

국내 서남 지역의 산림 토양 특성과 곤충병원성 진균과의 상관관계*

김희리** · 김형찬** · 이세진***

Correlation between Isolated Entomopathogenic Fungi and Soil Characteristics from Forest Areas of the Southwest Region in Korea

Kim, Hoe Ri · Kim, Hyingchan · Lee, Se Jin

Entomopathogenic fungi are one of the microorganisms distributed worldwide, and they inhabit not only insects but also soils of various regions such as agricultural land and forest areas. In this study, entomopathogenic fungi distributed in the soil of forest areas in Korea were isolated using the insect-baiting method, and the relationship between the distribution and diversity of entomopathogenic fungi and the physical/chemical characteristics of the soil was analyzed. The soils were collected from five forest areas in Korea, and a total of 42 entomopathogenic fungal isolates were isolated from the collected soils. Among them, *Beauveria bassiana* (42.9%) and *Metarhizium anisopliae* (45.2%) were mainly isolated. In particular, it was confirmed that the distribution of *M. anisopliae* varies depending on the total nitrogen (g/kg) and organic matter content (%) of the soil. The soils in forest areas in Korea have a low pH of 4-5. Among all isolates, > 50% of entomopathogenic fungi were isolated from silt loam. This study suggests that it will be helpful in understanding the relationship between the distribution and diversity of entomopathogenic fungi and the physical and chemical characteristics of soil.

Key words : *Beauveria bassiana*, entomopathogenic fungi, insect-baiting method, *Metarhizium anisopliae*

* 본 연구를 위해 토양을 분석해주신 강세원 교수님께 감사드립니다. 본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 연구사업(PJ016387)의 지원에 의하여 이루어진 것임.

** 국립순천대학교 생명산업과학대학 식물의학과 학사과정

*** Corresponding author, 국립순천대학교 생명산업과학대학 농생명과학과 조교수(sejinlee@scnu.ac.kr)

I. 서 론

곤충병원성 진균은 합성 살충제의 대체제로서 자연적으로 발생하며, 절지동물문에 병원성을 가지고 있다. 현재, 90속 700종 이상이라고 알려져 있으며(Onofre et al., 2001), 자낭균류, 접합균류, 불완전균류, 난균류 및 병꼴균류에서 발견된다. 지금까지 알려진 곤충병원성 진균은 자낭균류, 접합균류, 불완전균류가 많은 부분 차지하고 있으며(Maina et al., 2018; Samson et al., 1988), 특히 자낭균문에 속하는 *Beauveria* 속과 *Metahrizium* 속은 곤충병원성 진균 중에서 농업해충을 방제하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다(Gebremariam et al., 2021). *B. bassiana*는 700종 이상의 곤충에 병원성을 가지는 것으로 알려져 있으며(Imoulan et al., 2016), *M. anisopliae*는 200종 이상의 해충을 방제할 수 있는 잠재력을 가지고 있다(Jitendra et al., 2012). 국내외에서는 농업 해충을 방제하기 위해 *B. bassiana*와 *M. anisopliae* 소재 살충제가 판매되고 있지만, 곤충병원성 진균 제품은 다양한 농업 환경에 적용할 수 없으며 대상 해충에 대한 방제율이 감소될 수 있다(Gebremariam et al., 2021). 하지만, 대상 해충에 대한 방제 효과를 높이기 위해서는 토착 균을 분리하여 적용해야 하며, 이전 연구들을 통해서도 토착 곤충병원성 진균을 처리 시 농업 해충에 대해 높은 방제율을 보였다(Clifton et al., 2019; Hernandez-Trejo et al., 2019).

