韓蠶學誌 45(2), 108~111 (2003)
Korean J. Seric. Sci.
<論 文>

# 눈꽃동충하초 재배상 내에 발생된 오염균의 동정

남성희* · 정이연 · 홍인표 · 지상덕 · 장승종 · 한명세[1)]
농촌진흥청 농업과학기술원 잠사곤충부, [1)]경북대학교 농과대학

# Identification of Infectious Fungus in the Artificial Cultivation Rooms of *Paecilomyces tenuipes*

Sung-Hee Nam*, I-Yeon Jung, In-Pyo Hong, Sang-Duk Ji, Seung-Jong Chang and Myung-Sae Han[1)]
*Department of Sericulture and Entomology, NIAST, RDA, Suwon 441-100, Korea*
*[1)]College of Agriculture, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea*

## ABSTRACT

A infectious fungus (J131) recently isolated from artificial cultivation farms of *Paecilomyces tenuipes* is known to cause a great yield loss and deterioration of products. In this study, its occurrence and characterization were made. The isolate (J131) was identified as *Paecilomyces farinosus* (Holm ex S. F. Gray) Brown & Smith. Colonies of the isolate on PDA grew moderately fast, attaining a diameter of 19 mm within 14 days at 24±1°C. Vegetative hyphae are smooth-walled and hyaline. Conidiophores mainly arose from the submerged mycelium, usually measuring 1.3-1.5 μm wide and consisted of verticillate branches with whorls of 2 to 4 phialides. Phialides of 3.8-5.8×1.5-1.8 μm, with a swollen basal portion tapered into a distinct neck of about 0.6-0.8 μm wide. Conidia arisen from the phialides, were ellipsoidal to fusiform, smooth-walled, hyaline, 1.8-2.4×1.1-1.4 μm.When silkworm larvae were injected with concentration of $1\times10^8$ conidia/m*l* of infectious fungus J131, infection rate was 41.3% and synnemata formation rate was 23.6%. Black spots were appeared on the surface of silkworm larvae in 5-9 days after injection. The surface of larvae was covered with hyphae which were gradually turned into yellow from white color during the incubation period of 3-4 days. 1 to several 4-6 mm long synnemata of yellow or orange color were formed on the surface. The matured synnemata were ramified from its end and produced much conidia of white color.

**Key words :** *Paecilomyces tenuipes*, Identification, Infectious Fungus

## 서 론

*Cordyceps sinensis*로 대표되는 동충하초는 장수, 강장 등 다양한 효능을 가지므로 신비의 비약으로 알려져 왔으나, 자생자원이 희귀하고 인공재배가 불가능하여 이용이 어려웠다(Tanada & Kaya, 1992). 따라서 국내에서는 이를 대체할 수 있는 새로운 동충하초 자원의 탐색 결과 *Paecilomyces tenuipes*로부터 *C. sinensis*에 상회하는 약리효능을 구명하였다(조 등, 1999). 본 균은 동물실험에서 항암, 면역증강, 간기능 보호 효과가 입증되었을 뿐 아니라 자연상태에서 생육범위가 매우 넓고, 대체숙주인 누에에 감염되므로 대량생산이 용이한 장점이 있다. 따라서 1998년 양잠농가를 중심으로 눈꽃동충하초 재배기술이 보급되고 이후 연구(Yamanaka *et al.*, 1998) 및 생산량은 급격한 증가 추세를 보이고 있으나 재배중 발생되는 다양한 오염균으로 인해 농가 생산에 많은 어려움을 겪고 있다(남 등, 2002).

지금까지 동충하초 오염균은 재배농가 전역에 걸쳐 발생되고 있으며, 누에를 치사시킬 뿐만 아니라 누에 표피에 부정형 분생자병속을 발생시켜 생산성과 상품가치를 떨어뜨려왔다. *Syspastospora parasitica*는 최초 동정된 오염균으로(Lee & Nam, 2000) 동충하초 개체 간 급속히 확산되는 심각성을 보이며, 그 외 곤충 굳음병의 일종인 *Beauveria bassiana* 등 5종이 확인된 바 있다(남 등, 2002). 오염균은 눈꽃동충하초 재배 조건과 유사하므로 재배 상에서 용이하게 전파되고 있는 실정이다. 한편 2000년 추잠기 전라북도 눈꽃동충하초 재배 농가에서는 원인 불명의 오염균 발생으로 누에가 치사되고 자실체 형성이 불량하여 해

