

눈꽃 동충하초균의 누에감염에 관한 연구

윤재수*

상주대학교 잠사곤충자원학과

요약 : 건강식품으로 각광 받고 있는 누에 동충하초균의 누에에 대한 병원성을 알아보기 위하여 동충하초균을 4령기잠에 접종 후 감염잠 발생율을 조사한 결과 10^7 /mm³ 시험구에서는 100%, 10^6 /mm³ 시험구에서는 96%, 10^5 /mm³ 시험구에서는 76%, 10^4 /mm³ 시험구에서는 44%, 10^3 /mm³ 시험구에서는 28% 10^2 /mm³ 시험구에서는 8%의 감염율을 나타 내었다. Probit법에 의한 생물검정 결과 감염효과는 LD₅₀ 값이 3.78×10^3 spores/mm³ 로서 생물 살충제로 개발 가능성이 높았다.(2000년 10월 23일 접수, 2000년 11월 8일 수리)

Key word : Silkworm, susceptibility, cordyceps, LD₅₀.

서론

사람들이 곤충의 질병에 관심을 갖게 된 것은 꿀벌, 누에 등과 같이 경제성 곤충에 관심을 갖게 되면서부터 시작되었을 것이다. 곤충에 질병을 일으키는 곰팡이 균은 약 500여종이 있다(福原, 1979)고 알려져 왔다. 이들 병원성 사상균을 이용하여 효율적인 방제 방법에 대하여 활발한 연구가 이루어지고 있다(Shiname and Kawakami, 1994; 岡田, 1994). 그 중에서 동충하초는 1726년 밤나방과 나방에서 California 대학의 생물적 방제 연구소 연구팀에 의하여 발견(George, 1974) 된 이래 현재 약 200여 종으로 반시목, 등시목, 직시목, 초시목, 인시목, 막시목, 쌍시목 등 많은 곤충에 기생한다. Steinhaus(1974), Yoshimori and Harry(1993), Ainsworth(1973) 등은 동충하초가 곤충 곰팡이병의 일종이며 해충방제의 가능성을 시사 하였다. 누에에 기생하는 눈꽃 동충하초는 자낭균 아문 핵균류강 맥각균목 동충하초속에 속하는 *Paecilomyces japonica* 균이다(남 등, 1999).

동충하초는 포자가 숙주곤충의 표피에 긴 자좌(stroma)를 형성한다. 자좌는 줄기모양의 병부와 선단의 결실부로 구분된다. 결실부에는 자낭이 형성되어 있고 자낭 속에 수많은 자낭포자가 내포되어 있고 성숙 자낭포자가 다격막으로 방출된 후에는 많은 구성 세포로 나누어진다(George and Thomas, 1982). 이 포자가 숙주곤충의 피부에 부착하면 점점 팽대해져 둥글게 되고 발아관을 형성하여 피부를 뚫고 신장한다. 혈 체강에 도달한 균사는 원통형으로 끊겨 떨어져서 단균사로 된다. 이 단균사는 체액의 유동을 따라 기주체 몸 속을 돌아다니고 출아법에 의하여 증식을 반복하여 체액 중에 증만하게 된다. 이와 같은 시기에 유조직이 파괴되고 시간이 지나면 감염 층이 죽게 된다(Steinhaus, 1949). 죽은 직후의 사체는 유연하지만 균사는 활발히 증식을 계속하여 조직 내를 중형으로 관통하여 1 - 2일 지나면 체강에 딱딱한 균사피를 형성하게 된다. 건조 상태에서는 이러한 상태로 수개월동안 균사의 생존이

