarid형과 Cecid형 버섯 파리류가 서식하고 있다¹⁾. 이 중 Sciarid형 버섯 파리는 국내 느타리 버섯과 양송이 버섯 재배지에서 봄과 가을에 걸쳐 발생하고, 특히, 가을에는 발생량이 많아 그 피해가 심각하다고 보고 되었다²⁻³⁾. 최근 이들 버섯 파리류의 방제법으로 버섯 파리와 기생관계에 있는 선충과 응애의 이용 가능성이 보고된 바 있으나, 실용화 단계에 이르지 못하여 아직까지는 화학적 방제에 크게 의존하고 있는 실정이다. 우리 나라의 많은 버섯 재배농가에서는 주로 미주지역에서 권장되고 있는 Malathion, DDVP 중심의 방제 체계를 적용하여 왔으나, 방제에 있어서 거의 실효를 거두지 못하고 있는 실정이며 주로 생식으로 사용되는 버섯의 특성상 잔류독성 문제와 더불어 살충제에 의한 환경오염 등의 문제점도 야기되고 있다⁴⁾.

*Bacillus thuringiensis*는 토양 그람 양성 세균으로서 현재 전 세계적으로 가장 각광 받고 있는 미생물 살충제로서, 이들은 균주에 따라 몇 가지 곤충 목에 대하여 특이적으로 독성을 나타내는 내독소 단백질을 생산하는 특징을 가지고 있다⁵⁾. 지금까지 밝혀져 있는 수십 종의 *B. thuringiensis* 아종들 중에서 독성을 가지고 있는 아종들의 대부분은 나비목 곤충의 유충에 기주 특이성을 보이지만, 일부는 파리목인 모기와 집파리 및 검정파리 유충에 독성을 보이는 균주도 있다⁶⁻¹¹⁾. 따라서, 본 연구에서는 파리목 곤충에 독성을 나타내는 *B. t. israelensis*, *B. t. morrisoni* PG-14와 *B. t. darmstadiensis*를 포함한 13가지 Bt 아종의 버섯파리(*Lycoriella* sp.)에 대한 생물적 방제 효과를 검토하고자 수행하였다.

재료 및 방법

공시충

생물 검정에 사용된 버섯 파리는 국내 느타리 버섯 재배

지에서 주로 발생하는 Sciarid형의 버섯파리(*Lycoriella* sp.) 성충을 1995년 경북 칠곡의 버섯 재배농가에서 채집한 후 플라스틱 Petri-dish (9×2cm)에서 온도 21±1℃, 습도 55±5%, 광주기 16L:8D의 환경조건으로 실내에서 누대 사육하여 생물 검정에 사용하였다. 공시 유충의 먹이로는 팥이 버섯(*Flammulina velutipes*) 균사를 15일정도 충분히 배양시킨 후 2일에 한 번씩 공급하였다. 실험에 사용된 버섯 파리 유충은 부화 후 9일에서 10일이 경과된 3령 말에서 4령 초 유충을 암수 구분하지 않고 독성 검정에 사용하였으며 실험에 사용하기 전 12시간 정도 절식시켰다.

Bt 균주 배양 및 내독소 단백질 추출

버섯 파리 유충의 독성 검정에 사용된 *Bacillus thuringiensis* (Bt) 균주는 일본 구주대학의 Ohba 박사로부터 분양받은 *B. t. israelensis*, *B. t. gallerae*, *B. t. morrisoni* PG-14, *B. t. alesti*, *B. t. sotto*, *B. t. dendrolimus*, *B. t. finitimus*, *B. t. japonensis*, *B. t. darmstadiensis*, *B. t. canadensis*, *B. t. entomocidus*, *B. t. thuringiensis*, *B. t. aizawai*의 13개 아종이었다. Bt의 배양과 내독소 단백질 분리는 Ohba와 Aizawa의 방법¹²⁾에 준하여, 500ml 삼각 플라스크에 G.Y.S 배지 [0.2% (NH₄)₂SO₄, 0.05% K₂HPO₄, 0.2% Yeast extract, 0.1% Glucose, 0.002% MgSO₄, 0.005% CaCl₂·2H₂O, 0.008% MnSO₄·4H₂O] 200ml에 200μl의 균주 부유액을 이식하여 30℃ 진탕 배양기에서 충분한 양의 내독소 단백질이 형성되도록 5일간 배양시켰다 (Fig. 1). G.Y.S 배지에서 진탕배양 후 방출된 내독소 단백질은 50ml Conical-tube를 이용하여 3,000r.p.m 에서 10분간 원심분리하여 Pellet만을 남기고 상등액은 모두 버린후 3차 증류수를 각각 1ml씩 첨가, 부유시켜 실험 때까지 4℃에서 보관하였다.

