

## 3종의 페루산 entomopathogenic fungi의 전자현미경적 구조와 ITS1, 5.8S ribosomal RNA gene, ITS2의 염기서열 다양성

한상훈\* · 남성희 · 이희삼 · 여주홍  
국립농업과학원 농업생물부

### Comparison of scanning electron microscopic structures and nucleotide sequences variation of ITS1, 5.8S ribosomal RNA gene and ITS2 region in three Peruvian entomopathogenic fungal isolates

Sang-Hoon Han\*, Sunghee Nam, Heui-Sam Lee and Joo-Hong Yeo

Department of Agricultural Biology, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-100, Kore

(Received August 30, 2013, Accepted October 23, 2013)

#### ABSTRACT

In this study, nucleotide sequence structures of intergenic transcribed spacer (ITS) 1, complete 5.8S ribosomal RNA gene and ITS 2 region were analyzed to identify three Peruvian entomopathogenic fungal isolates. The isolates had highly conserved sequence region in 5.8S rRNA gene and unique sequences in ITS 1 and 2 region among them. 5.8S rRNA gene regions were highly conserved and showed high homologies among tested isolates. In contrast, ITS region showed species-specific sequence region, resulting in inter-genus differences. Scanning electron microscopic images of these isolates supported the result of ITS-based identification. From these result, Peruvian entomopathogenic fungal isolate J270, J278, were identified as *Beauveria bassiana* and J271 was identified as *Lecanicillium attenuatum*.

**Key words :** *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium attenuatum*, Intergenic transcribed spacer, Peruvian entomopathogenic fungi, Bioinsecticide

#### 서 론

18S, 5.8S, 28S ribosomal RNA gene의 사이에 존재하는 intergenic transcribed spacer (ITS) 1과 2의 염기서열 정보는 매우 높은 종간 다양성으로 인해 진균류의 동정을 분자생물학적으로 수행하는데 있어 자주 이용되어 왔다 (Lee et al. 1995, Meyer et al. 2010). Genome 상에 반복적으로 존재하는 multicopy region이므로 PCR을 이용할 경우 매우 작은 양의 genomic DNA로도 증폭이 용이한 장점을 가지고 있다. 이러한 장점 때문에 2011년도에 ITS 부위는 곰팡이류에 대한 DNA barcode marker로 선정되었다 (Fungal Barcoding Consortium, www.fungalbarcoding.org).

1988년 Shimazu 등은 *Beauveria* 속이 일반적으로 알려져 있는 동충하초들이 포함되어 있는 *Cordyceps* 속의 무

성생식세대라고 처음으로 보고하였다. *B. bassiana*는 전세계적으로 가장 흔하게 발견되는 곤충병원성 진균류이다 (Lee et al. 2010a). *B. bassiana*는 1838년 Bassi에 의해 곤충병원성 진균 중 최초로 발견되었으며 (Lee et al. 2010b), 나비목 등 곤충의 유충, 번데기, 성충에 기생하여 독성 대사 물질인 beauvericin을 분비하여 숙주를 폐사시킨다 (Min and Han 2002). 또 다른 곤충병원성 진균류의 한 종인 *Lecanicillium attenuatum*은 국내에서 목화 진딧물 방제제로서의 적용에 관한 연구가 수행되었으며 (Kim and Kim 2007) 국내에서 복숭아혹 진딧물 방제 관련 특허가 출원되었다 (Kwon et al. 2007). 곤충병원성 진균류를 이용한 해충의 방제는 화학 살충제에 비해 방제시간이 오래 걸리고, 온도나 습도 같은 환경적 요인에 의해 영향을 받으며, 숙주 특이성 때문에 광범위한 해충 방제가 힘들며, 생산

\*Corresponding author. E-mail: kometaler@kyonggi.ac.kr

**Table 1.** List of reference species for comparison of Peruvian entomopathogenic fungal isolates in ITS1-5.8S rDNA-ITS2 sequence diversities

