

온실가루이 병원성 곰팡이의 특성 및 살충제 개발을 위한 평가

윤취건 · 신태영 · 유미라 · 이원우 · 고승현 · 배성민 · 최재방 · 우수동*

충북대학교 농업생명환경대학 식물의학과

Characterization of Entomopathogenic Fungus from *Trialeurodes vaporariorum* and Evaluation as Insecticide

Hwi Gun Yoon, Tae Young Shin, Mi Ra Yu, Won Woo Lee, Seung Hyun Ko, Sung Min Bae, Jae Bang Choi, and Soo Dong Woo*

Department of Plant Medicine, College of Agriculture, Life & Environment Sciences, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Republic of Korea

(Received January 29, 2013 / Accepted February 20, 2013)

The greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*, is an economically important pest for greenhouse crops because they cause direct damage by feeding on plant nutrients and indirect damage as transmits many virus vectors. It has recently become a serious problem because of the continuous use of insecticide resulting in resistance among greenhouse whitefly population. To overcome these problems, in this study, the biological characteristics and virulence of an entomopathogenic fungus isolated from the cadaver of nymph greenhouse whitefly were investigated. Isolated fungus was identified as *Isaria fumosorosea* by morphological examinations and genetic identification using sequences of the ITS, β -tubulin, and EF1- α regions. This fungus was named as *I. fumosorosea* SDTv and tested for the virulence against nymphs *T. vaporariorum* and the cold activity, the thermotolerance and the stability of UV-B irradiation on conidia. Mortality rate of greenhouse whitefly showed from 84 to 100% and the virulence increased with increasing conidial concentrations, 1×10^5 to 10^8 conidia/ml. Conidia were stable at 35°C, 0.1 J/cm² of UV irradiation and germinated after 8 days at 4°C. Additionally, the activities of chitinases and proteases produced by *I. fumosorosea* SDTv were varied according to the medium. In conclusion, *I. fumosorosea* SDTv which showed high mortality rate against greenhouse whitefly will be used effectively in the integrated pest management programs against the greenhouse whitefly.

Keywords: *Isaria fumosorosea*, *Trialeurodes vaporariorum*, entomopathogenic fungus, fungal insecticide

온실가루이(*Trialeurodes vaporariorum* West.) (Hemiptera: Aleyrodidae)는 넓은 기주 범위와 짧은 생활사를 가지고, 전 세계적으로 약 84과 249종의 작물을 가해하며, 국내에서는 27과 39종의 기주를 가해하는 것으로 조사되어 있는 대표적인 광식성, 난방제 해충이다(Malais and Ravensberg, 2003). 약충시기부터 성충에 이르기까지 작물의 잎 뒷면에 붙어서 흡즙하기 때문에 생육의 장애를 일으켜 잎의 퇴색, 왜소, 낙엽고사와 같은 피해를 주고, 분비하는 감로에 의해 그을음병이 유발되어 상품 가치를 저하시킬 뿐만 아니라 바이러스를 매개하는 등 그 피해가 큰 것으로 보고되고 있다(Guzman *et al.*, 1997). 최근에는 비닐하우스와 유리온실 등 시설 재배면적의 급격한 증가로 온실가루이의 월동과 번식에 좋은 조건이 제공되어 발생과 피해가 매년 증가하는 추세에 있다(Jeon *et al.*, 2009). 또한 성충이전에는 약

제에 강한 내성을 보이기 때문에 방제를 위해서는 여러 번의 약제 살포가 필요하게 되고, 이러한 살충제의 빈번한 사용은 저항성 유발과 함께 밀도의 증가를 초래하기도 한다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 최근에는 합성농약을 대체할 수 있는 친환경적인 방법으로써 병원성 미생물과 다른 생물 천적을 이용한 방제 개발의 연구가 활발히 이루어지고 있다. 그 중 곤충병원성 미생물인 곰팡이를 이용한 방제법은 곰팡이의 접촉만으로 병원성을 보일 수 있으므로 흡즙성 해충인 온실가루이 방제에 효과적이며, 저항성이 거의 유발되지 않는 장점으로 인해 이미 선진 외국에서는 이를 이용한 미생물 살충제가 개발되어 이용되고 있다(de Faria and Wraight, 2007). 살충제 개발에 이용되는 곤충병원성 곰팡이는 대부분 불완전균류(Hyphomycetes)에 속하며 사람과 동, 식물에는 무해하고 대상으로 하는 목적해충에 대해서만 병을 일으켜 숙주를 사멸케 함으로써 자연상태에서 곤충의 밀도를 조절하는 역할을 한다. 또한 높은 숙주특이성으로 인해 일반적으로 환경, 인축에 대한 독성이 없으며 숙주의 저항성 기작이 잘 발현되지 않는 것으로 알려져 있어 난방제 해충의 친환경

*For correspondence. E-mail: sdwoo@cbnu.ac.kr; Tel.: +82-43-261-2553; Fax: +82-43-271-4414

경제 방제제로 적합한 것으로 보고되고 있다(Lacey *et al.*, 2001). 이러한 곤충병원성 곰팡이를 이용하여 외국에서는 온실가루이를 방제하기 위한 살충제가 이미 개발되어 있으나, 우리나라의 경우 자체 개발품이 없을 뿐만 아니라, 수입하여 이용하는 단계에서 유통 또는 보관 과정상의 활성화 문제 그리고 우리나라와 다른 환경에서 적응된 곰팡이를 이용함으로써 국내에서는 그 효과가 만족스럽지 못하여 이용이 전혀 이루어지지 못하고 있는 실정이다. 이러한 단점을 극복하고자 자국 내 환경에 적응된 다양한 토착 균주들의 분리는 필수적으로 여겨져 우리나라에서도 근래 곤충병원성 곰팡이의 분리보고가 활발히 이루어지고 있으나, 실제 균주들의 미생물제제로서 평가에 있어 그 병원력만을 주요인으로 평가하고, 환경에 대한 포자의 안정성 및 발아력에 대한 기본 특성 조사는 이후 실용성 측면에서 높은 필요성에도 불구하고 현재까지 평가의 대상이 되지 않고 있는 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 국내에서 온실가루이 사충으로부터 분리한 곤충병원성 곰팡이 균주의 기본적인 특성 분석과 더불어 살충성을 비롯한 살충제로써의 여러 가지 특성을 평가함으로써, 우리나라에서 온실가루이의 효율적인 방제가 가능한 곰팡이 살충제 개발을 위한 기초 자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

