

### 삼림 토양으로부터 솔잎혹파리 감염 사상균의 분리

#### Isolation of Entomopathogenic Fungi for Infection to the Pine Gall Midges, *Thecodiplosis japonensis* from the Forest Soil in Korea

서종복<sup>1</sup> · 진병래<sup>1</sup> · 신상철<sup>2</sup> · 박호용<sup>3</sup> · 이범영<sup>2</sup> · 이창근<sup>2</sup> · 강석권<sup>1</sup>  
Jong Bok Seo<sup>1</sup>, Byung Rae Jin<sup>1</sup>, Sang Chul Shin<sup>2</sup>, Ho Yong Park<sup>3</sup>,  
Bum Young Lee<sup>2</sup>, Chang Keun Lee<sup>2</sup> and Seok Kwon Kang<sup>1</sup>

**ABSTRACT** To develop a microbial pesticide for the control of pine gall midges, *Thecodiplosis japonensis*, entomopathogenic fungi were isolated from 233 soil samples in the damaged region of *Thecodiplosis japonensis*, and identified with *Beauveria* spp. 29 strains and *Paecilomyces* spp. 2 strains. The morphology of entomopathogenic fungi was observed by scanning electron microscope. In addition, the toxicity of entomopathogenic fungi isolated from soil samples was determined by bioassay against *Thecodiplosis japonensis* larvae. The result showed that toxicity of relatively pathogenic strains, *Beauveria* spp. SFB-168-2 was 82.9%, suggesting that *Beauveria* spp. SFB-168-2 is effective entomopathogenic fungi for the control of pine gall midges.

**KEY WORDS** *Thecodiplosis japonensis*, entomopathogenic fungi

**초 록** 곤충병원성 사상균을 이용한 솔잎혹파리의 효과적인 방제법을 개발하기 위하여, 병원성이 강한 균주를 전국 산림토양으로 부터 분리·동정하고, 병원성 검정을 통하여 유효 곤충병원 사상균을 선발코자 하였다. 솔잎혹파리 다발 지역을 중심으로 전국으로 부터 233개 지역의 토양시료를 채취하여, *Beauveria*속 29균주, *Paecilomyces*속 2균주를 분리하였다. 분리된 균주는 위상차현미경 및 주사전자현미경으로 형태를 관찰하였다. 아울러 토양 분리 균주를 솔잎혹파리 유충에 대해 병원성을 검정한 결과, *Beauveria*속 SFB-168-2가 82.9%로 높은 병원성을 나타내어, 솔잎혹파리 방제를 위한 유효병원 사상균으로 선발하였다

**검색어** 솔잎혹파리, 곤충병원 사상균

솔잎혹파리(*Thecodiplosis japonensis* Uchida et. Inouye)는 우리나라 산림의 주종을 이루는 적송과 해송을 가해하는 주요해충으로 현재 제주 서귀포와 경북 울릉도까지 전국적으로 만연되어 그 피해는 21만 ha 이상으로 보고되고 있다(이 1995). 이렇게 전국적으로 막대한 피해를 주고 있는 솔잎혹파리의 방제는 약제살포, 침투성 약제의 수간주입 등에 의한 약제방제, 먹줄방 등의 천적사육 방사, 방충대 설치 등의 임업적 방제 및 포식성 천적의 이용 등 많은 시험연구와 노력이 이루어졌으나, 많은 인력의 소요,

천적증식을 위한 인공사육 기술의 한계, 방제시기의 제약 등의 문제로 효과적인 방제가 어려운 실정이다 (이 1995) 최근에 와서는 본 해충의 특이한 생태적인 특성을 고려할 때, 경피전염을 하는 곤충병원 사상균을 이용한 미생물적 방제법이 유력한 것으로 판단되어 이에 적합한 미생물 살충제의 개발이 절실히 요구되어 지고 있다(강 1995)

곤충에 병원성을 나타내는 사상균은 현재 약 700여종 이상이 보고되고 있으며(Hajek와 St Leger 1994), 그 중에서 *Beauveria bassiana*를 비롯한 십

