

곤충의 식물병원성 진균에 대한 항균활성

김경아 · 이경렬 · 송경식 · 노시갑*
경북대학교 농업생명과학대학

Antifungal Activities of Insect Against the Plant Pathogenic Fungi

Kyung-a Kim, Kyung-yeol Lee, Kyung-Sik Song and Si-Kab Nho*

College of Agriculture and Life sciences, Kyungpook National University, Sangkyuk-dong, Puk-gu, Daegu, 702-701, Korea

ABSTRACT

The hemolymph and whole body of insect, *Bombyx mori*, *Allomyrina dichotoma* and *Neotocia brevitarsi*, conspicuously inhibited the mycelial growth of several plant pathogenic fungi. The hemolymph of 1087 strain among the 16 strains of *B. mori* has inhibition activities against the 3 species of fungi, *Alternaria panax*, *Colletotrichum gloeosporioides*, and *Pyricularia oryzae*. The whole body of *B. mori* was more effective than the hemolymph as a inhibitor on fungi growth. The antifungal activity of *B. mori* was variable to the fungi species. In addition, *A. dichotoma* and *N. brevitarsi* showed antifungal activities against the same fungi as did *B. mori*. These data showed that the insect has potent antifungal activity. Whereas, the level of activities were differ according to the fungal species. This finding underlines that the possibility of the insect can be use of the agent as a inhibitor against the plant pathogenic fungi.

Key words : Insect, strain, Antifungal activity, Inhibitor, Pathogenic fungi

서 론

환경문제에 대한 세계적인 관심과 병원성 미생물들의 저항성 등이 문제로 대두되면서 친환경적인 생물농약에 대한 중요성이 증가하고 있다. 생물농약에 대한 연구는 약 10년 전부터 일부 선진국을 중심으로 연구 개발 중이며, 지금까지 실용화된 생물농약은 대부분이 미생물에 근간한 미생물농약이라는 특징이 있다.

병원성 미생물들의 농약 및 항생제 등에 대한 높은 저항성은 항미생물 활성을 갖는 천연물질의 개발을 필연적으로 요구하고 있으며, 이것을 위한 천연물 탐색은 동·식물 및 곤충 등에 이르기까지 광범위하게 진행되고 있다. 자연계에 항세균 및 항진균 활성을 갖는 천연물질이 많이 존재한다 것은 여러 보고에서도 알려져 있는 사실이며, 이들 대부분은 식물에서 확인되었다(Alzoreky & Nakahara, 2003; Lee *et al.*, 2003; Seo *et al.*, 2004). 그러나 일부 동물 및 곤충에 있어서도 자기방어 수단의 한 방법으로 여러 형태의 항균작용이 있다는 것이 보고되고 있다.

특히, 곤충의 생존환경은 여러 미생물과의 접촉을 피할

수 없으며, 그것들에 저항하기 위한 방어기구 및 물질의 존재가 필연적이다(Yasui & Shirata, 1995). 일반적으로 물리적 방어로서 외부와 접촉하는 부위의 cuticle, 피부를 두 겹께 둘러싸고 있는 내수성의 wax층과 저급지방산, 화학적 방어로서 체표면에서의 항균성물질 발산 및 소화관내의 감염방제 물질 등이 알려져 있다. 이 외에 혈액 단백질에 존재하는 항균성 단백질도 보고되어 있지만, 이들 대부분이 항세균성 단백질이다.

지금까지 보고된 곤충유래의 항진균성 단백질은 떠돌이 쉬파리유충의 AFP(Ijima *et al.*, 1993), 노랑초파리의 drosomycin(Fehlbaum *et al.*, 1994)과 metchnikowin(Levashina *et al.*, 1995) 및 참검정풍뎅이에서의 holotoricin 3 (Lee *et al.*, 1995) 정도이다. 그리고, 대표적인 경제곤충인 누에에서 protease inhibitor가 보고되어 있다(Eguchi *et al.*, 1982). 곱팡이 protease를 불활성화하는 protease inhibitor가 누에의 혈액에서 확인된 이래, 누에의 생체방어제어기 술연구가 진행되어져 왔다. 그 결과, trypsin 및 α -chymotrypsin에는 작용하지 않고 사상균 protease에만 작용하는 특이적 inhibitor가 정제되어 분자량과 아미노산배열이 결

*Corresponding author. E-mail: nohsk@mail.knu.ac.kr

정되었다(Eguchi *et al.*, 1994, 1995). 또한, 누에 장 내용물의 아세톤 추출액은 벼 도열병균(*P. oryzae*)에 대해서 항균활성을 가진다는 보고도 있다(Yasui & Shirata, 1995).