온실가루이 사육

본 실험에 사용된 온실가루이는 충북대학교 곤충생태 및 독성학 실험실에서 분양 받아 토마토를 이용하여 온도 25°C, 광주 조건 16L:8D, 습도 70% 조건으로 실내 사육하면서 곰팡이의 생물검정 실험에 사용하였다.

곤충병원성 곰팡이의 분리

2012년 5월 온실가루이 사육 중 곰팡이 병징을 보이며 사멸한 온실가루이 사충으로부터 포자를 수거하여, 곤충병원성 곰팡이 선택배지인 SDA-D50 [Sabouraud Dextrose Agar (SDA; Difco™, USA), 100 µg/ml Chloramphenicol, 50 µg/ml Streptomycin, and 50 µg/ml dodine] (Shin *et al.*, 2010)에 접종하고 25°C 암 조건에서 7일간 배양하였다. 분리된 곰팡이는 PDA (Potato Dextrose Agar) 배지에 접종하고 2주간 25°C에서 배양 후 0.02% Tween 80을 이용하여 포자를 수거하였다. 수거된 포자는 최종농도 20% glycerol 상태로 -80°C에 보관하면서 필요시 다시 배양하여 사용하였다.

배지 증식상 및 형태학적 관찰

분리 균주의 배지에서 증식상과 형태학적 관찰을 위하여 slide glass culture 방법을 이용하였다(Sigler and Gibas, 2005). 배지에서의 증식상은 PDA 배지 중앙에 곰팡이 포자 현탁액 50 µl (5×10^6 conidia/ml)를 접종하여 25°C에서 15일간 5일 간격으로 관찰하였다. Slide glass culture는 PDA 배지에서 25°C, 3-4일간 배양된 균체를 배지와 함께 약 6 mm로 자른 후 slide glass에 올려놓고 그 위에 지름 22 mm의 cover glass를 덮은 뒤 다시 25°C에서 3-4일간 배양하였다. 배양 후 포자형성이 유도된 것을 확인

하고 400× 위상차 현미경을 이용하여 균사 및 포자를 관찰하였다(Canon PowerShot A640, Japan).

곰팡이 DNA 분리 및 PCR

곰팡이 genomic DNA 추출은 균사로부터 화학적 lysis 방법을 일부 수정하여 추출하였다(St. Leger and Wang, 2009). PDA 배지에서 2주간 자란 곰팡이 균체 일부에 fungal DNA extraction buffer [0.2 M Tris-Cl; pH 7.5, 0.5 M NaCl, 10 mM EDTA; pH 8.0, and 1% SDS (w/v)]를 처리한 후 phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1)로 원심 분리하여 DNA를 정제하였다. 정제된 DNA 용액은 냉에탄올을 이용하여 침전시키고 원심분리 후 멸균 증류수에 녹여 실험에 이용하였다. 분리 균주의 분자생물학적 동정을 위한 PCR primers는 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')와 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990), tubF (5'-TGGGCYAARGGYCACTACACYGA-3')와 tub-R (5'-TCAGTGAAGTCCATCTCRTCCAT-3') (Tartar *et al.*, 2002), 1577F (5'-CARGAYGTBTACAAGATYGGTGG-3')와 2218R (5'-ATGACACCRACRGCACRGTGTG-3') (Rehner and Buckley, 2005)를 사용하여 각각 internal transcribed spacer (ITS1-5.8S-ITS2), β -tubulin gene, elongation factor 1-alpha (EF1- α) 부분을 증폭시켰다. PCR 반응은 AccuPOWER™ PCR PreMix (Bioneer Co., Korea)를 이용하여 94°C 30초, 53°C 30초, 72°C 1분 35 cycles 조건으로 수행하였다. PCR 반응 후 증폭 산물은 1.0% agarose gel을 이용하여 전기영동 분석하고 Power Gel Extraction Kit (Dyne Bio Inc., Korea)를 이용하여 순수 정제하였다.

염기서열 분석

각 PCR 산물은 pTOPO-Vector 플라스미드를 이용하여 클로닝하였다. 재조합 콜로니들은 무작위로 선정하였고 LaboPass™ Mini Plasmid DNA Purification Kit를 이용하여 플라스미드 DNA를 분리하였다. DNA 염기서열은 Macrogen (Korea)사에 의뢰하여 분석하였다. 염기서열은 DNA MAN을 이용하여 정렬한 다음 BLAST search tool을 이용하여 기 보고된 다른 곰팡이 들 서열과 비교·분석하였다.