<sup>1</sup>서울대학교 농업생명과학대학 농생물학과(Department of Agricultural Biology, College of Agriculture & Life Sciences, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea)  
<sup>2</sup>산림청 임업연구원(Forestry Research Institute, Forestry Administration, Seoul Korea)  
<sup>3</sup>KIST 생명공학연구소(Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology, KIST, Taejon, Korea)

여종의 유효한 사상균이 미생물 살충제로 개발되어 구미각국을 비롯한 여러 나라에서 원예, 목초, 산림의 해충방제에 이용되고 있다(岡田齊夫 1994). 그러나 솔잎혹파리 방제를 위해 *B. bassiana* 등 사상균의 이용은 아직 보고되지 않고 있다.

따라서, 본 연구에서는 우리나라에 극심한 피해를 주고 있는 솔잎혹파리의 미생물적 방제를 위해 전국적인 솔잎혹파리의 피해 지역을 대상으로 채집된 산림토양으로부터 솔잎혹파리에 강한 병원성을 나타내는 사상균 균주를 분리·동정하고, 병원성 검정을 통하여 유효 곤충병원 사상균을 선발하였다.

## 재료 및 방법

### 토양시료 및 솔잎혹파리의 채집

유효 곤충병원 사상균의 분리를 위한 토양 시료는 솔잎혹파리 다발지역의 토양과 그 외 산림토양을 각도별, 지역별로 분리하여 채집하였다.

또 본 실험에서 사용된 솔잎혹파리 유충은 산림청 임업연구원으로부터 분양 받았으며 한편으로 솔잎혹파리 피해지역 선단과 다발지역 솔잎에서 채집된 솔잎혹파리 유충을 톱밥과 함께 4°C 이하의 저온에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

### 곤충병원 사상균의 분리

채집된 토양으로부터 곤충병원 사상균의 분리는 토양시료를 petri-dish에 적당량 깔고 솔잎혹파리 유충을 접종한 뒤, 토양속 분생자의 출제 접촉을 유도하기 위하여 1일에 한번씩 잘 흔들어주며, 26±1°C, RH 80% 이상의 조건에서 배양하였다. 감염유충은 표면을 70% 에탄올로 살균한 후, Sabouraud Dextrose Agar 배지(Dextrose 4%, Bacto-peptone 1%, Yeast extract 0.2%, Agar 1.5%, pH 6.5)에 접종하고 사상균의 성장에 적당한 조건(26°C, RH 80% 이상)에서 배양하면서 곤충병원 사상균을 분리하였다.

### 위상차현미경 관찰

분리된 사상균의 위상차현미경 관찰은 slide glass 배양 방법을 이용하였다(Dhingra와 Sinclair 1985). 이러한 slide glass 배양은 petri dish의 바닥에 여과지를 깔 뒤, 바닥과 분리시키기 위하여 두개의 이

썬씨계를 놓고, 그 위에 깨끗한 slide glass를 두고, 멸균기로 멸균하였다. 멸균된 slide glass 위에 1 cm<sup>2</sup>으로 절단한 SDA+Y 배지를 올려놓고, 각각의 사상균을 접종한 뒤, slide glass에 cover slip을 접착시키고, 충분한 습도를 유지하면서 분생자가 형성될 때까지 10-15일간 배양하였다. 그 후 slide glass 위의 배지를 조심스럽게 제거한 후, 분생자병(conidiophore)에 부착되어 있는 분생자의 형태를 위상차현미경을 이용하여 관찰하였다