가능하지만 적당한 습기를 만나면 균핵에서 자좌가 형성된다. 균사는 cordycepin 및 ophiocordin 이라는 항생 물질을 생산하여 병사체의 분해를 막고 virus 증식을 억제한다(성, 1996). 한의학에서는 불로장생의 비약으로 사용되어 왔을 뿐만 아니라 폐를 보호하고 신장을 튼튼하게 하며 정력을 증강하고 피를 멈추게하며 담을 삭이고 기침을 멎게 한다(謝, 1983; 陳, 1984)고 하여 널리 이용되어 왔다. 중국, 인도네시아 등지에서 건강식품, 의약품으로 사용되어 오고 있으며 오늘날에는 항균작용, 진정작용, 기관지 확장작용, 혈압 강하작용, 항암작용, 면역 증강작용, 항피로 작용, 염증 억제작용, 마약 해독작용 등에 관심을 갖고 연구되고 있다. 또한 생물 농약으로도 개발 가능성을 여러 각도에서 검정하고 있다. 화학 농약의 계속적인 사용으로 발생하는 생태계의 불균형적인 파괴와 여러 가지 나쁜 현상들을 억제 또는 감소시키기 위한 생물 농약의 개발이 더욱 강하게 요구되고 있는 현실에서 동충하초를 이용하여 해충을 방제하기 위한 노력이 계속되고 있다. 생물 농약으로서 동충하초가 갖는 장점은 화학 농약에 비하여 안전하고 생태계에 주는 영향이 적어 생태계의 균형을 깨뜨리지 않으며 화학농약이 단기적 속효성인데 비하여 장기적이고 지속적인 타방제 수단과 병용이 가능하여 종합적 관리 체계에 적용이 가능하고 대상 해충의 저항성을 가질 가능성이 적고 유전적 조작이 가능하다는 점이다(성, 1996). 동충하초를 이용한 해충방제제로서 가치와 가능성을 알아보기 위하여 누에에 대한 병원성을 조사 생물 검정하였다.

재료 및 방법

본 시험에 사용한 눈꽃 동충하초균은 대한잠사회에서 배분한 균을 누에에 접종하여 동충하초가 발생한 번데기를 5% 차아염소산소다(NaClO) 수용액(sodium hypochlorite solution)에 1분간 침지 후 멸균 증류수로 3회 반복 세척하고 70% alcohol에 30초간 침지하여 표면 소독을 행하였다(서 등, 1995; 靑島 등, 1984). 번데기에 발생한 동충하초균을 분리하기 위하여 충체를 여지를 깬 Petri dish에 넣고 멸균수를 주입하여 다습한 상태가 되도록 하고(靑島 등,

*연락처

1984) 25°C에 보존하면서 자작가 충분히 자라도록 하여 자낭포자가 형성되도록 환경 조건을 만들어 주고 멸균 핀셋으로 균사체를 잘라내어 포자괴를 분리하였다. 포자괴의 포자가 균일하게 분산되도록 0.02% Tween 80(sigma)수용액을 포자 한 loop 당 약 0.2 ml를 가하여 200회 이상 진탕한 후 현탁액으로 사용하였다. 현탁액의 농도는 Toma 혈구 계산기를 사용하여 현탁액이 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 spores/mm³가 되도록 희석하였다(이 등, 1994). 각 농도별로 시험구를 설정하였다. 각 농도별로 현탁액을 50ml씩을 준비하고 백옥잠 4령 인누에를 각구 25두씩 선발한 다음 침지법으로 접종하였다. 접종한 누에는 포자가 몸에 부착하기 쉽도록 6시간동안 상온에 둔 후 상자에 넣고 보통 상엽육으로 4, 5령 누에를 사육하면서 매일 오전 10시와 오후 8시에 병잡 발생을 조사하였다.

결과 및 고찰

포자의 형태 관찰

누에 번데기 표면에 형성된 균사체에서 포자를 분리하여 현미경 하에서 관찰한 결과는 그림 1과 같다.

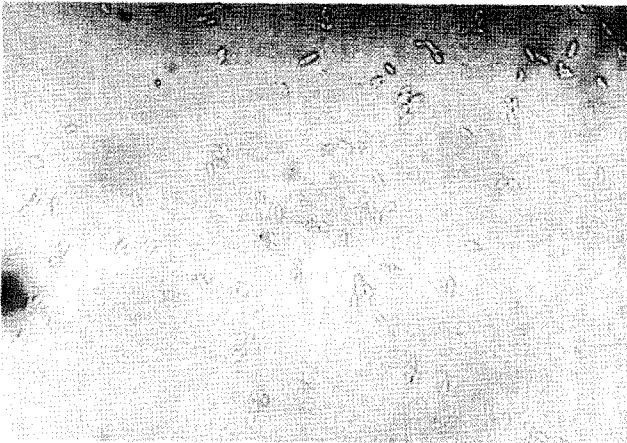


Fig. 1. Spores of *Cordyceps, Paecilomyces japonica*.
(Elliptical spore: $3.12 \sim 4.78 \times 1.21 \sim 2.53 \mu\text{m}$)

그림 1에서 알 수 있는 것과 같이 포자의 형태는 장타원형으로 미립자 포자와 유사하였다. 크기는 $3.12 \sim 4.78 \times 1.21 \sim 2.53 \mu\text{m}$ 이었다. 이것은 남 등(1999)이 조사한 포자의 크기 $2.98 \sim 6.61 \times 1.20 \sim 2.56 \mu\text{m}$ 보다 장경이나 단경의 범위가 좁았다. 번데기 표면에 형성된 균사체에서 균사괴를 잘라내어 0.02% Tween 80 을 함유한 수용액에 일정 농도가 되도록 조정하여 4령 인누에에 접종하고 보통 상엽육을 하면서 병징의 발현 상태를 조사하였다. 접종균의 병원성은 Bliss의 probit 법에 의하여 검정하였다(正野, 1980; 菅原, 1967; 渡部, 1966).