생물검정

PDA 배지에서 2주 동안 배양된 곰팡이 표면을 긁어 수확된 포자를 0.02% Tween 80을 이용하여 포자현탁액을 만들고 hemocytometer를 이용하여 계수하였다. 생물검정 전 포자의 viability는 기 보고된 방법(Fernandes *et al.*, 2008)에 준하여 SDAY 배지에 5 µg/ml benomyl [95% active ingredient (Sigma, USA)]이 첨가된 SDAY+B 배지에서 발아 여부를 확인하여 95% 이상 viability를 보이는 것만을 생물검정에 이용하였다. 생물검정은 증류수로 적신 거즈가 얇게 깔린 90 mm petri dish (SPL CO., Korea)에서 온실가루이 2-3령 약충 25마리가 고착되어 있는 토마토 잎을 올려놓은 후, 준비된 균주의 포자현탁액 1 ml (1×10^5 - 10^8 conidia/ml with 0.02% Tween 80)을 원통 케이지로 구성된 SD tower sprayer (Shin *et al.*, 2011)를 사용

하여 스프레이하는 방법으로 접종하였다. 스프레이 접종 시 hemocytometer를 옆에 두고 떨어지는 포자량을 계산하였다. 떨어지는 포자량은 1×10^8 conidia 스프레이시 $1.2 \pm 0.04 \times 10^5/\text{mm}^2$; 1×10^7 conidia 스프레이시 $1.2 \pm 0.1 \times 10^4/\text{mm}^2$; 1×10^6 conidia 스프레이시 $1.6 \pm 0.4 \times 10^3/\text{mm}^2$ 이었으며, 1×10^5 conidia가 떨어지는 양은 계산할 수 없었다. 접종 후 온실가루이는 25°C, 광조건 16L:8D, 습도 70%에서 유지하여 7일 동안 매일 관찰하였다. 사충들은 표피에서 곰팡이의 발생이 육안으로 관찰될 경우에만 접종한 곰팡이에 의한 치사로 인정하였으며, 대조구로는 0.02% Tween 80 용액만을 처리하였다. 생물검정은 3반복 수행하였다.

고온 및 UV-B 안정성과 저온 발아력 평가

분리 균주의 고온에서의 안정성을 보기 위하여 수거된 포자 현탁액 100 μl (5×10^6 conidia/ml)를 PCR tube에 넣고 thermal cycler (TaKaRa, Japan)을 이용하여 35, 40, 45°C에서 1시간 처리하고, 처리된 포자 현탁액 20 μl 를 SDAY+B 배지에 점적하여 25°C 암 조건에서 24시간 배양한 후, 400 \times 위상차 현미경 상에서 포자의 발아율을 관찰하였다. UV-B에서의 안정성은 수거된 포자 현탁액 20 μl (5×10^6 conidia/ml)를 SDAY+B 배지에 점적하고 BIO-LINK - CROSSLINKER UV-B (312 nm) lamp를 이용하여 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 J/cm²으로 처리한 후 25°C 암 조건에서 24시간 배양한 뒤, 400 \times 위상차 현미경 상에서 포자의 발아율을 관찰하였다. 마지막으로 분리 균주의 저온 발아력은 수거된 포자 현탁액 20 μl (5×10^6 conidia/ml)를 SDAY+B 배지에 점적하고 4°C에서 14일간 배양하면서, 2일 간격으로 400 \times 위상차 현미경 상에서 포자의 발아율을 관찰하였다. 모든 포자의 발아율 조사는 100개의 포자를 무작위로 조사하였으며 3반복 실시하였다.

효소 활성 분석

분리 균주의 세포 외 효소 활성을 알아보기 위해 minimal medium (MM; 1.5 g KH₂PO₄, 0.5 g MgSO₄·7H₂O, 0.5 g KCl, 1 mg FeSO₄, 1 mg ZnSO₄ in 1,000 ml distilled water), MM+1% colloidal chitin, MM + 1% skim milk, PDB (Potato dextrose broth; DifcoTM, USA), SDYB (Sabouraud Dextrose

broth + 1% yeast extract) 배지가 각각 20 ml씩 들어있는 100 ml flask에 포자현탁액 200 μl (1×10^8 conidia/ml)씩 접종하고 25°C, 150 rpm으로 배양하면서 24시간 간격으로 배양액을 4일간 수거하였다. 수거된 배양액은 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 균체와 배양액을 분리시켰고 ADVANTEC No.2 filter paper를 사용하여 filtering된 배양액을 효소활성 측정에 이용하였다. Chitinases 활성 측정은 90 μl 의 4-Nitrophenyl N-acetyl- β -D-glucosaminide (3 mM in 200 mM citrate phosphate buffer pH 4.7)에 배양액 10 μl 을 넣고 37°C에서 30분 반응하였다. 그 후, 200 μl 의 stop solution (sodium carbonate, 40 mg/ml)을 넣어 반응을 종료시키고 Emax Microplate reader (Molecular Devices, UK)를 이용하여 405 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. Proteases (Pr1, subtilisin-like) 활성 측정은 90 μl 의 N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe p-nitroanilide (1 mM in 100 mM Tris-HCl pH 8.0)에 배양액 10 μl 을 넣고 28°C에서 30분간 반응하였다. 그 후, 200 μl 의 stop solution (30% acetic acid)을 넣어 반응 종료하고 405 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 두 효소의 활성은 1분 동안에 1 μmol 의 p-nitroaniline과 p-nitrophenol을 생산하는 효소량을 각각 1 unit로 정의하였다(Estevés et al., 2009).

결과

곤충병원성 곰팡이의 분리 및 형태학적 조사

사육 중 회색 곰팡이로 뒤덮여 사멸한 온실가루이 사충으로부터 선택배지인 SDA-D50을 이용하여 곰팡이를 분리한 결과, 오직 한 종류의 colony만 형성되었다. 분리 균주를 PDA 배지에 옮겨 생장을 관찰한 결과, 흰색으로 균사생장을 하다가 시간이 지나면서 사충에서 분리한 곰팡이의 색깔과 같은 회색의 포자를 형성하는 것을 관찰하였다(Figs. 1A-C). 형태학적 관찰 결과 포자의 형태는 긴 타원형으로 크기는 $3.98 \pm 0.09 \times 1.92 \pm 0.05 \mu\text{m}$ (n=20)이고 분생자자루가 매끄럽고 색을 띠지 않으며 분생자의 사슬이 길고 분생자두가 확산되어 있는 형태로 관찰됨으로써, 이를 토대로 기보고 된 문헌들과(Humber, 1997) 비교 관찰하여 *Isaria fumosorosea*로 1차적으로 동정하였다(Fig. 1D).

