

동충하초 감염 누에의 병리형태학적 특성

윤재수*

경북대학교 생태환경대학 생물응용학과

(2009년 8월 10일 접수, 2009년 8월 28일 수리)

Pathomorphological Peculiarity of Dometic Silkworm, *Bombyx mori*. Infected with *Cordyceps*, *Paecilomyces tenuipes*

Yun, Jae-Su*

Dept. of Applied Biology, College of Ecology & Environmental System, Kyungpook National University, Sangju city, Kyungpook, 742-170, Korea

Abstract

This study was carried out to investigate infection process, symptoms and main component of the domestic silkworm, *Bombyx mori*. larvae and pupa infected with the entomopathogenic fungus *Cordyceps*, *Paecilomyces tenuipes*. The *Cordyceps*, *Paecilomyces tenuipes*, was highly infectious to the silkworms. A pathogenicities of *Cordyceps*, *Paecilomyces tenuipes*, may be highly virulent because of the low resistance or high susceptibility of the silkworms. The silkworm larva infected with *Cordyceps* formed phialospores on the phialides at the imperfect stage of the genus *Cordyceps*, But silkworm pupa infected with *Cordyceps* formed ascospores in the asci at the perfection stage of the genus *Cordyceps*. The results of analysis of health silkworm pupa and silkworm pupa infected with *Cordyceps* were obtained that amino acid, fatty acid, and nucleoside were very different.

Key words Silkworm, *Cordyceps*, silkworm pupa, symptom, component

서 론

동충하초는 한의학에서는 불로장생의 비약으로 사용되어 왔을 뿐만 아니라 폐를 보호하고 신장을 튼튼하게 하며 정력을 증강하고 피를 멈추게 하며 담을 삭이고 기침을 멎게 한다(사, 1983; 진, 1984)고 하여 널리 이용되어 왔다. 현재의 연구는 인간에 대한 기능성 연구로 항균작용, 진정작용, 기관지 확장작용, 혈압 강하작용, 항암작용, 면역 증강작용, 노화억제, 간보호작용, 피로회복 작용, 염증 억제작용, 마약 해독작용 등이 있다(신, 1999; 김, 1999; 조, 2003)고 보고하였고 그 외에도 인공재배를 위한 배양조건(남 등, 1999), 동충하초

의 불완전 세대와 자실체 형성(성 등, 2003), 균사의 생장과 자실체형성(심 등, 2003), 동충하초 자원의 효율적 이용(남 등, 2004), 동충하초의 배양적 특성(하 등, 2005), 형태적 특성에 의한 동정(남 등, 2005) 등 주로 누에를 이용한 기능성 식품이나 의약품 소재 개발에 주력하였다(농업과학기술연구소, 2003). 한편으로는 동충하초의 활용도를 넓히기 위하여 생물 농약으로 개발 가능성을 검증(윤, 2000)하는 등 다방면으로 연구가 진행되고 있다.

인류의 문명이 발달하고 사용하는 물질의 다양화와 사용량의 증가로 지구환경은 오염되어 균형을 상실하고 있다. 특히 농약의 무분별한 사용으로 생태계의 변화를 초래하고 있는 실정이다. 생태계의 균형을 유지하면서 해충을 구제하는 생물농약의 개발을 현실은 요구하고 있다. 이러한 현실에서

*연락처 : Tel. +82-54-530-1213, Fax. +82-54-530-1218

E-mail: jsyun45@knu.ac.kr

사람들은 곤충의 질병과 해충의 생물학적 구제에 관심을 갖게 되었다. 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 300여 종으로 반시목, 등시목, 직시목, 초시목, 인시목, 막시목, 쌍시목 등 많은 곤충에 기생한다(성, 1996). 또한 Ainsworth(1973), Steinhaus(1974), Yoshimori and Harry(1993) 등은 동충하초가 곤충 곰팡이 병의 일종이며 해충방제의 가능성을 보고 하였다.