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

당지역 농가 약 65%가 재배손실이 발생된 바 본 시험에서는 동충하초의 안정적 생산을 위해 원인균을 분리하고 동정하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 오염균 분리 및 관찰

2000년 6월 전라북도 누에동충하초 농가에서 부정형 분생자병속이 발생된 시료를 수집하였고, 표본의 건조와 2차 감염을 예방하기 위해 밀폐용기에 개체 별로 담아 5~10°C에 보존하였다. 수집된 분생자병속은 2~3% *Sodium hypochloride*로 소독 후, water agar 배지의 페트리디쉬 뚜껑 내측에 멸균테이프로 부착시킨 후 배지에 떨어진 포자를 1차 분리하였고, 감자한천배지(Potato dextrose agar; PDA)에 이식하여 24±1°C에서 14일간 정치 배양하였다. 주사전자현미경(LEO 440, 1420VP) 관찰을 위해 PDA 배지 상의 균을 0.5×0.5 cm 크기로 잘라 내어 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 2차 고정하였다. 그 다음 ethanol 시리즈(50, 75, 90, 95, 100%)로 탈수하고 amylacetate로 40분간 2회 치환하였고 critical point dryer로 건조 후 gold-palladium으로 coating하였다. 속 분류는 Saccardo system(Barnett & Hunter, 1986), 종 분류는 Samson(1974) 체계를 따랐다.

### 2. 누에접종

PDA 상에 배양된 균은 직경 5 mm 크기로 잘라 PD(Potato dextrose broth) 배지에 접종하고 24°C에서 7일간 150 rpm에서 진탕하며 얻어진 종균 1%를 삼각플라스크에 준비된 현미배지(남 등, 1999)에 재접종하고 교반 후 정치 배양하였다. 생산된 분생포자는 증류수에 $1\times10^8$/ml 농도로 조정하여 유충(100두/3반복)에 경피접종한 후 표준 누에사육법으로 사육하며 상족 10~14일 이후 고치를 잘라 감염된 번데기를 20일간 적정온도에서 보호, 배양하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 배양특성

PDA 상에 배양한 결과(표 1) 콜로니는 직경 19 mm로 생장하였으며 앞면은 흰색, 뒷면은 노란색으로 *Paecilomyces* 속의 전형적인 특성(Samson, 1974)을 나타내었다. 동일 조건에서 눈꽃동충하초는 배양 앞, 뒷면이 흰색, 미백색이며 직경 32 mm로 생장하는 것과 비교해(남, 1999) 생장속도가 다소 느렸으며, 이는 종의 고유 배양특성으로 판단된다. 균사는 투명하고 매우 뚜렷한 형태로 직립하며 직경 1.2-1.9 μm이다. 대다수는 분지하여 윤생의 분생자병을 형성하며 크기는 직경 1.3-1.5 μm이다(그림 1). 밀집된 형태로 분생자병으로부터 발생되는 분생자형성세포(phialides)는 평균 2-4개이며, 하부는 부풀고 상부로 갈수록 점차 폭이 좁아지며 목이 긴 호리병형으로 3.8-5.8×1.5-1.8 μm 크기이다. Phialides의 neck은 직경 0.6-0.8 μm이며, phialides의 선단에서 연쇄상으로 발생한 분생포자는 한 개의 세포로 구성된 타원형 혹은 방추형이고 표면은 매끈하며 크기는 1.8-2.4×1.1-1.4 μm이다. 본 균주는 Samson(1974)의 연구와 비교한 결과 배지 상에서 배양된 콜로니의 색상 및 형태는 동일하였으며, 균사, 분생자병, phialides, 분생포자 등에 있어서도 구조가 일치하였으나 *Paecilomyces* 중 분생포자의 직경은 다소 짧아 다른 종과 뚜렷이 구분된다. 또한 측정된 미세구조의 크기에서는 다소 차이가 있으나 이러한 것은 균주간 특이성에 의한 것으로 인정된다. *P. farinosus*는 *Isaria farinosa*의 동의어로 1781년 Holm

**Table 1.** Morphological characteristics of the J131 isolate on PDA

| Characteristics | J131 |
|---|---|
| Color of synemata | yellow |
| Odour | mushroom-like |
| Mycelial colony (mm/days/medium) | 19/14/PDA |
| Mycelial density | thick mycelia |
| Mycelial color (obverse/reverse) | white/yellow |
| Hyphal width (μm) | 1.2-1.9 |
| Conidiophores (μm) | hyaline, 1.3-1.5 |
| Conidial shape | 1 cell, ellipsoidal to fusiform, |
| Conidial size (μm) | 1.8-2.4×1.1-1.4 |
| No. of phialide | 2-4 |
| Phialide (μm) | 3.8-5.8×1.5-1.8 |
| Phialide neck (μm) | 0.6-0.8 |