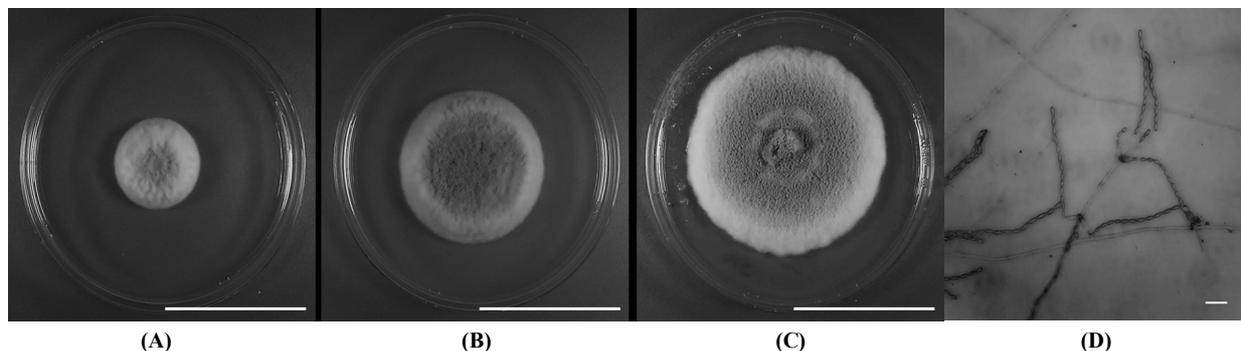


Fig. 1. Morphological examination of isolated fungus from cadaver of greenhouse whitefly. Fungus was inoculated on the center of PDA media and cultured at 25°C for 5 days (A), 10 days (B), and 15 days (C). The growth of white with flocculent mycelium was observed at 5 days after inoculation and the gray conidiation was partially observed in center of mycelium at 10 days after inoculation. The gray conidiation was almost observed whole of mycelium at 15 days after inoculation. Long and diffuse chains of conidia were observed under phase contrast microscope (400 \times) (D). Scale bars (A-C) 5 cm and (D) 10 μm .

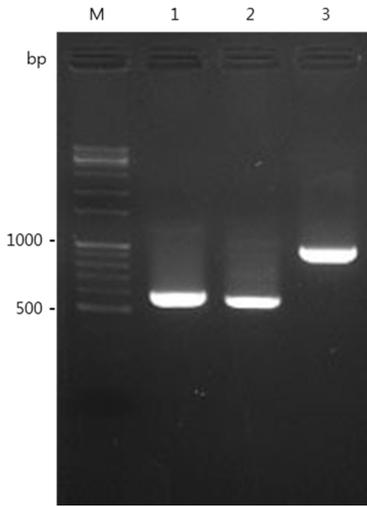


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of ITS, EF1- α , and β -tubulin region specific PCR products from isolated fungus. Each of ITS, EF1- α , and β -tubulin region showed about 600 bp, 500 bp, and 1 kb, respectively. Lanes: M, 100 bp ladder; 1, ITS; 2, EF1- α ; 3, β -tubulin.

분자생물학적 동정

분자생물학적 동정을 위하여 ITS 영역, EF1- α 그리고 β -tubulin gene 부분을 PCR 증폭한 결과, 각각 약 600 bp, 약 500 bp 그리고 약 1 kb 근처에서 예상된 크기의 밴드가 형성되었다 (Fig. 2). 얻어진 PCR 산물을 T-vector에 cloning 후 염기서열을 결정된 결과, ITS 영역은 580 bp, β -tubulin 영역은 938 bp 그리고 EF1- α 영역은 517 bp로 나타났으며, 분리 균주의 ITS 영역은 *I. fumosorosea* NLUC (FJ765015), NLHG-2 (FJ765013), NLHG-1 (FJ765012), CNHG (FJ765009), CNZH (FJ765008) 와 100%로 높은 상동성을 나타내었다. 또한 β -tubulin 영역은 *I. fumosorosea* (EF429303), *I. fumosorosea* Pfr 97 (EF429306)가 99%로 가장 높은 상동성을 보였으며 그 뒤로 *I. fumosorosea* ARSEF3590 (DQ079604)가 94% 상동성을 보였고, *Beauveria bassiana* Bb 9023 (AY366065), Bb 9010 (AY366061)가 93% 상동성을 보였다. 마지막으로 EF1- α 영역은 *Cordyceps* cf.

takaomontana NHJ 12623 (EF468778)와 98% 높은 상동성을 보였으며 다수의 *Beauveria* 속의 곰팡이 *Beauveria* sp. ARSEF 3529 (HQ880998), *B. bassiana* 793 (AY531958), 3216 (AY531927), ARSEF 1564 (HQ880974)와 각각 97%의 상동성을 나타내었다. 형태학적 및 분자생물학적 동정 결과를 통해 분리 곰팡이는 최종적으로 *I. fumosorosea*로 동정하였고, *I. fumosorosea* SDTv로 명명하였다.

생물검정

포자현탁액 1 ml (1×10^5 - 10^8 conidia/ml with 0.02% Tween 80)을 이용하여 온실가루이 유충에 대하여 살충력을 검정한 결과, 접종 후 5일차부터 사충이 발생하기 시작하였고 농도가 높아 질수록 살충률도 증가하였다(Fig. 3A). 특히, 일반적인 포자처리 농도인 1×10^8 conidia/ml에서 5일차부터 90% 이상의 높은 살충률을 보였다. 사멸한 온실가루이들은 체내에 침입하여 발아된 균사가 온실가루이 표피를 뚫고 나와 하얀색의 균사로 덮였고, 하얀색 균사는 점차 회색의 포자를 형성하는 전형적인 곤충병원성 곰팡이의 병징을 보였다(Fig. 3B).