곤충병원성 진균은 전 세계적으로 분포하며, 곤충, 토양을 비롯한 농업 및 산림 모든 지역에서 분리될 수 있으며(Bidochka et al., 1998; Jaber and Ownley, 2018; Korosi et al., 2019; Sanjuan et al., 2015; Wakil et al., 2013), 곤충 사체를 통해 직접 분리되기도 하지만 주로 토양에서 곤충을 사용한 insect-baiting 방법과 dodine 기반 선택배지 기술을 사용하고 있다(Mantzoukas et al., 2020; Meng et al., 2017). Dodine 기반 선택배지 기술은 대부분의 종의 분리에 널리 사용되고 있지만 일부 종은 dodine에 대한 높은 민감성으로 인해 분리의 어려움을 겪고 있다(Rangel et al., 2010). 또한, 곤충병원성 진균 외 토양 미생물이 과도하게 증식하고 소량의 토양 샘플을 사용함으로써 분리 균주가 누락될 수도 있으며(Meyling, 2007), 분리된 곤충병원성 진균은 곤충에 대한 낮은 병원성을 보이고 있다. 이러한 단점들로 인해 최근에는 토양에 곤충을 처리하여 곤충병원성 진균을 분리하는 insect-baiting 방법을 사용하고 있으며, 국내에서는 저렴한 비용으로 대량 사육이 가능한 갈색거저리 유충(*Tenebrio molitor*)을 이용하여 분리하고 있다(Kim et al., 2018).

토양에 서식하는 곤충병원성 진균은 토양 pH, 유기물 함량과 같은 화학적 요인에 의해 영향을 받지만 토양 특성에 따른 곤충병원성 진균의 분포와 관련된 연구는 여전히 부족한 실정이다(Deaver et al., 2019; Jaronski, 2010; Johansson et al., 1999; Quesada-Moraga et al., 2003). 곤충병원성 진균의 생태학적 요인과 환경적 특성을 이해한다면 해충관리에서 고려할 적합한 진균 후보를 찾는 데 도움이 될 수 있다. 호주, 파키스탄 등 국외에서는 토양 특성과 진균과의 상관성을 분석하였지만, 국내에서는 산림, 농경지 등 각 지역의 토양에서 분

리된 곤충병원성 진균과 관련된 논문이 보고되었을 뿐 토양의 물리적 요인과 진균과의 상관성에 관한 연구는 보고된 바 없다(Kim et al., 2018; Shin et al., 2013).

본 연구에서는 토양의 물리·화학적 특성에 따른 곤충병원성 진균의 분포도를 이해하고자 국내 산림 지역을 5곳 선정하여 토양을 채집하였으며, 갈색거저리 유충을 이용하여 채집된 토양에서 곤충병원성 진균을 분리하고자 하였다. 분리된 곤충병원성 진균을 바탕으로 진균의 발생 및 분포에 영향을 미치는 토양의 pH, 유기물 함량, 총 질소량 및 토성을 분석하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 토양 샘플 채집 및 분석

토양 샘플은 국내 서남 지역 산림 5곳을 선정하여 채집되었다(Fig. 1). 전북 1곳, 전남 4곳의 산림 지역의 각 장소에서 10~20개의 토양 샘플을 수집하였으며, 약 200 g의 토양은 표층에 존재하는 식물 등 표면을 제거한 후 정원용 삽으로 상단 10 cm 이내에서 채집되었다. 샘플은 투명한 플라스틱 백(18×20 cm)에 넣어 밀봉한 후 운반되었으며, 모든 샘플은 4℃ 조건으로 보관되었다. 토양 샘플의 토성, pH, 총 질소량 및 유기물 함량은 순천대학교 바이오매스자원화 실험실에 의뢰하여 분석되었다. 토양 샘플은 분석을 위해 자연건조 후 2 mm 체를 이용하여 불필요한 부분을 제거하였으며, 농촌진흥청의 분석법(NIAST, 2000)에 따라 토

