

## 백강균(*Beauveria bassiana*)101A의 특성 및 가잠(*Bombyx mori*)에 대한 병원성 검정

정이연 · 남성희 · 조세연  
농촌진흥청 농업과학기술원 잠사곤충부

### Characteristics and pathogenicity of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*101A on the silkworm (*Bombyx mori*)

I-Yeon Jung, Sung-Hee Nam and Sae-Yun Cho

Department of Sericulture and Entomology, National Institute of Agricultural Science and Technology, R.D.A. Suwon 441-100, Korea

#### ABSTRACT

This study was carried out to investigate incubating characteristics, LTSEM observation, nature of a disease of infected silkworms(*bombyx mori*), LD<sub>50</sub>, optimum infective condition for mass production and infection percentage(%) on conservation periods. On the V8 media, the colony was 0.5~2.0 cm/8 days in diameter and white or slightly colored with a white fluffy to powdery appearance. The conidia was subglobose in shape, zig-zag appearance, 1-celled, hyaline and 3.2 × 2.4 μm in size on the average. The conidiophore was irregular grouped, hyaline, rounded or flask-shaped. The LD<sub>50</sub> values of the 2nd and 4th silkworms were each other 6.6142(Log), 7.0669(Log) in natural temperature and humidity (25°C, 65%). On optimum infective condition for mass production, all of preservation time(hr.) postinoculation in 1.0 × 10<sup>8</sup> conidia/ml was over 97% and only 20 hr in 1.0 × 10<sup>7</sup> conidia/ml was over 90%.

**Key words** : *Beauveria bassiana*, *Bombyx mori*

#### 서 론

곤충의 곰팡이병은 농림생태계에서 흔하게 발견되어지고 있으며 때로는 해충의 밀도를 자연적으로 크게 감소시키고 있다. 곤충병원성 곰팡이는 현재까지 100여속에서 약 700여 종으로 알려져 있으며(Roberts, 1989), 핵균강에 속하는 *Beauveria bassiana*를 포함한 많은 종류의 진균은 동물 뿐만 아니라 곤충에도 균음병을 일으키기 때문에(Tanada & Kaya, 1992) 이에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 한편 균음병은 포도, 배, 과자등의 향기를 뜻하는 이태리어에서 유래된 것으로(Steinhaus, 1949), 균음병에 감염된 곤충의 표피는 분생포자로 완전히 덮여지며, 백강균 즉 흰곰팡이병은 매뚜기목, 나비목, 딱정벌레목 등 기주범위 넓으며, Vuillemin(1912)에 의해 *Beauveria bassiana* 종으로 분류되고, 흰곰팡이병으로 기술되어졌다(Steinhaus, 1949). 이러한 곤충병원성 백강균은 해충의 저항성 및 환경오염을 방지하기 위한 미생물 농약개발 연구재료로 이용되어 왔다. 기주곤충의 표피를 통하여 내부로 침입하여 곤충의 면역작용을 차단하거나 독성물질을

분비하여 기주를 치사시키며(Bidochka & Khachatourians, 1987) 백강균으로부터 생성되는 독성물질과 균사와 포자가 기주곤충의 표피를 침투할 때 분비하는 곤충 큐티클 분해효소인 단백질 가수분해효소, 키틴 분해효소, esterase의 특성에 대한 연구 등(Ferron, 1985) 주로 병원성 검정으로 미생물 농약개발에 관심이 있었다. 또한 백강균에 감염된 백강잠은 예로부터 중풍, 두드러기, 목구멍의 종기, 어린아이의 급성경기 등의 치료에 한방약재로 이용되고 있다(동의보감, 1991).

본 연구는 기존의 백강균(*Beauveria bassiana*)과는 다른 병징과 누에 감염력이 우수하여 본균을 새로이 개발하여 누에(*Bombyx mori*) 유충에 경피접종하여 감염 누에유충의 병징 및 누에에 대한 병원력을 조사하였다.

#### 재료 및 방법

##### 1. 균분리 및 배양

본 시험에 공시한 백강균(*Beauveria bassiana*)101A은 '96 춘잠기 잠사곤충부 잠시양봉과 잠실에서 수집하였으며 감

염된 누에유충을 2% Sodium hypochloride로 소독후 PDA (PD 24 g, 한천 15 g, 증류수 1000 ml) 배지상에 포자를 떨어뜨려 10일간 배양, 분리하였다. 또한 접종원으로 사용한 분생포자를 현미배지(250 ml 삼각플라스크)에 재접종하여 24°C 항온기에서 20일간 배양, 생산하였다.