포자의 안정성 및 저온발아력

분리 균주 *I. fumosorosea* SDTv의 고온에 대한 안정성은 35°C에서는 90% 이상의 높은 발아율을 보였고, 40°C 이후부터는 그 발아율이 현저히 저하되는 결과를 보였다(Fig. 4A). UV-B에 대한 포자의 안정성은 자외선을 0.1 J/cm²로 처리하였을 때에는 80% 이상의 발아율을 보였지만, 처리되는 에너지에 양이 증가함에 따라 발아율이 감소하였다(Fig. 4B). 저온에서의 포자 발아력은 8일차부터 발아를 시작하여 14일차에는 약 80%의 발아율을 보이는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4C).

살충 관련 효소 활성 분석

곤충병원성 곰팡이의 병원력에 큰 영향을 준다고 보고된 세포 외 효소인 chitinase와 protease의 활성을 조사하기 위하여 다양한 배지에서 균주를 증식시킨 뒤 그 배양액을 이용하여 각 효소의 활성을 측정하였다. 그 결과, chitinases와 proteases의 활성

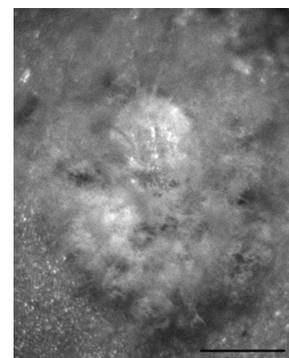
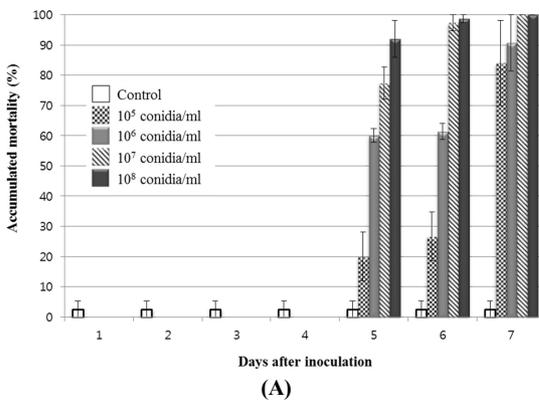


Fig. 3. Virulence of *I. fumosorosea* SDTv against greenhouse whitefly. Accumulated mortality rates of greenhouse whitefly were from 84 to 100% and they were increased according to the conidial concentrations, 1×10^5 to 10^8 conidia/ml of *I. fumosorosea* SDTv (A). The gray conidiation was observed on cadaver infected with *I. fumosorosea* SDTv at 7 days after inoculation (B). Scale bar, 0.5 mm.

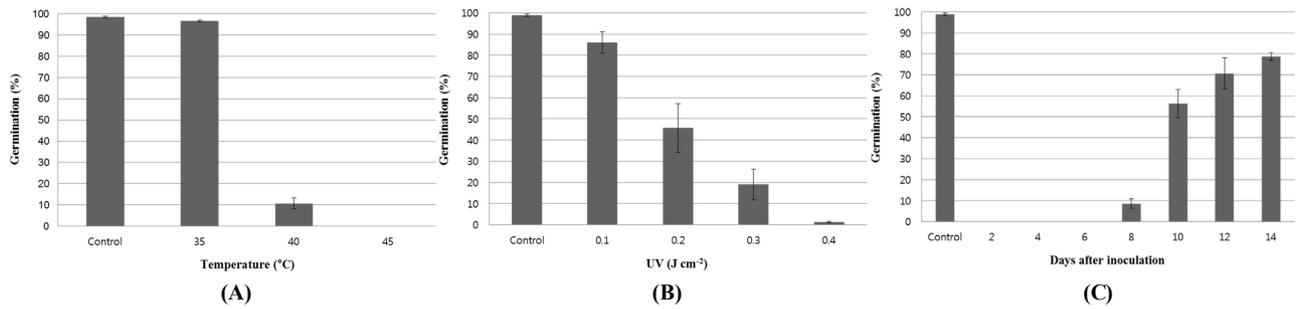


Fig. 4. Thermotolerance (A), UV-B stability (B) and cold activity (C) of *I. fumosorosea* SDTv. Germination rate of *I. fumosorosea* SDTv was determined after exposure of conidia to 35, 40, and 45 °C for 1 h (A) and UV-B dose of 0.1, 0.2, 0.3, and 0.4 J/cm² (B). The thermotolerance on conidia at 35 °C was more than 90% germination and the stability of UV-B irradiation on conidia at 0.1 J/cm² ultraviolet was more than 80% germination. The cold activity was determined by the accumulated germination of *I. fumosorosea* SDTv at 4 °C for 14 days (C). It showed about 80% germination at 14 days after treatment. Vertical bars correspond to standard error.

은 배지별로 0-0.041과 0-0.006 unit까지 각각 다양하게 나타났으며, chitinases의 활성은 MM+1% skim milk 배지에서 가장 높게 나타났고(Fig. 5A), proteases의 활성은 PDB 배지에서 가장 높은 활성이 나타났다(Fig. 5B).

고찰

친환경적 방제 수단으로써의 곤충병원성 곰팡이는 난방제 해충 중에서도 식물을 직접 섭식하지 않는 흡즙성 해충을 중심으로 효과적인 미생물 살충제로 여러 나라에서 연구, 개발되어 이용되고 있다. 흡즙성 해충을 중심으로 주로 곤충병원성 곰팡이가 살충제로 고려 되는 이유는, 미생물 살충제 개발에 이용되는 다른 곤충병원성 세균 또는 바이러스는 곤충의 섭식에 의해서만 효과를 보일 수 있으나, 흡즙성 해충은 섭식의 기회가 거의 없어 이들의 적용이 어렵기 때문에 접촉만으로도 효과를 보일 수 있는 곤충병원성 곰팡이가 그 개발의 대상이 되고 있다(de Faria and Wraight, 2007). 따라서 대표적인 난방제 해충이면서 흡즙성 해충인 온실가루이의 방제를 위해서도 접촉만으로 병원성을 보일 수 있는 곰팡이가 그 방제원으로써 연구되고 있다(Lacey et al., 1996). 본 연구에서는 곰팡이병으로 사멸한 온실가루이의

