

솔잎혹파리의 병원성 진균 *Beauveria bassiana* 및 *Paecilomyces fumosoroseus*의 온도별 병원성과 생장 변화

이인기 · 심희진 · 우수동 · 제연호* · 楊自文 · 강석권
서울대학교 농업생명과학대학 응용생물화학부

Variations in Growth and Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* Pathogenic to the Pine Gall Midge, *Thecodiplosis japonensis*. Lee, In-Kee, Hee-Jin Shim, Soo-Dong Woo, Yeon-Ho Je*, Ziwen Yang, and Seok-Kwon Kang. Division of Applied Biology and Chemistry, College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea – *Thecodiplosis japonensis* is an important insect pest in pine trees and hard to be controlled by chemical pesticides due to its characteristic life cycle. Experiments were conducted to determine the pathogenicity and growth temperature of several entomopathogenic fungi as potential microbial insecticides for *T. japonensis*. *Beauveria bassiana* SFB-SC and *Paecilomyces fumosoroseus* SFP-198 were highly pathogenic against *T. japonensis*. *B. bassiana* SFB-SC had also pathogenicity against a beneficial insect *Bombyx mori*. Growth rate and pathogenicity of *P. fumosoroseus* SFP-198 under 15°C was higher than those of *B. bassiana* SFB-SC. These results indicated that *P. fumosoroseus* SFP-198 is a potential microbial control candidate for control of *T. japonensis*.

Key words : *Thecodiplosis japonensis*, *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Verticillium lecanii*

솔잎혹파리(*Thecodiplosis japonensis*, DIPTERA: CECIDOMYIIDAE)는 소나무가 주종인 우리 나라 산림에 막대한 피해를 주는 해충으로서 성충은 6월경 소나무의 어린 잎에 산란하며 부화된 유충은 솔잎의 기부로 이동하여 충영을 형성한 뒤 수액을 흡즙하여 소나무의 생육을 저하시킨다. 유충은 충영내에서 3령까지 성장을 하고 10-12월 사이에 충영을 탈출하여 지표 1-2 cm의 토중이나 지표물 속에서 월동한다. 솔잎혹파리를 방제하기 위하여 화학살충제를 지표면에 살포하거나 주간 주사하는 화학적 방제방법과, 생물적 방제 중 살어먹좀벌 등의 천적을 이용하는 방법이 시도되어왔으나 경제적·환경적 문제 또는 솔잎혹파리 유충이 솔잎 기부로 이동하는 기간이 3~4일로 짧은 생태적인 문제 등으로 인해 큰 실효를 거두지 못 하였으며, 최근에는 본 해충의 생태적인 면을 고려하여 병원성 곰팡이를 이용하는 미생물적 방제방법이 주목받고 있다[14].

곰팡이에 의한 병은 주로 곤충 표피에서 포자가 발아하여 침입함으로써 시작되고[3], 이것은 곤충 표피 성분을 분해하는 효소의 분비와 침입기구의 형성 등 화학적이고 물리적인 작용과 관계가 있다[9]. 침입균사는 숙주의 조직으로 들어가서 혈관에서 증식한 후 사충의 외부로 균사를 자라게 하여 포자를 형성한다. 곤충은 곰팡이의 성장, 영양분의 고갈, 독물중독에 의한 복합적인 작용에 의해 죽게 되며 이

러한 곰팡이에 의한 병현상을 "mycosis"라 한다.

곰팡이 미생물 살충제를 실제 적용할 시에는 곰팡이의 활력과 안정에 적합한 온도인가를 고려해야 하므로[2, 12] 솔잎혹파리 유충이 낙하하는 시기인 10~11월경의 지표면 온도를 감안하여 저온에서도 생장이 가능한 곤충병원성 곰팡이를 선발하여 살충제로 사용하여야 할 것이다. 앞서 솔잎혹파리 방제를 위한 곰팡이를 분리하여 병원성을 조사하고, 이 중 *Beauveria bassiana*의 대량 배양에 관한 연구가 이미 보고되었다[11]. 따라서 본 연구에서는 기존에 보고되었던 *B. bassiana* 균주보다 저온에서의 병원성이 양호한 *Paecilomyces fumosoroseus* 균주를 분리하고 이들의 성장률과 병원성을 비교하였다.

