

국내 서식하는 파밤나방(*Spodoptera exigua*)에서 분리된 곤충병원성곰팡이 (*Nomuraea rileyi* ANU101)의 동정

황지현 · 박복리 · 김근섭 · 이순구 · 김용균*

안동대학교 자연과학대학 생명자원과학과

Identification of an entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi* ANU101, infecting the beet armyworm, *Spodoptera exigua*, in Korea

Ji-Hyeun Hwang, Bok-Ri Park, Soon-Gu Lee and Yonggyun Kim*

Department of Bioresource Sciences, Andong National University, Andong 760-749, KOREA

(Received July 6, 2009. Accepted December 28, 2009)

ABSTRACT: Several entomopathogenic fungi have been exploited to be developed into biological control agents in insect pest management. The beet armyworm, *Spodoptera exigua*, is a serious insect pest infesting various crops, but not effectively controlled by commercial chemical pesticides due to its high insecticide resistance. A fungal isolate was isolated from *S. exigua* larvae collected from cabbage field in Andong, Korea. The fungus could be cultured in potato dextrose agar. Larvae of *S. exigua* injected with the cultured conidia showed a potent entomopathogenicity. To identify the fungus isolate, its internal transcribed space (ITS) and surrounding partial 18S/28S regions were sequenced. The ITS sequence was highly matched (99%) to that of *Nomuraea rileyi*. Morphological characters of its hyphae and conidia were well fit to those of known *N. rileyi*. This study reports the first record of an entomopathogenic fungus, *N. rileyi*, in Korea.

KEYWORDS : Entomopathogenic fungus, Identification, ITS, *Nomuraea rileyi*, Pest control, *Spodoptera exigua*

곤충병원성곰팡이는 전 세계적으로 최소한 90 속, 700 여종에 이르고 있다(Goettel *et al.*, 2005). 이들은 크게 4개의 분류군으로 나눌 수 있어 Oomycetes, Chitridiomycetes, Zygomycetes 그리고 Ascomycetes가 포함된다. Oomycetes는 균사체에 키틴 없이 셀룰로스를 포함하고 두 개의 편모를 지닌 유주자를 갖는 것이 특징으로 대표적 곤충병원성곰팡이로 모기류에 기생하는 *Lagenidium giganteum*이 포함된다. Chitridiomycetes는 세포벽 성분이 키틴으로 셀룰로스는 포함하고 있지 않다. 또한 유주자가 후방에 단일 편모를 지니고 있다. 약 70종 이상의 곤충병원성 곰팡이 분류군에 속한다. Zygomycete는 격막이 없는 다핵질의 균사를 갖는 것이 특징이며 배우자낭(gametangia) 사이에 교미를 통해 접합포자(zygospore)를 형성한다. 곤충병원성곰팡이는 Entomophthorales 목에 200 종 이상이 포함된다. Ascomycetes는 격막이 존재하며 반수체인 균사를 지닌다. 자실체(fruiting body)의 자낭(ascus)에서 8개의 성분화 포자인 자생포자(ascospore)를 형성한다. 유주자는 운동성이 없다. 다양한 곤충병원성곰팡이가 이 분류군에 속하며 대표적으로 동충하초로 알려지고 있는 *Cordyceps* 속으로 약 300 종 이상이 이 속에 포함된다고

알려지고 있다. 또한 유성세대를 형성하는 능력을 상실한 Ascomycetes에 속한 다양한 변이체들이 Hypomycetes의 독립적 분류군을 형성하며, 여기에 40 속 이상의 중요한 곤충병원성곰팡이류로서 *Aspergillus*, *Beauveria*, *Culicinomyces*, *Gibellula*, *Hirsutella*, *Hymenostillbe*, *Lecanicillium*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Paecilomyces*, *Sorosporella*, *Tolyposcladium* 등이 대표적으로 포함된다(Goettel *et al.*, 2005).