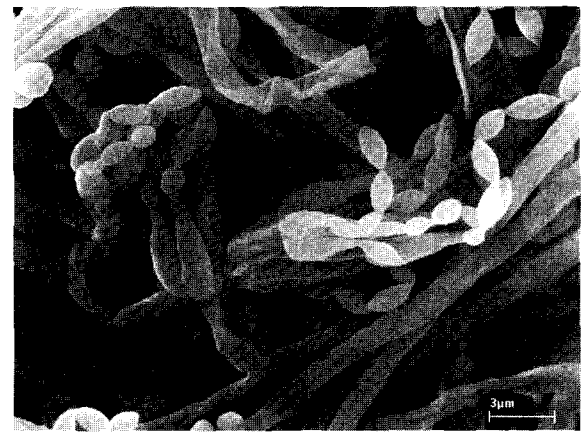


**Fig. 1.** Hyphae and conidia of J131 isolate.

**Table 2.** Characteristics of silkworm infected with infectious fungus J131

| Fungi | Infection rate (%) | formation rate of synnemata (%) | Length of synnemata (mm) | Color |
|---|---|---|---|---|
| J131 | 41.3±7.5 | 23.7±3.1 | 4-6 | white or yellow |
| *P. tenuipes* | 92.0±5.2 | 88.0±5.2 | 30-50 | whitish yellow |

에 의하여 최초로 기술되었으며, 1821년 Gray에 의해 종명으로 인정된 바 있다(Samson *et al.*, 1988).

### 2. 누에접종 및 분생자병속 형성

균 접종 5-9일 후 감염 유충은 피부에 검은 반점을 형성하였으며 일부 치사잠이 발생하였으나 대다수는 고치를 형성하였다. 절견 번데기는 표피에 분생자병속을 형성하였는데 하단부는 노란색을 띠었으며 선단부로 갈수록 흰색을 나타내었다. 이러한 색상은 배지 상에서 배양된 콜로니의 색상과 일치하는 경향이었다. 감염률 및 분생자병속 형성률은 눈꽃동충하초에 비해 41.3, 23.7%로 매우 저조한 수준이었다(표 2). 더욱이 분생자병속 생장 길이는 4-6 mm로 눈꽃동충하초가 30-50 mm인 것과 비교해 매우 짧은 생장을 보였는데, 초기 발생시 색상은 눈꽃동충하초와 매우 유사하여 육안식별이 어려울 것으로 판단된다(그림 2). 본 시험에서 접종누에는 상족 전까지 치사하지 않았으나 농가에서 치사잠이 대량 발생한 것은 누에가 오염균에 어린 시기부터 노출된 후 감염되었거나, 사육시 요구되는 환경요인이 부적합 등 여러 요인이 복합적으로 작용한 것으로 사료된다. 일반적으로 *Paecilomyces* 속은 식물에서는 부생균으로 알려져 있으며, 본 종은 나비목(Lepidoptera), 파리목(Diptera), 매미목 (Homoptera), 딱정벌레목(Coleoptera) 및 벌목(Hymenoptera)등을 숙주로 하는 다범성균으로(Dunbar 등, 1972) 곤충에 치명적인 병을 일으키며 곤충에 있어서 황강균으로 보고된다(Tanada & Kaya, 1992). 또한 곤충의 전 시기에 걸쳐 발생하며, 많은 학자들에 의해 생물학적 방제제로 연구된 바 있다(Deacon, 1998).