### 주사전자현미경 관찰

분리된 사상균의 주사전자현미경 관찰은 King과 Brown(1983)의 방법을 변형하여 사용하였다. 분리된 사상균을 두께 2 mm의 SDA+Y 배지에서 26±1°C, RH 80% 이상 조건에서 14일간 배양한 후, 5×5 mm으로 배지와 함께 분리하여 Petri dish 뚜껑(90×15 mm)에 접착시키고, 바닥에는 5 ml의 1% OsO<sub>4</sub> 용액을 넣고, 상온에서 2시간 동안 방치하여 혼중 고정을 실시하였다 그리고 4°C에서 15-20분 동안 0.1 M PBS(Phosphate Buffered Saline)로 3번 반복하여 세척하였다. 탈수과정은 에탄올 농도를 50%, 70%, 80% 및 90%에서는 각각 15분, 100%에서는 20분씩 3번 반복하여 탈수를 실시한 후, 에탄올과 propylene oxide의 비를 3:1로 15분, 1:3으로 15분, 100% propylene oxide에서 20분씩 3번 반복하고, 액체 이산화탄소에서 Critical Point Drying하여 건조시킨 뒤, 금으로 coating하여 주사전자현미경(Phillips SEM 515)으로 관찰하였다.

### 병원성 검정

병원성 검정은 Barson 등(1994)의 방법을 변형하여 사용하였다. SDA+Y 배지에서 20일 배양한 사상균을 0.02% Tween-80이 포함된 10 ml의 멸균증류수로 분생자를 현탁하고, 1분간 잘 흔들어서 분생자의 덩어리나 연결된 것을 분리시켰다 그리고 분생자의 농도를 혈구계수기를 사용하여 측정하고, 모두 10<sup>10</sup> conidia/ml 농도가 되게 현탁한 다음, 야외에서 채집된 솔잎혹파리 유충을 분생자가 포함된 현탁액에 5초간 침지시킨 후, 지름 9 cm의 petri-dish의 바닥에 여과지를 지름 8.5 cm의 원형으로 잘라 2 ml의 증류수로 가습된 여과지 위에 방치하

었다. 그리고 치사율은  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , RH 80% 이상의 조건에서 24시간 간격으로 30일간 조사하였다. 이때 사충수는 사충 체표면에서 균사가 발견되는 시점으로 결정하였다. 대조구는 0.02% Tween-80을 포함한 증류수에 처리 후, 상기와 동일한 방법으로 실시하였다. 본 실험에서 병원성 검정은 처리구당 각각 30개체의 솔잎혹파리 유충을 공시하여 3반복으로 처리하였다.

### 결과 및 고찰

#### 산림 토양으로 부터 곤충병원 사상균의 분리 및 동정

솔잎혹파리 유충에 병원성을 갖는 사상균을 분리하기 위하여, 솔잎혹파리 다발지역을 중심으로 전국 233개 지역에서 산림토양 시료를 채집하였다(Table 1). 채집된 산림토양 시료에서 곤충병원 사상균의 분리는 솔잎혹파리 유충을 이용하였는데, 그림 1에서와 같이 접종 1주일 후 부터 사상균에 의한 솔잎혹파리 감염 유충이 나타나기 시작하였다. 솔잎혹파리 감염 유충으로 부터 곤충병원 사상균은 Table 1에서 보는 바와 같이 *Beauveria*속 29균주와 *Paecilomyces*속 2균주가 분리되었다. 그러나 이러한 분리율은 지역에 따라 많은 차이를 나타내어 다양한 자연환경 조건에서의 지속적인 토양시료 채취와 곤충병원 사상균의 분리가 요구 되며, 또 토양 시료로 부터 곤충병원 사상균의 효과적인 분리를 위해 유

충의 총체표면이 넓은 다른 대체 숙주 곤충의 이용이 요구되어진다.

분리된 곤충병원 사상균의 동정은 먼저 colony의 형태 및 색깔별로 1차 screening하고, 위상차 현미경으로 형태를 관찰하였으며(Fig. 2), 또 주사전자현미경을 이용하여 분생자와 분생자병에 분생자의 부



Fig. 1. Infected larva of *Thecodiplosis japonensis* with *Beauveria* sp. isolated from the soil.



Fig. 2. Micrographs of conidia and conidiophores *Beauveria* sp (A) and *Paecilomyces* sp. (B) isolated from soil.