## 2. 백강균(*Beauveria bassiana*)101A의 특성

### 1) 배양특성

PDA배지 상에서 배양균을 0.5×0.5 cm 크기로 떼어내어 2.5% Glutaraldehyde(0.1 M Milonig's phosphate 완충액, pH 7.4)로 고정한 후 0.1 M Milonig's phosphate 완충액으로 3회 세척하고 1% Osmium tetroxide로 2차고정하였다. 그 후 에탄올 50, 75, 90, 95, 100% 순으로 탈수하고 amlyacetate용액으로 40분간 2회 치환하여 critical point dryer로 건조한 후 gold-palladium으로 coating하여 주사전자현미경(LEO 440형)으로 관찰하였다. 또한 V8배지(V8 야채쥬스 300 ml, CaCO<sub>3</sub> 4.5 g, agar 15 g, 증류수 800 ml)에서 분리한 균을 8일간 24°C에서 배양 후 colony의 형태 및 색깔의 변화를 조사하였다.

### 2) LD<sub>50</sub> 조사

현미배지(250 ml 삼각플라스크)에서 20일간 배양된 분생포자를 Tween20(Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate, 0.1 g/500 ml)으로 용해시킨 증류수로 희석하여 원심(3000 rpm, 5 min)추출하였으며, 얻어진 희석액을 혈구계수기(Hemacytometer)를 이용하여 1.0×10<sup>6</sup> conidia/ml, 1.0×10<sup>7</sup> conidia/ml, 1.0×10<sup>8</sup> conidia/ml, 1.0×10<sup>9</sup> conidia/ml 농도로 조정된 다음, 2령, 4령기잠(백옥잠)에 각 100두 3반복으로 반복당 30 ml/을 살포하고 표준누에 사육법으로 사육하였으며, Finney(1963)의 Probit 계산법에 따라 LD<sub>50</sub> 값을 구하였다.

### 3) 최적 감염조건 구명시험

대량 생산을 위한 최적 감염조건 구명을 위해 본시험을 실시 하였다. 처리방법은 시험구당 50두2반복의 5령기잠에 1.0×10<sup>7</sup> conidia/ml과 1.0×10<sup>8</sup> conidia/ml로 반복당 25 ml/을 살포하였으며, 처리구는 4개구로 살포후 27°C, 95%의 온·습도를 각각 1시간 10시간, 15시간, 20시간 유지하고 대조구는 살포후 자연 온·습도(25°C, 65%) 상태로 처리구와 대조구 모두 살포 24시간 후 급상하였다. 감염을 조사는 살포 후 매일 같은 시각 감염치사잠의 병징을 육안 및 현미경으로 관찰하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 백강균(*Beauveria bassiana*)101A의 특성

곤충 병원성곰팡이 백강균(*Beauveria bassiana*)101A의



(A)



(B)

Fig. 1. Infected silkworms(*Bombyx mori*) by *Beauveria bassiana* 101A, 72 h postinoculation(A) and 5 days postinoculation(B).



(A)



(B)

Fig. 2. Hyphae growth shape of *Beauveria bassiana*(A) and *Beauveria bassiana*101A(B).

Table 1. Formal characteristic features

Characteristic features	<i>Beauveria bassiana</i> [Gams et al. 1981]	<i>Beauveria bassiana</i> [KACC213200(H190)]	<i>Beauveria bassiana</i> 101A [Department of Sericulture and Entomology, 1997]
Colony	· 0.6-2.3(diameter)/8days, in 20 · White or slightly colored with a yellow fluffy to powdery appearance	· 0.6-2.0 cm(diameter)/8days, in 23°C · White or slightly colored with a white fluffy to powdery appearance · slightly yellow(behind)	· 0.5-2.0 cm(diameter)/8days, in 24°C · White or slightly colored with a white fluffy to powdery appearance · heavy yellow(behind)
Conidium	· Subglobose · 3-6×2.5-3.5 μm	· Subglobose · 4.0×3.0 μm	· Subglobose · 3.2-×2.4 μm
Conidiophore	· Conidiophores irregularly grouped, hyaline, rounded or flask-shaped-conidia zig-zag appearance, 1-celled, hyaline	· Conidiophores irregularly grouped, hyaline, rounded or flask-shaped-conidia zig-zag appearance, 1-celled, hyaline	· Conidiophores irregularly grouped, hyaline, rounded or flask-shaped-conidia zig-zag appearance, 1-celled, hyaline, dense clusters