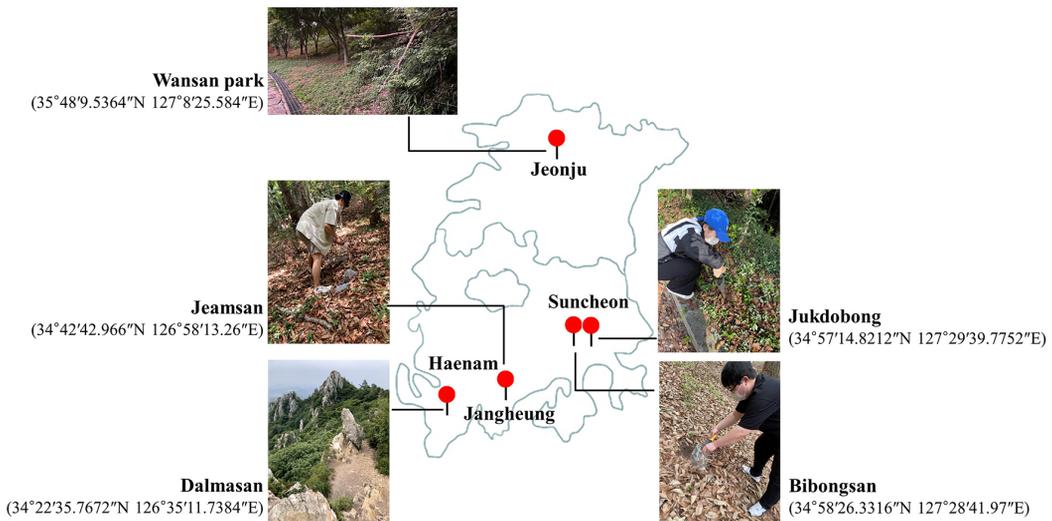


Fig. 1. Location of sampling soil for the isolation of entomopathogenic fungi.

양을 분석하였다. 토양의 pH는 초자전극법을 사용하여 분석하였으며(S230 Mettler Toledo), 유기물 함량과 총 질소는 Tyurin법과 Kjeldahl법을 이용하여 분석하였다. 토성은 Micropipette 법을 이용하여 시료의 입경분포를 조사한 후 미국농무성(USDA)의 분류체계에 따라 결정하였다.

2. 시험 곤충

곤충병원성 진균 분리에 사용되는 갈색거저리 유충은 전북대학교 곤충미생물공학연구실에서 분양받았으며, 밀기울이 들어간 플라스틱 상자(22 × 35 × 15 cm)에서 사육하였다. 수분 공급을 위해 배춧잎을 제공하였으며, 사육은 온도 25 ± 2°C, 상대습도 30 ± 5%의 조건에서 진행되었다.

3. 곤충병원성 진균 분리 및 동정

Kim 등(2018)에 따라 곤충병원성 진균은 insect-baiting법을 이용하여 토양에서 분리되었다. 플라스틱 컵(diameter 10 cm, height 11 cm)에 토양 샘플을 약 50 g씩 넣어준 후 5마리의 4-5령 갈색거저리 유충을 플라스틱 컵에 넣고 25 ± 2°C에서 2주 동안 배양했다. 곤충병원성 진균에 감염된 갈색거저리 유충은 1/4 SDA (Sabouraud dextrose agar) 배지에 계대배양하여 순수 분리하였다. 분리된 균주는 genomic DNA extraction buffer를 이용하여 DNA를 추출하였으며, 균 동정을 위해 White et al., 1990에 따라 ITS (Internal Transcribed Spacer region) 영역을 증폭하기 위해 ITS1-F(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'), ITS4-R(5'-TCCTCCGCTT ATTGATATGC-3') primer를 사용하였다. PCR 반응은 AccuPower PCR PreMix (Bioneer)를 사용하여 94°C에서 30초(denaturation), 55°C에서 30초(annealing), 74°C에서 30초(extension)를 한 주기로 총 30회 반복하여 증폭되었다. PCR 산물은 0.8% agarose gel을 이용하여 증폭된 것을 확인한 후 Bioneer (Daejeon, Korea)을 통해 염기서열이 분석되었으며, NCBI Genbank 데이터를 이용하여 BLAST되었다.

4. 계통도 분석

분리한 곤충병원성 진균 간의 계통 분석은 ITS sequence를 기반으로 수행하였다. 계통도 분석을 위하여 NCBI Genbank에 등록된 *B. bassiana* ARSEF 1564 (Accession no. NR_111594), *Isaria* sp. HB0201 (Accession no. AJ536568), *M. anisopliae* ARSEF 7487 (Accession no. NR_132017), *Paecilomyces clematidis* BRNU 677844 (Accession no. NR_182939)의 염기서열과 비교하였다. 각 균주의 ITS sequence는 ClustalX v.2.0 (Larkin et al., 2007)를 이용하여 서

열을 정렬하였으며, GeneDoc software를 이용하여 불필요한 sequence를 제거하였다. 계통수 분석은 정렬된 유전자 세트를 Kimura-2 parameter model을 이용한 Maximum likelihood 방법으로 MEGA11 software (Tamura et al., 2021)를 이용하여 수행하였다. 계통수의 분기는 1,000 회 반복을 기반으로 Bootstrap 분석을 통해 추정하였다.

