

뽕나무 하늘소(*Apriona germari* Hope)로부터 *Beauveria*속 사상균의 분리 및 PCR에 의한 동정

서종복 · 진병래 · 윤형주* · 마영일* · 강석권

서울대학교 농업생명과학대학

*농촌진흥청 잠사곤충연구소

Identification of *Beauveria* spp. Isolated from Mulberry Longicorn Beetle (*Apriona germari* Hope) using Polymerase Chain Reaction

Jong Bok Seo, Byung Rae Jin, Hyung Joo Yoon*, Young Il Mah* and Seok Kwon Kang

College of Agriculture & Life Sciences, Seoul National University, Suwon, Korea

*National Sericulture & Entomology Research Institute, RDA, Suwon, Korea

Abstract

To develop a microbial pesticide for the control of mulberry longicorn beetle, *Apriona germari*, *Beauveria* spp. were isolated from the infected *Apriona germari* larvae. The morphology of *Beauveria* spp. was observed by phase contrast and scanning electron microscope. In addition, the *Beauveria* spp. isolated from *Apriona germari* were identified by the random amplification of polymorphic DNA using polymerase chain reaction. The results showed that the *Beauveria* spp., SFB-1A and SFB-3A, isolated from *Apriona germari* were identified with *B. bassiana* and *B. brongniartii*, respectively, suggesting that the random amplification of polymorphic DNA is effective for the identification of *Beauveria* spp.

Key words : *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, mulberry longicorn beetle

서 론

뽕나무 하늘소(*Apriona germari*)는 뽕나무를 비롯한 사과나무, 배나무, 굴나무 등 과수에 심각한 피해를 주고 있는 주요 딱정벌레목 해충으로, 최근에는 버섯재배지 등에서도 하늘소의 피해가 심각한 것으로 알려지고 있으나, 이러한 하늘소는 穿孔性 害蟲이므로 방제에 많은 어려움이 있다(백 1987). 그러나 국내에서는 뽕나무 하늘소 등 천공성 해충의 효율적인 방제연구가 거의 이루어지고 있지 않으며, 다만 蟲孔에 살충제 주입 방법에 의존하고 있는 실정이나 일본의 경우는 그 피해가 심한 울도 하늘소(*Psacotha hilaris*)의 방제를 위해, 곤충병원 사상균을 이용한 효율적인

방제법에 대해 활발한 연구가 이루어지고 있다(島根과 河上 1994, 岡田 1994). 딱정벌레목 해충의 방제에는 곤충병원 사상균 중 주로 *Beauveria*속이 이용되고 있으며, 특히 *B. brongniartii*는 하늘소 등의 딱정벌레목에 병원성이 강한 반면, 누에에는 병원성이 약하여 미생물 살충제로서의 이용 가능성이 높은 것으로 보고되고 있다(河上和 島根 1986).

따라서 본 연구는 딱정벌레목 천공성 해충의 효과적인 방제법 개발을 위한 기초 연구로서, 뽕나무 하늘소 이병충으로부터 *Beauveria*속 곤충병원 사상균을 분리하고, 분리된 사상균의 분생자를 중심으로 위상차 현미경과 주사전자현미경으로 그 형태를 관찰하였으며, 또 PCR(polymerase chain reaction) 기법을 이

용하여 새로운 동정법을 개발하였다.

재료 및 방법

1. 곤충병원 사상균의 분리

잠사곤충연구소 생체기능 연구실에서 인공사육 중 이병된 뽕나무 하늘소(*Apriona germari*) 유충으로부터 사상균을 분리하기 위하여, 이병충 표면을 70% 에탄올로 살균한 후, yeast extract가 포함된 Sabouraud Dextrose Agar 배지(Dextrose 4%, Bacto-peptone 1%, Yeast extract 0.2%, Agar 1.5%, pH 6.5)에 접종하고 사상균의 성장에 적당한 조건(26°C, RH 80% 이상)에서 배양하면서 병원 사상균을 분리하였다.