독성 검정

버섯 파리 유충에 대한 Bt의 독성 검정은 세 가지 방법으로 수행 되었다.

첫 번째 방법은 8ml Potato dextrose agar(PDA)를 영양원으로 15일 정도 배양시켜 충분히 자란 팥이 버섯 균사 500mg과 각각의 13개 Bt 아종 부유액 1ml (10⁸ CFU 이상)을 잘 혼합하여 직경 9cm의 플라스틱 Petri dish에 Bt와 균사 혼합물을 골고루 살포한 후 12시간 동결 건조하여 적당량의 수분을 제거하였다. 그리고, 혼합물 내의 버

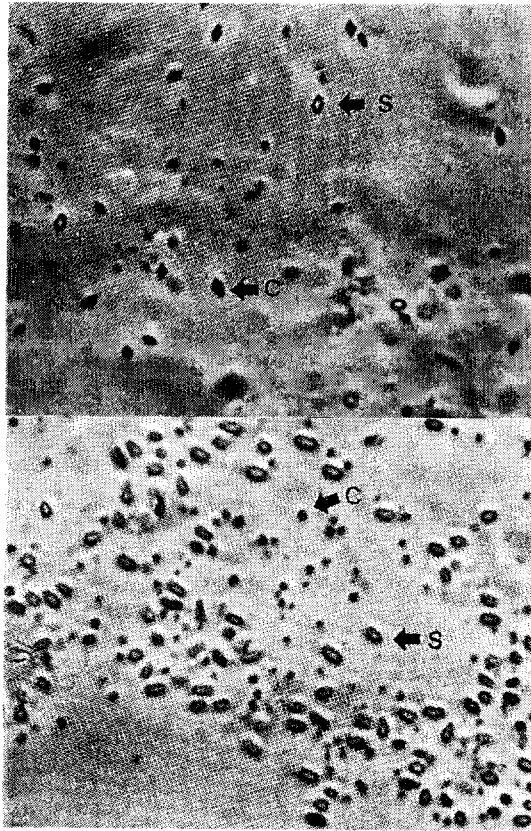


Fig. 1. Phase-contrast photographs of sporulated cultures of *Bacillus thuringiensis* (courtesy of Lee et al. 1996). S : spore C : crystal protein

섯 균사의 상태를 회복시키기 위해 12시간 실내에서 풍건한 후 3, 4령 유충을 각기 30마리씩 이식하여 12시간 마다 치사 유충 수를 확인하였다.

두 번째 방법은 버섯파리 유충의 먹이로 공급하는 팥이 버섯 균사가 알맞게 자란 Petri dish에 13개 Bt 아종 부유액을 각각 1ml(10^8 CFU 이상)씩 도말하고 10시간 동안 풍건시켜 버섯 균사 위에 Bt가 알맞게 정착되게 한 후 30마리씩의 유충을 이식하고 12시간 마다 치사 유충의 수를 확인하였다.

세 번째 방법은 15일 정도 배양시켜 충분히 자란 팥이 버섯 균사 500mg과 각각의 Bt 아종 부유액 1ml(10^8 CFU 이상)를 잘 혼합한 후 24시간 이상 완전히 동결 건조하여

버섯 균사가 알맞게 자라있는 사육상 위에 Bt와 균사 혼합물을 골고루 산포한 후 각각 30마리 유충을 이식하여 12시간 마다 Bt에 의해 치사된 유충 수를 확인하였다.

유충 소화액 추출과 내독소 단백질의 활성 유도

버섯 파리 유충의 중장 소화관 내에서 내독소 단백질의 활성 여부를 검증하기 위해 4령 유충으로부터 중장 소화액을 추출하였다. 소화액 추출 방법은 미세 해부용 바늘로 유충 100마리를 해부하여 채취한 중장을 15,000 r.p.m, 4°C에서 20분간 원심 분리하여 상등액을 모아 -70°C에 실험 때까지 보관하였다. 소화액 추출의 전 과정은 얼음 용기 내에서 행하였다.