재료 및 방법

곤충 병원성 곰팡이

실험에 이용한 곰팡이 중 *B. bassiana* SFB-SC 균주와 *P. fumosoroseus* SFP-198(KCTC 0499BP) 균주는 서울대학교 곤충병리·유전공학 연구실에서 분리한 균주를 사용하였다. 그 외 *Beauveria brongniartii* F-77과 *Verticillium lecanii* F-903은 Dr. SHIMAZU(Forestry and Forest Products Research Institute, Japan)로부터 분양받았다.

모든 곰팡이 균주는 Sabouraud dextrose agar+yeast extract(SDAY)배지에서 25°C 암조건으로 배양하였고, 4주마다 계대배양 하였다. 각 균주의 병원성 유지를 위해 정기

*Corresponding author
Tel. 82-331-290-2492, Fax. 82-331-296-0926
E-mail: kskipl@plaza.snu.ac.kr

적으로 솔잎혹파리의 사충(死虫)으로부터 재분리하였다.

생물 검정

솔잎혹파리 3령 유충은 피해 지역의 솔가지로부터 분리하였다. 즉 투명한 비닐 주머니에 피해엽을 넣고 솔잎이 충분히 젖도록 증류수를 뿌려준 다음 25°C 배양기에 24시간 방치하여 솔잎혹파리 유충이 충영 밖으로 탈출하도록 하였다. 실험에 사용한 곰팡이는 SDAY 배지에서 14일간 배양한 후 포자를 수거하여 0.02% Tween 80 용액에 현탁하였다. 포자의 농도는 haemocytometer를 사용하여 측정하였고, 1×10⁸ 포자/ml의 농도가 되도록 하였다. 솔잎혹파리 3령 유충 30마리를 포자현탁액에 10초간 침지한 후에 기습된 여과지를 간 petri-dish에 옮겨놓고 25°C 배양기에 두었다. *B. bassiana* SFB-SC와 *P. fumosoroseus* SFP-198의 온도별 생물검정을 위해서 10°C, 15°C 및 20°C에 두고 처리 21일 후에 병원성을 조사하였다. 병원성(%)은 솔잎혹파리 사충을 수거하여 현미경으로 관찰했을 때 충체 표피를 뚫고 균사가 생성된 것을 곰팡이에 의해 죽은 것으로 간주하고 그 수를 셈하여 백분율로 나타내었다. 누에 4령 유충에 대한 병원성 검정은 솔잎혹파리에 대한 것과 마찬가지로 1×10⁸ 포자/ml 농도의 현탁액에 누에를 2초간 침지한 후에 petri-dish에 옮긴 후 사료와 함께 25°C에 방치하고, 처리 15일 이후에 충체 외부로 곰팡이의 균사가 생성된 것을 사충으로 간주하여 병원성 여부를 조사하였다. 모든 실험은 각각 5회 반복으로 수행하였다.

온도별 곰팡이의 성장률 측정

B. bassiana SFB-SC와 *P. fumosoroseus* SFP-198의 포자현탁액(10⁵ 포자/ml) 10 μl를 SDAY 배지가 깔린 90 mm petri dish 중앙에 접종한 후 10°C, 15°C, 20°C 및 25°C, 암조건으로 항온기에 배양하였다. 육안으로 곰팡이 균총을 관찰할 수 있을 만큼 성장하면 매일 균총의 지름을 25일간 측정하여 곰팡이의 일일 평균 성장률을 산출하였으며 25일 후 각 곰팡이의 최종 성장률 또한 측정하였다. 각각의 실험은 5회 반복으로 행하였다.