본 연구는, 지구상에 가장 많은 종(種) 그리고 다양한 형태로 생존하고 있는 곤충을 자원화하여 병원성 미생물 방제를 위한 생물농약의 개발을 최종 목표로 한다. 그 시작으로 누에(*Bombyx mori*), 장수풍뎅이(*Allomyrina dichotoma*) 및 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis*)를 이용하여 병원성 곰팡이에 대한 항균활성을 조사하였다. 또한, 그 특성에 대한 몇 개의 검토를 보고한다.

재료 및 방법

1. 공시재료

이 연구에 사용된 곤충은 집누에(*Bombyx mori*) 16계통, 장수풍뎅이(*Allomyrina dichotoma*) 및 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis*)로 총 3종의 18계통을 Table 1에 나 타낸다. 모든 유충은 종령까지 실내 사육되어 혈액 및 유충체를 동결건조 후 시료로 사용하였다.

2. 사용균주

곤충혈액과 유충체의 항곰팡이 활성검정을 위해 식물 병원성 곰팡이균 8종을 사용하였다(Table 2). 곰팡이균은 Potato dextrose agar(PDA) 배지에서 24°C로 배양하여 사 용하였다.

3. 항곰팡이 활성검정

8종의 식물 병원성 곰팡이에 대한 활성검정은 고체배지 확산법(agar diffusion method)을 이용하여 측정하였다. 혈액 및 유충체는 동결건조 후 powder 상태로 만들어 증류수에 1, 2.5, 5, 10%의 농도로 희석하여 시료로 사용하였 다. 활성검정은 배지에 50 µl의 희석시료를 균일하게 도포 하여 건조시킨 후 각 곰팡이균을 직경 5 mm의 크기로 중

앙에 놓고 적정온도에서 배양하여 24시간 마다 그 성장 을 측정하였다. 활성측정의 적정조건을 확립한 후 각 시 료에 대해 4반복 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 계통에 따른 항진균활성

본 연구는 곤충이나 곤충유래 부산물의 병원성 곰팡이 에 대한 저항성을 조사하고, 이것을 이용한 식물 병원성 곰팡이의 방제를 위한 천연물질로서의 잠재성을 알기 위 하여 실시하였다.

Table 1. Species of insects used in the study

| Species | strains | origin |
|-----------------------------|-----------|-------------------------------|
| <i>Bombyx mori</i> | 1087 | Kyungpook National University |
| <i>Bombyx mori</i> | kwa | Kyungpook National University |
| <i>Bombyx mori</i> | fb100 | Kyungpook National University |
| <i>Bombyx mori</i> | j300 | Kyungpook National University |
| <i>Bombyx mori</i> | kb41 | Kyungpook National University |
| <i>Bombyx mori</i> | d90 | Kyungpook National University |
| <i>Bombyx mori</i> | kd4140 | Kyungpook National University |
| <i>Bombyx mori</i> | kb50 | Kyungpook National University |
| <i>Bombyx mori</i> | k30 | Kyungpook National University |
| <i>Bombyx mori</i> | kl20 | Kyungpook National University |
| <i>Bombyx mori</i> | jb31 | Kyungpook National University |
| <i>Bombyx mori</i> | j304 | Kyungpook National University |
| <i>Bombyx mori</i> | k45 | Kyungpook National University |
| <i>Bombyx mori</i> | r52 | Kyungpook National University |
| <i>Bombyx mori</i> | mal16 | Kyungpook National University |
| <i>Bombyx mori</i> | c58 | Kyungpook National University |
| <i>Allomyrina dichotoma</i> | Chuncheon | Gangwon-do |
| <i>Neotocia brevitarsis</i> | Gunwi | Gyeongsangbuk-do |