유충의 소화액과 Trypsin에서의 Bt 내독소 단백질의 활성 여부를 비교·검토하기 위해, 저온 보관 중인 Bt 3개 아종의 내독소 단백질에 각각 50mM NaOH (pH 9.5)을 첨가하고 37°C에서 90분간 정치하여 용해시킨 후 버섯 파리 유충의 소화액을 5 : 1 (v/v)로 혼합하고 25°C에서 120분간 정치하여 내독소 단백질의 활성을 유도하였다. 또한, 용해된 3개 아종의 내독소 단백질에 0.05% Trypsin (Sigma Co.)을 첨가하여 25°C에서 120분간 반응시켜 내독소 단백질의 활성을 유도하였다¹³⁾.

전기영동에 의한 내독소 단백질 활성 관찰

전기영동은 Laemmli의 방법에 준하여 SDS-PAGE를 실시하였다¹⁴⁾. 농축 gel의 농도는 5%를 사용하였고 10% 분리 Gel을 사용하여 농축 Gel에서는 20mA, 분리 Gel에서는 25mA로 전개한 후 1% Coomassie Blue R-250에 1시간 염색하고, Methanol : Acetic acid : D.W = 1 : 1 : 8 (v/v)에서 탈색시켜 관찰하였다. 전개된 단백질의 분자량을 측정하기 위해 표준단백질 (Bio-Rad Co.)을 사용하였다.

결과 및 고찰

버섯 파리 유충의 독성 검정에 사용된 Bt 균주는 모기 (*Aedes aegypti*와 *Culex molestus*)에는 독성을 나타내지만, 누에(*Bombyx mori*)에는 무독성인 것으로 보고된^{7,15)} *B. t. isarensis*와 *B. t. morrisoni* PG-14, 그리고 역시 모기 유충에 독성을 나타내는 *B. t. darmstadiensis*⁶⁾를 비롯하여 주로 나비목에 독성이 있는 것으로 알려진 *B. t. alesti*, *B. t. sotto*, *B. t. dendrolimus*, *B. t. finitimus*, *B. t. japonensis*, *B. t. galleriae*, *B. t. canadensis*, *B. t. entomocidus*와 *B. t.*

aizawai 등 13개 아종을 사용하여 버섯 파리 유충에 독성 검정을 하였다.

본 실험에서 13개 Bt 아종을 균사와 혼합하여 버섯 파리 유충에 처리하였으나 아무런 독성을 나타내지 않았으며 (Table 1), 대부분의 유충은 우화하여 성충이 되었다. 이러한 결과는 Cantwell과 Cantelo의 *B. t. isarelensis*를 이용한 *Lycoriella mali* 방제실험⁸⁾의 연구 결과와는 상반된 결과였다. Cantwell과 Cantelo에 의하면 균사 60g과 배지 6, 000g을 혼합한 후, 여기에 물에 부유시킨 *B. t. israelensis*를 농도별로 혼합하여 만들어진 600g의 Bt와 균사 혼합물에 *Lycoriella mali* 성충을 이식 하여 교미, 산란시킨 후 우화를 조사하였다. 그 결과, *B. t. israelensis*와 물의 혼합 비율이 1 : 64 (w/w)일 때 LC₉₅의 효과를 나타내었고, 1 : 60 (w/w)에서는 99.5% 정도의 치사 효과를 나타낸다고 하였다. 한편, 독성 검정의 방법에 의한 차이를 검토하기 위해 Bt와 균사 혼합물의 산포 외에 Bt 부유액의 도말과 동결 건조한 Bt와 균사 혼합물의 산포 등, 처리 방법을 다르게 하였으나 Bt와 균사 혼합물 산포와 같이 치사효과는 나타나지 않았다.

Table 1. Biological control with 13 strains of *B. thuringiensis* to *Lycoriella* sp.

| Strains | Activity | Strains | Activity |
|-----------------------|----------|--------------------|----------|
| <i>Thuringiensis</i> | —* | <i>Alesti</i> | — |
| <i>Sotto</i> | — | <i>Japonensis</i> | — |
| <i>Israelensis</i> | — | <i>Finitimus</i> | — |
| <i>Entomocidus</i> | — | <i>Dendrolimus</i> | — |
| <i>Aizawai</i> | — | <i>Canadensis</i> | — |
| <i>Darmstadiensis</i> | — | <i>Morrisoni</i> | — |
| <i>Galleriae</i> | — | | |

* Entirely not effective

일반적으로, 감수성 곤충이 Bt 내독소 단백질을 섭취하게 되면 중장과 구기 부분의 마비가 일어나 섭식이 중단되며, 치사하게 된다. 이 때, 내독소 단백질은 중장의 알칼리 pH와 효소에 의해 분해되어 저분자화한 Resistance core가 중장 피막세포의 수용체 단백질과 결합하여 Endoplasmic reticulum, Mitochondria, Ion channel의 파괴와 Glucose transport, O₂ uptake system의 손실을 일으키는 것으로

알려져 있어, 독성 발현에는 Resistance core의 생성이 필수적이다¹⁷⁾.