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(Yun, 2005). 생물 농약으로서 동충하초가 갖는 장점은 화학 농약에 비하여 안전하고 생태계에 주는 영향이 적어 생태계의 균형을 깨뜨리지 않으며 화학농약이 단기적 속효성인데 비하여 장기적이고 지속적이며 타 방제 수단과 병용이 가능하여 종합적 관리 체계에 적용이 가능하고 대상 해충의 저항성을 가질 가능성이 적고 유전적 조작이 가능하다는 점이다. 이러한 천연 생물 농약의 개발 노력은 해충은 물론이고 화학 농약에 의해 발생하는 환경오염까지 줄여 보자는 목적에서 큰 의미를 가지고 있다. 프랑스에서는 이미 동충하초로 만든 생물 농약이 시판 단계에 이르고 있다(성, 1996).

본 연구에서는 동충하초균을 해충방제제로서 활용 가능성을 알아보기 위하여 누에에 접종하고 누에의 형태적 변화와 성분변화를 조사 하였다.

재료 및 방법

병잠발생조사

본 시험에 사용한 동충하초균 *Paecilomyces tenuipes*는 대한잡사회에서 제공받은 표자 배양액 이다. 이 균액을 백옥잠 5 령 기잠 100 두를 시험구로 설정하여 누에 한 마리당 0.05 ml을 분무법으로 경피 접종하였다. 접종한 누에 표피에 포자가 부착하기 용이 하도록 24 시간동안 적온, 적습 상태에서 절식시킨 후(남 등, 1999) 사육 상자에 넣고 보통 상엽육으로 5 령 누에를 사육하면서 매일 오전 10 시와 오후 8 시에 병잠 발생을 조사하고 누에와 번데기 외형의 변화를 관찰하였다.

병반의 관찰

균 감염누에의 병반 관찰은 육안과 광학현미경으로 관찰하고 미세구조는 주사현미경으로 관찰하였다. 주사현미경 관찰은 king과 brown(1983)의 방법을 변형하여 사용하였다. 균의 침입을 받은 누에번데기를 1% osmium 용액으로 상온에서 2시간 고정하고 4°C에서 20 분 동안 0.1M phosphate buffered saline으로 3회 반복하여 세척하였다. 탈수는 ethanol 농도를 50%, 70%, 80%, 90%에서 각각 15 분 100%에서 20 분씩 3 회 반복하여 탈수를 실시한 후 액체 이산화탄소에서 critical point drying하여 건조 시킨 뒤에 금으로 코팅하여 주사현미경JSM-6700F(Japan)로 관찰 하였다.

성분분석

정상 누에와 동충하초균 감염 누에서 성분 변화를 알아보기 위하여 곤충의 성장에 영향을 크게 미치는 유리아미노산, 구성아미노산, 지방산 및 핵산물질을 다음과 같이 분석하였다.

A. 유리아미노산

- 1) 사용기기 : Biochrom 30, Biochrom Ltd., UK
- 2) Column : U-1631 4.6×200 mm Biochrom Ltd.
- 3) Sample processor : MIDAS, Spark Holland BV., Netherlands Loop volume 100 μ l
- 4) Injection volume : 40 μ l
- 5) 사용 Buffer
 - Buffer 1 Lithium Citrate Buffer A pH 2.8 0.2M
 - Buffer 2 Lithium Citrate Buffer B pH 3.0 0.3M
 - Buffer 3 Lithium Citrate Buffer CII pH 3.15 0.5M
 - Buffer 4 Lithium Citrate Buffer DII pH 3.5 0.9M
 - Buffer 5 Lithium Citrate Buffer pH 3.55 1.65M
 - Buffer 6 Lithium Hydroxide solution 0.3M
- 6) Reagent Ultra Ninhydrin Reagent Kit (Biochrom Ltd)
- 7) Flow rate(ml/h) Buffer Ninhydrin

	20	20
--	----	----

8) 전처리방법

80% Ethanol 80°C reflux시켜 solvent fractionation, aqua fraction 후 lithium citrate loading buffer에 녹여서 분석함

B. 구성아미노산

- 1) 사용기기 : Biochrom 30, Biochrom Ltd., UK
- 2) Column : U-1635 4.6×200 mm Biochrom Ltd.



Fig. 2. Dead silkworm larvae infected with cordyceps.