Table 1. Percentage pathogenicity of entomopathogenic fungi on the larvae of *T. japonensis*(3rd) and the larvae of *B. mori*(4th)

Strain	Pathogenicity (%)	
	3rd instar <i>T. japonensis</i> ^{a)}	4th instar <i>B. mori</i> ^{b)}
<i>Beauveria brongniartii</i> F-77	7.9 ± 4.1	-
<i>Beauveria bassiana</i> SFB-SC	52.0 ± 18.9	+
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i> SFP-198	50.9 ± 7.0	-
<i>Verticillium lecanii</i> F-903	34.0 ± 16.4	-
Control ^{c)}	4.3 ± 2.8	-

^{a)}The third instar larvae of *T. japonensis* were inoculated by dipping in a conidia suspension(1 × 10⁸ conidia/ml) and the pathogenicity was determined 21 days after treatment.

^{b)}The fourth instar larvae of *B. mori* were inoculated by dipping in a conidia suspension(1 × 10⁸ conidia/ml) and dead insects were checked 15 days after treatment. (-), not pathogenic; (+), pathogenic.

^{c)}Tween-80 solution(0.02%) were used as a control treatment.

결 과

솔잎혹파리와 누에에 대한 병원성

Table 1에서와 같이 모든 실험균이 솔잎혹파리에 대해서 병원성을 보였다. 특히 *B. bassiana* SFB-SC와 *P. fumosoroseus* SFP-198이 비교적 높은 병원성(각각 52.0, 50.9%)을 갖는 것으로 나타나 이 두 균주를 선발하여 온도별 병원성과 성장률을 조사하였다. *B. bassiana* SFB-SC는 누에 4령 유충에도 역시 높은 병원성을 보였으나 *P. fumosoroseus* SFP-198은 솔잎혹파리에는 높은 병원성을 갖는 반면에 누에 유충에 대해서는 병원성을 보이지 않았다.

온도에 따른 곰팡이의 성장

B. bassiana SFB-SC와 *P. fumosoroseus* SFP-198 균총의 온도별 일일 성장률을 비교하기 위하여 접종 후 25일 동안 조사하였다(Fig. 1). SFB-SC 균주의 균사 성장률은 0.67±0.06 mm/일부터 1.25±0.26 mm/일로 온도별로 차이는 있었지만, 10°C, 15°C, 20°C와 25°C에서 성장이 가능

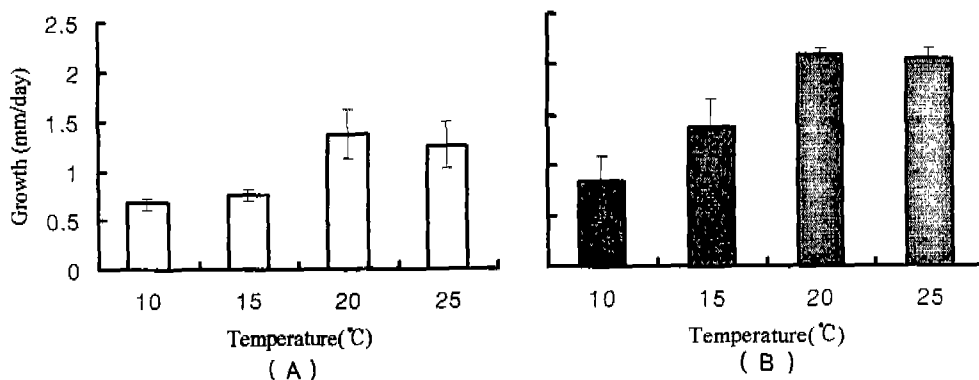


Fig. 1. Radial growth rate of *Beauveria bassiana* SFB-SC (A) and *Paecilomyces fumosoroseus* SFP-198 (B) at various temperatures.

