韓應昆誌 42(1): 65~70 (2003)
Korean J. Appl. Entomol.

흰점박이꽃무지로부터 *Metarhizium*속 사상균의 분리 및 ribosomal DNA 염기서열에 의한 동정

최지영 · 김철학[1] · 제연호[2] · 최영철 · 김종길 · 박규택[1] · 김근영*

농촌진흥청 농업과학기술원 잠사곤충부, [1]강원대학교 농업생명과학대학, [2]서울대학교 농생명공학부

Identification of *Metarhizium* sp. Isolated from *Protaetia brevitarsis seulensis* (Kolbe) Using Ribosomal DNA Sequence

Ji Young Choi, Cheol Hak Kim[1], Yeon Ho Je[2], Young Cheol Choi, Jong Gill Kim, Kye Tek Park[1] and Keun Young Kim*

Department of Sericulture and Entomology, National Institute of Agricultural Science and Technology, R.D.A. Suwon 441-100, Republic of Korea
[1]Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Republic of Korea
[2]School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Suwon 441-744, Republic of Korea

ABSTRACT : For the purpose of the protection of beneficial insects from pathogens and the development of control agent against pests, a strain of *Metarhizium* sp. was isolated from the infected *Protaetia brevitarsis seulensis* larvae in Korea. Under the scanning electron microscope, the isolate, *Metarhizium* sp. KMA-1, showed distinct formation of conidia on the palisade-like masse which were comprised of elongate chains and this shape is a typical feature of *Metarhizium* species. PCR techniques were used to identify the isolate and the primers used were designed on the basis of two kinds of rRNAs sequences, 28S rRNA and internal transcribed spacer(ITS). The specific PCR products from each primer set were amplified and the DNA sequences were determined for the similarity comparison. Sequence alignment of these fragments using GenBank database resulted in the highest homology similarity between the isolate *Metarhizium* sp. KMA-1 and *M. anisopliae*. From these results, the isolate *Metarhizium* sp. KMA-1 in this study was identified as *M. anisopliae*.

KEY WORDS : *Protaetia brevitarsis seulensis*, Fungi, Pathogen, Conidia, 28S rRNA, ITS

초 록 : 곤충자원의 대량사육을 위한 병 발생 예방과 해충의 효과적인 방제를 위하여 흰점박이꽃무지 이병충으로부터 곤충병원 사상균을 분리하였다. 전자현미경 관찰 결과 분리균주 KMA-1은 *Metharizium*속의 전형적인 쇠사슬형의 분생자를 paliside-like masse에 형성하였다. 따라서, 정확한 동정을 위하여 28S rRNA와 ITS 염기 서열을 바탕으로 제작한 특이 프라이머쌍을 사용하여 PCR 반응을 수행하였다. 각각의 프라이머쌍을 사용한 PCR 반응으로부터 특이 밴드가 검출되었으며 이 증폭 산물들의 염기 서열을 결정, 비교하였다. 분리 균주 KMA-1의 PCR 산물인 28S rRNA와 ITS DNA 염기서열을 GenBank 데이터베이스에 등록된 염기서열 정보와의 상동성을 검색한 결과, 모두 *Metarhizium anisopliae*와 가장 높은 서열 상동성을 보였다. 이상의 결과로서 본 실험에서 분리 · 명명된 KMA-1는 *M. anisopliae*로 동정되었다.

검색어 : 흰점박이꽃무지, 곤충병원사상균, 분생자, 28S rRNA, ITS

*Corresponding author. E-mail: kimky@rda.go.kr

서 론

꽃무지류의 유충은 예로부터 간질환 치료제로 이용되어 왔으며, 최근들어 국내에서도 꽃무지 유충의 약리적 연구 및 유용물질의 탐색 등이 진행되고 있다(Park *et al.*, 1994; Kang *et al.*, 2000). 또한 정서곤충 산업화의 일환으로 나비류나 풍뎅이류 등이 대량사육되어 판매되어지고 있다.