우리나라에서 파밤나방(*Spodoptera exigua* (Hbner))이 1988년 이후 남부지역 뿐만 아니라 전국에 걸쳐 대발생하기 시작했다. 이 해충은 넓은 기주범위로 대부분의 발작물에 큰 피해를 주고 있다(Gho *et al.*, 1991). 그러나 파밤나방 고유의 약제 저항능력 및 무분별한 살충제 남용으로 기존 약제에 대부분 저항성을 보임으로 방제에 큰 어려움을 주고 있다(Kim *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1998). 이에 효과적인 대체 방제 수단으로 생물적 방제인자가 탐색되고 있다.

국내에 서식하는 파밤나방에 대한 천적류 연구가 부재하여 이에 대한 야외 관찰 자료가 필요하였다(Kim *et al.*, 2008). 이에 본 연구는 경상북도 안동시 송천동 배추밭에서 파밤나방의 유충에 발생하여 기주를 죽인 곤충기생성곰팡이를 획득, 분리 및 배양하여 이의 형태적 특징 및 DNA 염기서열 분석을 통해 균을 동정하였다.

*Corresponding author <E-mail : hosanna@andong.ac.kr>

재료 및 방법

파밤나방 유충 채집 및 곰팡이 배양 조건

경상북도 안동시 송천동 배추밭에서 파밤나방을 채집하여 실내(25°C, 75% 상대습도, 16:8 (L:D) h)에서 사육하였다. 일부 몸 표면이 흰색의 포자로 둘러싸여 치사된 개체(Fig. 1)를 구분하여 외부 병징을 해부현미경(SZX9, Olympus, Tokyo, Japan)으로 촬영하였다. 다시 이 개체로부터 곰팡이를 PDA (potato dextrose agar, pH 5.6 ± 0.2 , 명성과학, 부산, 한국) 배지로 옮긴 후 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 2~3일간 배양하였다. 균사 성장은 광학현미경으로 주기적으로 관찰하였으며, 분생자병 및 분생포자의 길이 측정은 위상차현미경(BX41, Olympus)을 이용하였다.

곰팡이 게놈 DNA 분리

배지에 배양한 곰팡이의 균사와 포자(약 0.5~1 mg)에 400 μl 의 식염수 (0.8% NaCl, 0.0125% Tween 20)를 첨

가했다. 이 진균 현탁액에 400 μl 의 추출용액(1 M Tris, 0.05 M EDTA, 0.3% SDS, pH 8.0) 첨가하면서 막대봉으로 세포벽을 붕괴하였다. 이 추출 현탁액에 10 μl 의 proteinase K (0.5 mg/ml)을 첨가하고 50°C 항온수조에 10분간 반응시켰다. 이후 225 μl 의 페놀(pH 8.0)과 225 μl 의 chloroform:isopropanol (24:1, v/v)을 차례대로 넣은 후 상등액에 존재하는 DNA 용액을 분리하고 다시 에탄올을 이용하여 DNA를 침강시켰다. 침강된 DNA는 20 μl 의 탈이온증류수에 다시 녹였다.

ITS-1 (internal transcribed spacer-1) 영역 PCR과 염기서열 분석

추출된 DNA를 다시 50배 희석한 후 PCR의 주형으로 이용하였다. ITS-1 영역을 증폭시킬 PCR 프라이머는 primer는 5'-TTGATT ACGTCC CTGCCC TTT-3'와 5'-TTTCAC TCGCCG TTACTA AGG-3'을 각각 사용하였다. PCR 반응용액의 구성은 10X PCR 완충용액(5 μl), dNTP 혼합액(각 2.5 mM) (5 μl), 25 pmol 정반응 프라이머(2 μl), 25 pmol 역반응 프라이머(2 μl), Taq DNA 중합효소(1 μl) 및 탈이온증류수(34 μl)를 포함했다. 여기에 기계유(20 μl)를 첨가한 후 PTC-100 (MJ Research, Minnesota, USA) 기기를 이용하여 반응시켰다. PCR 반응 조건은 35 반복 증폭반응으로, 각 반응은 94°C에서 1 분, 46°C에서 1 분 그리고 72°C 2 분으로 구성되며, 이후 72°C에서 10 분간 잔여 합성 반응을 실시하였다. 이렇게 얻어진 PCR 증폭물은 TA 벡터(pPCR2.1[®], Invitrogen Korea, 서울, 한국)에 재조합시키고, Sp6와 T7 프라이머를 이용하여 양방향으로 염기서열을 분석하였다. 결정된 염기서열은 GenBank (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)의 BlastN 검색 프로그램을 이용하여 유사성이 있는 염기서열을 추적하였으며, 이를 다시 DNASTAR 프로그램(Version 5.01, DNASTAR Inc., Madison, USA)을 이용하여 염기서열 사이에 상동성을 결정하였다.