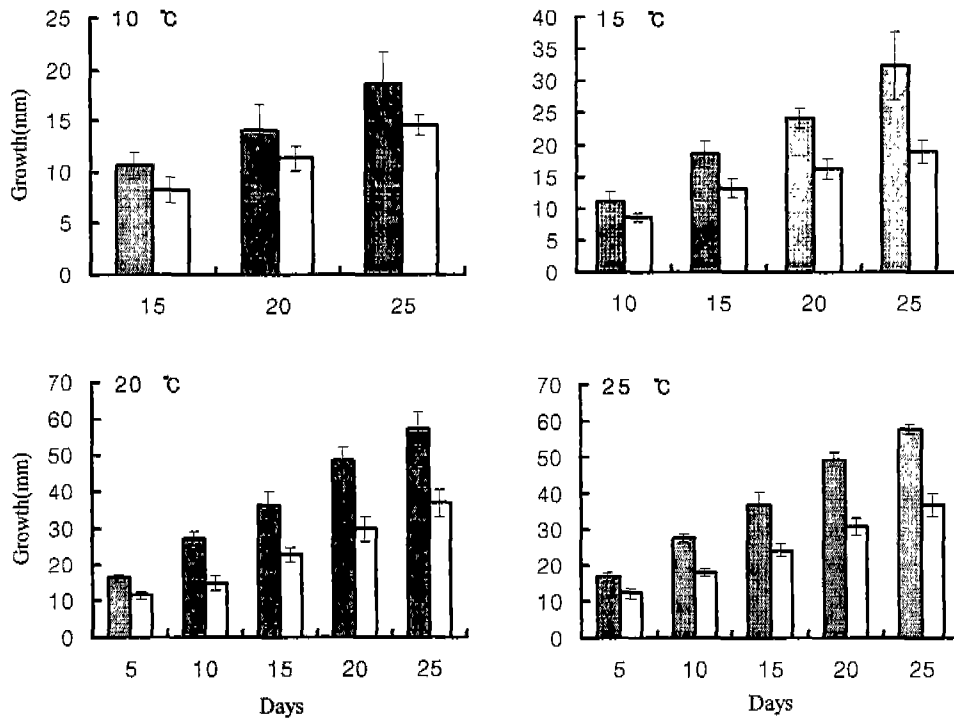


Fig. 2. Comparison of the vegetative growth rate of *Beauveria bassiana* SFB-SC (□) and *Paecilomyces fumosoroseus* SFP-198 (■) at various temperatures.

하였다(Fig. 1-A). SFP-198도 네 가지 온도에서 모두 성장이 가능하였고 균사 성장은 0.84 ± 0.27 mm/일부터 2.09 ± 0.05 mm/일이었다(Fig. 1-B). 온도별로 각 곰팡이의 성장률은 매일 일정하였고, 접종 25일 후 모든 온도 조건에서 *P. fumosoroseus* SFP-198이 *B. bassiana* SFB-SC보다 최종 성장률이 높았으며 처리 온도가 높을수록 각 균주의 성장률 차이는 컸다(Fig. 2).

온도별 솔잎혹파리에 대한 병원성

B. bassiana SFB-SC와 *P. fumosoroseus* SFP-198의 솔잎혹파리 3령 유충에 대한 온도별 병원성을 조사하였다(Table 2). 25°C에서 *B. bassiana* SFB-SC는 *P. fumoso-*

roseus SFP-198보다 높은 병원성을 보였으나, 다른 온도에서는 *P. fumosoroseus* SFP-198이 *B. bassiana* SFB-SC보다 높은 병원성을 보였다. *B. bassiana* SFB-SC는 25°C보다 20°C에서 절반으로 병원성이 감소되었으며 10°C에서는 매우 낮은 반면에, *P. fumosoroseus* SFP-198의 온도별 병원성의 차이는 급격하지 않았고, 10°C, 15°C에서는 *B. bassiana* SFB-SC보다 2배 이상의 병원성을 보였다.

고 찰

곰팡이의 병원성은 그들의 발아와 관계가 있고 이것은 온도 조건에 상당한 영향을 받는다[7, 8, 10]. 곤충 병원성 곰팡이를 이용하여 솔잎혹파리를 방제하는 시기는 솔잎혹파리 3령 유충이 지상에 낙하해 월동하는 시기이고, 그 시기의 평균 기온은 10~15°C정도이다. 이와 같은 생태적인 환경을 고려할 때, 솔잎혹파리 방제를 위한 곤충 병원성 곰팡이는 방제 시기에서 성장과 병원성이 양호해야 한다. 본 실험에서, *B. bassiana* SFB-SC와 *P. fumosoroseus* SFP-198의 최적 성장 온도는 20°C와 25°C이며, 이는 FARGUES 등과 VIDAL 등이 보고한 것과 비슷한 결과이다[4, 15]. 모든 온도별 실험구에서 *P. fumosoroseus*의 성장률은 *B. bassiana*보다 월등하였고, 솔잎혹파리 3령 유충에 대한 병원성은 10°C와 15°C에서 *P. fumosoroseus*가 *B. bassiana*보다 두 배 이상이었다. 이러한 결과로부터 Ferron과 Mietkiewski