Table 2. Species of fungi used in the study

| Fungi | Host plant | Receive from |
|---------------------------------------|---|-----------------------------------|
| <i>Cylindrocapon destructims</i> | Ginseng | Punggi Ginseng Experiment Station |
| <i>Alternaria panax</i> | Ginseng | Punggi Ginseng Experiment Station |
| <i>Phytophthora cactorum</i> | Tulip, Apple | Punggi Ginseng Experiment Station |
| <i>Rhizoctonia solani</i> | Strawberry, Cucumber, Eggplant, Spinach | Punggi Ginseng Experiment Station |
| <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> | Apple, Red pepper | Punggi Ginseng Experiment Station |
| <i>Pythium aphanidermatum</i> | Tomato | Punggi Ginseng Experiment Station |
| <i>Botrytis cinerea</i> | Strawberry, Cucumber, Tomato | Punggi Ginseng Experiment Station |
| <i>Pyricularia oryzae</i> | Rice plant, Corn, Millet | KRIBB* |

* Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology

| Fungi agents | <i>C. des</i> ^a | <i>A. pan</i> | <i>P. cac</i> | <i>R. sol</i> | <i>C. glo</i> | <i>P. aph</i> | <i>B. cin</i> | <i>P. ory</i> |
|-----------------------------|----------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| <i>B. 1087</i> ^b | + ^c | +++ | - | - | +++ | - | - | +++ |
| <i>B. kwa</i> | - | + | - | - | - | - | - | - |
| <i>B. fb100</i> | - | + | - | - | + | - | + | - |
| <i>B. j300</i> | - | + | - | - | - | - | - | - |
| <i>B. kb41</i> | - | + | - | - | + | - | - | - |
| <i>B. d90</i> | - | + | - | - | - | - | - | + |
| <i>B. kd4140</i> | - | + | - | - | + | - | - | - |
| <i>B. kb50</i> | - | + | - | - | - | - | - | - |
| <i>B. k30</i> | - | + | - | - | + | - | - | - |
| <i>B. kl20</i> | - | + | - | - | - | - | + | - |
| <i>B. jb31</i> | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>B. j304</i> | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>B. k45</i> | - | + | - | - | - | - | - | - |
| <i>B. r52</i> | - | + | - | - | - | - | - | - |
| <i>B. mal16</i> | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>B. c58</i> | - | + | - | - | + | - | - | - |
| Mix1 | + | +++ | + | + | +++ | - | + | +++ |
| <i>A. dis</i> | - | +++ | - | - | + | - | - | ++ |
| <i>N. bre</i> | - | ++ | - | - | +++ | - | - | +++ |

Fig. 1. The antifungal activity of insects. Applied insect reagents were prepared that the powder of freeze dried final instar hemolymph and whole body (gray shadow). ^a *C. des*, *C. destructims*; *A. pan*, *A. panax*; *P. cac*, *P. cactorum*; *R. sol*, *R. solani*; *C. glo*, *C. gloeosporioides*; *P. aph*, *P. aphanidermatum*; *B. cin*, *B. cinerea*; *P. ory*, *P. oryzae*. ^b *B.*, *B. mori*; *A. dic*, *A. dichotoma*; *N. bre*, *N. brevitarsis*. ^c +, degree of antifungal activity; -, no antifungal activity.

집누에 16계통의 혈액에 대한 곰팡이 억제효과 실험에서는 계통에 따른 차이가 확인되었다(Fig. 1). 1087계통이 인삼 흑반병(*A. panax*), 탄저병(*C. gloeosporioides*) 및 벼도열병(*P. oryzae*) 곰팡이 균에 강한 항균활성을 보인 반면, jb31, j304 및 mal16계통은 11종의 곰팡이에 대해 전혀 항균활성을 나타내지 않았다. 계통간 차이는 있지만 공통적으로 *A. panax*와 *C. gloeosporioides* 균주에 대해 활성을 가지는 것으로 확인되었다.

Fig. 1에 나타난 것과 같이 16계통의 누에 중 1087계통은 3종의 식물병원성 곰팡이균에 강한 항균활성을 나타내고, 9종의 균에 활성을 전혀 나타내지 않는 계통 또는 특정 균주에만 활성을 나타내는 계통 등 동일 종(species) 내에서도 계통에 따라 다른 항균활성을 나타내는 것을 확

인하였다.