병징의 발현

동충하초균은 습도와 온도가 높은 하절기인 6~9월에 포자가 곤충의 호흡기, 몸 표면의 부드러운 곳에 부착 발아한 다음 체벽을 침입하여 곤충에 피해를 준다(농촌진흥청,

1998)고 하였으나 누에 4령기에는 침입증상을 발견하기 어려웠고 주로 5령때에 병잡이 발생되었다. 감염된 누에 피부의 곳곳에 균의 침입반점이 나타났다(그림 2). 침입반점은 기문주위 또는 피부의 마디를 중심으로 형성되어 전형적인 균음병균의 현상을 나타내었다. 병원인 동충하초균의 침해를 받은 5령 7일째 누에는 발육이 저하되어 정상 발육 누에 체중은 20두 평균하여 4.6g 이었으나 감염누에는 2.5g으로 정상 발육 누에에 비하여 절반정도의 체중 밖에 되지 않았다. 감염누에의 체중이 감소하고 성장이 늦어지는 점을 감안하면 동충하초균은 누에에게는 무서운 병원성을 갖고 있었다. 병잡은 힘이 없고 자리를 배회하며 먹이를 먹지 않다가 2~3일 뒤에 죽는 경우가 있었다.



Fig. 2. 5th instar silkworms infected with cordyceps.
(IS: infected spot, S: spiracle)

죽은 다음에는 사체의 표면에 전반적으로 붉은 색을 나타내다가 시간이 지나면 경화되고 균사가 체외로 나오기 시작하면 흰색으로 변화되었다. 그러나 몸 표면상에 눈꽃모양의 균사체는 형성하지 않고 포자괴가 형성되었다(그림 3)

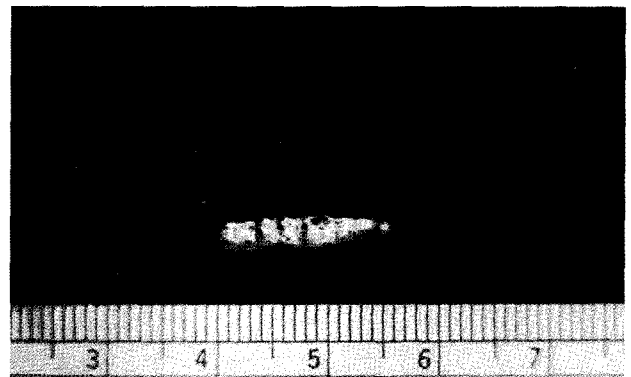


Fig. 3. Dead silkworm after infected with cordyceps in 5th Instars.

병잡의 발생 상황

4령인 누에에 포자를 접종한 후 경과에 따라 병잡 발생수를 조사한 결과는 표 1과 같다.

Table 1. susceptibility of infection in the silkworm larvae inoculated with entomopathogenic fungus cordyceps, *Paecilomyces japonica*

Instar	Day	Concentration of spores/mm ³						
		10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	Control
4th ^{a)}	1	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0
	3	1	0	0	0	0	0	0
	4	1	1	0	0	0	0	0
	5	2	1	1	0	0	0	0
Subtotal		4	2	1	0	0	0	0
5th	1	0	0	0	0	0	0	0
	2	2	1	1	0	0	0	0
	3	2	2	1	0	0	0	0
	4	7	3	5	2	0	0	0
	5	6	6	4	1	2	0	0
	6	4	6	4	3	2	0	0
	7	×	4	3	5	3	2	0
Subtotal		21	22	18	11	7	2	0
Total		25	24	19	11	7	2	0
Infectivity		100	96	76	44	28	8	0

^{a)}Each block represents number of larvae infected among 50 larvae.