Species	Strain (isolate)	GenBank accession number		Country
		ITS1-5.8S	rDNA-ITS2	
<i>Beauveria bassiana</i>	(A117)	KC461113		Mexico
<i>Beauveria bassiana</i>	MTCC 2028	JQ266095		India
<i>Beauveria bassiana</i>	SD 15	KC551951		South Korea
<i>Beauveria bassiana</i>	(EABb08 05Rf)	KC753386		Spain
<i>Beauveria brongniartii</i>	(SASRI SCHA2)	JX110388		South Africa
<i>Beauveria brongniartii</i>	ARSEF 8153	JF947191		Canada
<i>Beauveria brongniartii</i>	2753	GU373837		Switzerland
<i>Beauveria brongniartii</i>	IMBST 291	FJ973055		Greece
<i>Beauveria brongniartii</i>	(KH-II)	KC879271		India
<i>Cordyceps confragosa</i>	IFO 8579	AB079127		Japan
<i>Cordyceps confragosa</i>	(LeLe1)	JQ387576		Japan
<i>Cordyceps confragosa</i>	(LeLe2)	JQ387577		Japan
<i>Lecanicillium attenuatum</i>	CGMCC 5328	JQ901939		China
<i>Lecanicillium attenuatum</i>	(KYK 00324)	AB378513		Japan
<i>Lecanicillium attenuatum</i>	NBRC 103235	AB378510		Japan
<i>Lecanicillium attenuatum</i>	NBRC 103237	AB360369		Japan
<i>Lecanicillium attenuatum</i>	KYK 00034	AB378507		Japan
<i>Lecanicillium lecanii</i>	(ICAL-6)	FJ515770		Spain

비용이 비교적 높다는 단점을 가진다 (Khan et al. 2012). 그러나 숙주 곤충만을 가해하는 기주 특이성을 가지며, 균주의 대량생산이 용이하고, 환경 및 사람이나 가축에 대한 독성이 거의 없고, 비잔류의 장점을 가지므로 친환경적 해충방제를 위한 연구가 활발히 이루어져 왔다 (Bang et al. 2010, Lomer et al. 2001, Yoon et al. 1998, Rasette et al. 2011).

따라서, 본 연구는 최근 해충에 대한 미생물방제제로서의 가치가 부각되고 있으며, 관련 연구가 국내외에서 활발히 진행되고 있는 이들 두 곤충병원성 진균류들의 우수 자원 확보를 위해 페루에서 채집된 곤충병원성 진균류들 중 감염체의 형태적 특성이 이들 두 균주의 감염특성과 가장 유사한 3종의 시료들을 분류하고 ITS1, 5.8S rDNA, ITS2 염기서열 정보 분석과 전자현미경적 구조를 관찰함으로써 이들의 유전학적, 형태학적 동정을 수행하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 사용균주 및 배양조건

실험에 사용된 균주는 페루에서 채집된 PJ270, PJ271, PJ278 세 균주이다. 각각 Potato Dextrose agar (PDA) 상에서 24°C, 14일간 배양한 후 형성된 균사체를 ampicillin 이 100 ug/ml 농도로 첨가된 PD broth 30 ml에 접종하고

24°C 180 rpm에서 4~5일간 충분히 배양한 후 homogenizer (Nissei, Japan)를 이용하여 10,000 rpm에서 3분간 균사체를 분쇄하고 12,000 g로 원심분리하여 균사체만을 모아 이후의 실험에 사용하였다. Sequence 비교 분석에 사용된 reference 균들은 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.gov>)에 ITS1-5.8S-ITS2 DNA 염기서열이 제공되는 strain들을 다운로드하여 사용하였다. 이들에 대한 정보는 Table 1에 제시하였다.

### 2. DNA 추출 및 PCR

PCR에 사용될 DNA template로 사용하기 위해 각 균주들의 genomic DNA를 순수분리하였다. gDNA 순수분리는 원심분리 후 상등액을 제거한 각각의 균사체 0.1 g을 ZR Fungal/ Bacterial DNA MiniPrep Kit(Zymo Research, USA)를 이용하였으며 실험 절차는 제조사의 지시를 따랐다. 추출된 DNA는 spectrophotometer를 이용하여 정량하고 10 ng씩을 PCR에 사용하였다. PCR에 사용된 ITS1-5.8S rDNA gene-ITS2 primer쌍은 White 등이 (1990) 보고한 ITS1-F (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCC-3')와 ITS4-R (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')을 사용하였다. PCR 반응은 2X HS PrimeTaq Premix (GeNet Bio, South Korea)를 이용하여 Verti 96-well thermal cyclor

(ABI, USA)에서 수행하였다. PCR 온도조건은 95°C, 5분 동안 Predenaturation을 수행하고, 95°C/15초, 55°C/15초, 72°C/20초의 조건으로 35 cycle을 반복한 후, 72°C/5분으로 postextension을 수행하였다. PCR이 완료된 각각의 시료는 1.5% agarose gel과 1x TAE buffer를 사용하여 전기영동을 수행하고 1x SYBR safe DNA gel stain(invitrogen, USA)에 염색하여 단일 product 생성을 관찰한 후 Macrogen(South Korea)에 양방향 sequencing을 의뢰하였다.