지금까지 곤충에서 100여종 이상의 항세균성 단백질이 분리, 정제되어 있다(Boman, 1995; Gillespie와 Kanost, 1997; 산천, 1998). 이것들은 일반적으로 세균의 감염이나 여러 형태의 상해에 의해 지방체나 혈구에서 합성되어, 혈액으로 분비되는 유발성 단백질이다. 곤충의 항진균성 단백질인 drosomycin과 metchnikowin도 진균의 감염에 의한 유발성 단백질이다. 그러나 항진균성 단백질로 알려진 AFP와 holotricin 3는 내재성 단백질로 곤충 혈액에 늘 존재한다는 차이점이 있다.

누에 혈액의 항진균활성을 확인한 결과를 바탕으로 AFP와 같은 내재성 단백질의 존재 가능성에 기대를 가지고 유전자 탐색을 진행 중에 있다.

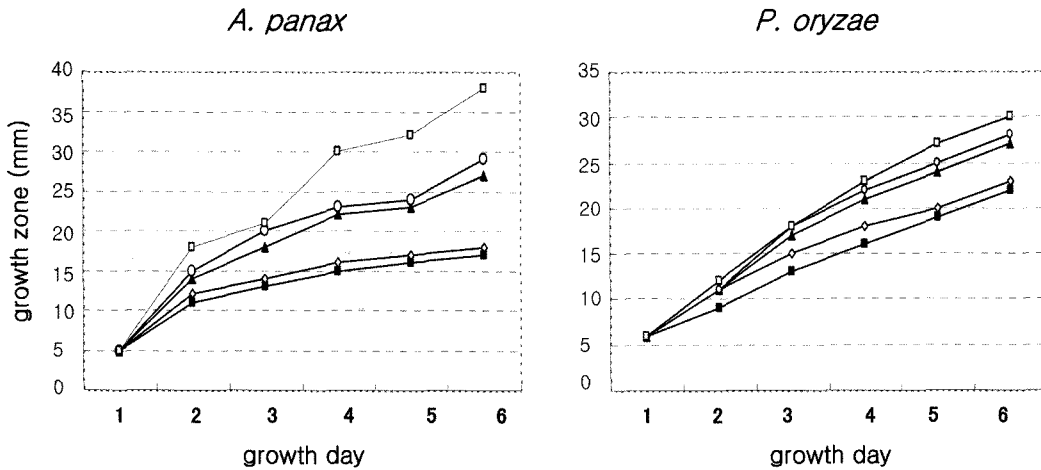


Fig. 2. Growth profile of fungi on PDA treated with *B. mori* whole body. Symbol; ○, 1%; ▲, 2.5%; ◇, 5%; ■, 10%; □, control.

2. 특정균에 대한 활성 검증

누에의 유충체를 이용한 경우는 혈액보다 강한 활성을 나타냈는데, 8종의 곰팡이중 *P. aphanidermatum* 균주를 제외하고 항균활성을 확인하였다(Fig. 1). 또한, 1087계통의 혈액에서와 같이 *A. panax*, *C. gloeosporioides* 및 *P. oryzae* 균주에 강한 활성을 가진다. 장수풍뎅이와 흰점박이 꽃무지의 유충체를 이용한 경우도 집누에 유충체의 것과 같이 *A. panax*, *C. gloeosporioides* 및 *P. oryzae* 에 항균활성을 가지며, 이 2종의 곤충은 나머지 5균주에 대해서는 항균활성을 나타내지 않았다. 또한 항균활성은 검정균의 생리적 특성에 따라 정도의 차이가 있었지만 시료의 농도가 높을수록 강하게 나타났다(Fig. 2).

Fig. 3과 4는 집누에 유충체를 시료로 하여 곰팡이 종에 따른 항균활성을 나타낸 것으로 동일시료에 대해서도 항균활성이 전혀 없는 것에서부터 비교적 높은 항균활성을 나타내는 것까지 검정균에 따라 다르게 나타났다.