5. 통계 분석

본 연구에서 채집된 토양의 특성(pH, 총 질소량, 유기물 함량)은 평균과 표준편차를 구하였으며, 토양의 총 질소량, 토성 및 유기물 함량과 분리된 곤충병원성 진균 간의 상관관계는 Pearson’s correlation coefficient (P<0.05)로 분석하였다(IBM SPSS statistics 27 for Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Ⅲ. 결 과

1. 토양 분석

수집된 각 산림 지역의 토양 샘플을 분석한 결과, 토양의 pH는 4.2-5.43이었으며, 달마산 지역이 4.27 ± 0.00로 가장 낮은 pH를 보였으며, 순천 죽도봉이 5.43 ± 0.01로 높은 pH를 보였다(Table 1). 죽도봉과 동일한 시군에 위치한 비봉산의 경우, 죽도봉에 비해 4.48 ± 0.19로 상대적으로 낮은 pH를 보였다. 각 산림 지역의 토성은 달마산과 전주는 미사질 양토(silt loam)으로 분석되었으며, 비봉산, 죽도봉, 제암산 토양은 각각 양토(loam), 실트질 점토(silty clay), 미사질식양토(silty clay loam)로 분석되었다. 총 질소량과 유기물 함량을 분석한 결과, 산림 지역에 따라 큰 차이가 확인되었으며, 총 질소량이 낮은 경우 유기물 함량 또한 상대적으로 낮은 경향을 보였다(r=0.998, p<0.01). 총 질소량과 유기물 함량이 낮은 토양은 순천

Table 1. Physico-chemical characteristics of sampling soil from 5 forest regions in Korea

No.	Natural mountain name	pH ± SD	Organic matter (%) ± SD	T-N (g/kg) ± SD	Soil texture
1	Bibongsan	4.48 ± 0.19	9.13 ± 0.29	3.49 ± 0.42	Loam
2	Jukdobong	5.43 ± 0.01	2.69 ± 0.11	1.09 ± 0.08	silty clay
3	Wansan park	4.73 ± 0.01	4.26 ± 0.21	1.77 ± 0.15	Silt loam
4	Jeamsan	4.82 ± 0.01	17.03 ± 0.71	7.24 ± 0.15	Silty clay loam
5	Dalmasan	4.27 ± 0.00	10.81 ± 0.22	4.60 ± 0.29	Silt loam

죽도봉으로 각각 1.09 ± 0.08 g/kg, $2.69 \pm 0.11\%$ 이었으며, 가장 높은 토양은 제암산으로 7.24 ± 0.15 g/kg, $17.03 \pm 0.71\%$ 이었다.

2. 곤충병원성 진균 분리 및 동정

국내 산림 5 지역의 토양 샘플에서 총 42 분리주가 순수 분리되었으며, 그 중 *M. anisopliae* (45.2%)가 많은 부분을 차지하고 있으며, *B. bassiana* (42.9%), *Metarhizium* sp. (9.5%), *Purpureocillium lilacinum* (2.4%) 순으로 분리되었다(Table 2). 모든 토양에서 *B. bassiana*가 분리되었으며, 순천 비봉산 지역에서는 다양한 종의 곤충병원성 진균이 분리되었지만, 순천 죽도봉 지역의 토양에서는 *B. bassiana*만 분리되었다. 국내 5 지역의 산림 토양 중 전주 완산칠봉의 토양에서 14개 분리주로 가장 많은 곤충병원성 진균이 분리되었으며, 제암산 지역 토양에서 4개 분리주(isolate)로 가장 적은 진균이 분리되었다.

Table 2. Number of entomopathogenic fungi isolated using the insect-baiting methods from the soil samples of 5 regions

No.	Natural Mountain Name	Species				Total isolates
		<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Metarhizium</i> sp.	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	
1	Bibongsan	2	-	4	1	7
2	Jukdobong	6	-	-	-	6
3	Wansan park	7	2	5	-	14
4	Jeamsan	1	-	3	-	4
5	Dalmasan	2	2	7	-	11