표 1을 살펴보면 누에 4령기의 병잠 발생은 10⁷ spores/mm³ 시험구에서 포자접종 3, 4일째, 각각 1마리씩, 5일째 2마리, 모두 4마리의 병잠이 발생하였고 10⁶ spores/mm³ 시험구에서는 4일, 5일째 각각 1마리씩 병잠이 발생하였다. 그리고 10⁵ spores/mm³ 시험구에서는 5일째 1마리의 병잠이 발생하였다. 10⁴, 10³, 10² spores/mm³ 시험구와 대조구는 병잠이 발생하지 않았다. 즉 4령기에는 접종 누에 150마리 중 7마리만 병잠이 발생하였다.

5령기 누에의 병잠 발생은 첫날인 인누에는 전구에서 병잠 발생이 없었다. 10⁷ Spores/mm³ 시험구에서는 5령 2, 3일째 각각 2마리, 4일째 7마리, 5일째 6마리, 6일째 4마리의 병잠이 발생하여 100%인 공시 누에 모든 개체가 발

병하였다.

10⁶ Spores/mm³ 시험구에서는 5령 2일째 1마리, 3일째 2마리, 4일째 3마리, 5일째 6마리, 6일째 6마리, 7일째 4마리가 발병하여 전공시 누에의 96%가 병잠으로 되었다.

10⁵ spores/mm³ 시험구에서는 5령 2일째 1마리, 3일째 1마리, 4일째 5마리, 5일째 4마리, 6일째 4마리, 7일째 3마리의 병잠이 발생하여 도합 18마리가 병들어 76%의 병잠율을 나타내었다. 상족 잠은 7마리였다.

10⁴ spores/mm³ 시험구에서는 5령 4일째 2마리, 5일째 1마리, 6일째 3마리, 7일째 5마리가 병잠화 되어 44%의 발병율을 나타내었다. 상족잠은 14마리였다.

10³ spores/mm³ 시험구에서는 5령 5, 6일째 각각 2마리씩 병잠이 발생하였고 7일째 3마리가 발병하여 28%의 병잠율을 나타내었다.

10² Spores/mm³ 시험구에서는 5령 7일째 2마리가 발병하여 8%의 병잠율을 보였다. 대조구에서는 병잠 발생이 없었고 전수가 상족되었다. 이러한 현상은 윤(윤, 1997)이 *Beauveria bassiana* 균의 병원성 시험 결과에서 보여준 10⁴ spores/mm³에서 28%를 감염시킨 현상과 비교하면 병원성이 강하게 나타났다.

병원성 검증

곤충실험 결과를 정리하는 데는 여러 가지 방법이 있지만 실험실내의 경우 Bliss(1934)가 제창한 probit법이 계산은 복잡하지만 높은 정확성 때문에 많이 이용되고 있어(渡部, 1966; 菅原, 1967; 正野, 1980) 본 시험 성적도 Bliss의 probit법에 따라 검증하였다. Bliss의 probit 법에 따라 검증한 경험 probit, 기대 probit, 수정 probit는 표 2와 같다. 표 2를 응용하여 회귀 방정식을 구하면 Y=6.24 + 0.93 (X-4.9)이다. 이 회귀방정식의 적합성을 χ^2 검정으로 검증한 결과 $\chi^2=0.667$ 이며 χ^2 표에서 유의 수준 5%, 자유도 3에서 $\chi^2(0.05, 3)=7.81$ 로 검증값 0.667 보다 크기 때문에 회귀방정식은 적합하다고 판정할 수 있다. 이 회귀방정식을 이용하여 유효도를 계산하면 LD₅₀=3.78×10³ spores/mm³였다. 이상의 결과로서 누에 동충하초균은 곤충의 구제 약제로서 개발 가능성이 충분히 있다고 사료된다. 그리고 누에 애벌레에 동충하초균이 성장하면 건강식품으로 활용하고 동충하초균이 성장하지 않아도 해충구제용으로 활용 가능하다. 누에 병사충을 적절히 처리하면 누에 유통 동충하초로 이용가능성이 있어 계속적인 연구가 필요하다.

Table 2. Calculation table of regression equation for bioassay of cordyceps

Block spores/mm ³	Tested larvae	Infected larvae	Susceptibility	Empirical probit	Expected probit	Corrected probit
10 ⁷	25	25	100	-	-	-
10 ⁶	25	24	96	6.751	6.485	6.707
10 ⁵	25	19	76	5.706	5.923	5.691
10 ⁴	25	11	44	4.849	5.264	5.151
10 ³	25	7	28	4.717	4.347	4.422
10 ²	25	2	8	7.595	3.097	3.881
Standard	25	0	0			

감사의 글

본 연구를 수행하도록 연구비를 지원하여 주신 상주대학교 산업과학기술 연구소에 감사를 드립니다.