유충체를 시료로 한 경우 *A. panax*, *C. gloeosporioides* 및 *P. oryzae* 균주들에 대해서 3종의 곤충 모두 강한 항균활성을 나타냈다. 장수풍뎅이와 흰점박이 꽃무지는 사용된 나머지 5종의 균주에 대해서는 전혀 활성을 나타내

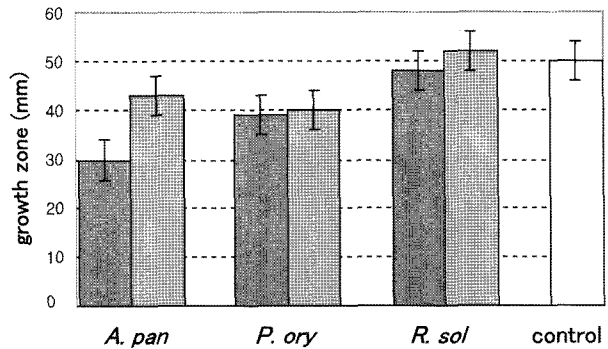


Fig. 3. Inhibitory effect of *B. mori* whole body on fungi. Mycelial growth cultured for 6 days after inoculation on PDA treated with whole body reagent. *A. pan*, *A. panax*; *P. pry*, *P. oryzae*; *R. sol*, *R. solani*; ■, 5%; ■, 1%.

지 않았다. 이 결과를 바탕으로 곤충은 특정 균주에 대한 항균활성 특이성을 갖는 것으로 추측된다. 또한, 누에(*B. mori*), 장수풍뎅이(*A. dichotoma*) 및 흰점박이 꽃무지(*P. brevitarsis*)는 인삼흑반병, 고추나 딸기의 탄저병 및 벼도열병을 방제하는데 유용한 생물자원으로의 가능성이 확인되었다.

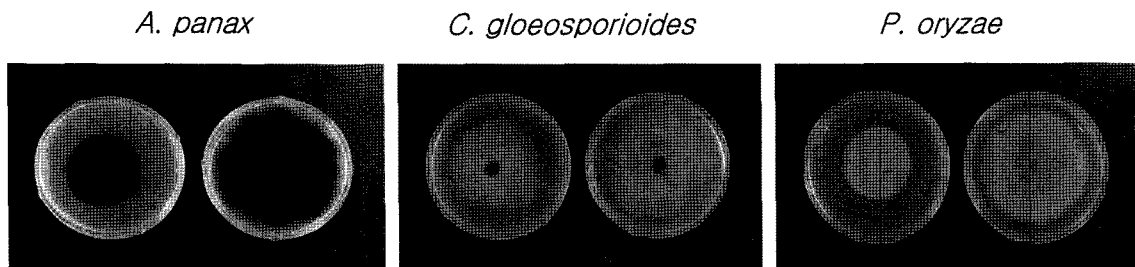


Fig. 4. Antifungal activity of *B. mori* whole body on fungi. Left, 50 ul spreading of 10% solution made by whole body powder on PDA; Right, spreading 50 ul pure water on PDA as a control.

누에에서는 장내용물의 아세톤 추출액에서 얻은 물질에서 항세균성 및 항곰팡이성 모두에 활성을 갖는 천연물질이 존재한다는 보고도 있다(Yasui와 Shirata, 1995). 본 연구에서 확인된 유충체의 활성이 혈액에 비해 높다는 것이 위의 보고를 뒷바침하는 결과로 여겨진다. 장수풍뎅이와 흰점박이 꽃무지와 같이 습한 땅속에서 오랜 시간을 보내는 생태학적 특징을 가지는 곤충들이 병원성 곰팡이에 강한 저항성을 가진다는 것이 확인 됨에 따라 병원성 곰팡이의 생물학적 방제에 대한 곤충자원 이용의 필요성과 이에 대한 긍정적인 효과가 기대된다.