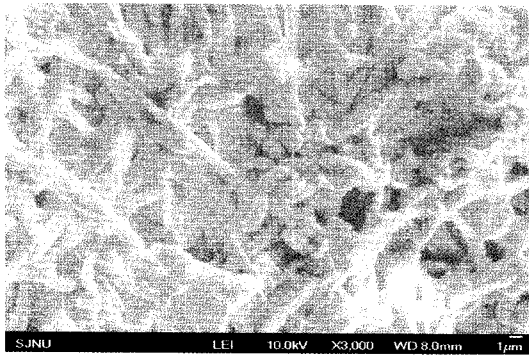


Fig. 3. Phialospores and phialides formed on the dead silkworm (SEM).



Fig. 4. Health silkwormpupa.

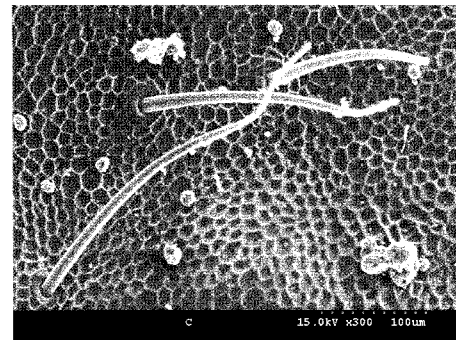


Fig. 5. Health silkwormpupa (SEM).



Fig. 6. Dead silkworm pupa infected with *Cordyceps* (dry).

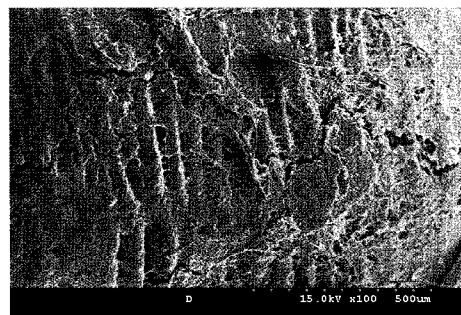


Fig. 7. Cuticle of dead silkworm pupainfected with *Cordyceps* (SEM).

타원형을 이루고 phialospore를 형성하였다.

한편 몸 표면상에 자실체는 형성되지 않으며 더우기 자낭 포자를 발견할 수 없어(그림 3) 전형적인 동충하초의 불완전 세대를 보여 주었다. 유충기간에서 발병은 온도, 습도 등 환경 조건의 부조화로 완전세대로 발육이 진전되지 않는 것 같았다. 양잠농가의 소득증대를 위한 동충하초 생산은 누에 유충기에 병사시키지 않고 번데기 때 병사시켜 자실체를 생산하지만 동충하초를 생물농약으로 개발할 경우 균사체 형성에 중점을 두지 않고 살충에 중점을 두어야 하기 때문에 자실체 또는 분생자좌 등의 형성은 고려할 점이 아닌 것으로 생각된다.

② 번데기 시기의 병징

정상적인 누에 번데기(그림 4, 5)는 피부가 윤택하고 마디가 뚜렷하였지만 동충하초균의 침입으로 병든 번데기는 피부에 반점이 형성되고 부적절한 습기와 온도하에서 건조현상이 발생하였으며(그림 6). 번데기 표면이 말라지면서 껍질이 파괴되었다. 껍질의 파괴 현상은 가뭄에 논바닥이 갈라지는 것 같이 거름모양의 갈라짐 현상이 일어나고 많은 균사체가 생성되었다(그림 7). 주위에서 90%이상의 습기와 20-25℃ 온도를 얻으면 마디사이에서 균사체가 형성되기 시작하여 육안으로도 균사체를 관찰할 수 있었다(그림 8). 균사체는 자라 몸의 전면

으로 뻗어갔다. 습도를 충분히 공급받고 온도가 알맞으면 자실체를 형성하였다. 자실체는 자라면 눈꽃 모양을 형성 하였다(그림 9).

③ 나방 때의 병징

동충하초 균액을 처리한 누에는 대부분 번데기 때에 병들어 죽었지만 일부 살아남아 화아된 성충은 정상적인 나방(그림 10)에 비해 체형이 작고 날개가 부정형이고 비늘털이 빠져 있고 활동력이 약화되어 있었다(그림 11). 이는 동충하초 균을 생물적 방제제로 이용시 동충하초균에 의해 누에 나방이 피해를 받아 살아남는다 하여도 산란성이 약화되어 다음 세대의 개체 탄생에 나쁜 영향을 주므로 차세대 해충 발생 수를 줄일 수 있을 것으로 보인다.



Fig. 8. Mycelial growth between segments of silkworm pupa.