3. 곤충병원성 진균과 토양의 상관관계 및 계통도 분석

분리된 42 분리주의 ITS 영역의 염기서열을 바탕으로 NCBI Genbank에 등록된 곤충병원성 진균과 98% 이상의 유사성을 보였다. 계통 발생학적 분석을 통해 *Metarhizium* 속 분리주가 이전에 보고된 *M. anisopliae*와 클러스터링(clustering) 되었으며, *Beauveria* 속 분리주 또한 이전에 보고된 *B. bassiana*와 클러스터링 되었다(Fig. 2). 분리된 모든 분리주는 bootstrap 값이 100%으로 각각 *B. bassiana*와 *M. anisopliae*로 분류되었으며, *B. bassiana*와 *M. anisopliae* 분리주는 NCBI Genbank에 등록된 균과 다른 하위 계통군으로 분류되었다. *Beauveria* 속 분리주는 4개의 하위 계통군으로 분류되었으며, *Metarhizium* 속 분리주는 6개의 하위 계통군

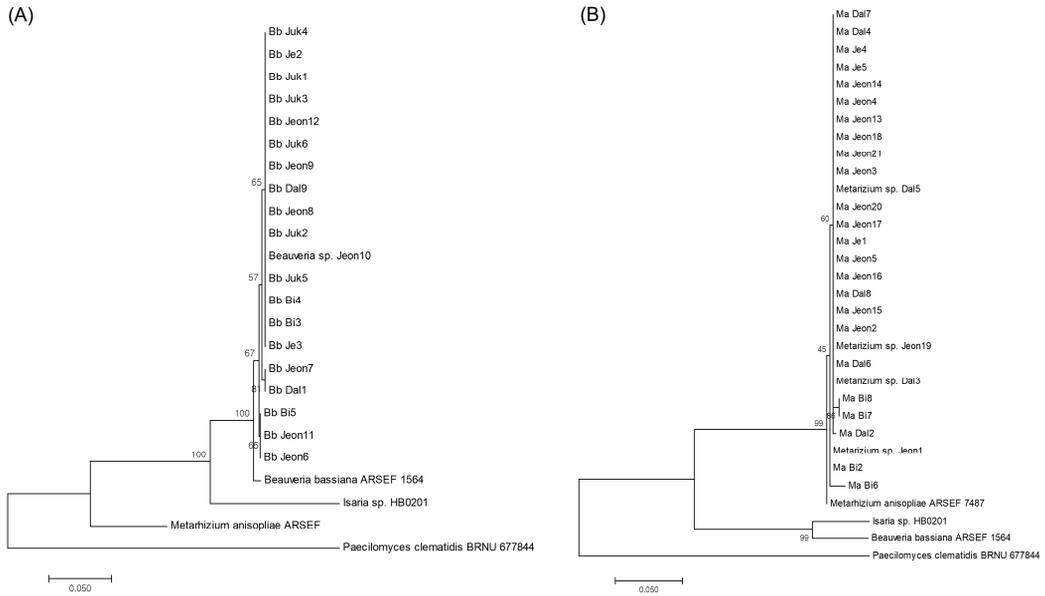


Fig. 2. Maximum likelihood phylogenetic tree based on internal transcribed spacer (ITS) gene of *Beauveria* spp. (A) and *Metarhizium* spp. (B) isolated southwestern forest region. The ITS sequences of *B. bassiana* ARSEF 1564, *Isaria* sp. HB0201, *M. anisopliae* ARSEF 7487 and *Paecilomyces clematidis* BRNU 677844 were included as outgroup species. Bootstrap analysis was performed with 1,000 replications.

으로 분류되었다. 곤충병원성 진균의 분포와 토양 특성의 상관관계를 분석하기 위해 pearson 상관분석을 실시한 결과, 토양의 유기물 함량과 총 질소량이 높아질수록 많은 수의 *M. anisopliae*가 분리되었으며($r=0.899$, $p<0.05$, $r=0.886$, $p<0.05$), 실트질 점토에서 곤충병원성 진균이 많이 분리된 것이 확인되었다($r=0.943$, $p<0.05$).

IV. 고 찰

국내 토양에서 주로 분리된 곤충병원성 진균은 *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *I. fumosorosea* 등이 있으며(Shin et al., 2013), 본 연구에서도 주로 *M. anisopliae*와 *B. bassiana*가 분리되었다. 곤충병원성 진균을 동정하기 위해 ITS 영역을 사용하여 유전적으로 분류하고 있으며, 특히 *B. bassiana*와 *M. anisopliae*를 분리하는데 주로 사용되고 있다(García et al., 2018). 본 연구에서 분리된 *Metarhizium* sp. 분리주는 *M. anisopliae* 분리주와 근연 관계가 있어 이들 균주들로 동정이 가능한 것으로 추정되며, 분리된 모든 균주들의 정확한 동정을 위해서는 분리주의 다양한 생화학적 특성 등을 추가로 조사할 필요가 있다.

