

곤충기생균 *Isaria sinclairii*(Berk.) Lloyd의 형태학적 특성

남성희* · 지상덕 · 홍인표 · 허 현¹⁾ · 장승중
농촌진흥청 농업과학기술원 잠사곤충부

The Morphological Characteristics of Entomopathogenic Fungus, *Isaria sinclairii* (Berk.) Lloyd

Sung-Hee Nam*, Sang-Duk Gi, In-Pyo Hong, Hyeon-Hyur¹⁾ and Seung-Jong Chang

Department of Sericulture and Entomology, NIAST, RDA, Suwon 441-100, Korea

¹⁾Dept. of Applied Biology, Dongguk University, Seoul 100-715

ABSTRACT

NIAST has developed the artificial cultivation technique of entomopathogenic fungus, *Isaria sinclairii* by using the silkworm. NIAST is planning to provide the silkworm farmers the guidance of the technique. Screening of pharmacologically active principles of *I. sinclairii* is needed to register the fungal breeding, attain the approval of food materials, and ultimately position the fungus as a high value-added product. The result of investigating the characteristics of *Isaria sinclairii* was showed that conidia were irregularly long oval-shaped and measured 6.33×3.33 μm in average. The optimal condition of cultivating hyphae was pH 5.0 in acidity and 21~25°C in temperature. And the best condition of producing conidia was pH 6.0 in acidity and 16~20°C in temperature.

Key words : *Isaria sinclairii*, conidia, culture

서 론

동충하초는 예로부터 약리효능이 우수하여 다양한 질병에 치료효과가 있는 것으로 알려져 있는데, 대표적으로 면역기능을 보강시켜 각종 종양과 바이러스에 대한 저항력을 높이며, 피로회복 효과와 스트레스 해소 및 노화억제 효능 등이 보고된다(Ohmori 등, 1986; Kiho 등, 1996). 최근 천연물질에 대한 효능과 관심이 높아지면서 동충하초는 의약품 원료로 많은 기대를 모으고 있으나, 자연산의 분포밀도가 낮고 채집이 까다로워 이용하기는 매우 어려운 실정이며 이러한 문제를 해결하기 위해 다양한 재배연구가 수행되어 왔다(Aoki 등, 1975; Agudelo & Falcon, 1983).

농촌진흥청에서는 누에를 기주로 한 *Paecilomyces tenuipes*의 대량 재배기술을 개발하였고, 산물로부터 면역력 증강, 항암, 항피로, 항스트레스, 항노화, 간보호 효과 등 우수한 약리효능을 확인한 바 있다(Cho 등, 1999; Shin 등, 2001). 또한 현재 식품원료로 사용 승인을 받아 국내 양잠농가에 재배기술을 보급 중에 있으며 일반인들이 현재 이용하고 있다.

동충하초는 전 세계적으로 300여종이 보고되어 있으며, 중국 고의서 “증류본초(證類本草)”에는 용충초, 아향봉충초 등 여러 종의 동충하초가 각종 질병에 다양한 효능을 가지는 것으로 기록되어 있다. 따라서 새로운 물질의 발굴과 신작목 창출을 통한 농가소득 증대에 기여하기 위해서는 유용자원으로 이용 가능한 동충하초를 발굴하고, 인공재배 기술을 개발할 필요성이 있다.

이에 농업과학기술원에서는 누에를 기주로 한 *Isaria sinclairii*의 대량재배 기술을 개발하여 단회 경구투여 급성독성시험(한국화학연구소, 1998)을 완료하고 특허출원 중에 있는바, 추후 농가 및 일반인들의 생산과 이용이 가능하도록 하기 위해서는 식품원료 승인 및 품종명칭 등록이 요구되고 있으며 이에 대한 기초 조사를 위하여 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

형태관찰용 시료제작

실험 균은 잠사곤충부 병해충연구실 보존주(J16)로써 감

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

자한천배지(Potato dextrose agar; PDA)에 접종하여 24±1°C에서 정지 배양하였다. 균 형태 관찰은 균사 등을 Lactophenol로 염색 후 광학현미경 또는 주사전자현미경(SEM)을 이용하였다. SEM(LEO 440, 1420VP) 관찰을 위해 PDA 상에 배양된 균을 0.5×0.5 cm 크기로 잘라하여 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 후 amylocetate로 40분간 2회 치환하고 critical point dryer로 건조 후 gold-palladium으로 coating하였다.