Fig. 9. Fruiting body formed on the silkworm pupa.

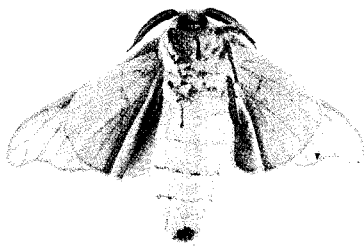


Fig. 10. Health silkworm moth.



Fig. 11. Silkworm moth infected with *Paecilomyces tenuipes*.

Table 1. Free amino acid (mg/100 g) of diseased (Y1) and health (Y2) silkworm pupa

A. acid	Taur	Urea	Asp	Thr	Ser	Glu	Sarc	AAAA	Pro
Y1	28.07	1,056.22	69.50	66.82	36.47	111.52	-	-	382.42
Y2	-	357.64	22.73	105.97	16.21	35.29	6.08	4.85	41.62
A. acid	Gly	Ala	Citr	aaba	Val	Cys	Met	Cysth	Ile
Y1	36.06	195.49	4.03	7.85	100.25	6.06	9.19	65.26	65.26
Y2	36.73	17.09	4.37	4.58	13.73	-	4.09	5.93	5.93
A. acid	Leu	Tyr	B-ala	Phe	aaiba	Gaba	Ethan	Asn	Hyls
Y1	115.42	32.21	13.11	41.76	-	20.41	39.56	503.61	15.43
Y2	11.51	39.15	29.39	10.92	16.91	11.77	12.28	156.52	72.27
A. acid	Om	Lys	1-Mhis	His	Tryp	3-Mhis	Car	Arg	
Y1	10.66	40.05	1.98	7.66	14.57	1.01	3.76	55.36	
Y2	8.58	114.40	7.31	112.06	7.37	-	16.14	125.93	

Y1: Silkworm pupa infected with *Cordyceps*, *Paecilomyces tenuipes*

Y2: Health silkworm pupa

성분의 비교

생명현상의 가장 원천적인 물질인 아미노산, 누에의 성장, 우화 및 생식에 관여하는 지방산(윤 등, 1980), 세포의 증식, 단백질 합성, 유전물질에 관여하는(백 등, 2005) 핵산물질을 동충하초 감염 번데기와 정상 번데기의 성분적 차이를 파악하여 병리관계를 고찰하고 자 하였으며 분석결과는 다음과 같다.

① 유리 아미노산

아미노산은 생명현상의 가장 근원적인 단백질을 구성하는 물질로서 고치실을 만드는 주원료이기 때문에 누에의 실험에서 아미노산 연구는 매우중요한 일이다(윤 등, 1980). 고치의 원료를 만드는 누에 실험 세포는 혈액의 유리 아미노산을 흡착하여 단백질을 합성하고 액상견을 만들어 고치실을 형성한다. 본 실험에서 분리된 유리 아미노산은 표 2와 같다.

유리아미노산은 대체적으로 동충하초 발생 번데기에 많이 포함되어 있다.

② 구성 아미노산

구성 아미노산은 18종이 분리되었으며 동충하초 감염 번데기에는 threonine, serine, proline, alanine, asparagine이 많았고 정상적인 번데기에서는 aspartic acid, glutamic acid, glycine, cysteine, valine, methionine, isoleucine, leucine, tyrosine, phenylalanine, histidine, lysine, argine이 많았다. 성분의 변화는 동충하초는 누에 번데기의 아미노산을 많이 이용하고 새로운 영양소를 만들고 있다는 사실을 이야기하고 있다.

③ 지방산

지방산의 분석결과는 그림 12와 같다. 동충하초균 감염 번

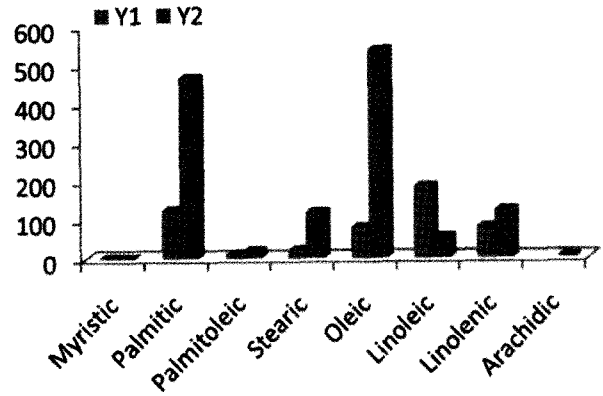


Fig. 12. Fatty acid of diseased (Y1) and health (Y2) silkworm pupa.