따라서, 버섯 파리 유충에 Bt의 독성이 발현되지 않는 원인을 찾고자 파리 목에 독성이 강한 3개 아종의 Bt 내독소 단백질을 Trypsin과 유충 소화액에 각각 처리한 후 SDS-PAGE하여 비교하였다. 그 결과, 50mM NaOH(pH 9.5)에 용해된 3개 아종의 내독소 단백질들은 각 균주에 따라 다양한 밴드 패턴을 보인데 반해(Fig. 2A) Trypsin처리에서의 밴드 패턴은 50mM NaOH처리에서 보다 밴드 수가 줄었으며, 고분자 밴드는 없어진 반면에 저분자 밴드들이 관찰되었다 (Fig. 2B). 또한 유충 소화액을 처리한 경우 밴드의 수가 더욱 적게 나타났으며, Trypsin처리에서와 동일한 이동도를 나타낸 밴드를 볼 수 있었다. 이러한 단백질들의 분자량은 *B. t. morrisoni*에서 약 52Kd, *B. t. israelensis*는 약 37 Kd 그리고 *B. t. darmstadiensis*에서는 약 39 Kd이었다(Fig. 2C).

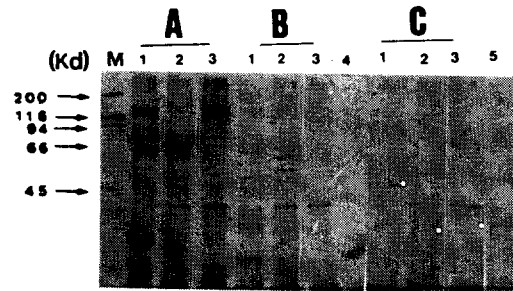


Fig. 2. SDS-PAGE analysis of crystal protein of *B. thuringiensis* substrains toxic to *Lycoriella* sp. Solubilized (A), Trypsin (B) and *Lycoriella* sp. gut juice-treated (C) of crystal proteins of the *B. t. morrisoni* PG-14 (Lane 1), *B. t. israelensis* (Lane 2), *B. t. darmstadiensis* (Lane 3) and Trypsin (Lane 4) and *Lycoriella* sp. gut juice (lane 5) were also loaded as controls. Molecular masses are given to the left in kilodalton (M).

Lecadet(1984)¹⁷⁾에 의하면 *B. t. kurstaki*의 경우 내독소 단백질의 약 10~30%를 차지하는 65Kd와 62kd의 protoxin이 중장의 Trypsin과 같은 소화 효소에 의해 저분자화된 Resistance core가 파리 목에 독성을 나타내는 작용을 한다는 것으로 미루어, 본 실험의 Trypsin과 소화액치리에

서 동일한 이동도를 보인 밴드들은 상기의 Resistance core와 유사한 형태일 것으로 생각된다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 본 실험에서 버섯 파리가 Bt에 의해 치사되지 않은 원인은 Resistance core로 생각되는 저분자화된 단백질이 독소를 발현할 수 없는 비활성 형태로 존재 하였거나 또는 이들 단백질이 활성화된 형태로 전환이 되었으나 버섯 파리 유충 중장의 Brush border membrane vesicle에 존재하는 내독소 단백질 수용체가 이들 내독소 단백질을 인지하지 못하여 독성이 발현되지 못한 것으로 사료된다.

현재, 전세계적으로 새로운 숙주범위를 갖는 *B. thuringiensis* 균주의 분리가 지속적으로 보고되고 있고 이에 따른 *B. thuringiensis*의 독성 발현 기주 범위에 관한 연구도 계속적으로 이루어지고 있다. 이러한 현실을 감안 할 때, 국내 버섯 재배지에서 문제시 되고 있는 버섯 파리류의 *B. thuringiensis* 세균을 이용한 생물적 방제를 위해서는 버섯 파리류에 대하여 강한 독성을 갖는 새로운 *B. thuringiensis*의 분리와 독성 발현의 기작해명에 대한 연구가 지속적으로 수행 되어져야 할 것으로 생각된다.