### 3. 염기서열 분석 및 neighbor joining tree의 제작

각 균주별로 결정된 염기서열은 MEGA5.2 (www.megasoftware.net)를 사용하여 multiple alignment를 수행하고 maximum likelihood analysis를 위해 nucleotide substitution model test를 수행하고 최적 model로 제시된 Kimura-2 parameter model을 이용하여 maximum likelihood analysis를 수행하고 neighbor-joining tree를 제작하였다. Bootstrapping은 1,000회 수행하였고 Gaps/Missing Data Treatment option은 Complete Deletion을 사용하여 분석하였다.

### 4. 주사전자현미경을 통한 미세구조의 관찰

주사전자현미경을 통한 형태적 특성을 관찰하기 위하여 PD배지에서 액체배양한 세 개의 실험균주들을 2% 물한 천배지에 접종하고 24°C에서 14일간 배양하였다. 주사전자현미경 촬영을 위한 시료의 전처리 과정은 국립농업과학원 농산물안전성부 작물보호과 전자현미경실에 의뢰하였고 주사전자현미경을 이용해 conidium, conidiophore 및 phialide의 형태를 관찰하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. ITS 부위의 염기서열 비교분석

ITS1, 2 및 5.8S rDNA 염기서열은 버섯류, 곤충 및 식물병원균류에 대한 분자생물학적 유전정보를 이용한 분류법으로 동일 속내 종간 및 속간 유연관계 분류에 가장 많이 사용되어 왔다 (Ito and Hirano 1996, Nam et al. 1999, Kim et al. 2003). ITS1/ITS4 primer 쌍을 이용하여 증폭된 PCR product의 염기서열 분석 결과를 바탕으로 GenBank에서 제공하는 BLAST를 수행한 결과 PJ270과 PJ278은 모두 *B. bassiana*와 100%의 염기서열 상동성을 나타내는 것으로 나타났으며, PJ271은 *Lecanicillium attenuatum*과 100%의 염기서열 상동성을 보이는 것으로 분석되었다.

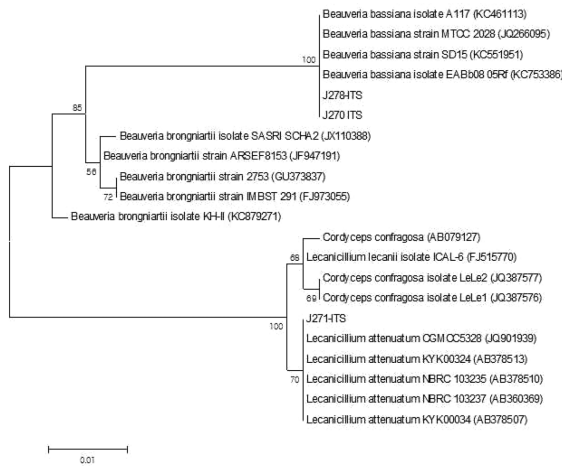
실험에 사용된 페루산 3종의 ITS1-5.8S-ITS2 염기서열 정보와 GenBank에서 제공되는 Reference 종들의 ITS1-5.8S-ITS2 염기서열을 이용하여 Mega5.2 프로그램으로 sequence alignment 분석을 수행하였다. ITS1, 2의 염기서



**Fig. 1.** ITS1, complete 5.8S rDNA and ITS2 DNA sequence alignments of Peruvian entomopathogenic fungi isolates with reference strain sequences. Reference sequences were chosen by results of BLAST alignment of each isolate. This result was directly used to construct neighbor-joining tree. The ITS1 region shows higher diversity comparison with others (a). Region of 5.8S rRNA gene shows high conservation over a genus level (b). The highlighted box of 5.8S rRNA region indicates EcoRI endonuclease which members of *Beveria* do not have (b).