데기에서는 myristic acid 2.09 mg/100 g와 linoleic acid 185 mg/100 g 분석되어 건강한 누에 번데기가 각각 함유한 0.69 mg/100 g, 53.61 mg/100 g 보다 많았고 정상적인 번데기는 palmitic acid 465.84, palmitoleic acid 19.43, stearic acid 118.48, oleic acid 537.95, linolenic acid 123.13 mg/100 g가 함유되어 있어 동충하초 번데기가 각각 함유한 124.36, 11.96, 21.76, 79.89, 79.26 mg/100 g 보다 많았다. arachidic acid는 정상번데기에서는 4.48 mg/100 g이 검출되었으나 동충하초 감염 번데기에서는 전혀 검출되지 않았다. 이러한 사실은 동충하초의 자실체 성장으로 누에 번데기의 지방산을 많이 흡수 이용하였고 myristic acid와 linoleic acid는 동충하초 성장 중 생성된 것으로 간주된다.

④ 핵산물질

본 실험에서 분석한 핵산물질의 chromatogram은 그림 13, 그림 14와 같다.

그림 13, 14를 기초로 시료 100 g 당 함유된 mg 량을 계

Table 2. Composition amino acid (mg/100 g) of diseased (Y1) and health (Y2) silkworm pupa

Amino acid	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly
Y1	2.12	1.11	1.29	2.27	1.25	1.17
Y2	2.74	1.10	1.28	2.63	1.05	1.54
Amino acid	Ala	Cys	Val	Met	Ileu	Leu
Y1	1.37	0.19	0.89	0.19	0.53	1.41
Y2	1.19	0.30	0.99	0.60	0.62	1.65
Amino acid	Phe	His	Lys	Amm	Arg	Tyr
Y1	0.76	0.55	1.17	4.21	1.14	0.91
Y2	1.05	0.84	1.44	2.42	1.19	1.03

Y1: Silkworm pupa infected with *Cordyceps*, *Paecilomyces tenuipes*

Y2: Health silkworm pupa

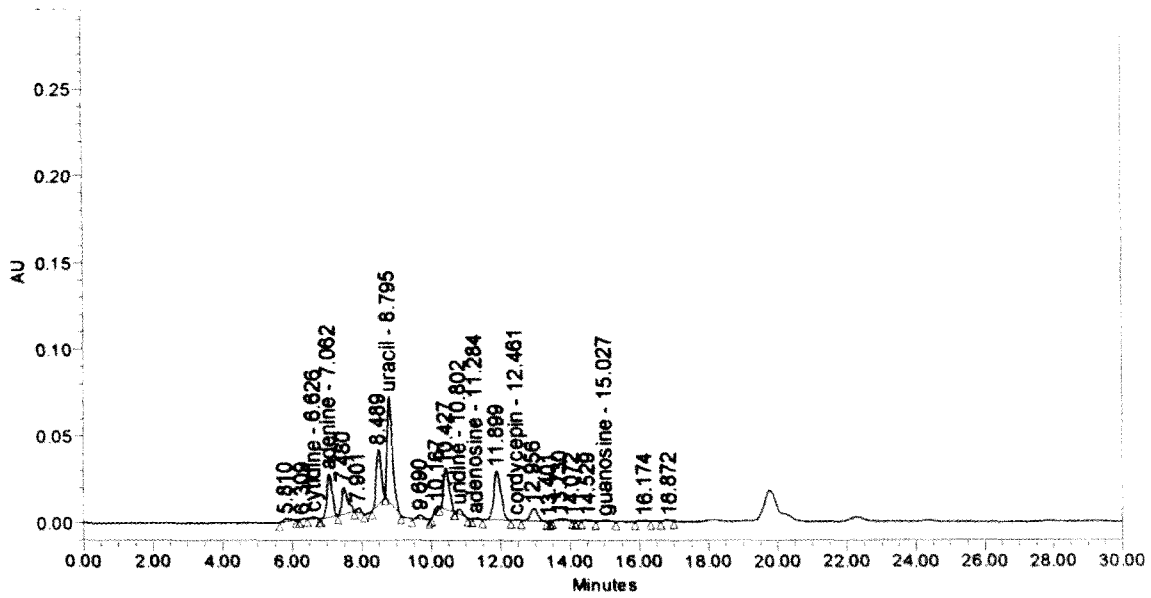


Fig. 13. Nucleoside chromatogram of silkworm pupae infected with cordyceps.