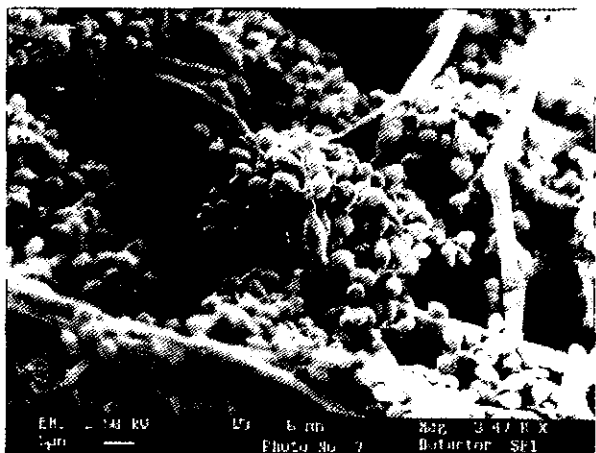


Fig. 3. LTSEM photograph of conidia and conidiophore of *Beauveria bassiana*101A.

특성조사에서 5령기잠에  $1.0 \times 10^8$  conidia/ml로 접종한 결과 접종 3일에 90% 이상의 누에가 머리를 90° 이상 뒤로 젖히고, 이때부터 식상을 중지 하였다. 또한 시간이 경과 될수록 표피에 검은 반점이 형성되었으며(Fig. 1), 접종 5 일경부터는 미이라 형태로 딱딱하게 굳으면서 표피는 분홍빛으로 변하였다. 누에(가잠) 치사체 표피에서 하얀균사가 성장하여 완전히 표피를 덮은후 2차적으로 다시 균사가 솟처럼 부풀게 성장하는 특징을 지닌다(Fig. 2).

한편 PDA배지 상에서 8일간 배양한 colony는  $\Phi 0.5 \sim$

2.0 cm로 분말상태의 미백색이었으며 colony 뒷면은 진한 노랑색을 띤다. 주사전자현미경하의 분생포자는 타원형으로 크기가 3.2~2.4 μm크기였다. 농업과학기술원 미생물 보존센터의 *Beauveria bassiana*(KACC213200)가 타원형(Subglobose)이며 크기가 4.0×3.0 μm로 분균과의 크기에 있어서 0.8~0.6 μm의 차이가 있었다(Table 1).

또한 분생자병(Conidiophore)(Fig. 3)은 둥근 플라스크 모양을 하며 여러개의 분생자병이 모여 군집을 이루고, 분생포자병은 지그재그 모양으로 발생하였다.

## 2. LD<sub>50</sub> 조사

V8 배지에서 배양된 균을 현미배지에 접종하여 24°C 항온기에서 20일간 배양한 것을 농도  $1.0 \times 10^6$  conidia/ml,  $1.0 \times 10^7$  conidia/ml,  $1.0 \times 10^8$  conidia/ml,  $1.0 \times 10^9$  conidia/ml로 경피접종 하였다. 2령기잠의 농도별 치사두수는 각각 9, 91, 99, 91두였고, 4령기잠에서는 8, 66, 83, 87두로 2령과 4령기잠의 LD<sub>50</sub>은 각각 6.6142와 7.0669로 령기가 낮을수록 LD<sub>50</sub> 값이 낮아졌다.

## 3. 최적 감염조건 및 균주 보존기간별 감염률

본 시험은 공시균의 곤충병원성이 우수하여 미생물을 이용한 생물적 해충방제제 개발 및 백강잠의 한약재 이용을 위한 경제적 감염조건 구명시험으로 백강균(*Beauveria bassiana*)101A을 대량생산하기 위해서는 현탁액을 많이

Table 2. LD<sub>50</sub> values of the 2nd and 4th silkworms

Instar	Section	Number	Concentration and motality(num.)				LD <sub>50</sub> (Log)
			$1.0 \times 10^6$ (conidia/ml)	$1.0 \times 10^7$ (conidia/ml)	$1.0 \times 10^8$ (conidia/ml)	$1.0 \times 10^9$ (conidia/ml)	
The 2nd		100	9	91	99	91	6.6142
The 4th		100	8	66	83	87	7.0669

※ Temperature and humidity : Natural temperature and humidity(25°C, 65%)

Table 3. Optimum infective condition for mass production

Concentration	Time(hr.)	Preservation time(hr.) postinoculation			
		1	10	15	20
$1.0 \times 10^8$ conidia/ml	-	98	97	100	100
	Control	97(100)			
$1.0 \times 10^7$ conidia/ml	-	73	73	79	93(131)
	Control	71(100)			

- 1) Control : Natural temperature and humidity(25°C, 65%)
- 2) Times : The 5th instar(spray inoculation)
- 3) Number of larvae : 50(number)×2(repetition)