2. 위상차현미경 관찰

분리된 사상균의 위상차현미경 관찰은 slide glass 배양 방법을 이용하였다(Dhingra & Sinclair 1985). 이러한 slide glass 배양은 petri dish의 바닥에 여과지를 깔고, 바닥과 분리시키기 위하여 가는 나무막대를 놓고, 그 위에 깨끗한 slide glass를 두고, 멸균하였다. 멸균된 slide glass 위에 1 cm²으로 절단한 SDA+Y 배지를 올려놓고, 각각의 사상균을 접종한 뒤, slide glass에 cover slip을 접착시키고, 충분한 습도를 유지하면서 분생자가 형성될 때까지 10~15일간 배양하였다. 그 후 slide glass 위의 배지를 조심스럽게 제거한 후, 분생자(conidiophore)에 부착되어 있는 분생자의 형태를 위상차 현미경을 이용하여 관찰하였다.

3. 주사전자현미경 관찰

분리된 곰팡이의 주사전자현미경 관찰은 King & Brown(1983)의 방법을 변형하여 사용하였다. 분리된 곰팡이를 두께 2 mm의 SDA+Y 배지에서 26±1°C, RH 80% 이상 조건에서 14일간 배양한 후, 5×5 mm 크기로 배지와 함께 분리하여 petri dish 뚜껑(90×15 mm)에 접착시키고, 바닥에는 5 ml의 2% OsO₄ 용액을 넣고, 상온에서 2시간 동안 방치하여 혼중 고정을 실시하였다. 탈수과정은 에탄올 농도를 50%, 70%, 80% 및 90%에서는 각각 20분, 100%에서는 20분씩 3번 반복하여 탈수한 후, 액체 이산화탄소에서 Critical Point Drying하여 건조시킨 뒤, 금으로 coating하여 주사전자현미경(Phillips SEM 515)으로 관찰하였다.

4. Genomic DNA의 분리

사상균의 genomic DNA의 분리는 Pfeifer와 Kha-

chatourians(1993)의 방법을 변형하여 분리하였다. SDA+Y 배지에서 14일간 배양한 각 균주의 분생자를 수거하여, yeast extract가 포함된 Sabouraud Dextrose Broth(2% dextrose, 1% bacto-peptone, 0.2% yeast extract)의 50 ml 삼각 플라스크에 접종한 후 26°C, 120 rpm에서 4일간 진탕배양하고, 다시 배양된 균주의 10 ml를 250 ml 삼각플라스크에 있는 50 ml의 SDB+Y 배지에 접종하여, 위의 조건에서 24시간 배양하였다. 단균사는 3,500 rpm에서 20분간 원심분리하여 수거하고 20 mM Tris-HCl(pH 7.5)에 5 mM β-Mercaptoethanol이 포함된 완충액에 한번 세척하였다. 이렇게 수거된 단균사는 10 ml의 안정화 완충액 [0.6 M ammonium sulfate, 0.2 M potassium phosphate(pH 7.0)]에 재현탁하고, 현탁액에 200 mg의 *Penicillium funiculosum* cellulase(Sigma)를 첨가한 뒤, 37°C에서 4시간 처리하고 단균사를 위의 원심분리 방법으로 수거하였다. 수거된 단균사는 안정화 완충액으로 다시 한번 세척한 다음, 5 mg의 proteinase K(Sigma)가 포함된 0.1 M Tris(pH 9.5), 2% sodium dodecyl sulfate(SDS), 0.15 M ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA) 용액의 5 ml에 재현탁하고, 55°C에서 6시간 또는 현탁액이 마아질 때까지 처리하였다. 그리고 현탁액에 10 mM Tris-HCl(pH 8.0), 1 mM EDTA, 50 mM NaCl(TGS)용액 5 ml를 첨가하고, 동량의 phenol을 혼합한 후 microcentrifuge로 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층을 채취하였다. 여기에 phenol : chloroform/isoamyl-alcohol(24 : 1)이 1 : 1로 혼합된 용액을 같은 양으로 혼합한 후 같은 방법으로 원심분리하여 DNA가 함유된 상층액을 채취하였다. 채취된 상층액은 0.3 M sodium acetate와 0.54 부피의 isopropanol을 첨가한 후, 잘 섞은 다음 microcentrifuge로 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하고, DNA 침전물을 70% 에탄올로 2번 세척하여 진공에서 건조하였다. 건조한 DNA는 250 μl의 3차 증류수로 현탁하여 RNase(Sigma)를 처리한 다음, 1% agarose gel 전기영동으로 확인하고, -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