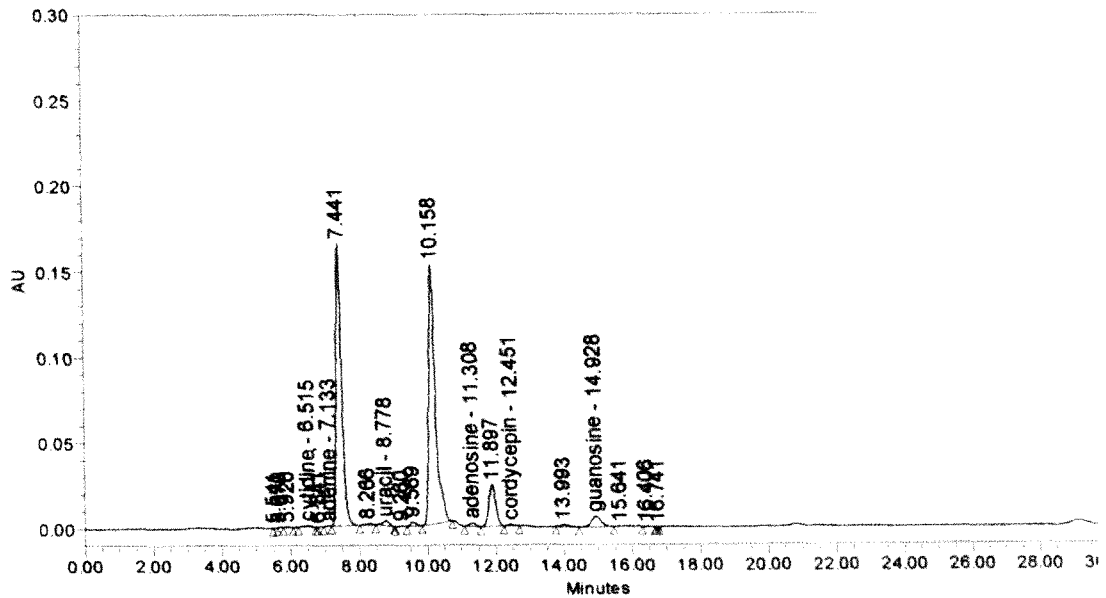


Fig. 14. Nucleoside chromatogram of health silkworm pupae.

산하면 누에 동충하초 번데기에서는 adenine 17.08, uracil 62.28, uridine 4.56 mg/100 g 함유되어 있어 건강한 정상적인 누에 번데기에 각각 함유된 0.60, 5.13, 미함유 mg/100 g 보다 많았고 정상적인 건강한 누에번데기에서는 cytidine 1.76, adenosine 4.97, cordycepin 1.64, guanosine 31.35 mg/100 g가 함유되어 있어 동충하초 번데기가 각각 함유한 0.84, 1.15, 0.40, 2.34 mg/100 g 보다 많이 함유되어 있었다. 이러한 현상은 누에 번데기에 동충하초가 침입하여 대사 활동을 함으로서 번데기의 성분 변화를 초래하였다고 사료됩니다. 이상에서 살펴본 바와 같이 동충하초균의 감염 누에는

발병하여 여러 가지 병징을 나타내고 성분적 차이를 보일 뿐만 아니라 유충 또는 번데기 때에 대부분 사충 되고 나방이가 되어도 허약한 상태로 되기 때문에 살충제로 개발 가능성이 있다고 사료된다.

감사의 글

이 논문은 “경북대학교(2008년도) 학술연구 지원금에 의하여 연구되었음”을 밝히며 감사를 드립니다.