*M. anisopliae*와 *B. bassiana*는 곤충병원성 진균 중 많은 부분을 차지하고 있으며, 특히 *Metarhizium* 속은 광범위한 온도와 수분 조건을 견딜 수 있어 다양한 조건의 토양에 서식할 수 있었으며, 이러한 특성으로 인해 분리 균주의 많은 부분을 차지하였다(Bueno-Pallero et al., 2020; Horton and Bruns, 2001). 토양에서 곤충병원성 진균의 분포는 토성, pH, 온도와 같은 특성이 중요한 역할을 하고 있으며, 유기물 함량은 곤충병원성 진균과 진균 개체군의 다양성을 촉진할 수 있는 조건 중 하나이다(Klingen et al., 2002). 높은 유기물 함량을 보인 토양은 제암산과 달마산이었으며, 죽도봉이 가장 낮은 유기물 함량을 보였다. 죽도봉은 다른 지역과 달리 *B. bassiana*만 분리된 지역으로 Quesada-Moraga 등(2007)에 따르면 *B. bassiana*의 경우 낮은 유기물 함량을 가지는 토양에 많이 분포하며, 이러한 특성은 죽도봉에서 *B. bassiana*만 분리된 원인 중 하나일 것으로 판단할 수 있다. 국내 산림 지역은 대부분 산성 토양으로, 산림 지역 5곳의 토양 pH를 분석한 결과 4-5 정도로 낮은 pH를 보였으며, pH가 상대적으로 낮은 비봉산과 달마산의 경우 *B. bassiana*보다 *M. anisopliae*가 더 높은 비율로 분리되었다. 곤충병원성 진균은 일반적으로 알칼리성보다 산성에 더 내성이 있어 산성 토양에서 잘 서식할 수 있으며, *M. anisopliae*의 경우 4-7.8 정도의 pH 조건에서 분포할 수 있을 정도로 *B. bassiana*보다 산성 토양에 더 잘 적응할 수 있는 특성을 보인다(Issaly et al., 2005; Padmavathi et al., 2003; Quesada-Moraga et al., 2007).

이 결과를 통해 토양의 특성과 곤충병원성 진균의 분포도 간의 상관관계가 확인되었다. 하지만, 토양 내에서 곤충병원성 진균의 분포 및 다양성을 이해하기엔 한계가 있으며, 본 연구의 신뢰도를 높이기 위해 국내 다양한 산림 지역의 토양을 확보하여 추가적인 연구가 필요하다.

결론적으로 국내 일부 산림 지역의 토양을 이용하여 곤충병원성 진균을 분리하였으며, 분리된 곤충병원성 진균과 토양의 물리적, 화학적 특성과의 상관관계를 분석하였으며, 특히 토양의 유기물 함량 및 총 질소량과 곤충병원성 진균의 분포가 상관관계가 있음을 확인하였다.

V. 적 요

본 논문에서는 국내 산림 지역의 토양에서 서식하는 곤충병원성 진균을 insect-baiting 방법을 이용하여 분리하고자 하였으며, 곤충병원성 진균과 토양의 물리적, 화학적 특성과의 관계를 분석하고자 하였다. 국내 산림 지역 5곳을 선정하여 토양을 채집하였으며, 채집된 토양에서 총 42 분리주를 분리하였다. 그 중 *Beauveria bassiana* (42.9%)와 *Metarhizium anisopliae* (45.2%)가 주로 분리되었으며, 특히 *M. anisopliae*의 분포는 토양의 총 질소량(g/kg)과 유기물 함량(%)에 따라 달라지는 것이 확인되었다. 국내 산림 지역의 토양은 낮은 pH를 보였으

며(pH 4-5), 전체 분리주 중에서 미사질 양토(silt loam)에서 50% 이상이 분리되었다. 본 연구의 결과는 통하여 토양의 물리적, 화학적 특성과 곤충병원성 진균의 분포 및 다양성과의 관계를 이해하는데 도움이 될 것으로 판단된다.