열은 진화속도가 매우 빠른 부분으로 18S rDNA와 5.8S rDNA, 26S rDNA의 사이에 존재하므로 ITS1-5.8S rDNA-ITS2 부위의 염기서열 분석은 높은 염기서열 다양성과 높은 염기서열 보존성을 가지고 있는 부위를 동시에 비교분석함으로써 균류의 분류에 있어 자주 이용되어지고 있다. 본 실험에 사용된 분리균주에서도 이들 부위의 염기서열은 ITS 부위의 매우 높은 다양성과 5.8S rDNA의 매우 높은 보존성의 특징을 그대로 보여주었다 (Fig. 1b). 특히 ITS1에서의 다양성이 두 분류군의 가장 큰 차이로 관찰되었다 (Fig. 1a). 이러한 결과는 종 동정에 있어 이들 부위의 염기서열이 DNA barcode로 사용되어지는 근거를 확인할 수 있었다.

Alignment 결과를 바탕으로 neighbor-joining tree를 제작한 결과(Fig. 2), J278과 J270 균주는 *B. bassiana*와, J271 균주는 *L. attenuatum*과 100%의 염기서열 상동성을 반영하면서 동일 종무음을 형성하는 것을 확인할 수 있었으며 이들의 bootstrap replication value의 지지도는 *B. bassiana* group에서 100%, *L. attenuatum* group에서 70%를 보여주었다. 결국 ITS1과 ITS2를 기반으로 한 분자생물학적 종동정에서 J278과 J270 균주는 *B. bassiana*로, J271균주는 *L. attenuatum*으로 동정되었다.

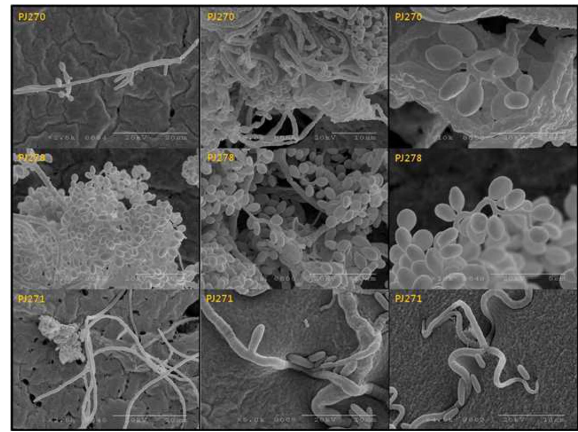


**Fig. 2.** Construction of neighbor-joining tree of entomopathogenic fungal isolates, which were collected in Peru, based on nucleotide sequences of ITS1, 5.8S rDNA and ITS2 regions. Reference sequences are taken from GenBank and the accession numbers are presented. Statistical method for tree construction was maximum likelihood and neighbor-joining method. Tree support values are taken by using bootstrap method and number of bootstrap replication was 1,000. Substitution model was Kimura 2-parameter. Gaps/missing data treatment was complete deletion. The Scale bar and 0.01 at the left bottom means analytical genetic distance of 1%. Construction of neighbor-joining tree of entomopathogenic fungal isolates, which were collected in Peru, based on nucleotide sequences of ITS1, 5.8S rDNA and ITS2 regions. Reference sequences are taken from GenBank and the accession numbers are presented. Statistical method for tree construction was maximum likelihood and neighbor-joining method. Tree support values are taken by using bootstrap method and number of bootstrap replication was 1,000. Substitution model was Kimura 2-parameter. Gaps/missing data treatment was complete deletion. The Scale bar and 0.01 at the left bottom means analytical genetic distance of 1%.

**2. 주사전자현미경을 통한 형태적 특성 관찰**

DNA 염기서열 분석결과에 따르면, PJ270과 PJ278은 *B. bassiana*로, PJ271은 *L. attenuatum*으로 동정됨으로 이러한 분석결과를 뒷받침하기 위해 주사전자현미경을 이용하여 분류형질로 알려져 있는 현미경적 구조 관찰을 수행하였다.