사충으로부터 곤충병원성 곰팡이를 분리하여 형태학적 및 분자 생물학적 동정을 거쳐, 최종적으로 분리 균주가 *I. fumosorosea*임을 확인할 수 있었다. 분리 곰팡이 동정에 있어 ITS 영역 염기 서열은 100%, β-tubulin 영역은 99%로 다른 *I. fumosorosea* 균주들과 상동성이 있는 것으로 나타났으나, EF1-α 영역은 *Cordyceps* 속 또는 *Beauveria* 속의 곰팡이와 상동성이 높은 것으로 나왔다. 이는 *Isaria* 속과 그 유연관계에 있는 *Paecilomyces* 속의 곰팡이 동정에 있어서 ITS 영역과 β-tubulin 영역만을 주로 사용하여 NCBI database에 다른 *I. fumosorosea*의 염기서열이 등록되어 있지 않았기 때문으로 확인되었다. *I. fumosorosea*는 최근 연구에서 *Paecilomyces fumosoroseus*가 재분류되었던 것이며(Luangsa-ard et al., 2005) *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*와 같이 곤충에 병원성을 가지는 대표적인 곰팡이 중 하나이고, 세계적으로 노린재목을 중심으로하여 10개의 제품이 살충제로서 사용되고 있다(de Faria and Wraight, 2007).

해충 방제를 위해 선발되는 곰팡이들은 실제 포장에서의 적용에 있어서 다양한 환경조건에 치명적인 영향을 받게 되는데, 그 중에서도 낮 시간 동안의 높은 온도와 UV 조사의 영향이 가장 중요한 문제점으로 인식되고 있다. 또한, 일교차가 심한 환경이나 낮은 온도에서 발생하는 해충의 방제를 위해서 곰팡이 포

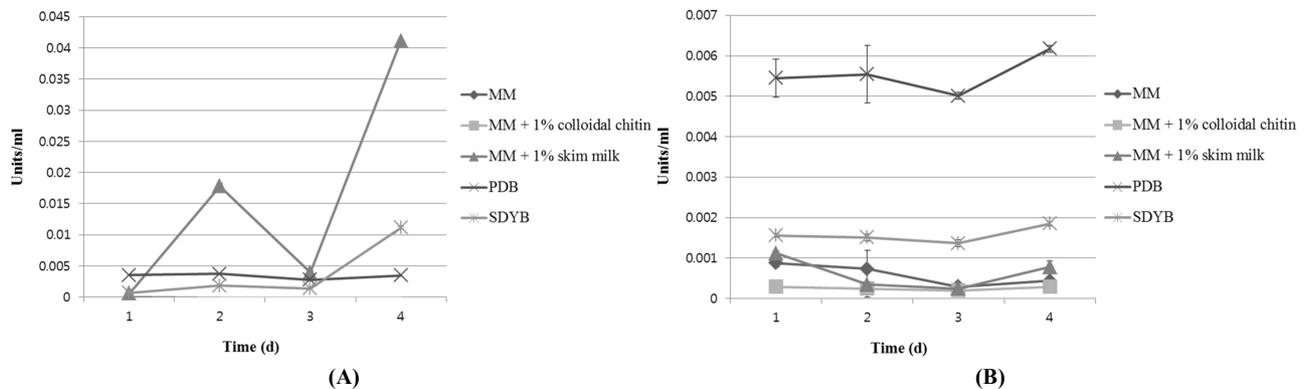


Fig. 5. Production of extracellular enzymes by *I. fumosorosea* SDTv. Specific activity of chitinase (A) and protease (B) were determined after culture for 1, 2, 3, and 4 days in various media (MM, MM+1% colloidal chitin, MM+1% skim milk, PDB and SDYB). Chitinase and protease activities were highest in the MM+1% skim milk media and in the PDB media, respectively. Vertical bars correspond to standard error.

자의 저온에서의 발아력은 필수적이다. 따라서 해충 방제용 곰팡이의 선발에 있어서 과거에는 곰팡이 자체의 목적 해충에 대한 병원력 평가만으로 선발이 이루어졌지만, 근래에 들어서는 실제 포장에서의 효과적인 적용을 위해 곰팡이 포자의 고온, UV에 대한 안정성 및 저온에서의 포자 발아력도 곰팡이의 선발을 위한 평가의 대상이 되고 있다(Vega *et al.*, 2012). 하지만 현재까지 우리나라에서는 분리 균주의 분리 동정 및 대상해충에 대한 병원성 평가만이 이루어지고 위와 같은 조건에서의 특성조사가 이루어지지 않아, 분리 균주들의 다양한 환경에서의 적응능력 및 실제 활성능력에 대한 효과를 예측하기 어려운 실정이다. 본 연구에서 분리된 *I. fumosorosea* SDTv의 고온안정성을 평가한 결과 35°C에서는 90% 이상의 높은 발아율을 보임으로써 비교적 안정적인 것으로 조사되었지만, 40°C 이후부터는 그 발아율이 현저히 저하되는 결과를 보였다. 따라서 일반적인 작물의 생육 한계점인 35°C까지는 비교적 높은 안정성이 인정되었으나, 계절 및 환경에 따라 처할 수 있는 비정상적인 고온 환경에서 제제의 안정성을 높이기 위해서는 보조제의 첨가가 필요할 것으로 확인되었다. UV-B에 대한 안정성은 0.1 J/cm²로 처리하였을 때에는 비교적 안정적이었지만, 처리되는 에너지에 양이 증가함에 따라 안정성이 감소하는 것을 확인하였다. 따라서 실제 야외 환경 처리시 자외선을 반사하는 Tinopal이나 흡수하는 Congo red와 같은 자외선 차단제를 첨가하여 곰팡이 포자의 안정성을 높여야 할 것으로 판단되었다(Vega *et al.*, 2012). 곤충병원성 곰팡이의 저온 발아력은 숙주가 활동정지 상태인 온도에서도 곰팡이의 침입이 가능하다는 이점이 있어 살충제 개발에 있어 주요한 요인으로 평가 되고 있다. 본 연구에서의 분리 균주는 4°C에서 8일차부터 발아를 시작하여 14일차에는 약 80%의 발아율을 보임에 따라, 실제 온실가루이 방제 시 처할 수 있는 온도보다 더욱 낮은 온도에서도 비교적 높은 살충성을 보일 것으로 기대되었다.