균 성장 특성조사

PDA 배지 상에 균을 접종하여 배양온도 15~31°C 및 pH 3~11 범위에서 14일간 정지 배양하여 균사 성장량을 조사하였다. 현미배지 조제는 증류수에 현미를 24시간 냉침 후 수분을 제거하고 80 g씩 삼각플라스크에 넣어 멸균하였으며, 배지 내에 균 접종 후 상기의 온도 및 산도와 동일 조건으로 정지 배양하여 포자 형성량을 측정하였다. 배양 중 7일째부터 종료일까지 3일 간격으로 교반하였으며 35일후 배양 종료하였다. 포자가 증식 배양된 현미배지 내에 Tween 20을 넣은 증류수로 포자를 수집하여 혈구측정계로 농도를 조사하였다. 본 시험의 조사항목은 잠사곤충부에서 설정한 품종평가기준(잠관 56110-227호, '98. 5. 8)에 요구되는 필수요건에 준하였다.

결과 및 고찰

형태적 특성

PDA 배지 상에서 *I. sinclairii*의 균을 배양한 결과 24±1°C에서 14일 동안 직경 35.6 mm로 성장하였으며, colony는 앞, 뒷면이 흰색이었다. 배양 20일 이상 경과되면 균사는 회색빛을 띠는데 자연 상태에서 수집된 분생자병속과 색상이 유사하다. 광학현미경 하에서 관찰시 균사는 투명하며 폭이 2.1~4.5 μm이고, 분생자병에서 발생한 분생자형성세포(phialides)는 4.1~5.2×2.7~3.2 μm 크기로 2~4개 발생하는데, 선단에는 길고 뾰족한 목(neck), 하단에는 장구형의 부푼 형태로 구성된다. 분생포자는 분생자형성세포의 말단에서 연쇄상으로 발생하며 타원형 혹은 굽은 형태로 평균 6.33×3.33 μm 크기이다. 본 균은 국내산지를 중심으로 전역에 걸쳐 발생하고 있으며, 일본 동북지방에서 발생된 균은 분생자병속이 1개 혹은 2~8개이고 분생포자는 계란형, 타원형, 방추형 등 다양한 형태로 보고된다(Shimizu, 1994). *I. sinclairii*의 분생포자의 특성은 인공배양 과정에서 발생이 쉽고, 동충하초의 불완전세대 균들과 비교해 다소 커서 동정시 뚜렷한 차이를 보

인다(Kobayasi, 1940; Samson, 1974). *I. sinclairii*는 자연 상태에서는 기주 특이적으로 매미목(Homoptera) 매미과(Cicadidae) 곤충의 유충에서 발생하는 것으로 알려져 있으나, 집누에에 경피 접촉시 감염력을 가지는 것이 확인됨으로써(조 등, 1999) 추후 기타 곤충에도 적용 가능할 것으로 예상되며 따라서 생물학적 방제에도 이용 가능할 것으로 판단된다.

균 성장 특성

종균의 이용과 생산을 위해서는 종자산업법 규정에 따라 품종명칭 등록이 우선되어야 하며, 그 기초 자료로써 균 생리특성인 포자와 균사의 성장조건 구멍이 요구된다.

본 시험에서는 *I. sinclairii*의 균사 및 포자의 성장환경을 구명하기 위해 배지 상에서 온도 및 pH 별로 처리하였다. 균사 생장은 15°C 이하에서 처리시 직경 21 mm로 성장하였으며, 21~25°C일때 55 mm로 최대 성장량을 보였다. 반면 26°C 이상의 범위에서는 생장이 다소 느려지는 경향을 나타내었다(그림 1). 특히 31°C 이상에서는 14일간 9 mm로 생장이 매우 느려 오히려 성장저해 요인으로 작용한 것으로 판단된다. 적정산도 구멍을 위해 pH 3~11의 범위로 조정된 PDA 상에 균 배양한 결과 44~56 mm의 낮은 성장량을 보였으며, pH 5에서 가장 왕성하게 성장하는 것을 확인하였다(그림 2). 일반적으로 진균생장에 pH의 영향이 매우 중요한 요인으로 작용하는 것으로 알려

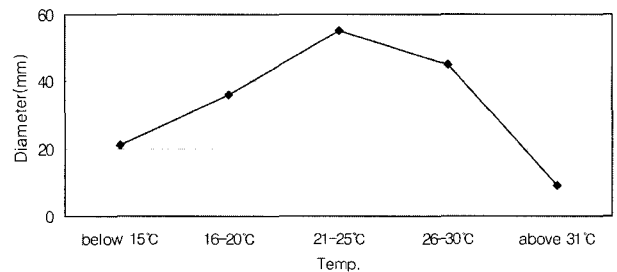


Fig. 1. Hyphae growth in the PDA medium based on cultural temperature of *I. sinclairii*.