*B. bassiana*는 다양한 곤충을 기주로 하며 감염된 곤충의 표면은 백색의 분생포자로 뒤덮인다. 현미경적 구조는 phialide에서 생긴 여러개의 마디 끝부분에 지그재그 모양으로 분생포자가 발달하는 전형적인 특징을 가지고 있다. 이러한 구조적 특징은 PJ270과 PJ278에서 확인할 수 있으며 ITS 염기서열 분석결과 *L. attenuatum*과 100% 상동성을 보인 PJ271의 경우 누운 형태로 뻗는 균사로부터 (Fig. 3 하단 좌측) phialide들이 자라거나 2차 균사가가지에 3~5개 정도의 phialide들이 나오며, phialide의 끝에 한 개씩의 분생포자가 만들어진다. PJ271의 경우 균사의 성장 및 2차 균사가가지의 형태 등은 명확하게 관찰되었으나



**Fig. 3.** Scanning electron microscope (SEM) images of Peruvian entomopathogenic fungal isolates; PJ270, PJ271 and PJ278. All isolates were grown up on 2% water agar media for 14 days at 24°C.



**Fig. 4.** Conidia and phialides of Peruvian entomopathogenic fungal isolate PJ271. DIC. X1000S.

phialide의 구조 및 분생포자 생산의 형태 관찰은 이루어지지 않았다. 따라서 광학현미경 하에서 phialide의 구조 및 분생포자 생산 형태를 관찰한 결과 *L. attenuatum*의 전형적 구조를 확인할 수 있었으며 (Fig. 4) ITS 염기서열 분석의 중동정 정확성을 지지함을 확인하였다.

결과적으로 본 연구는 18S rDNA와 ITS1, 2 및 5.8S rDNA 염기서열 분석을 통해 페루산과 한국산 *B. bassiana*의 유연관계를 분석하고자 하였다. 결과에서 확인한 바와 같이 각각의 염기서열 정보 만으로는 분리군들간의 유연관계 분석에서 낮은 해상도를 보이는 것을 확인할 수 있었으며, 종내 유연관계 분석에도 multigene을 사용하였을 경우 deep branch level에서 보다 높은 해상도의 결과를 얻을 수 있다는 것을 확인하였다. 본 실험의 분석 결과에 따르면 한국산과 페루산 분리군간에 높은 수준에서의 차이는 관찰되지 않았으며, 보다 더 높은 수준의 분석을 위해서는 다른 유전자들에 대한 추가 분석이 필요할 것으로 판단된다.

전기한 바와 같이 *B. bassiana*와 *L. attenuatum*은 해충에 대한 생물방제제를 위한 유용한 재료이며, 이들의 다양한 숙주 특이성들에 대한 연구를 위해 전 세계에 널리

분포하고 있는 다양한 strain의 수집 및 보존은 해당 연구에 귀중한 재료로서 사용될 수 있을 것이다. 특히 화학 살충제에 비해 안전성이 높은 장점을 가지고 있다는 점은 각종 농약의 환경 오염 문제를 시급히 해결해야 하는 현 시대의 요구에 매우 높은 매력을 가지고 있는 연구재료라는 사실이 이미 많은 연구들에 의해 입증되어져 왔으므로 실용화를 위한 관련 연구들이 지속적으로 시도되어야 할 것으로 판단된다.

## 적 요

ITS 1, 2, 5.8S ribosomal RNA gene 염기서열 분석과 주사전자현미경 구조 분석을 통해 3종의 페루산 곤충병원성진균들의 동정을 수행하고자 하였다. 이를 위해 두개의 ITS 부위와 5.8S rRNA gene 부위를 포함하는 PCR product를 증폭하여 염기서열 분석을 수행하였으며 분석된 염기서열을 이용하여 NCBI의 BLAST를 이용하여 가장 높은 상동성을 보이는 종들의 ITS1-5.8S-ITS2 염기서열 정보와 비교분석을 위한 근연종들의 염기서열 정보를 다운로드하여 neighbor joining 분석을 수행하였다. 이를 통해 5.8S rRNA 유전자 염기서열은 속 수준에서도 거의 차이를 보여주지 않을 정도로 매우 안정적으로 보존되어 있음을 확인할 수 있었으며 중간 구분이 모호한 결과를 보여주었다. 그와 반대로 ITS 부위의 염기서열은 종에 매우 특이적임을 확인할 수 있었으며, 비교분석에 사용된 *Beauveria bassiana* strain 간의 차이는 확인할 수 없었다. ITS 염기서열 분석결과를 뒷받침하고자 곤충병원성 진균류의 동정을 위한 분류 key로 사용되는 미세구조 관찰을 위해 주사전자현미경 관찰과 광학현미경 관찰을 통해 *B. bassiana* 및 *Lecanicillium attenuatum*의 전형적 구조를 관찰할 수 있었다.