[Submitted, November. 2, 2022; Revised, November. 18, 2022; Accepted, December. 15, 2022]

References

1. Aguilera Sammaritano, J. A., C. C. López Lastra, A. Leclerque, F. Vazquez, M. E. Toro, C. P. D'Alessandro, A. G. Cuthbertson, and B. E. Lechner. 2016. Control of *Bemisia tabaci* by entomopathogenic fungi isolated from arid soils in Argentina. *Biocontrol Sci. Technol.* 26: 1668-1682.
2. Bidochka, M. J., J. E. Kasperski, and G. A. Wild. 1998. Occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soils from temperate and near-northern habitats. *Can. J. Bot.* 76: 1198-1204.
3. Bueno-Pallero, F. Á., R. Blanco-Pérez, I. Vicente-Díez, J. A. Rodríguez Martín, L. Dionísio, and R. Campos-Herrera. 2020. Patterns of occurrence and activity of entomopathogenic fungi in the Algarve (Portugal) using different isolation methods. *Insects* 11: 352.
4. Clifton, E. H., L. A. Castrillo, A. Gryganskyi, and A. E. Hajek. 2019. A pair of native fungal pathogens drives decline of a new invasive herbivore. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 116: 9178-9180.
5. Deaver, N. R., C. Hesse, C. R. Kuske, and A. Porras-Alfaro. 2019. Presence and distribution of insect-associated and entomopathogenic fungi in a temperate pine forest soil: An integrated approach. *Fungal Biol.* 123: 864-874.
6. Eski, A. and M. M. Gezgin. 2022. Susceptibility of different life stages of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) to indigenous entomopathogenic fungi. *J. Stored Prod. Res.* 98: 102008.
7. García, J. L., P. Sotelo, D. M. Monroy, G. Barrera, J. Gómez-Valderrama, C. Espinel, E. Barreto, and L. F. Villamizar. 2018. Identification and characterization of a *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. isolate having a high potential for the control of the *Diatraea* sp. sugarcane stem borer. *Biotechnol. Apl.* 35: 1201-1207.
8. Gebremariam, A., Y. Chekol, and F. Assefa. 2021. Phenotypic, molecular, and virulence

- characterization of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* (Balsam) Vuillemin, and *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin from soil samples of Ethiopia for the development of mycoinsecticide. *Heliyon* 7: e07091.
9. Hernandez-Trejo, A., B. Estrada-Drouaillet, J. A. López-Santillán, C. Rios-Velasco, R. Rodríguez-Herrera, and E. Osorio-Hernández. 2019. Effects of native entomopathogenic fungal strains and neem extract on *Spodoptera frugiperda* on Maize. *Southwest. Entomol.* 44: 117-124.
 10. Horton, T. R. and T. D. Bruns. 2001. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Mol. Ecol.* 10: 1855-1871.
 11. Imoulan, A., H. Wu, W. Lu, Y. Li, B. Li, R. Yang, W. Wang, X. Wang, P. M. Kirk, and Y. Yao. 2016. *Beauveria medogensis* sp. nov., a new fungus of the entomopathogenic genus from China. *J. Invertebr. Pathol.* 139: 74-81.
 12. Issaly, N., H. Chauveau, F. Aglevor, J. Fargues, and A. Durand. 2005. Influence of nutrient, pH and dissolved oxygen on the production of *Metarhizium flavoviride* Mf189 blastospores in submerged batch culture. *Process Biochem.* 40: 1425-1431.
 13. Jaber, L. R. and B. H. Ownley. 2018. Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens? *Biol. Control* 116: 36-45.
 14. Jaronski, S. T. 2010. Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. *Biocontrol* 55: 159-185.
 15. Jitendra, M., D. Kiran, K. Ambika, S. Priya, K. Neha, and D. Sakshi. 2012. Biomass production of entomopathogenic fungi using various agro products in Kota region, India. *I. Res. J. Biological Sci.* 1: 12-16.
 16. Johansson, M., B. Stenberg, and L. Torstensson. 1999. Microbiological and chemical changes in two arable soils after long-term sludge amendments. *Biol. Fertility Soils* 30: 160-167.
 17. Kim, J. C., M. R. Lee, S. Kim, S. J. Lee, S. E. Park, Y. Nai, G. S. Lee, T. Y. Shin, and J. S. Kim. 2018. *Tenebrio molitor*-mediated entomopathogenic fungal library construction for pest management. *J. Asia-Pac. Entomol.* 21: 196-204.
 18. Klingen, I., J. Eilenberg, and R. Meadow. 2002. Effects of farming system, field margins and bait insect on the occurrence of insect pathogenic fungi in soils. *Agric. Ecosyst. Environ.* 91: 191-198.
 19. Korosi, G. A., B. A. Wilson, K. S. Powell, G. J. Ash, A. Reineke, and S. Savocchia. 2019. Occurrence and diversity of entomopathogenic fungi (*Beauveria* spp. and *Metarhizium* spp.) in Australian vineyard soils. *J. Invertebr. Pathol.* 164: 69-77.