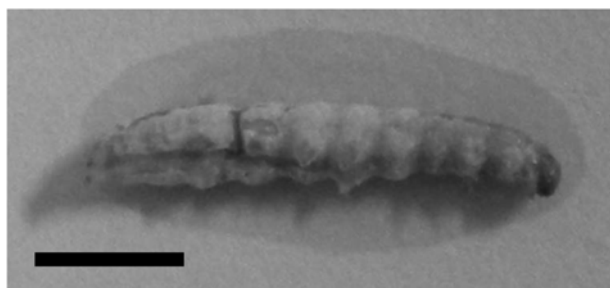
병원성 검정

파밤나방 4령충을 대상으로 PDA에서 증식한 곰팡이 포자를 5×10^4 개의 농도로 곤충 혈관에 주입하였다. 치사된 곤충으로부터 치사체 모양(Fig. 1A)과 이들로부터 다시 균사를 분리하여 크기와 형태를 기준(Table 2)으로 동일성을 판정하였다.

결과 및 고찰

야외에서 3-4령의 파밤나방(*S. exigua*) 집단을 채집하여 실내에서 사육한 결과 곤충병원곰팡이에 감염된 개체를 얻었다(Fig. 1). 몸 전체가 흰가루로 뒤덮이는 모습을 모였고, 이후 몸이 경화되는 전형적 곤충병원성 곰팡이병 증상을 나타냈다. 이러한 증상은 5령충으로 발육 후에 뚜렷하게 나타나서 아마도 야외에서 어린 유충 단계에서 감염된 곰팡이 포자가 기주가 특정 발육 시기에 이를 때 병징을 보여주는 발육

(A)



(B)

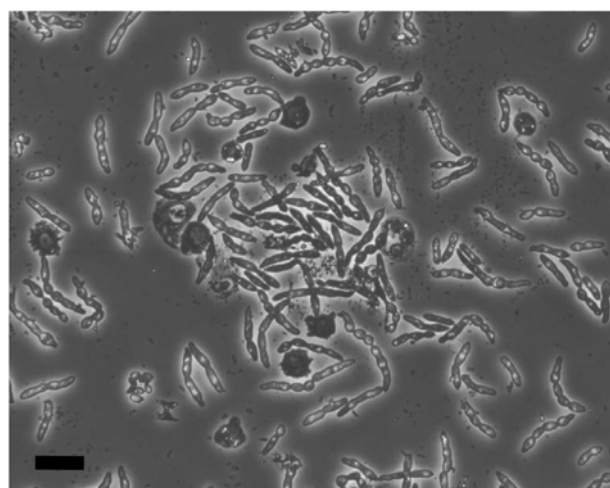


Fig. 1. A dead *Spodoptera exigua* larva infected with a fungus pathogen. (A) External symptom taken under a stereo-microscope (SZX9, Olympus, Tokyo, Japan). Scale bar = 1 cm. (B) Fungal hyphal bodies observed in the larval hemocoel under a phase contrast microscope (BX41, Olympus). Scale bar = 10 μm .