Table 4. Infection percentage(%) of the 5th instar on conservation periods

Concentration	Period(days)	Immediately	30 days conservation		60 days conservation	
			Hulled rice	Mixed liquid	Hulled rice	Mixed liquid
$1.0 \times 10^8$ conidia/ml		99 %	97 %	98 %	91 %	87 %
$1.0 \times 10^7$ conidia/ml		75	66	64	58	49

- 1) Inoculated temperature and humidity : 27°C, 95%
- 2) Conservation temperature : 4 incubator

만들 수 있는 낮은 농도와 감염율이 높아야 한다. 이러한 조건을 구명하기 위해서  $1.0 \times 10^8$  conidia/ml과  $1.0 \times 10^7$  conidia/ml의 농도로 처리하였으며 접종후 처리 유지시간을 1시간, 10시간, 15시간, 20시간으로 처리한 결과  $1.0 \times 10^8$  conidia/ml의 농도에서는 처리 유지시간에 관계없이 97% 이상의 높은 감염율을 보였다.  $1.0 \times 10^7$  conidia/ml의 농도에서는 20시간 처리시간 유지구가 93%로 다른 처리 유지시간 구보다 감염율이 높았으며, 특히 대조구보다는 31% 높은 감염율을 보였다. 따라서 대량생산을 위해서는  $1.0 \times 10^7$  conidia/ml 농도에서 20시간 유지한 처리구가 적당한 것으로 생각된다. 배양균주 보존기간별 감염율은  $1.0 \times 10^8$  conidia/ml에서는 최고 12% 차이가 있었고  $1.0 \times 10^7$  conidia/ml에서는 최고 26% 차이가 있었다. 보존기간에 따라 큰 차이가 없으나, 보존기간이 길수록 감염율이 낮았다. 특히 60일 현탁액 보존균주의 감염율이 배양즉시에 비해 12% 낮았다.

## 적 요

백강균(*Beauveria bassiana*)101A의 배양 특성 및 감염 병징은 다음과 같다.

1. 접종누에 유충에는 백색의 균사와 분생포자(Conidium)만 형성되었고, 포자형태는 타원형으로 3.2~2.4 $\mu$ m크기로 분말상태의 미백색이었다. 분생자병(Conidiophore)은 둥근 플라스크 모양으로 여러개의 분생자병(Conidiophore)이 모여 군집을 이루고 분생포자 형성세포는 지그재그 모양으

로 자란다.

2. 2령기잠과 4령기잠의 LD<sub>50</sub>은 각각 6.6142, 7.0669였다.
3. 대량생산을 위한 최적 감염조건 구명시험에서는  $1.0 \times 10^7$  conidia/ml의 농도에서 27°C, 95%의 온·습도를 20시간 유지한 처리구가 경제적이고 감염율이 높았고  $1.0 \times 10^8$  conidia/ml 농도에서는 처리유지 시간에 따라 큰 차이가 없었다.
4. 배양균주 보존기간별 감염율은 낮은 농도에서는 보존기간이 길수록 감염율이 낮았다. 특히 60일 현탁액 보존균주의 감염율이 배양즉시에 비해 12% 낮았다.

## 참고문헌

- Bidochka, M. J., and Khachatourians, G. G. 1987. Hemocytic defense response to the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the migratory grasshopper *Melanoplus sanguinipes*. *Entomol. Exp. Appl.* 45 : 151-156.
- Ferron, P. 1967. Etude en laboratoire des conditions ecologiques favorisant le developement de la mycose a *Beauveria. tenella* du ver Blanc. *Entomophaga* 12(3) : 257-293
- Ferron, P. 1985. Fungal control. In "Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology."(G. A. Kerkut and L. I. Gilbert, eds.), Vol. 12, pp. 313-346. Pergamon Press, Oxford.
- Finney, D. J. 1963. *Statistical Methods in Bioassay*. Griffin, London.
- Roberts, D. W. 1989. World picture of biological control of fungi. *Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 84(Supl. III) : 89-100
- Steinhaus, E. A. 1949. "Principles of Insect Pathology." McGraw-Hill Book, New York.

백강균(*Beauveria bassiana*)101A의 특성 및 가잠(*Bombyx mori*)에 대한 병원성 검정

Tanada Y. and H. Kaya(1992). Insect pathology, Academic press.  
357-359.

*Paris Soc. Bot. Fr. Bull.* **59** : pp. 34-40.  
동의보감, 학력개발사(동의보감 편찬위원회.1991). 339 : 529-537.

Vuillemin, P. 1912. *Beauveria*, nouveau genre de Verticilliacées.