5. PCR 증폭

Oligonucleotide primer의 염기서열은 5'-ACG GGC GCT C-3'이며, primer는 물에 녹여 100 pM의 농도로 사용하였다. PCR 반응은 DNA Thermal cycler(Perkin-Elmer)를 사용하여 50 μl 부피로 실시하였다. 증폭반응은 아래의 혼합물: 약 30 ng의 template DNA, 3 mM MgCl₂, 0.15 mM dATP, dCTP, dGTP와 dTTP, 1 nM primer, 1 U *Taq* DNA polymerase(Ko-

rea Biotech. Co.), 5 μ l의 10 \times reaction buffer를 사용하여 수행하였으며, 수행조건은 94 $^{\circ}$ C에서 3분동안 반응 후, 94 $^{\circ}$ C/1분, 35 $^{\circ}$ C/1분, 72 $^{\circ}$ C/2.5분을 40번 반복한 후, 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 실시하였다. 반응산물은 1% agarose gel에서 전기영동하고, ethidium bromide로 염색하여 확인하였다. 한편, PCR 산물 비교 분석을 위해, 대조구로서 사용된 곤충병원 사상균 *B. bassiana*와 *B. brongniartii* 균주는 일본 삼림 종합연구소로부터 분양받았다.

결과 및 고찰

1. 사상균의 분리

뽕나무 하늘소 이병충으로 부터 곤충병원 사상균의 분리는 Fig. 1에서 보여지는 것처럼 인공사육 중 사상균에 의해 이병된 뽕나무 하늘소 유충 개체를 70% 에탄올로 표면 살균하고, SDA+Y 배지에서 배양함으로써 분리하였다.

각각의 개체로 부터 분리된 곤충병원 사상균은 SDA+Y 배지에서 콜로니의 형태와 색깔로 1차 sc-

reening하고, 위상차 현미경으로 형태를 관찰하였으며 (Fig. 2), 또 주사전자현미경을 이용하여 분생자와 분생자병의 형태 및 분생자의 부착형태를 관찰하였다 (Fig. 3). 그 결과, 뽕나무 하늘소 이병충 두 개체로부터 분리된 곤충병원 사상균은 *Beauveria*속의 전형적인 특징인 zig-zag rachis 위에 분생자가 형성되어 있는 모습을 보였으며, 분생자 병은 약간 부풀어 있는 모습으로 길게 신장되어 있으며, 분생자는 지름이 2.0~2.5 μ m \times 1.8~2.0 μ m의 크기로 타원형 또는 구형이었다. 이상의 형태적인 특징은 青木裏胤(1989)의 형태적인 특징에 따른 사상균의 분리·동정 방법에서 나타난 *Beauveria*속의 전형적인 형태를 보여주었다.

따라서 본 실험에서 뽕나무 하늘소 이병충 두 개체로부터 분리된 *Beauveria*속의 곤충병원 사상균을 *Beauveria* sp. SFB-1A(Fig. 2의 A와 Fig. 3의 A)와 *Beauveria* sp. SFB-3A(Fig. 2의 B와 Fig. 3의 B)로 명명하였다. 그러나 형태적인 특징으로는 이들의 종명(種名)을 동정하기에는 용이하지 않음을 알 수 있었다.