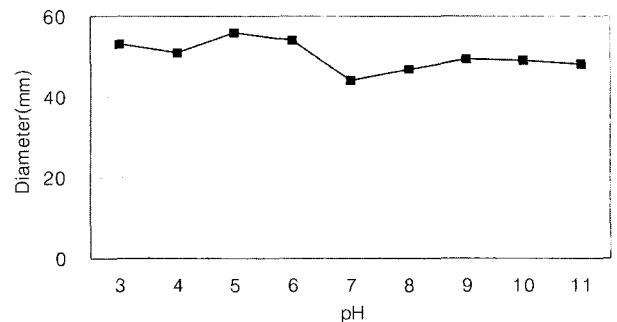


Fig. 2. Hyphae growth in the PDA medium based on pH of *I. sinclairii*.

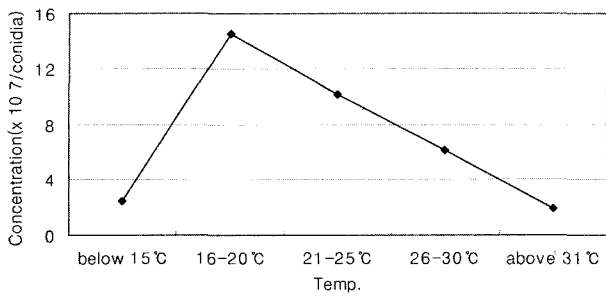


Fig. 3. Conidial production in the hulled rice medium based on cultural temperature of *I. sinclairii*.

저 있으나 본 시험에서는 현저한 차이는 확인되지 않았다. 상기와 동일 조건하에서 현미배지 내 분생포자 형성량을 조사하였으며, 온도 16~20°C 범위에서 배양시 포자농도는 14.5×10^7 conidia/ml로 가장 높은 발생량을 보였으며, 21°C 이상으로 높아지면 포자형성량은 급격히 감소하였다(그림 3). 적정산도 시험에서는 pH 6에서 14.5×10^7 conidia/ml로 최대 성장율을 나타내었으며, pH 11로 조정시 포자 농도가 최저 6.24×10^7 conidia/ml을 나타내어 pH가 높을수록 성장량이 급격히 저하되었다. 본 시험에서 pH는 균사 성장량에는 다소 큰 영향을 미치지 않았으나, 포자 발생에는 현격한 차이를 보이는데, 이것은 균사 및 포자 배양 배지의 차이점에서 기인하는 것으로 판단된다. 즉 한천배지 상에 배양된 균사는 배지 표면만 영양원으로 이용하였고, 포자배양은 현미의 전 표면에 걸쳐 접촉, 배양되므로 pH별 배지의 영향력이 더 컸던 것으로 보인다.

한편 자연산 동충하초의 발생은 습기가 많고 온도가 높은 시기 7월~8월 경 가장 많고, 8월 이후에는 발생량이 현저히 감소하며, 이때 분생자좌는 포자가 전면에 덮인 상태로 발견된다.

본 시험에서 영양생장 균사 발달은 21~25°C 범위에서 최대치를 나타내었는데 이것은 *I. sinclairii*의 자연발생지인 계곡 등의 7~8월경 온도와 유사한 결과이며, 포자발생이 최대치를 나타내는 16~20°C 온도범위는 8월 이후 채

Table 1. Cultural characteristics of *Isaria sinclairii* on the potato dextrose agar medium

	Mycelium	White
Mycelial colony (mm/days/medium)	35.6/14/PDA	
Mycelial colour	white cream	
Phialide (μm)	2 to 4 phialide, consisting of a swollen, globose basal portion tapering into a thin neck, 4.1~5.2×2.7~3.2	
Conidiophore (μm)	hyaline, width : 2.1~4.5	
Conidia (μm)	cylindrical, usually curved 3.01×2.50 (6.33×3.33) 8.10×3.60	

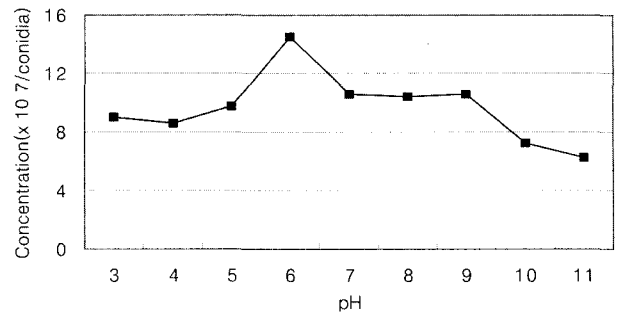


Fig. 4. Conidial production in the hulled rice medium based on pH of *I. sinclairii*.