단계로 진전된 것으로 보여진다. 곤충병원성곰팡이가 대상 곤충에 기생하여 치사시키는 일반적 생활사는 감염 포자의 곤충 체벽 부착으로부터 비롯된다. 곤충의 큐티클의 부착을 높여주기 위해 포자는 점착물질을 함유할 수 있다(Hajek and St. Leger, 1994). 이 단계에서 다양한 환경적 요인(예, 습도, 온도 등)이 포자접종율에 관여하게 된다. 예를 들어, *Hypomecetes*는 20-30°C의 온도가 유지되어야 하지만, *Entomophthorales*는 15-25°C의 감염 온도를 선호한다. 이후 키틴 및 단백질을 분해를 통해 발아관(germ tube) 성장이 이뤄지고 체벽을 뚫고 혈강에 이르게 된다. 이후 균사성장과 더불어 기주체를 치사에 이르게 된다. 곤충의 치사에 이르게 하는 원인은 곰팡이증식에 따른 기주체의 영양소 결핍 또는 곰팡이가 분비하는 독소에 의해 이뤄질 수 있다. 또한 분생자를 생성하기 위한 분생자병(conidiophore)이 발달되고 분생포자를 생산하게 된다. 이렇게 형성된 포자는 다시 주변의 기주를 찾아가게 된다.

병징을 보인 파밤나방을 PDA 배지에서 옮겨 놓고 이후 성장한 곰팡이를 분리하였다(Fig. 2). PDA 배지에서 이 곰팡이는 성장하였으며, 균사의 형태는 곤충 체내에서 성장한 모습(Fig. 1B)과 동일하였다. 이 균사와 포자 집합체를 다시 파밤나방에 처리한 결과 동일한 병징을 유발하였다. 즉, 본 연구에서 분리하여 PDA에서 성장시킨 곰팡이가 곤충병원성 곰팡이라는 것을 입증하여 주었다. 곤충병원성곰팡이가 생산하는 독소는 효능에서 살충 및 살균성으로 나눌 수 있다. 살충성 독소로서 대표적인 것이 *Metarhizium* spp.가 생산하는

destruxin류이다(Kodaira, 1961). 이들은 cyclodepsipeptide류로서 기본 골격은 5개의 아미노산과 α -hydroxyl acid이나 다양한 이성체 또는 동족체(congener)가 포함된다(Vey *et al.*, 2001). Destruxin은 다양한 곤충 종에 대해서 독성을 보이고, 이를 생산하는 곰팡이류의 기주 범위가 비교적 넓어 기주 선택성에 관여하는 것으로 여겨지고 있다(Amiri-Besheli *et al.*, 2000). *Beauveria* spp.가 생산하는 독소는 beauvericin으로 다양한 무척추동물에 독성을 보이는 depsipeptide 대사이물이다(Hamil *et al.*, 1969; Roberts and Hajek, 1992). 이외에 *B. bassiana*는 beauverlides, isarolides, bassianolides의 cyclotetradepsipeptide류를 생산한다(Frappier *et al.*, 1975; Suzuki *et al.*, 1977). 비펩타이드류 독소로서 bassianin과 tenellin이 동정되었으며 이들은 적혈구막의 ATPase를 억제하는 것으로 보고되었다(Jeffs and Khachatourians, 1997). Efrapeptin류는 *Tohyopocladium* 종이 생산하는 독소로서 살충 및 살비효과를 나타내고 있다(Matha *et al.*, 1988; Krasnoff *et al.*, 1991). Hirsutellin A는 *Hirsutella thompsonii*가 생산하는 독소로서 비단백질성으로 다양한 곤충 및 응애류에 치사효과를 나타내고 있다(Mazet and Vey, 1995; Omoto and McCoy, 1998). 이 외에 곤충병원성곰팡이가 생산하는 살균물질로서 적색의 dibenzoquinone인 oosporein이 *Beauveria* spp.에서 보고되었고, 세균과 바이러스에 항생능력을 나타냈다(Terry *et al.*, 1992). 기타 beauvericin은 세균에 대해서(Ovchinnikov *et al.*, 1971), destruxin E는 바이러스에 대해서(Quiot *et al.*, 1980) 항생능력을 보여주었다. 곰팡이류에 대해서도 항생능력을 보이는 항생물질로서 phomalactone이 *H. thompsonii* var. *synnematos*에서 보고되었다(Krasnoff and Gupta, 1994).