*Metarhizium anisopliae*는 Deuteromycota문, Hyphomycetes강에 속하는 토양서식곰팡이로서 포자형성 콜로니가 짙은녹색을 띠며, 대략 200종의 곤충과 다른 절지동물이 감염되는 것으로 보고되고 있다(Boucias and Pendland, 1998). 일반적으로 *Metarhizium anisopliae*의 체내침입은 주로 경피적으로 일어나며 기계적 압력과 효소에 의한 분해작용을 통해 체벽(cuticle)을 통과하고(Boucias and Pendland, 1998), 큐티클의 지질에서 영양분을 얻을 수도 있으며, 낮은 습도조건(< 50 %)에서도 분생포자를 퍼뜨릴 수 있기 때문에 전파력이 매우 뛰어나다(Sosa-Gomez *et al.*, 1997). 치사원인으로는 독소가 주원인인 것으로 보고되며 dextruxin A, B, C, D, E 등이 알려져 있다(Cerenius *et al.*, 1990; Dumas *et al.*, 1996). 기주곤충이 폐사하면 균사는 부생적으로 왕성히 번식하고, 이후 체내의 균사가 체벽의 얇은 몸마디 사이부분이나 기문부분을 통해 밖으로 나와 분생자병을 내고 분생자를 형성한다(Hanel, 1982; Glare *et al.*, 1996).

불완전균류의 속과 종의 분류기준은 분생자, 분생자병 등의 외부형태 특징에 의존하여 왔으나(Tulloch, 1976), 최근들어 형태적 특징과 더불어 분자생물학적 계통분류 기준을 첨가하여 체계적인 유연관계를 구명하고 있다. RFLP 분석(Pipe *et al.*, 1995)이나 rDNA 염기서열 비교(Curran *et al.*, 1994) 그리고 RAPD (Leal *et al.*, 1994)방법 등이 많이 이용되고 있다. 그 중 rDNA 염기서열의 의한 계통분류방법이 많이 응용되는데 그것은 모든 생물종 내에 고루 편재되어 있으며 종에 따라 수백에서 수천까지 보존적인 염기서열을 가지고 있으나 noncoding 영역은 종속간에 다양성을 나타내기 때문이다(Anderson *et al.*, 1989; Suh *et al.*, 1993). 특히, 비교적 진화속도가 빠른 Internal transcribed spacer (ITS)와 28S rDNA D3 region의 염기서열 분석이 계통적 유연관계 추정이나 동정에 유용하게 이용되고 있다(Driver *et al.*, 2000).

한편, 곤충병원 사상균은 지금까지 약 800여종이 보고되고 있으며, 미생물살충제로는 주로 불완전균류가 이용되고 있다. 사상균은 세균이나 바이러스와는 달리 경피감염을 하기 때문에 경구감염이 어려운 선충, 가루이, 진딧물, 응애 등 흡즙성 해충들을 효과적으로 방제할 수 있어, 앞으로의 미생물살충제 개발 가능성이 높다(Knudsen *et al.*, 1991).

따라서, 본 연구에서는 곤충자원의 안정적인 대량사육을 위한 병 발생 예방차원뿐만 아니라 해충의 효과적인 방제법 개발을 위한 기초연구로서, 곤충에 강한 병원성을 보이는 *Metarhizium*속 균주를 흰점박이꽃무지 이병충으로부터 분리하고, 분리된 사상균의 분생자를 중심으로 주사전자현미경으로 그 형태를 관찰하였으며, 또 분자수준에서의 동정을 위하여 rDNA 염기서열을 이용하여 다른 종과의 상동성을 비교 분석하였다.

재료 및 방법

곤충병원 사상균의 분리

강원대학교 자원생물환경학부 곤충분류연구실에서 인공사육 중 이병된 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis seulensis* (Kolbe)) 유충으로부터 사상균을 분리하기 위하여, 이병충을 70% 에탄올에 담궈 10초간 표면 소독한 후 멸균증류수로 3번 씻어낸다. 내부조직을 잘라내어, yeast extract가 포함된 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, 80% R.H.)에서 배양하면서 병원 사상균을 분리하였다.

주사전자현미경 관찰

분리된 곰팡이의 주사전자현미경 관찰은 King & Brown (1983)의 방법을 변형하여 사용하였다. 분리된 곰팡이를 두께 2 mm의 SDA+Y 배지에서 26±1°C에서 14일간 배양한 후, 5×5 mm 크기로 배지와 함께 분리하여 petri-dish 뚜껑(90×15 mm)에 접착시키고, 바닥에는 5 ml의 2% OsO_4 용액을 넣고, 상온에서 2시간 방치하여 훈증고정을 실시하였다. 탈수과정은 에탄올 농도를 20%, 70%, 80% 및 90%에서는 각각 20분, 100%에서는 20분씩 3번 반복하여 탈수한 후, 액체 이산화탄소 Critical Point Drying하여 건조시킨 뒤 금으

로 coating하여 주사전자현미경(LEO 1420 VP)으로 관찰하였다.