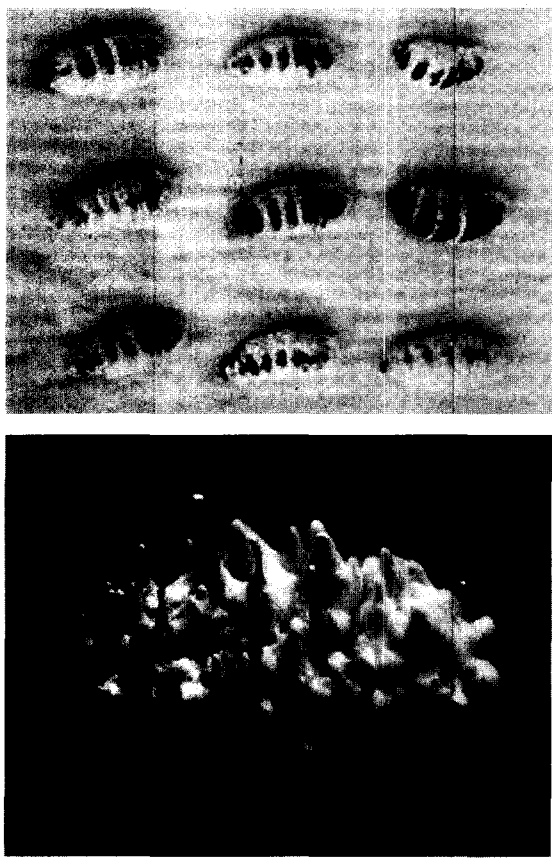

**Fig 2.** The symptoms of pupae infected after inoculation of infectious fungus J131. L) The early symptom of infected silkworm, R) The last symptom of infected silkworm.

## 적 요

전라북도 동충하초 재배농가 오염균은 *Paecilomyces farinosus*(Holm ex S. F. Gray) Brown & Smith로 동정되었으며 특성은 다음과 같다.

분리 균은 감자한천배지 상에서 24±1°C, 14일간 배양한 결과 배지 앞면은 흰색, 뒷면은 노란색을 띠고 직경 19 mm로 생장하였다. 균사 직경은 1.2-1.9 μm이며 분생자병은 투명하며 직경 1.3-1.5 μm이다. phialides는 윤생형으로 분생자병으로부터 2-4개가 형성되며 기부는 부풀어 있고 상단부로 갈수록 폭이 좁아지는 호리병형으로 3.8-5.8×1.5-1.8 μm이다. phialides의 neck은 직경 0.6-0.8 μm이며, 분생포자는 분생자형성세포로부터 연쇄상으로 발생하며 타원형 혹은 방추형이며 크기 1.8-2.4×1.1-1.4 μm이다. 균 농도 $1\times10^8$ conidia/ml로 경피 접종된 누에의 감염률은 41.3%이었으며, 분생자병속 형성률은 23.7%이었다. 균 접종 5-9일 후 누에피부 상에 검은 반점이 형성되었으며, 보호기간 3-4일 후 감염누에 표피는 흰색의 균사에서 점차 노란색 균사로 덮이며, 분생자병속이 발생되었다. 분생자병속은 노란색, 선단부로 갈수록 흰색을 나타내었으며 4-6 mm 길이로 표피에 한 개에서 다수가 형성되었다. 또한 성숙된 분생자병속의 끝부분에는 분지 후 흰색의 분생포자가 다량 발생하였다.

## 인용문헌


Barnett. H. L., Hunter, B. B. (1986) Illustrated genera of imperfect fungi(4th). Macmillan publishing company, pp. 4-209.

조세연 · 신국현 · 송성규 · 성재모(1999) 누에동충하초 생산 및 유용물질 개발. 농촌진흥청, pp. 162-166.

Deacon, J. W. (1998) Modern Mycology. Blackwell Science, pp. 262-265.

Dunbar, D. M., Veseloh, R. M. and Walton, G. S. (1972) A fungus observed on egg clusters of the Gypsy Moth, Porthetria dispar (Lepidoptera: Lymantriidae). *Ann. ent. Xoc. Am.* 65: 1419-1421.

Lee, S., Nam, S. H. (2000) A Mycoparasitic Ascomycete *Syspastospora parasitica* on the Entomopathogenic Fungus *Paecilomyces tenuipes* growing in *Bombyx mori*. *Kor. J. Mycol.* 28(3): 130-132.

남성희 · 정이연 · 지상덕 · 조세연(1999) 눈꽃동충하초의 형태 및 배양 조건. Kor. J. Seric. Sci. 41(1): 36-41.

남성희 · 윤철식 · 정이연 · 지상덕 · 조세연 · 한명세(2002) 동충하초 재배상 내 기형균 및 오염균의 발생현황 및 특성. *Kor. J. Seric. Sci.* 44(1): 32-36.

Samson. R. A. (1974) *Paecilomyces* and some allied hyphomycetes. Centraalbureau voor schimmelcultures barrn, pp. 32-36.

Samson. R. A., Evans. H. C., Paullatge. J. (1988) Atlas of Entomopathogenic fungi. Springer-Verlag, pp. 12.

Tanada, Y. and Kaya, H. K. (1992) Insect pathology, Academic press, pp. 2-364.

Yamanaka, K., Inatomi, S. and Hanaoka, M. (1998) Cultivation characteristics of *Isaria japonica*, Mycoscience, 39: 43-48.