분리된 곤충병원성곰팡이를 동정하고자 먼저 분자생물학 기술을 이용하여 일반적으로 종 동정에 널리 이용되고 있는 ITS 염기서열을 분석하였다. 이를 위해 PDA에서 성장시킨 곰팡이를 이용하여 DNA를 추출하고 ITS 영역의 염기서열을 밝혔다. 분석된 ITS 영역은 일부 18S rRNA, ITS-1 그리고 일부 5.8S rRNA의 부위를 포함하였다. 이 영역의 염기서열을 NCBI에 수록된 DNA 염기서열 database에 접속한 결과 이 부위가 ITS 영역이며, 이와 가장 유사한 ITS 염기서열을 지니는 종이 곤충병원성곰팡이의 일종인 *Nomuraea rileyi*로 판명되었다(Table 1). 분석된 염기서열은 NCBI의 GenBank에 #FJ824809의 입력 번호로 등록했다.

분자생물학적 종 동정 결과를 확인하기 위해 이 곰팡이의 형태학적 특징을 분석하였다(Table 2). PDA 배지에 배양한 곰팡이는 흰 균총을 형성한 후 일부분 회색 또는 연두색의 균총을 다시 만드는 모습을 관찰할 수 있었다. 위상차 현미경 관찰결과 병원균의 분생자병은 가지모양이고, 뭉툭한 난형의 분생포자가 연속적인 짧은 체인을 뺄뺄하게 형성하고 있으며, 분생포자의 크기는 $1.5 \times 4.0 \mu\text{m}$ 이다. 이러한 형태학적 특징은 *N. rileyi*와 동일한 것으로 판명되었다. *N. rileyi*는 나비목은 물론이고 일부 딱정벌레도 병을 유발하는 비교적 넓은 기주 범위를 지니고 있다(Srisukchayakul *et al.*, 2005).

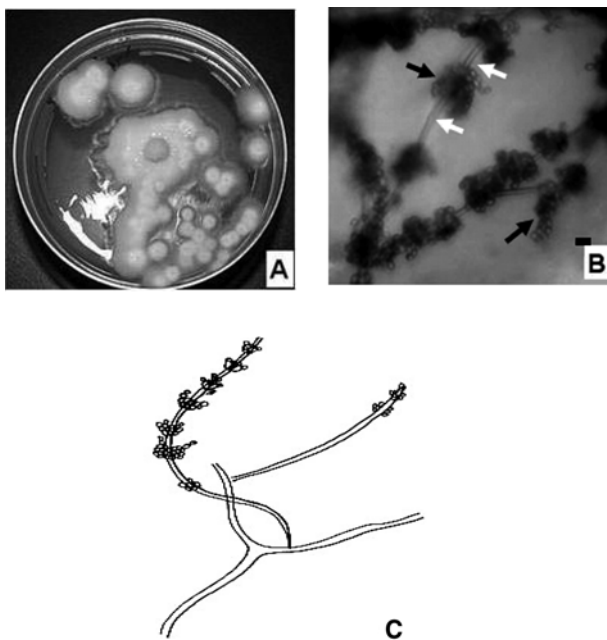


Fig. 2. *Nomuraea rileyi* (A) The *N. rileyi* growth was on PDA (Potato Dextrose Agar) media at 27.5°C. (B) Shape of conidia (black arrow) and conidiophore (white arrow) (phase contrast microscope X40, Camera-NIKON). (B : Scale bar : 5 μm) (C) Drawing of *Nomuraea rileyi*

Table 1. Comparison of nucleotide sequences at partial 18S rDNA, complete internal transcribed spacer-1, and partial 5.8S rDNA of an entomopathogenic fungus ('Andong isolate', NCBI accession #FJ824809) with other entomopathogenic fungi