잡지의 환경과도 일치한다. 진균은 성장최적의 환경에서 균사발달이 촉진되며, 환경이 불량하거나 스트레스를 받게 되면 포자형성이 극대화되는 현상이 나타나는데, 본 시험에서도 뚜렷이 나타나고 있다. 결과를 종합해 볼 때 인공배양시 나타나는 균사 및 포자생육 조건은 추후 진균의 발생환경을 추적하는데 이용이 가능할 것으로 보인다.

적 요

*I. sinclairii*의 균의 형태학적 특성 및 배양특성을 조사한 결과 PDA 배지에서 $24 \pm 1^\circ\text{C}$, 14일간 배양시 colony는 직경 35.6 mm로 성장하였으며, 배양 앞, 뒷면은 흰색을 띠었다. 현미경 관찰시 균사는 투명하며 직경 2.1~4.5 μm 이고, 분생자형성세포(phialides)는 4.1~5.2×2.7~3.2 μm 크기로 2~4개 발생하며, 선단의 목은 길고 뚜렷하였다. 연쇄상으로 발생하는 분생포자는 타원형 혹은 굽은 형태이며 평균 $6.33 \times 3.33 \mu\text{m}$ 크기이다.

PDA 배지에서 *I. sinclairii*의 균사생장은 21~25°C에서 직경 55 mm 크기이며, 동일 환경에서 pH 5로 처리시 56 mm로 가장 우수한 성장을 보였다. 한편 포자 유발을 위해 현미배지를 이용하여 온도 16~20°C에서 정지배양시 포자농도는 14.5×10^7 conidia/ml이었으며, 동일조건에서 pH 6로 처리시 14.5×10^7 conidia/ml로 가장 우수한 포자형성율을 보였다.

인용문헌

Agudelo, F. and Falcon, L. A. (1983) Mass production, infectivity, and field application studies with the entomogenous fungus *Paecilomyces farinosus*. J. Invertebr. Pathol. 42: 124-132.

Aoki, J. Tanase, K. and Kusida, T. (1975) The pathogenicity to the silkworm and taxonomic considerations on some muscardine fungi. J. Sericult. Sci. Japan. 44(5): 365-370.

조세연, 신국현, 송성규, 성재모(1999) 누에동충하초 생산 및 유용물질 개발. 농촌진흥청, pp. 69-230.

한국화학연구소(1998) *I. sinclairii*의 랫트를 이용한 단회 경구투여

급성독성시험.

- Kiho, T., Kaizu, Y., Taketomo, N. and Tusunoo, A. (1996) Physiological activities of the extracts from cultured mycelia of *Cordyceps militaris* (Vuill.) Fr. Bull. Gen. Educ. Tokyo Med. Dent. Univ. 26; 7-14 (In Japanese).
- Kobayasi, Y. (1940) The genus *Cordyceps* and its allies. Sci. Rept. Tokyo Bunrika Daikaku, Sect. B. 5: 242-246
- Ohmori, T., Tamura, K., Tsuru, S. and Nomoto, K. (1986) Antitumor activity of protein-bound polysaccharide from *Cordyceps ophioglossoides* in mice. Jpn. J. Cancer Res. (Gann). 77: 1256-1263.
- Samson, R. A. (1974) *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes, Centraalbureau voor schimmel Cultures Baarn. pp. 52-54
- Shimizu, D. (1994) Color iconography of vegetable wasps and plant worms. Seibundo shinkosa. Japan. pp 1-381 (In Japanese).
- Shin K. H., Lim, S. S. Lee, S. H. Lee, Y. S. and Cho, S. Y. (2001) Antioxidant and immunostimulating activities of the fruiting bodies of *Paecilomyces japonica*, a new type of *Cordyceps* sp. Healthy Aging for Functional Longevity. 928: 261-273.