Genomic DNA 분리

SDA+Y 배지에서 14일간 배양한 각 균주의 분생자를 수거하여, yeast extract가 포함된 Sabouraud Dextrose Broth (Dextrose 2%, Bacto-peptone 1%, Yeast extract 0.2%)의 100 ml 삼각플라스크에 접종한 후 26 °C, 150 rpm에서 7일간 진탕배양하였다. 배양된 균사체는 3,500 rpm에서 20분간 원심분리하여 수거한 뒤 액체질소를 첨가해 마쇄하였다. 마쇄한 균사체를 25 mg 취하여 Qiamp Tissue Kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 제조회사의 방법에 따라 DNA를 분리하였다. 분리한 DNA는 −20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

PCR 증폭

PCR에 사용된 Primer는 Nunn *et al.* (1996)에 보고된 28S rRNA의 D3 expansion region (D3A: 5′-GACCCGTCTTGAAACACACGGA-3′과 D3B: 5′-TCCGGAAGGAACCAGCTACTA-3′)을 사용하였으며 template DNA 1 μl (50 ng/μl)와 각각의 프라이머는 1 μl (50 pmol)를 취하여 Premix (한국바이오니아)를 이용하여 증폭하였다. PCR 반응조건은 initial denaturation step은 95°C에서 2분, denaturation, annealing 그리고 extension time은 각각 95°C에서 30초, 61°C에서 30초, 72°C에서 1분간 35회 반복하고, 마지막으로 72°C에서 10분간 반응시켜(Biometra PCR Thermal Cycler) 종료하였다. ITS region은 White *et al.* (1990)에 보고된 ITS 1 (5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′)과 ITS 4 (5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′)를 사용하였다. PCR 반응조건은 initial denaturation step은 95°C에서 2분, denaturation, annealing 그리고 extension time은 각각 95°C에서 30초, 56°C에서 30초, 72°C에서 1분간 35회 반복하고, 마지막으로 72°C에서 10분간 반응시켜(Biometra PCR Thermal Cycler) 종료하였다.

DNA 회수 및 PCR 산물의 클로닝

염기서열 분석 목적으로 사용될 PCR product DNA는 Gel Extraction kit (Qiagene, German)를 사용하여 제조회사의 방법에 따라 회수하여 pGEM-T easy vector system (Promega Co.)을 이용하여 재조합하였다. 25 ng의 PCR 산물, 50 ng의 vector, 3 unit의 T4 DNA ligase, 1 μl의 10×buffer 및 증류수를 혼합하여 전체 부피를 10 μl로 맞춘 후 4°C에서 6시간 반응시킨다. 재조합된 벡터의 형질전환을 위해 2 μl의 반응물과 50 μl competent cell (JM 109, Promega Co.)을 혼합하고 얼음에 20분간 둔 다음, 42°C에서 45-50초간 열충격을 가하고 세포를 LB배지에서 1시간동안 진탕배양(200 rpm)한 다음 원심분리(12,000 rpm, 1 min.)하여 적당량의 LB에 현탁한 후 ampicillin이 첨가된 LB 고체배지에 도말하였다. blue/white screening에 의해 선발된 white colony를 배양하여 유전자 단편의 삽입 여부를 확인하였다.

염기서열 결정 및 분석

형질전환된 *E. coli* colony를 취해 ampicillin이 첨가된 50 ml의 LB배지에 배양한 후 Wizard Plus SV Minipreps kit (Promega Co.)를 이용해 plasmid DNA를 분리·정제하였다. 자동 염기서열은 ABI prism 377 DNA sequencer를 사용하였으며, cycling sequencing은 terminater ready reaction mixture 8 μl와 template DNA (500 ng/μl), primer 2 μl (3.0 pmol), 그리고 증류수를 첨가하여 전체 20 μl volume으로 맞춰 PCR에 사용하였다. 염기서열 결정에 사용한 primer는 T7 primer와 SP6 primer이며, 94°C에서 5분간 denaturation하여 1.5 μl씩 loading, 7시간 동안 running하여 염기서열을 결정하고 GenBank에 등록하였다(Accession No. AY237118, AY237119). 결정된 염기서열 분석은 DS Gene software (Accelrys Inc. USA) 을 이용하였고, GenBank database에 등록된 정보를 대상으로 Blast program (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)에 의해 실행하였다.