Fungi	NCBI accession number	Analyzed sequence (bp)	Nucleotide gaps	Nucleotide identity (%)	Match score (bits) ¹	E value ²
<i>Nomuraea rileyi</i>	AB268359	787	0	99	1448	0.0
<i>Metarhizium flavoviride</i>	AY646390	652	33	90	835	0.0
<i>Blistum tomentosum</i>	AB208109	926	32	88	926	0.0
<i>Paecilomyces carneus</i>	AB103379	826	57	88	957	0.0

¹Match score was calculated by nucleotide that agree to the given score.

²E value indicates the number of hits expected to occur by chance with the given score.

Table 2. Morphological characters of a fungal isolate from an infected larva of *Spodoptera exigua*

Characters	Isolate	Nomuraea rileyi	Nomuraea typicola	Metarhizium flavoviride	Blistum tomentosum	Paecilomyces carneus
Host/habitat	<i>Spodoptera exigua</i>	<i>Spodoptera exigua</i>	Spider	<i>Manduca sexta</i>	Trichiales	Soil
Mycelial color	gray-green	gray-green	purple-gray	gray-green	white	pale pink
Conidium size (μm)	1.5×4.0	1.6×3.2	3.0×5.5	3.5×9.0	2.4×5.0	2.5×5.0
Conidium shape	ovoid and short divergent chains	round to ovoid and short divergent chains	round to ovoid and long single chains	ovoid and very long chains	ovoid and broad fusiform	ovoid and long tangled chains

이러한 넓은 곤충 기주 범위와 더불어 인축 및 환경에 무해하기에 해충 방제 도구로서 주목을 받아 왔다. 본 연구는 국내에 서식하는 *N. rileyi*를 최초로 보고하며, 이를 국내 해충 방제에 추후 이용될 가능성이 있는 방제 인자로서 제시하는 바이다.

적요

한국 안동의 배추 재배지의 파밤나방(*Spodoptera exigua*) 유충으로부터 획득 분리한 곰팡이를 PDA 배지에 배양 후 생성된 분생자를 파밤나방 애벌레에 접종한 결과 곤충기생성 균임을 확인하였고, 이 균의 형태학적 특성과 분자생물학적 특성에 대해 동정하였다. 동정 결과 형태학적 특성 및 분자생물학적 특성이 *Nomuraea rileyi*와 거의 동일함을 확인하였다. 이 논문은 한국에서 처음으로 곤충기생성 곰팡이 *N. rileyi*를 보고한다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부 단기핵심기술사업으로부터 지원 받아 수행되었다. 김근섭은 교육부 2단계 BK21사업에서 지원받았다.

참고문헌

Amiri-Besheli, B., Khambay, B., Cameron, S., Deadman, M., Butt, T. M. 2000. Inter- and intra-specific variation in destruxin production by the insect pathogenic *Metarhizium*,

and its significance to pathogenesis. *Mycol Res* 104:447-452.

Frappier, F., Ferron, P. and Pais, M. 1975. Chimie des champignons entomopathogènes - le beauvellide, nouveau cyclodepsipeptide isole d'un *Beauveria tenella*. *Phytochemistry* 14:2703-2705.

Goh, H. G., Lee, S. G., Lee, B. P., Choi, K. M. and Kim, J. W. 1991. Simple mass-rearing of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hbner) (Lepidoptera: Noctuidae), on an artificial diet. *Kor. J. Appl. Entomol.* 29:180-183.

Goettel, M. S., Eilenberg, J. and Glare, T. 2005. Entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect populations. In : Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS, (eds), *Molecular Insect Science*, Elsevier, New York, pp 361-405.

Hajek, A. E. and St. Leger, R. J. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annu Rev Entomol* 39:293-322.