요 약

버섯 파리(*Lycoriella* sp.)의 생물적 방제를 위해 파리 목 유충에 강한 독성을 나타내는 *Bacillus thuringiensis israelensis*, *B. t. morrisoni* PG-14와 *B. t. darmstadiensis*를 포함한 13개 아종을 팥이 버섯 균사에 처리한 후 버섯 파리 유충에 대한 치사 효과를 조사하였다. 13개 아종의 *B. thuringiensis* 중에서 버섯 파리에 효과적인 독성을 보이는 균주는 없었다. 이를 검증하고자 파리 목에 독성을 가지는 *B. thuringiensis* 3개 아종의 내독소 단백질의 활성화 여부를 확인하기 위하여 Trypsin과 유충의 중장 소화액을 처리하여 SDS-PAGE로 비교한 결과, Trypsin과 유충 소화액 처리에서 *B. t. morrisoni*의 경우 약 52kd, *B. t. israelensis*에서 약 37kd, *B. t. darmstadiensis*에서는 약 39kd 등의 내독소 단백질이 생성되었으나, 이들 단백질의 활성화 여부는 확인할 수 없었다.

감사의 글

본 논문은 1995년도 동아대학교 교비지원 연구비에 의

해 이루어 졌으며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. 金光布: 버섯해충의 생태 및 방제. 最新園藝, 4, pp. 43-47(1990).
2. 金泰山, 金光布: 양송이 病害蟲 防除에 關한 試驗. 農振廳 農技研報(1981).
3. K. J. Kim and C. Y. Hwang: An investigation of insect pest on the Mushroom(*Lentinus edode*, *Pleurotus ostreatus*) in south region of Korea. *Korean. J. Appl. Entomol.*, 35(1), pp. 45-51(1996).
4. 金泰山, 金光布: 느타리버섯 버섯파리 藥濟防除選拔實驗. 農振廳 農技研報, pp. 660-671(1982).
5. Hofte, H. and H. R. Whiteley: Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbial. Rev.*, 53, pp. 242-255(1989).
6. 한용식, 신관철, 김광포: 버섯파리類 *Mycophila* sp. 幼筮에 依한 양송이 子實體 汚染 防止에 關한 試驗. 농시 논문집, 19, (1977).
7. Padua, L. E., M. Ohba and K. Aizawa: Isolation of a *Bacillus thuringiensis* strain(serotype 8a: 8b) highly and selectively toxic against mosquito larvae. *J. Invertebr. pathol.*, 44, pp. 12-17(1984).
8. George, E. A and William, W. C: Effectiveness of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in controlling a sciarid fly, *Lycoriella mali*, in Mushroom compost. *J. Econ. Entomol.*, 77, pp. 473-475(1984).
9. Leodegario, E. P., Michio, O and K. Aizawa: The isolates of *Bacillus thuringiensis* serotype 10 with highly pre ferential toxicity to mosquito larvae. *J. invertebr. pathol.*, 36, pp. 180-186(1980).
10. Federici, B. A, P. Luthy and P. V. Pietrantonio: Parasporal body of *Bacillus thuringiensis*. In "Bacterial Control of Mosquitoes & Black Flies." (de Barjac H. and D. J. Surtherland, eds.), pp. 16-44 (1992). Rutgers University Press, New Brunswick.
11. T. C. Hodgman, Y. Ziniu, S. Ming, T. Sawyer, C. M. Nicholls and D. J. Ellar: Characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain which is toxic to the housefly *Musca domestica*. *FEMS. Micro. letters.*, 114, (1993).
12. Ohaba, M., K. Aizawa, and S., Sudo: Serological identification of *Bacillus thuringiensis* and related bacteria isolated in Japan. *J. Invertebr. Pathol.*, 32, pp. 303-309(1978).
13. Cheon, H. M., Y. M. Yu, S. K. Kang and S. J. Seo: Degradation of the parasporal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* and induction of stress protein

- synthesis in *Bt* δ -endotoxin ingested larvae of fall webworm, *Hyphantria cunea*. Korean J. Appl. Entomol., 33(3), pp. 178–183(1994).
14. Laemmli, U. K : Clavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*, 227, pp. 680–685(1970).
 15. Goldberg, L. J and Margalit, J. : A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles segentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex Univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex Pipiens*. *Mosquito News.*, 37, pp. 355–358(1970).
 16. Neil, C. Eileen, J. B., Juliet, A. W and Davis, J. E. : Contribution of individual components of the δ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* sub. *israelensis*. *Microbiology. FEMS., Micro letter*, 131(1995).
 17. Lecadet, M. M. and Lereclus : Structure and activity of the *B. thuringiensis* δ -endotoxin. In "Bacterial Protein Toxin." (J. E. Alouf, F. J. Fehrenbach, J. H. Freer and J. Jeljaszewicz, eds.), pp. 147–154. Academic Press, London(1984).