20. Larkin, M. A., G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigank, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson, D. G. Higgins. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 23: 2947-2948.
21. Maina, U. M., I. B. Galadima, F. M. Gambo, and D. Zakaria. 2018. A review on the use of entomopathogenic fungi in the management of insect pests of field crops. *J. Entomol. Zool. Stud.* 6: 27-32.
22. Mantzoukas, S., I. Lagogiannis, A. Ntoukas, P. A. Eliopoulos, D. Kouretas, D. G. Karpouzas, and K. Poulas. 2020. Trapping entomopathogenic fungi from vine Terroir soil samples with insect baits for controlling serious pests. *Appl. Sci.* 10: 3539.
23. Meng, X., J. Hu, and G. Ouyang. 2017. The isolation and identification of pathogenic fungi from *Tessaratomia papillosa* Drury (Hemiptera: Tessaratomidae). *PeerJ* 5: e3888.
24. Meyling, N. V. 2007. Methods for isolation of entomopathogenic fungi from the soil Environment. University of Copenhagen, Frederiksberg. pp. 1-18.
25. Onofre, S. B., C. M. Miniuk, N. M. de Barros, and J. L. Azevedo, 2001. Pathogenicity of four strains of entomopathogenic fungi against the bovine tick *Boophilus microplus*. *Am. J. Vet. Res.* 62: 1478-1480.
26. Padmavathi, J., K. Uma Devi, and C. Uma Maheswara Rao. 2003. The optimum and tolerance pH range is correlated to colonial morphology in isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* - a potential biopesticide. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19: 469-477.
27. Quesada-Moraga, E. and A. Vey. 2003. Intra-specific variation in virulence and in vitro production of macromolecular toxins active against locust among *Beauveria bassiana* strains and effects of in vivo and in vitro passage on these factors. *Biocontrol Sci. Technol.* 13: 323-340.
28. Quesada-Moraga, E., J. A. Navas-Cortés, E. A. Maranhao, A. Ortiz-Urquiza, and C. Santiago-Álvarez. 2007. Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. *Mycol. Res.* 111: 947-966.
29. Rangel, D. E., S. J. Dettenmaier, É. K. Fernandes, and D. W. Roberts. 2010. Susceptibility of *Metarhizium* spp. and other entomopathogenic fungi to dodine-based selective media. *Biocontrol Sci. Technol.* 20: 375-389.
30. Samson, R. A., H. C. Evans, and J. Latgé. 1988. Taxonomy of entomopathogenic fungi. In: Anonymous, Atlas of Entomopathogenic Fungi. Springer. Berlin, Heidelberg. pp. 5-16.
31. Sanjuan, T. I., A. E. Franco-Molano, R. M. Kepler, J. W. Spatafora, J. Tabima, A. M. Vasco-Palacios, and S. Restrepo. 2015. Five new species of entomopathogenic fungi from

- the Amazon and evolution of neotropical *Ophiocordyceps*. *Fungal Biol.* 119: 901-916.
32. Shin, T. Y., W. W. Lee, S. H. Ko, J. B. Choi, S. M. Bae, J. Y. Choi, K. S. Lee, Y. H. Je, B. R. Jin, and S. D. Woo. 2013. Distribution and characterisation of entomopathogenic fungi from Korean soils. *Biocontrol Sci. Technol.* 23: 288-304.
 33. Tamura, K., G. Stecher, and S. Kumar. 2021. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Mol. Biol. Evol.* 7: 3022-3027.
 34. Wakil, W., M. U. Ghazanfar, T. Riasat, Y. J. Kwon, M. A. Qayyum, and M. Yasin. 2013. Occurrence and diversity of entomopathogenic fungi in cultivated and uncultivated soils in Pakistan. *Entomol. Res.* 43: 70-78.
 35. White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Innis, M. A. (ed). *PCR Protocols*, Academic Press, California. pp. 315-322.