## 감사의 글

본 연구는 2013년도 농촌진흥청 연구개발과제(PJ008559)의 지원에 의하여 이루어진 결과이며 이에 감사드립니다. 또한 주사전자현미경과 관련하여 많은 도움을 주신 농촌진흥청 이준성 선생님께 감사드립니다.

## 인용문헌

Bang HS, Jung MP, Kim MH, Han MS, Kang KK, Lee DB, Nam SH (2010) Pathogenicity screening of entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* against *Paratlanticus ussuriensis*. Kor J Environ Agricul **29**, 300~303.

Ito Y, Hirano T (1996) First successful amplification of 18S ribosomal DNA of *Cordyceps* spp. by the PCR method. Mycosci **37**, 109~110.

Khan S, Guo L, Maimaiti Y, Mijit M, Qiu D (2012) Entomopathogenic fungi as microbial biocontrol agent. Mol Plant Breeding **3**, 63~79.

Kim JJ, Kim KC (2007) Compatibility of entomopathogenic fungus *Lecanicillium attenuatum* and pesticide to control cotton aphid, *Aphis gossypii*. Int J Indust Entomol **14**, 143~146.

Kim SH, Lee YJ, Kim IB, Kim MG, Han JA, Hong MK, Lee SH, Lee JD (2003) Phylogenetic analysis of the entomopathogenic fungal species and taxonomical positions of their commercial products. Kor J Life Sci **13**, 400~411.

Kwon OS, Kim JK, Park CH (2007) Entomopathogenic *Lecanicillium attenuatum* CNU-23, and agents and methods for controlling green peach aphid using the same. KIPRIS. 1020070104197.

Lee GJ, An WG, Lee JD, Joo WH (1995) Evolutionary relationships of the genus *Trichoderma* and related taxa based on the partial sequences of 18S ribosomal RNA. Kor J Mycol **23**, 318~324.

Lee JO, Shrestha B, Sung GH, Han SK, Sung JM (2010a) Successful development of *Cordyceps bassiana* stromata from *Beauveria bassiana*. Kor Soc Mycol **38**, 13~16.

Lee KM, Nam SH, Yoon CS, Jeon JY, Yeo JH, Lee KG (2010b) Conditions for formation of synnemata from *Beauveria bassiana*. Kor J Appl Entomol **49**, 43~47.

Lomer CJ, Bateman RP, Johnson DL, Langewald J, Thomas M (2001) Biological control of locusts and grasshoppers. Annu Rev Entomol **46**, 667~702.

Meyer A, Todt C, Mikkelsen NT, Lieb B (2010) Fast evolving 18S rRNA sequences from Solenogastres (Mollusca) resist standard PCR amplification and give new insights into mollusk substitution rate heterogeneity. BMC Evolutionary Biology **10**, 70.

Min EG, Han YH (2002) Optimal condition for mycelial growth of *Beauveria bassiana* and its extracellular enzyme activity. Kor J Microbiol **38**, 50~53.

Nam SH, Hwang JS, Cho SY, Goo TW (1999) Genetic relationship of *Cordyceps* spp. based on internal transcribed spacer sequences of ribosomal DNA. Kor J Seric Sci **41**, 174~179.

Rassette MSW, Pierpont EI, Wahl T, Berres M (2011) Use of *Beauveria bassiana* to control northern fowl mites (*Ornithonyssus sylviarum*) on roosters in an agricultural research facility. J Amer Labor Anim Sci **50**, 910~915.

Shimazu M, Mitsuhashi W, Hashimoto H (1988) *Cordyceps brongniartii* sp. nov., the teleomorph of *Beauveria brongniartii*. Trans Mycol Soc Jpn **29**, 323~330.

White T, Burns J, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 482. In Innis, M. A. D. H. Gelfand, J. J. Sinsky and T. J. White. (eds.), PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, California

Yoon CS, Yoon TJ, Park HS, Lee SG, Yoo JK, Lee JO (1998) Field evaluation of conidia of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin strain CS-1 against diamondback moth larvae. Kor J Pesticide Sci **2**, 113~118.