>> 인 / 용 / 문 / 헌

- Ainsworth G. C. (1973) Fungal parasites of invertebrates, The Fungi vol. III, pp. 94~126, Academic press 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.
- King, E. J. and M. F. Brown (1983) A technique for preserving aerial fungal structure for scanning electron microscopy. Can. J. Microbial. 29:653~658.
- Shimane, K. and K. Kawami (1994) Pathogenicity of an entomogenous fungus *Beauveria brongniartii* (saccardo) petch 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.
- Yun, Jae-su (2005) Effect of cordyceps on the development of domestic silkworm. Entomological research 35(4):199~205.
- 福原敏彦 (1979) 真菌病, 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.
- 김대오 (1999) 동충하초버섯의 대량생산 및 기능성 물질이용기술개발(보건복지부 연구보고서).
- 남성희, 정이연, 지상덕, 조세연 (1999) 눈꽃동충하초의 형태 및 배양조건, 한국잡사 학회지 41(1):36~40.
- 남성희, 정이연, 홍인표, 지상덕, 박해철, 이진근, 이명렬, 장승중 (2004) 동충하초 자원의 효율적 이용에 관한 고찰. 한국잡사학회지 46(1):18~22.
- 남성희, 정이연, 홍인표, 지상덕, 황재삼, Mau Tuan Nguyen, 한명세 (2005) 한국자생동충하초의 채집 및 자원보고. 한국잡사학회지 47(1):12~17.
- 농업과학기술원(2003) 누에동충하초의 한약재 등록을 위한 기준설정연구(농촌진흥청 특정과제 연구보고서).
- 백형환 외 25명 (2005) 단백질의 구조 및 기능, 피린코트의 그림으로 보는 생화학 pp. 1~68, 신일사.
- 사 관 (1983) 증편, 동약의학대사전 pp. 167~168, 고문사.
- 송성규 (2001) J300 동충하초의 항AIDS 활성물질 구명(농촌진흥청 특정연구과제 연구보고서).
- 성재모 (1996) 동충하초균을 이용한해충방제. 한국의동충하초 pp. 280~283, 교학사.
- 성재모 (2004) 붉은 자루 동충하초의 생리활성 및 산업화연구에 관한 연구(농촌진흥청 대형과제 보고서).
- 성재모, 홍성준, R. A. Humer, J. W. Spatafora (2003) 유충노랑곰보 동충하초의 불완전세대와 자실체 형성. 한국균학회지 31, 1~7.
- 신국현 (1999) 누에동충하초 유용물질구명 및 약리효과 검색(농촌진흥청 대형공동 연구보고서).
- 심성미, 이경립, 임경환, 이우윤, 이민용, 이태수 (2003) 동충하초의 균사 생장과 자실체 형성 조건의 특성, 한국균학회지 31(1): 8~13.
- 윤재수 (2000) 눈꽃동충하초균의 누에감염에 관한연구. 농약과학회지 4(4):77~80.
- 윤재수 (2001) 눈꽃동충하초균의 누에감염이 고치에 미치는 영향. 한국곤충학회지 31(2):135~138.
- 윤재수, 이언필, 문병원 (1980) 누에의 성분, 잡사화학 pp. 125~134, 교학사.
- 조세연 (1999) 누에동충하초 생산 및 유용물질 개발(농촌진흥청 대형공동연구보고서).
- 진재인 (1984) 증편, 도설한방의약대사전 4 권, pp. 170~173, 동도문화사.
- 하남규, 김승렬, 강진호, 강필돈, 성규명, 홍인표 (2005) 눈꽃동충하초의 배양특성 및 생리활성. 한국잡사학회지 47(1):12~17.

동충하초 감염 누에의 병리형태학적 특성

윤재수*

경북대학교 생태환경대학 생물응용학과

요 약 동충하초 포자 현탁액을 누에에 경피 접촉하고 발병경과를 관찰하여 누에의 형태적 변화와 균사체 형성 번데기의 형태 및 성분변화를 조사하였다. 누에 유충 때 발병 치사된 누에는 불완전세대를 거쳐 분생포자를 형성하고 번데기 때 병사한 번데기는 균사체를 형성하고 자낭포자를 생산하는 완전 세대의 동충하초가 되었다. 발병하지 않은 건강한 번데기와 균사체 형성 번데기의 성분변화는 유리아미노산, 구성아미노산, 지방산, 핵산물질, 모두 차이가 있었다.

색인어 누에, 병징, 동충하초, 누에번데기, 성분