2. PCR에 의한 *Beauveria* 속의 동정

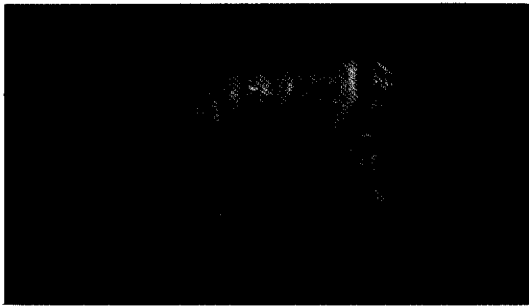


Fig. 1. *Apriona germari* larvae infected with entomopathogenic fungi.



Fig. 2. Phase contrast micrographs of *Beauveria* spp. isolated from *Apriona germari* larvae. A; *Beauveria* sp. SFB-1A, B; *Beauveria* sp. SFB-3A.

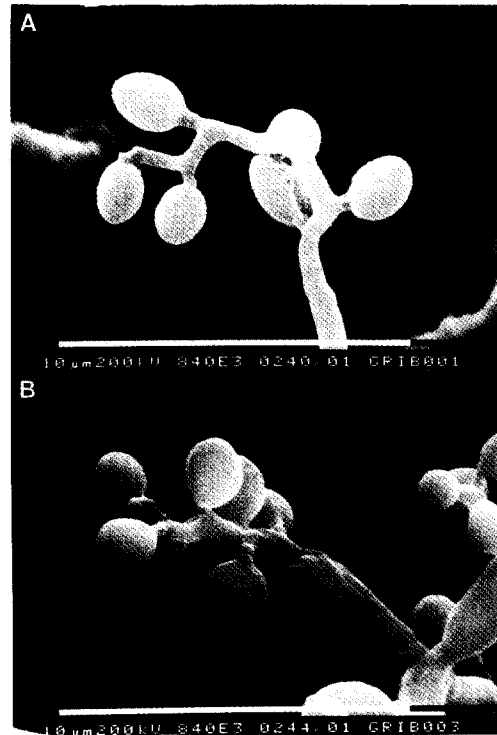


Fig. 3. Scanning electron micrographs of *Beauveria* spp. isolated from *Apriona germari* larvae. A; *Beauveria* sp. SFB-1A, B; *Beauveria* sp. SFB-3A.

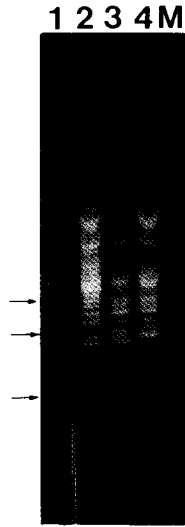


Fig. 4. The patterns of random amplification of polymorphic DNA of *B. bassiana* and *B. brongniartii*. The oligonucleotide (5'-ACG GGC GCT C-3') was used as polymerase chain reaction primer. Lane 1; *B. bassiana*, Lane 2; SFB-1A, Lane 3; SFB-3A, Lane 4; *B. brongniartii*, M; Lambda DNA digested with *Hind*III.

Fig. 2와 3의 위상차 현미경 및 주사전자현미경 관찰에 의한 형태적 특징에 따른 *Beauveria*속의 정확한 동정의 어려움과 문제점을 해결하기 위하여, 곤충병원 사상균의 genomic DNA를 추출하고 PCR을 이용한 RAPD(random amplification of polymorphic DNA) 방법으로 분석하였다(Fig. 4). PCR 산물의 전기영동 결과, 대조구인 *B. bassiana* (Fig. 4의 1) 및 *B. brongniartii* (Fig. 4의 4)와 비교할 때 본 실험에서 뽕나무 하늘소 이병충으로부터 분리된 SFB-1A는 *B. bassiana*의 DNA 패턴과 유사하였으며(Fig. 4의 2), SFB-3A는 *B. brongniartii*의 DNA 패턴과 유사하였다(Fig. 4의 3).