곤충병원성 곰팡이의 해충방제제로서 이용은 대부분 포자를 직접 처리하는 방법이 많이 이용되고 있는데, 이러한 관행적인 방법은 자연환경의 온도, 자외선 그리고 습도 등의 영향을 많이 받게 되며, 체내 침입 후 증식과정을 통해 살충성을 보임으로써 그 효과가 늦게 발현되는 단점을 가지고 있다. 그리하여 최근에는 이런 단점을 보완하고 새로운 형태의 방제원 개발을 위하여 곤충병원성 곰팡이의 포자가 아닌 배양액을 해충방제에 이용하고자 하는 연구가 진행되고 있다. 이는 곤충병원성 곰팡이가 기주를 침입시 생산하는 주요 효소인 chitinase, protease 및 lipase를 비롯하여 다양한 살충성 물질을 이용하는 것으로, 실제로 살충성 효소만을 처리하였을 경우 포자를 처리하는 것보다 더 높은 살충력을 나타낸다는 보고도 있다(Kim *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2012). 또한 이러한 살충성 효소의 생산은 균주마다 선호하는 배지 및 환경 조건에 따라 차이가 있으므로 그 이용을 위해서는 여러 조건에 따른 효소의 생산에 대한 연구가 필요하다고 알려져 있다(Campos *et al.*, 2005). 따라서 본 연구에서는 온실가루이에 대해 높은 살충활성을 보인 분리 균주의 배양액 그 자체를 살충물질로써 이용할 수 있는 가능성을 조사하기 위하여 다양한 배지에서의 세포 외 효소 활성을 관찰하였다. 그 결과, 분리 균주 SDTv는 chitinases 활성을 유도 시켜주기 위한 배지인

chitin 첨가 배지보다 skim milk 첨가 배지에서 더욱 높은 chitinases 활성을 나타냈으며, 마찬가지로 proteases 활성을 유도 시켜주기 위한 배지인 skim milk 첨가 배지보다 PDB 배지에서 더욱 높은 proteases 활성을 나타내었다. 이는 다른 선행연구 결과에서 보이는 것처럼(Estevés *et al.*, 2009) 배지에 따른 효소 활성의 유도 능력이 각각의 기본적 특성으로 인하여 곰팡이에 따라 예상과는 다르게 나타날 수 있는 것과 일치하는 결과였으며, 효소 활성을 더욱 높이기 위해서는 좀 더 다양한 조건에 대한 연구가 필요할 것으로 여겨졌다. 본 연구에서 이용된 다양한 배지에서 증식시킨 배양액을 이용하여 실제 온실가루이 약충에 대해 살충성을 평가한 결과 어떠한 살충성도 확인할 수 없었다(자료 미제시). 이러한 결과는 본 분리 균주의 살충활성이 세포 외 물질보다 곰팡이 자체의 증식에 의한 치사에 더욱 영향을 받아서이거나 또는 세포 외 살충물질의 효율적인 생산에 적합한 배양조건이 충족되지 않은 결과로 추정되었다. 이러한 결과에 대해서도 다양한 배양조건의 검토로 세포 외 물질의 살충성 평가를 통해 그 자체로써 살충제 개발의 가능성을 확인할 수 있을 것으로 여겨진다.

이상의 결과를 통해 온실가루이 사충에서 분리한 곤충병원성 곰팡이 *I. fumosorosea* SDTv는 높은 살충성 확인과 더불어 포자의 고온 및 UV에 대한 안정성 그리고 저온 발아력 평가 결과 자료를 바탕으로 향후 온실가루이의 효율적인 방제를 위한 미생물 살충제로써 그 활용이 기대된다.

적 요

온실가루이(*Trialeurodes vaporariorum*)는 온실에서의 경제적 주요 해충으로, 직접적으로는 작물을 흡즙 가해하여 영양분 고갈로 작물을 고사시키고 간접적으로는 많은 식물바이러스를 매개한다. 이러한 온실가루이를 방제하기 위해 최근에 다양한 합성 농약을 사용하고 있지만, 농약의 오남용으로 인해 온실가루이 개체의 저항성이 높아지고 환경오염을 초래하는 문제가 있다. 그리하여 본 연구에서는 이러한 문제를 극복하고자 온실가루이 사충으로부터 분리된 곤충병원성 곰팡이의 생물학적 특성과 살충성을 조사하였다. 분리된 곤충병원성 곰팡이는 형태학적 조사와 ITS, β -tubulin, EF1- α 영역의 염기서열을 이용한 분자생물학적 동정을 통하여 *Isaria fumosorosea*로 동정하였고, *I. fumosorosea* SDTv로 명명하였다. 그리고 *I. fumosorosea* SDTv의 온실가루이 약충에 대한 살충력과 포자의 고온, UV-B 안정성, 저온발아력에 대하여 조사 하였다. 살충력 검정은 실험실 조건에서 온실가루이 약충에 대하여 다양한 포자 농도($1 \times 10^5 - 10^8$ conidia/ml)로 접종한 결과, 7일차에서 84-100%의 살충력을 보였으며 포자 농도가 증가할수록 살충력도 증가하는 양상을 나타내었다. 분리 균주의 포자는 35°C에서 그리고 0.1 J/cm² UV-B 조사에 대하여 비교적 안정적이었으며, 4°C 조건에서 8일차부터 발아하였다. 또한, *I. fumosorosea* SDTv의 배지에 따른 chitinases와 proteases의 생산 활성을 비교한 결과 배지에 따라 다른 효소 생산 양상을 보였다. 이상의 결과로 온실가루이에 대하여 높은 살충력을 보인 *I. fumosorosea* SDTv는 온실가루이에

대한 종합적 해충 방제 방법에 있어 효과적인 방제수단의 일환이 될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 말

이 논문은 2012년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초 연구사업(No. 2011-0013004) 및 2012년도 정부(농림수산식품부)의 재원으로 수행된 기초 연구사업(AGC0911011)임.