결과 및 고찰

사상균의 분리

흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis seulensis* (Kolbe)) 이병충으로부터 곤충병원 사상균의 분리는 인공사육 중 사상균에 의해 이병된 꽃무지 유충 개체를 70% 에탄올로 표면 살균하고, SDA+Y 배지에서 배양함으로서 분리하였다. 곤충병원 사상균에 감염된 유충

Fig. 1. *Protaetia brevitarsis seulensis* (Kolbe) larvae infected with *Metarhizium* sp. KMA-1. A, Early; B, Middle; C, Late.

Fig. 2. Scanning electro micrographs of *Metarhizium* sp. KMA-1 isolated from *Protaetia brevitarsis seulensis* (Kolbe) larvae. The elongated chains of conidia of *Metarhizium* sp. KMA-1 became densely packed to form palisad-like masses.

의 경우 초기에는 침입부 피부에 암갈색의 반점이 생기는데 이는 진피조직 내층에서의 혈구의 집적이나 체벽 내에서의 멜라닌 형성에 의한 기주반응의 결과이다. 기주곤충이 죽은 후 처음에는 백색의 균사로 덮히게 되어 *Beauveria bassiana*로 잘못 진단하기 쉬우나 시간이 경과하면 짙은 녹색의 분생자가 형성된다(Fig. 1). 이병충로부터 분리된 곤충병원 사상균은 SDA+Y 배지에서 콜로니의 형태와 색깔로 1차 screening 하고, 주사전자현미경을 이용하여 분생자와 분생자병의 형태 및 분생자의 부착형태를 관찰하였다(Fig. 2). 그 결과 꽃무지로부터 분리된 곤충병원 사상균은 *Metarhizium*속의 전형적인 특징인 palisade-like masse 위에 분생자가 형성되어 있는 모습을 보였으며, 분생자병은 약간 길게 신장되어 있으며, 분생자는 9.4-11.2 μm × 2.5-3.5 μm의 장타원형으로 쇠사슬모양(elongate chains)으로 되어 있었다. 이상의 형태적인 특징은 青木裏兒(1989)의 형태적인 특징에 따른 사상균의 분리·동정 방법에서 나타난 *Metarhizium*속의 전형적인 형태를 보여주었다.

따라서 본 실험에서 꽃무지 이병충 개체로부터 분리된 *Metarhizium*속의 곤충병원 사상균을 *Metarhizium* sp. KMA-1로 명명하였다. 그러나, 형태적인 특징만으로는 이들의 종명(種名)을 동정하기에는 용이하지 않음을 알 수 있었다.

PCR에 의한 *Metarhizium*속의 동정

Fig. 2의 주사전자현미경 관찰에 의한 형태적 특징에 따른 *Metarhizium*속의 정확한 동정의 어려움과 문제점을 해결하기 위하여, 28S rRNA D3 expansion region의 primer를 사용하여 곤충병원 사상균에 대해 PCR하여 325 bp의 단일 밴드를 얻을 수 있었다. 얻어진 단편의 염기서열을 분석하기 위해 우선 pGEM-T easy vector에 이들 단편을 클로닝하였다. 단편의 삽입여부는 pGEM-T easy vector의 polycloning site를 두가지 제한효소 *Pst* I과 *Sph* I으로 절단하여 3 kb 정도의 Vector와 PCR로 증폭하여 얻어진 단편 크기의 insert로 확인하였다. 얻어진 클론의 염기서열은 ABI prism 377 DNA sequencer를 사용하여 염기서열을 결정하고(Fig. 3), Blast program을 이용하여 GenBank database에 등록되어 있는 기존의 염기서열 정보와의 상동성 검색을 하였다(Table 1). 그 결과 *Metarhizium*

GACCCGTCTT GAAACACACG GACCAAGGGA GTTCGTCTTC GTATGGCCGA GTGTTCGGGT GTTAAACCCC
TAACGCCGTA ATGAAAGTGA ACGCAGGTGA GAGCCCTCCG GGGCGCATCA TCGACCGATC CTGATGTTCT
CGGATGGATT TGAGTAAGAG CATACGGGGC CGGACCCGAA AGAAGGTGAA CTATGCCTGT ATAGGGTGAA
GCCAGAGGAA ACTCTGGTGG AGGCICGCAG CGGTTCTGAC GTGCAAATCG ATCGTCAAAT ATGGGCATGG
GGGCGAAAGG ACTAATCGAA CCTTCTAGTA GCTGGTTCCT TCCGA

Fig. 3. Nucleotide sequences of the 28S rRNA D3 region of *Metarhizium* sp. KMA-1 (GenBank accession number; AY237118).