인용문헌

- Ainsworth G. C. (1973) Fungal parasites of invertebrates, The Fungi Vol. III, pp.94~126, Academic press INC, U.S.A.
- George E. Cantwell (1974) Mycoses, Insect Disease Vol. 1, pp.185~230, Marcel dekker, INC, U.S.A.
- George O. Poinar, Jr. and Gerard M. Thomas (1982) Key to common genera, Dignostic manual for the identification of insect pathogens. pp.12~17, Plenum press, Newyork, USA.
- Shimane, K and K. Kawami (1994) Pathogenicity of an entomogenous fungus *Beauveria brongniartii*(saccardo) patch against the yellow-spotted longicorn beetle *psacotha hilaris pascoe* and mycological characteristics of the fungus, Bull. Natl. Inst. seric. entomol. sci. 10:1~36
- Steinhaus, E. A. (1941) Cordyceps infections, Principle of insect pathology, pp.351~359, McGraw - Hill Book, N. Y.
- Yoshimori Tanada, Harry K. Kaya (1993) Fungal infections, Insect Pathology, pp.320~363, Academic Press INC, U.S.A.
- 青島清雄, 椿啓介, 三浦廣一郎 (1984) 昆蟲寄生菌類, 菌類研究法 共立出版株式會社, pp.259~267, 日本福原敏彦 (1979) 眞菌病, 昆蟲病理學, pp.77~102, 學會出版 Center, 日本
- 岡田齊夫 (1994) 微生物防除の現状と展望, 植物防役 48:449~454.
- 正野俊夫 (1980) 殺蟲試驗, 昆蟲試驗法, pp.146~152, 學會出版 center, 東京
- 菅原寛夫 (1967) プロゼットの計算, 昆蟲試驗法, pp.700~707, 日本植物防役協會, 東京
- 渡部 仁 (1966) 家蠶における細胞質多角體病ウイルスに対する抵抗性のプロゼット法による検定日本蠶絲學雜誌, 35:289~295
- 남성희, 정이연, 지상덕, 조세연 (1999) 눈꽃동충하초의 형태 및 배양조건, 한국잠사학회지 41(1):36~40
- 농촌진흥청 (1998) 동충하초버섯의 특징과 재배기술, pp.3~22, 상록사
- 사 관 (1983) 증편, 동약의학대사전, pp.167~168, 고문사
- 서중복, 진병래, 윤형주, 마영일, 강석권 (1995) 뽕나무하늘소로부터 *Beauveria*속 사상균의 분리 및 PCR에 의한 동정, 한국잠사학회지 37:167~171
- 성재모 (1996) 동충하초균을 이용한 해충방제, 한국의 동충하초, pp.280~283, 교학사
- 윤재수 (1997) 치잠 기생 *B. b.* 균에 관한 연구, 상주대 연구논총, pp.31~40
- 이인기, 서중복, 진병래, 신상철, 박호용, 이범영, 이창근, 우수동, 강석권 (1996) 곤충 병원성진균의 대량배양체계에서의 성장률, 한국잠사학회지 38:150~153.
- 진재인 (1984) 증편, 도설한방의약대사전 4 권, pp.170~173, 동도문화사

Studies on Infectivity of Cordyceps, *Paecilomyces japonica*, on the Domestic Silkworm, *Bombyx mori*.

Yun, Jae - Su (Dept. of Sericulture and Entomology Resources, Sangju university, Sangju city, Keungbuk, 742-170, Korea)

Abstract : This study was carried out to investigate infection process, symptoms and LD₅₀ values of the entomopathogenic fungus cordyceps, *Paecilomyces japonica*, on the domestic silkworm, *Bombyx mori*. Susceptibility of infection in the silkworms by cordyceps, *Paecilomyces japonica*, was 100% in 10⁷ block, 96% in 10⁶ block, 76% in 10⁵ block, 44% in 10⁴ block, 28% in 10³ block and 8% in 10² block. Cordyceps, *Paecilomyces japonica*, was highly infectious to the silkworms. A pathogenicities of cordyceps, *Paecilomyces japonica*, may be highly virulent because of the low resistance or high susceptibility of the silkworms. Dosage of the pathogen of LD₅₀ was 3.78×10³ spores mm⁻³.

*Corresponding author (Tel : 054-530-5213, E-mail : jsyoun@sangju.ac.kr)