Table 2. Percentage pathogenicity^{a)} of the pine gall midge at various temperatures after treatment with *Beauveria bassiana* SFB-SC and *Paecilomyces fumosoroseus* SFP-198

Fungi	Temperature (°C)			
	10	15	20	25
<i>B. bassiana</i>	5.3 ± 2.4	18.3 ± 16.4	21.1 ± 1.9	52.0 ± 18.9
<i>P. fumosoroseus</i>	12.6 ± 4.3	35.7 ± 6.3	56.7 ± 6.6	50.9 ± 7.0
Control ^{b)}	4.4 ± 5.0	3.6 ± 3.7	3.9 ± 1.0	4.4 ± 2.8

^{a)}The third instar larvae of *T. japonensis* were inoculated by dipping in a conidia suspension(1×10^8 conidia/ml) and the pathogenicity was determined 21 days after treatment.

^{b)}Tween-80 solution was used as control treatment.

등에 의해 보고되었던 온도에 따른 곰팡이 성장과 병원성의 관계를 알 수 있다[5, 13].

병원성 곰팡이를 미생물 살충제의 원료로 사용되기 위해서는 유용 곤충에 해가 적은 것이 바람직하다. Zimmermann에 의하면 *M. anisopliae*는 새, 어류, 쥐, 물뿔, 또는 토끼에 독성이나 병원성이 없다고 하였다[16]. 그러나 Genthner와 Middaugh는 inland silverside fish(*Menidia beryllina*)의 배 발생 단계에 *M. anisopliae*가 좋지 않은 영향을 끼치는 것으로 보고하였다[6]. Alves 등은 아프리카 꿀벌, *Apis mellifera* L.(Hym., Apidae)에 영향을 주는 곤충 병원균을 보고한 바 있으며[1] 이런 점에서 누에에 영향을 없는 *P. fumosoroseus* SFP-198은 상당히 유용한 균주라 할 수 있다.

본 연구에서는 솔잎혹파리에 대해서 높은 병원성을 보이는 *B. bassiana* SFB-SC와 *P. fumosoroseus* SFP-198 두 균주를 선발하였다. 특히 *P. fumosoroseus* SFP-198은 유익충인 *B. mori*에 대해 무독성이며 저온 조건에서 병원성과 성장이 양호하다. 이러한 결과는 *P. fumosoroseus* SFP-198이 솔잎혹파리 방제를 위한 미생물 살충제로서 유용한 균주임을 보여주는 것이다.

요 약

솔잎혹파리(*Thecodiplosis japonensis*)는 한국의 산림자원에 막대한 피해를 끼치는 해충으로서 그들의 생활사적 특징으로 인하여 화학살충제를 이용한 방제가 어려운 실정이다. 본 연구에서는 솔잎혹파리에 병원성을 갖는 몇 가지 균주를 선발하고 온도별 병원성과 성장률을 조사하였다. 생물검정을 통해 솔잎혹파리에 비교적 높은 병원성을 보이는 두 개의 균주, *Beauveria bassiana* SFB-SC와 *Paecilomyces fumosoroseus* SFP-198을 선발하였다. *B. bassiana* SFB-SC는 산업곤충인 누에에 대해 병원성을 갖는 것으로 나타났고, 10°C와 15°C에서 *Paecilomyces fumosoroseus* SFP-198의 성장률과 솔잎혹파리에 대한 병원성은 *Beauveria bassiana* SFB-SC보다 높은 것으로 조사되었다. 이러한 결과로 *Paecilomyces fumosoroseus* SFP-198은 솔잎혹파리 방제를 위한 유용한 균주로 기대되어진다.