Table 1. Isolation of entomopathogenic fungi from forest soil infesting with *Thecodiplosis japonensis* in Kores

Sampling regions	No. of soil samples	Entomopathogenic fungi isolated (Number)
Kyunggi Prov.	15	<i>Beauveria</i> (1)
Kangwon Prov.	22	<i>Beauveria</i> (6)
Chungnam Prov	15	-
Chonbuk Prov.	18	<i>Beauveria</i> (1)
Chonnam Prov.	16	<i>Paecilomyces</i> (1), <i>Beauveria</i> (7)
Kyongbuk Prov.	43	<i>Beauveria</i> (3)
Kyongnam Prov.	70	<i>Beauveria</i> (8)
Cheju Prov.	34	<i>Paecilomyces</i> (1), <i>Beauveria</i> (3)

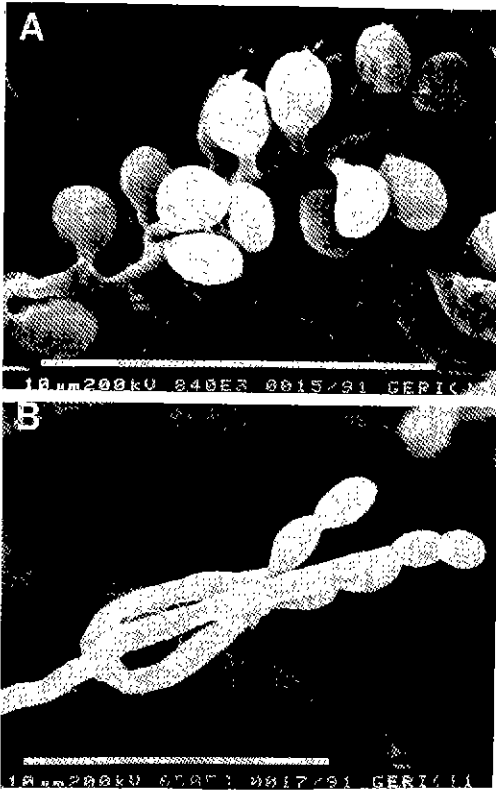


Fig. 3. Scanning electron micrographs of conidia of *Beauveria* sp. (A) and *Paecilomyces* sp. (B) isolated from soil.

착형태를 관찰하였다(Fig. 3). 그 결과, *Beauveria*속의 분생자병은 zig-zag rachis 위해 분생자가 형성되어 있는 전형적인 형태를 보였으며, 분생자는 지름이  $1.5 \pm 0.2 \mu\text{m} \times 1.8 \pm 0.2 \mu\text{m}$ 의 크기로 형태는 타원형 또는 구형이었다. 또한 *Paecilomyces*속의 경우는 분생자병이 하나로 불규칙하게 분지되어 있었으며, 그 끝부분에 분생자가 염주처럼 길게 형성되어 있고, 분생자는  $2.5 \pm 0.2 \mu\text{m} \times 3.0 \pm 0.3 \mu\text{m}$ 의 크기로 형태는 타원형이었다.

이상의 형태적인 특징은 靑木襄兒(1989)의 형태적인 특징에 따른 사상균 분리 동정 방법에서 나타난 *Beauveria*속과 *Paecilomyces*속의 전형적 특징의 형태를 보여주었다.

병원성 검정

토양 샘플로부터 분리된 사상균 균주는 각각

Table 2. Pathogenicity of the isolated *Beauveria* strains from soil to *Thecodiplosis japonensis* larvae

Strains	Isolated source	Mortality <sup>a)</sup> (%)
SFB-104	Kyongnam	63.2
SFB-144	Kyongnam	60.0
SFB-168-2	Chonnam	82.9
SFB-177	Chonnam	66.7
SFB-188	Kangwon	60.0
SFB-238	Cheju	68.4

<sup>a)</sup> $1.0 \times 10^6$  conidia of each strain was individually inoculated to *T. japonensis* larva.