Table 1. The rDNA sequence similarity based on 28S rRNA D3 region of *Metarhizium* sp. KMA-1

Fungal species	%rDNA gene sequence similarity				
	1	2	3	4	5
1. *Metarhizium* sp. KMA-1 (AY237118)	–				
2. *Metarhizuim anisopliae* var. *anisopliae* (AF218207)	98	–			
3. *Metarhizuim anisopliae* var. *majus* (AF339530)	97	97	–		
4. *Cordyceps militaris* (AB027379)	95	94	94	–	
5. *Paecilomyces* sp. 97014 (AB027379)	95	95	95	98	–

TCCGTAGGT GAACCTGCG GAGGGCATC ATTACCGAG TTATCCAAC TCCCACCCC TGTGACTTA TACCTTTAA
TTGTTGCTT CGGCGGGAC TTTGCGCCC GCCGGGGAC CCAAACCTT CTGAATTTT TTAATAAGT ATCTTCTGA
GTGGTTAAA AAAAATGAA TCAAAACTT TCAACAACG GATCTCTTG GTTCTGGCA TCGATGAAG AACGCAGCG
AAATGCGAT AAGTAATGT GAATTGCAG AATTCAGTG AATCATCGA ATCTTTGAA CGCACATTG CGCCCGTCA
GTATTCTGG CGGGCATGC CTGTTCGAG CGTCATTAC GCCCCTCAA GTCCCCTGT GGACTTGGT GTTGGGGAT
CGGCGAGGC TGGTTTTTT CCAGCACAG CCGTCCCTT AAATTGATT GGCGGTCTC GCCGTGGCC CTCCTCTGC
GCAGTAGTA AAACACTCG CAACAGGAG CCCGGCGCG GTCCACTGC CGTAAAACC CCCCCAACT TTTTATAGT
TGACCTCGA ATCAGGTAG GACTACCCG CTGAACTTA AGCATAATC ATAAGCGGA GGA

Fig. 4. Nucleotide sequences of the ITS region of *Metarhizium* sp. KMA-1 (GenBank accession number; AY237119).

Table 2. The rDNA sequence similarity based on ITS region of *Metarhizium* sp. KMA-1

Fungal species	%rDNA gene sequence similarity				
	1	2	3	4	5
1. *Metarhizium* sp. KMA-1 (AY237119)	–				
2. *Metarhizuim anisopliae* var. *anisopliae* (AF135216)	97	–			
3. *Metarhizuim anisopliae* var. *majus* (AF137061)	96	97	–		
4. *Metarhizuim* sp. KACC40230 (AF293843)	97	97	97	–	
5. *Metarhizuim taii* (AF348394)	96	96	96	95	–

sp. KMA-1는 GenBank database에 등록된 *M. anisopliae* var. *majus* (AF339530), *Cordyceps militaris* (AB027379), *Paecilomyces* sp. 97014 (AB027379)에 대하여 각각 97, 95, 95%의 상동성을 나타내었고, *M. anisopliae* var. *anisopliae* (AF218207)에 대하여는 98%의 높은 상동성을 나타내었다.

또한, ITS1과 ITS4의 프라이머를 사용하여 염기서열을 결정하고(Fig. 4), Blast program을 이용하여 GenBank database에 등록되어 있는 기존의 염기서열 정보와의 상동성을 검색해 본 결과, *Metarhizium* sp. KMA-1는 GenBank database에 등록된 *M. anisopliae* var. *majus* (AF137061), *M.* sp. KACC 40230 (AF293843),

M. taii (AF348394)에 대하여 각각 96, 97, 96%의 상동성을 나타내었고, *M. anisopliae* var. *anisopliae* (AF135216)에 대하여 97%의 상동성을 나타내었다 (Table 2).

이상의 형태적 특징과 염기서열 상동성 분석 결과, 국내 흰점박이꽃무지 이병충으로부터 분리한 KMA-1은 *M. anisopliae* var. *anisopliae*으로 동정되며, 딱정벌레목의 해충방제에 적용이 기대된다. 그리고, 본 실험에서 사용한 28S rRNA 유전자는 Rakotonirainy *et al.* (1994)가 *Metarhizium*속의 유연관계 분석에 사용하여 그 다양성이 확인된 바가 있는 유전자로서 앞으로 국내 분리 *Metarhizium*속 사상균의 용이한 동정을 위해 유용한 수단이 될 수 있을 것이다.