감사의 글

본 연구는 과기처 특정연구 개발과제와 서울대학교 농업생물신소재 연구센터의 연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

REFERENCES

- Alves, S. B., L. C. Marchini, R. M. Pereira, and L. L. Baumgratz. 1996. Effects of some insect pathogen on the africanized honey bee, *Apis mellifera* L. (Hym., Apidae). *J. Appl. Ent.* **120**: 559-564.
- Benz, G. 1987. Environment, pp. 177-203. *Epizootiology of Insect Diseases*. J. R. Fuxa and Y. Tanada (eds.). Wiley, New York.
- Brey, P. T., J. P. Latge, and M. C. Prevost. 1986. Integumental penetration of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, by *Conidiobolus obscurus*. *J. Invertebr. Pathol.* **48**: 34-41.
- Fargues, J. M., S. Goettel, N. Smits, A. Ouedraogo, and M. Rougier. 1997. Effect of temperature on vegetative growth of *Beauveria bassiana* isolates from different origins. *Mycologia* **89**: 383-392.
- Ferron, P. 1978. Biological control of insect pests by entomopathogenic fungi. *Annu. Rev. Entomol.* **23**: 409-442.
- Genthner, F. J. and D. P. Middaugh. 1995. Nontarget testing on an insect control fungus: Effects of *Metarhizium anisopliae* on developing embryos of the inland silverside fish *Menidia beryllina*. *Dis. Aquat. Org.* **22**: 163-171.
- Hajek, A. E., R. I. Carruthers, and R. Soper. 1990. Temperature and moisture relations of sporulation and germination by *Entomophaga maimaiga* (Zygomycete: Entomophthoraceae), a fungal pathogen of *Lymantria dispar* (lepidoptera: Lymantriidae). *Environ. Entomol.* **19**: 85-90.
- Hall, R. A. 1981. The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphids and scales, pp. 483-498. In H. D. Berges (ed.), *Microbial Control of Pests Insects and Plant Diseases*. Academic Press, New York.
- Hassan, A. E. M. and A. K. Charnley. 1989. Ultrastructural study of the penetration by *Metarhizium anisopliae* through Dimilin-affected cuticle of *Manduca sexta*. *J. Invertebr. Pathol.* **54**: 117-124.
- Ignoffo, C. M., C. Garcia, and D. L. Hostetter. 1976. Effects of temperature on growth and sporulation of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. *Environ. Entomol.* **5**: 935-936.
- Lee, I. K., J. B. Seo, B. R. Jin, S. C. Shin, H. Y. Park, B. Y. Lee, C. K. Lee, S. D. Woo, and S. K. Kang. 1996. Growth rate of entomopathogenic fungi in mass culture system. *Korean J. Seric. Sci.* **32**: 150-153.
- McCoy, C. W., R. A. Samson, and D. G. Boucias. 1988. Entomopathogenic fungi, pp. 151-236. In C. M. Ignoffo (ed.), *Handbook of Natural Pesticide*. CRC Press, Boca Raton.
- Mietkiewski, R., C. Tzaczuk, M. Zurek, and L. P. S. van der Geest. 1994. Temperature requirements of four entomopathogenic fungi. *Acta Mycol.* **29**: 109-120.
- Seo, J. B., B. R. Jin, S. C. Shin, H. Y. Park, B. Y. Lee, C. K. Lee, and S. K. Kang. 1995. Isolation of entomopathogenic fungi for infection to the pine gall midges, *Thecodiplosis japonensis* from the forest soil in Korea. *Korean J. Appl. Entomol.* **34**: 368-372.
- Vidal, C., J. Fargues, and L. A. Lacey. 1997. Intraspecific variability of *Paecilomyces fumosoroseus*; Effect of temperature on vegetative growth. *J. Invertebr. Pathol.* **70**: 18-26.
- Zimmermann, G. 1993. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. *Pestic. Sci.* **37**: 375-379.

(Received April 7, 1999)