적 요

본 연구는 식물병원성곰팡이에 대한 곤충 혈액 및 유충체의 항곰팡이 활성을 조사하였다. 집누에, 장수풍뎅이, 흰점박이 꽃무지 모두 곰팡이 저해활성을 나타냈으며, 집누에의 계통간 비교에서는 1087계통의 활성이 가장 높았다. 또한, 혈액 보다는 유충체를 이용한 경우가 더 강한 항곰팡이 활성을 나타냈다. 곤충의 항곰팡이 활성은 곰팡이균주에 따라 다르며, 본 연구에 사용된 3종은 *A. panax*, *C. gloeosporioides* 및 *P. oryzae* 균에 항곰팡이 활성을 가진다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청의 농업특정과제로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

신성의, 서두석, 정길록, 차월석 (2006) Chemical Characterization and Antibacterial Effect of Volatile Flavor Concentrate from *Houttynia cordata* Thunb. *J. Life Science* **30**: 297-301.
 Alzoreky, N. S. and K. Nakahara (2003) Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *Int. J. food Microbiol.* **80**: 223-230.
 Boman, H. G. (1995) Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **13**: 61-92.
 Eguchi, M., I. Haneda and A. Iwamoto (1982) Properties of protease inhibitors from the haemolymph of silkworms,

Bombyx mori, *Antheraea pernyi* and *Philosamia Cynthia ricini*. *Comp. Biochem. Physiol.* **71**: 569-576.
 Eguchi, M., M. Itoh, L. Y. Chou and K. Nishino (1993) Purification and characterization of a fungal protease specific protein inhibitor (FPI-F) in the silkworm haemolymph. *Comp. Biochem. Physiol.* **104**: 537-543.
 Eguchi, M., M. Itoh, K. Nishino, H. Sibata, T. Tanaka, K. Kamei-Hayashi and S. Hara (1994) Amino acid sequence of an inhibitor from the silkworm (*Bombyx mori*) hemolymph against fungal protease. *J. Biochem.* **115**: 881-884.
 Fehlbaum, P., P. Bulet, L. Michaut, M. Lagueux, W. Broekaert, C. Hetru and J. A. Hoffman (1994) Insect immunity. Septic injury of *Drosophila* induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. *J. Biol. Chem.* **269**: 33159-33163.
 Iijima, R., S. Kurata and S. Natori (1993) Purification, characterization, and cDNA cloning of an antifungal protein from the hemolymph of *Sarcophaga peregrina* (Flesh fly) larvae. *J. Biol. Chem.* **268**: 12055-12061.
 Kanost M. R. and L. Zhao (1996) Insect hemolymph proteins from the immunoglobulin superfamily. *Adv. Comp. Environ. Physiol.* **23**: 185-197.
 Kim H. N., D. H. Kwon, H. Y. Kim and H. K. Jun (2005) Antimicrobial activities of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* makino methanol extract. *J. Life Science* **15**: 279-286.
 Kim, K. A., U. K. Min, N. S. Kim, J. S. Lee, S. W. Kang and S. K. Nho (2005) Isolation and expression of hemolin in *Bombyx mori*. *Korean J. Genetics* **27**: 81-88.
 Lee, H. B., O. S. Kwon, H. N. Kim, M. K. Kim and C. J. Kim (2003) Bioactivities of Korean ginkgo (*Ginkgo biloba* L.) extract and its potential as a natural pesticide. *Res. Plant Dis.* **9**: 99-103.
 Lee, S. Y., H. J. Moon, S. Kurata, S. Natori and B. K. Lee (1995) Purification and cDNA cloning of an antifungal protein from the hemolymph of *Holotorichia diomphalia* larvae. *Biol. Pharm. Bull.* **18**: 1049-1052.
 Levashina, E. A., S. Ohresser, P. Bulet, J. M. Reichhart, C. Metru and J. A. Hoffman (1995) Metchinikowin, a novel immune-inducible proline-rich peptide from *Drosophila* with antibacterial and antifungal properties. *Eur. J. Biochem.* **233**: 694-700.
 Seo, S. T., J. S. Lee, J. H. Park, k. S. Han and H. I. Jang (2004) Inhibitory effect of garlic extracts on some plant pathogens. *Res. Plant Dis.* **10**: 349-352.
 Trenczek T. (1998) Endogenous defense mechanisms of insect. *Zoology* **101**: 298-315.
 Yasui, H. and A. Shirata (1995) Detection of antibacterial substances in insect gut. *J. Seric. Sci. Japan* **64**: 246-253.