또 본 실험에서 선발한 PCR primer(5'-ACG GGC GCT C-3')로 *B. bassiana*와 *B. brongniartii*의 genomic DNA를 RAPD 방법으로 분석하였을 때, PCR 산물의 DNA 패턴은 대부분 2 Kb 크기 이하의 저분자량으로 서로 유사하게 나타났으나, Fig. 4에서 화살표로 표시된 3개의 밴드에서 비교적 뚜렷하게 차이를 나타내었다. 이러한 결과를 볼 때 SFB-1A는 *B. bassiana*로 SFB-3A는 *B. brongniartii*로 동정되어 딱정벌레목의 해충방제에 적용이 기대된다. 따라서 본 실험에서 선발된 PCR primer는 *B. bassiana*와 *B.*

*brongniartii*의 용이한 동정을 위해 유용한 수단이 될 수 있으며, PCR 결과 구별되는 밴드들은 효과적인 DNA 표식자로 이용될 수 있을 것이다.

적 요

딱정벌레목 천공성 해충인 뽕나무 하늘소(*Apriona germari*)의 효과적인 방제를 위하여, 뽕나무 하늘소 이병충으로부터 곤충병원 사상균을 분리하고, 위상차 현미경 및 주사전자현미경으로 관찰하였으며, PCR (polymerase chain reaction)을 이용하여 동정하였다. 뽕나무 하늘소 이병충으로부터 분리된 곤충병원 사상균은 현미경 관찰 결과 *Beauveria*속의 전형적인 형태적 특성을 나타냈다. 따라서 이들의 용이한 동정을 위하여 PCR primer(5'-ACG GGC GCT C-3')를 이용한 RAPD(random amplification of polymorphic DNA) 방법으로 분석하고, *B. bassiana*와 *B. brongniartii*의 PCR 산물을 전기영동한 결과 DNA 패턴은 서로 유사하였으나, 3개의 밴드에서 비교적 뚜렷한 차이를 나타내어, 이들 종간의 동정을 위한 DNA 표식자로 이용이 가능하였다. 이상의 결과로서 본 실험에서 분리·명명된 SFB-1A는 *B. bassiana*로, SFB-3A는 *B. brongniartii*로 동정되었다.

사 사

본 연구는 과기처 특정연구 개발과제의 연구비 지원에 의해 수행되었음.

인 용 문 헌

- 백운하 (1987) 신고 해충학, 향문사. 서울. pp367-368.
- Bidochka, M. J., M. A. McDonald, R. J. St. Leger and D. W. Roberts (1994) Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *Curr. Genet.* 25: 107-113.
- 青木裏兒 (1989) 昆蟲病原菌の檢索. 全國農村教育協會. 東京. pp102-103.
- Dhingra, O. D. and J. B. Sinclair (1985) Basic plant pathology methods. CRC press, Inc. Boca Raton.
- Kawakami, K. and T. Shimane (1986) Microbial control of the yellow-spotted longicorn beetle, *Psacotha hilaris* Pascoe (Coleoptera; Cerambycidae), by an entomogenous fungus, *Beauveria tenella*. *J. Seric. Sci. Jpn.* 55(3): 227-234.
- King, E. J. and M. F. Brown (1983) A technique for preserving aerial fungal structures for scanning electron microscopy. *Can. J. Microbiol.* 29: 653-658.

岡田齊夫 (1994) 微生物的防除の現状と展望. 植物防疫. 48: 449-454.

Pfeifer, T. A. and G. G. Khachatourians (1993) Isolation of DNA from entomopathogenic fungi grown in liquid cultures. J. Inverteb. Pathol. 61: 113-116.

Shimane, K. and K. Kawakami (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.