Literature Cited

Anderson, J.B., S.S. Bailey and P.J. Pukkila. 1989. Variation in ribosomal DNA among biological species of Armillasria, a genus of root-infecting fungi. Evolution. 43: 1652~1662.

Boucias, D.G. and J.C. Pendland. 1998. Principle of insect pathology. 537 pp. Kluwer academic publishers, Boston.

Cerenius, L., P.O. Thornqvist, A. Vey, M.W. Johansson and K. Soderhall. 1990. The effect of the fungal toxin destruxin E on isolated crayfish haemocytes. J. Insect Physiol. 36: 785~789.

Curran, J., F. Driver, J.W.O. Ballard and R.J. Milner. 1994. Phylogeny of *Metarhizium* : sequence analysis of the internally transcribed and 5.8s region of the ribosomal DNA repeat. Mycological Research 9: 547~552.

Driver, F., R.J. Milner and J.W.H. Trueman. 2000. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rRNA sequence data. Mycol. Res. 104: 134~150.

Dumas, C., V. Matha, J.M. Quiot and A. Vey. 1996. Effects of dextruxins, cyclic depsipeptide mycotoxins, on calcium balance and phosphorylation on intracellular proteins in lepidopteran cell lines. Comp. Biochem. Physiol. 114C: 213~219.

Glare, T.R., R.J. Milner and C.D. Beaton. 1996. Variation in *Metarhizium*, a genus of fungal pathogen attacking *Orthoptera*: Is phialide morphology a useful criterion? J. Orthopteran Res. 5: 19~27.

Hanel, H. 1982. The life cycle of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* in the termite *Nasutitermes exitiosus*. Mycopathologia. 80: 137~145.

Kang, I.J., H.K. Kim, C.K. Chung, S.J. Kim and D.W. Oh. 2000. Effects of *Protaetia orientalis* (Gory et Perchlon) larva on the lipid metabolism in ethanol administered rats. J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr. 29: 479~484

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.

Knudsen, G.R.M., D.J. Eschen, L.M. Dandurand and Z.G. Wang. 1991. Method to enhance growth and sporulation of pelletized biological fungi. Appl. Environ. Microbiol. 57: 2864~2867.

Leal, S.C.M., D.J. Bertioli, B.V. Ball and T.M. Butt. 1994. Presence of double-stranded RNAs and virus-like particles in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Biocontrol Science and Technology 4: 89~94.

Nunn, G.B., B.F. Theisen, B. Christensen and P. Arctander. 1996. Simplicity corrected size growth of the nuclear 28S ribosomal RNA D3 expansion segment in the crustacean order Isopoda. J. Mol. Evol. 42: 211~223.

Park, H.Y., S.S. Park, H.W. Oh and J.I. Kim. 1994. General characteristics of the white-spotted flower chafer, *Protaetia brevitarsis* reared in the laboratory. Kor. J. Entomol. 24: 1~5.

Pipe, N.D., D. Chandler, B.W. Bainbridge and J.B. Heale. 1995. Restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal RNA gene complex of isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Mycol. Res. 99: 485~491.

Rakotonirainy, M.S., M. Dutertre, Y. Brygoo and G. Riba. 1994. Phylogenetic relationships within the genus Metarhizium based on 28S rRNA sequences and isozyme comparisons. Mycol. Res. 98: 225~230.

Schabel, H.G. 1976. Oral infection of *Hylodius pales* by *Metarhizium anisopliae*. J. Invertebr. Pathol. 27: 377~383.

Sosa-Gomez, D.R., D.G. Boucias and J.L. Nation. 1997. Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the southern green stink bug *Nezara viridula* cuticle and fungistatic effect of cuticular lipids and aldehydes. J. Invertebr. Pathol. 69: 31~39.

Suh, Y., L.B. Thien, H.E. Reeve and E.A. Zimmer. 1993. Molecular evolution and phylogenetic implications of internal transcribed spacer sequences of ribosomal DNA in witeraceae. American J. Botany. 80: 1042~1055.

Tulloch, M. 1976. The genus *Metarhizium*. Transactions of the British Mycological Society 66: 407~411.

White, T.J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. pp. 315~322. In PCR Protocols: A Guide to Method and Applications. ed. by M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White. 482 pp. Academic Press. New York.

(Received for publication 16 January 2003;
accepted 6 March 2003)