참고문헌

- Campos, R.A., Arruda, W., Boldo, J.T., da Silva, M.V., de Barros, N.M., de Azevedo, J.L., Schrank, A., and Vainstein, M.H.** 2005. *Boophilus microplus* infection by *Beauveria amorpha* and *Beauveria bassiana*: SEM analysis and regulation of subtilisin-like proteases and chitinases. *Curr. Microbiol.* **50**, 257-261.
- de Faria, M.R. and Wraight, S.P.** 2007. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biol. Control.* **43**, 237-256.
- Esteves, I., Peteira, B., Atkins, S.D., Magan, N., and Kerry, B.** 2009. Production of extracellular enzymes by different isolates of *Pochonia chlamydosporia*. *Mycol. Res.* **113**, 867-876.
- Fernandes, E.K., Rangel, D.E., Moraes, A.M., Bittencourt, V.R., and Roberts, D.W.** 2008. Cold activity of *Beauveria* and *Metarhizium* and thermotolerance of *Beauveria*. *J. Invertebr. Pathol.* **98**, 69-78.
- Guzman, P., Aredondo, C.R., Emmatty, D., and Gilbertson, R.L.** 1997. Partial characterization of two whitefly-transmitted geminiviruses infecting tomatoes in Venezuela. *Plant Dis.* **81**, 312.
- Humber, R.A.** 1997. Fungi: Identification, pp. 153-185. In Lacey, L.A. (ed.), *Manual of Techniques in Insect Pathology*, Academic Press, London, UK.
- Jeon, H.Y., Kim, H.H., Yang, C.Y., Kang, T.J., and Kim, D.S.** 2009. A tentative economic injury level for greenhouse whitefly on cucumber plant in the protective cultivation. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* **27**, 81-85.
- Khan, S., Guo, L., Shi, H., Mijit, M., and Qiu, D.** 2012. Bioassay and enzymatic comparison of six entomopathogenic fungal isolates for virulence or toxicity against green peach aphids *Myzus persicae*. *Afr. J. Biotechnol.* **11**, 14193-14203.
- Kim, J.S., Roh, J.Y., Choi, J.Y., Wang, Y., Shim, H.J., and Je, Y.H.** 2009. Correlation of the aphicidal activity of *Beauveria bassiana* SFB-205 supernatant with enzymes. *Fungal. Biol.* **114**, 120-128.
- Lacey, L.A., Fransen, J.J., and Carruthers, R.** 1996. Global distribution of naturally occurring fungi of Bemisia, their biologies and use as biological control agents, pp. 401-433. In Gerling, D. and Mayer, R. (eds.), *Bemisia 1995. taxonomy, biology, damage control and management*, Intercept, Andover, Hants, UK.
- Lacey, L.A., Frutos, R., Kaya, H.K., and Vail, P.** 2001. Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future? *Biol. Control.* **21**, 230-248.
- Luangsa-ard, J.J., Hywel-Jones, N.L., Manoch, L., and Samson, R.A.** 2005. On the relationships of *Paecilomyces* sect. *Isarioidea* species. *Mycol. Res.* **109**, 581-589.
- Malais, M.H. and Ravensberg, W.J.** 2003. Knowing and Recognizing: The biology of glasshouse pest and their natural enemies. p. 288. Koppert B.V systems and Reed Business Information, Netherlands.
- Rehner, S.A. and Buckley, E.** 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycol.* **97**, 84-98.
- Shin, T.Y., Choi, J.B., Bae, S.M., Cha, Y.R., Oh, J.M., Koo, H.N., and Woo, S.D.** 2010. Study on selective media for isolation of entomopathogenic fungi. *Int. J. Indust. Entomol.* **20**, 7-12.
- Shin, T.Y., Lee, W.W., Ko, S.H., Ji, Z., Shin, D.H., Son, K.H., Park, H.Y., and Woo, S.D.** 2011. Preliminary evaluation of *Paecilomyces lilacinus* HY-4 to control *Tetranychus urticae*. *Int. J. Indust. Entomol.* **22**, 25-28.
- Sigler, L. and Gibas, C.F.C.** 2005. Utility of a cultural method for identification of the ericoid mycobiont *Oidiodendron maius* confirmed by ITS sequence analysis. *Stud. Mycol.* **53**, 63-74.
- St. Leger, R.J. and Wang, C.** 2009. Entomopathogenic fungi and the genomics Era, pp. 365-400. In Patricia Stock, S., Vanderberg, J., Boemare, N., and Glazer, I. (eds.), *Insect Pathogens: Molecular Approaches and Techniques*, CABI, Wallingford, UK.
- Tartar, A., Boucias, D.G., Adams, B.J., and Becnel, J.J.** 2002. Phylogenetic identifies the invertebrate pathogen *Helicosporidium* sp. as a green alga (Chlorophyta). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 273-279.
- Vega, F.E., Meyling, N.V., Luangsa-ard, J.J., and Blackwell, M.** 2012. Fungal Entomopathogens, pp. 171-220. In Vega, F.E. and Kaya, H.K. (eds.), *Insect Pathology: Second Edition*, Academic Press Inc, New York, N.Y., USA.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J.W.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, pp. 315-322. In Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., and White, T.J. (eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press Inc, New York, USA.