SDA+Y 고체배지에서 배양하여 분생자를 현탁한 후, dipping방법에 의해 솔잎혹파리 유충에 개체당 약  $1 \times 10^6$  분생자의 비교적 낮은 농도로 접종하여 병원성 차이에 따른 유효 곤충병원 사상균을 선별하였다(Table 2). 그 결과, 분리된 균주는 병원성 검정에서 약 10%에서 82.9%로 다양한 병원성을 나타내었으며, 그 중 Table 2에서 나타난 것처럼 60% 이상의 치사율을 보인 *Beauveria*속 6균주를 선별하였다. 특히, 선별 균주 중 *Beauveria*속의 SFB-168-2는 82.9%로 높은 병원성을 나타내어 솔잎혹파리 방제를 위한 유효병원 사상균으로 기대된다

이상의 병원성 검정 결과로 볼 때, 이미 여러 보고들에서 *Beauveria* 균주내에서도 병원성 차이와 genomic DNA에 있어서 변이가 심한 것으로 알려져 있듯이(St. Leger 등 1992, Bidochka 등 1994, Shimane와 Kawakami 1994, Tigano-Milani 등 1995), 본 실험 역시 다양한 지역에서 분리된 균주는 병원성 역시 많은 차이를 나타내어 유효병원 사상균 분리를 위해 자연환경 조건이 다른 여러지역에서 토양 시료 채집과 곤충병원 사상균 분리 및 병원성 검정이 계속 요구되어진다.

사 사

본 연구는 과기처 특정연구 개발과제의 연구비 지원에 의해 수행되었음.

인 용 문 헌

Barson, G., N. Renn and A. F. Bywater. 1994. Labora-

- tory evaluation of six species of entomopathogenic fungi for the control of the house fly (*Musca domestica* L.), a pest of intensive animal units. *J Invertebr Pathol.* **64**: 107-113.
- Bidochka, M. J., M. A. McDonald, R. J. St. Leger and D. W. Roberts. 1994. Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *Curr Genet* **25**: 107-113.
- 青木裏兒. 1989. 昆蟲病原菌の檢索 全國農村教育協會. 東京
- Dhingra, O. D. and J. B. Sinclair 1985. Basic plant pathology methods CRC press, Inc Boca Raton
- Hajek A. E. and R. J. St. Leger. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts *Annu. Rev. Entomol.* **39**: 293-322
- 강석권 1995. 솔잎혹파리의 생물적방제 국가대책수립을 위한 조사연구 곤충병원미생물 이용 솔잎혹파리 방제 기술. pp. 125-154. 과학기술처.
- King, E. J. and M. F. Brown. 1983. A technique for preserving aerial fungal structures for scanning electron microscopy *Can. J. Microbiol.* **29**: 653-658
- 이범영. 1995. 솔잎혹파리의 생물적방제 국가대책수립을 위한 조사연구. 솔잎혹파리 방제효과의 평가 및 관리 전략. pp. 39-83 과학기술처.
- 이창근 1995. 솔잎혹파리의 생물적방제 국가대책수립을 위한 조사연구. 솔잎혹파리에 의한 산림 피해 및 해식 pp. 1-38 과학기술처
- 岡田齊夫 1994. 微生物的 防除の現状と 展望. 植物防疫 **48**(11): 449-454
- Shimane T. and K. Kawakami. 1994. Pathogenicity of an entomopathogenic fungus *Beauveria brongniartii* (Saccardo) Petch against the yellow-spotted longicorn beetle *Psacotheta hilaris* Pascoe and mycological characteristics of the fungus. *Bull Natl Inst Seric. Entomol Sci* **10**: 1-36.
- St. Leger, R. J., B. May, L. L. Allee, D. C. Frank, R. C. Staples, and D. W. Roberts 1992. Genetic differences in allozymes and in formation of infection structures among isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.* **69**: 89-101
- Tigano-Milani, M. S., R. J. Honeycutt, L. A. Lacey, R. Assis, M. McClelland and B. W. Sobral. 1995. Genetic variability of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates revealed by molecular markers *J. Invertebr. Pathol.* **65**: 274-282.

(1995년 9월 25일 접수)