Hamill, R. L., Higgins, C. E., Boaz, H. E. and Gorman, M. 1969. The structure of beauvericin, a new depsipeptide antibiotic toxic to *Artemia salina*. *Tetrahed Lett* 49:4255-4258.

Jeffs, L. B. and Khachatourians, G. G. 1997. Toxic properties of *Beauveria* pigments on erythrocyte membranes. *Toxicon* 35:1351-1356.

Kim, Y., Lee, J., Kang, S. and Han, S. 1997. Variation in insecticide susceptibilities of the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hbner): esterase and acetylcholinesterase activities. *Kor J Appl Entomol* 36: 172-178.

Kim, Y., Lee, J., Kang, S. and Han, S. 1998. Age variation in insecticide susceptibility and biochemical changes of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hbner). *J Asia Pac Entomol* 1: 109-113.

Kodaira, Y. 1961. Biochemical studies on the muscardine fungi in the silkworms, *Bombyx mori*. *J Fac Text Sci Technol Sinshu Uni Sericult* 5:1-68.

Krasnoff, S. B. and Gupta, S. 1994. Identification of the antibiotic phomalactone from the entomopathogenic fungus *Hirsutella thompsonii* var. *synnematosus*. *J Chem Ecol* 20:293-302.

Krasnoff, S. B., Gupta, S., St. Leger, R. J., Renwick, J. A. and Roberts, D. W. 1991. Antifungal and insecticidal properties of efrapeptins:

- metabolites of the fungus *Tolypocladium niveum*. *J Invertebr Pathol* 58:180-188.
- Lacey, L. A. 1997. Manual of Techniques in Insect Pathology. pp. 156-167
- Matha, V., Weiser, J. and Olejnicek, J. 1988. The effect of tolypin in *Tolypocladium niveum* crude extract against mosquito and blackfly larvae in the laboratory. *Folia Parasitol* 35:381-383.
- Mazet, I. and Vey, A. 1995. Hirsutellin A, a toxic protein produced in vitro by *Hirsutella thompsonii*. *Microbiol Reading* 141: 1343-1348.
- Omoto, C. and McCoy, C. W. 1998. Toxicity of purified fungal toxin hirsutellin A to the citrus rust mite *Phyllocopra oleivora*. *J Invertebr Pathol* 72:319-322.
- Ovchinnikov, Y. A., Ivanov, V. T. and Mikhaleva, I. I. 1971. The synthesis and some properties of beauvericin. *Tetrahed Lett* 2:159-162.
- Quiot, J. M., Vey, A., Vago, C. and Pais, M. 1980. Action antivirale d'une mycotoxine. Etude d'une toxine de l'hyphomycete *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. en culture cellulaire. *CR Acad Sci Ser D* (Paris) 291:763-766.
- Roberts, D. W. and Hajek, A. E. 1992. Entomopathogenic fungi as bioinsecticides. In : Leatham GF, (ed), *Frontiers in Industrial Mycology*. Chapman and Hall, New York, pp 144-159.
- Srisukchayakul, P., Wiwat, C. and Pantuwatana, S. 2005. Studies on the pathogenesis of the local isolates of *Nomuraea rileyi* against *Spodoptera litura*. *ScienceAsia* 31: 273-276.
- Suzuki, A., Kanaoka, M., Isogai, A., Murakpshi, S., Ichinoe, M. and Tamura, S. 1977. Bassianolide, a new insecticidal cyclodepsipeptide from *Beauveria bassiana* and *Verticillium lecanii*. *Tetrahed Lett* 25:2167-2170.
- Terry, B. J., Liu, W. C., Cianci, C. W., Proszynski, E., Fernandes, P., Bush, K. and Meyers, E. 1992. Inhibition of herpes simplex virus type 1 DNA polymerase by the natural product oosporein. *J Antibiotics* 45:286-288.
- Vey, A., Hoagland, R. E. and Butt, T. M. 2001. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In : Butt TM, Jackson C, Magan N, (eds), *Fungal Biocontrol Agents*, CABI Publishing, Wallingford, pp 311-346.